

毛霉脂肪酶的研究

肖春玲^{1,2} 宋欣¹ 曲音波¹

(¹山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

(²江西省吉安师范高等专科学校生物系 吉安 343009)

摘要 从土样中分离筛选到一株脂肪酶菌株——毛霉(*Mucor* sp.)M₂,其优化后的培养基组成(%):黄豆粉4.0、蔗糖0.5、橄榄油1.0、硫酸铵0.1、磷酸氢二钾0.2、硫酸镁0.01、pH自然。产酶最适条件:初始pH6.5、培养温度28℃、培养周期96h。该酶最适作用温度50℃、最适pH8.0、pH稳定范围为7.0~10.0, Fe²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、K⁺对酶有激活作用。

关键词 毛霉, 产酶条件, 酶学性质

分类号 Q939.5

脂肪酶在60年代已得到实际应用,但直到80年代后期,由于近代生物科学技术的发展,特别是有机相中酶催化领域的研究使脂肪酶的潜在性能不断得到开发。其应用已从食品、皮革、轻纺、香料、化妆品等领域扩展到脂肪酸的生产、油脂改良、洗涤剂、有机合成及药物制备。目前国内脂肪酶制剂的种类非常有限,而用微

生物来生产脂肪酶具有来源广、种类多、周期短、便于工业化生产等特点。所以,寻找新特性,高活力的脂肪酶菌种,可为脂肪酶新用途的开发提供基础。

1997-07-04收稿

1 材料和方法

1.1 分离土样

取自济南油脂厂、济南乳品厂、济南造纸厂及食堂污物。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基 (%): 酵母浸出汁 0.2, 橄榄油 0.5, K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, NaCl 0.05, pH 自然。

1.2.2 平板初筛培养基 (%): $(NH_4)_2SO_4$ 0.2, K_2HP_4 0.1, KCl 0.05, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, 橄榄油 1.0, 聚乙烯醇 0.1, 琼脂 2.0, pH 自然。

1.2.3 摇瓶复筛培养基 (%): 黄豆粉 4.0, 可溶性淀粉 1.0, 橄榄油 1.0, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1, K_2HPO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, pH 自然。

1.3 脂肪酶活力测定

采用乳化系统^[1]: 化学纯橄榄油与聚乙烯醇以 1:3 比例混合后, 高速匀浆, 使成乳白色均匀稳定的乳化液。缓冲系统采用 0.05mol/L pH8.0 的磷酸缓冲液。在测定条件下, 每分钟分解脂肪释放出 1 微克分子游离脂肪酸所需的酶量定义为 1 个脂肪酶活力单位(u)。

1.4 脂肪酶产生菌的筛选

1.4.1 富集培养: 以土样 1g 于 9ml 无菌水三角瓶内, 振摇得悬液, 接种一环于富集试管, 50℃ 恒温水浴振荡培养 4d 后, 产生混浊的试管涂布于初筛平板。

1.4.2 初筛方法: 将混浊的富集培养液涂布于初筛平板, 经培养后, 观察菌落周围是否有透明圈, 然后把形成透明圈的菌落进行分纯。

1.4.3 复筛方法: 把经初筛后分纯的菌株接种于复筛培养基中, 振摇培养, 定时测其脂肪酶活性。

2 结果及分析

2.1 脂肪酶产生菌的筛选

对不同来源的土样富集培养, 初筛后, 分离到 19 株脂肪酶产生菌, 经摇瓶复筛, 得到一株活力最高的 M_2 菌株。经过形态观察, 初步认定 M_2 是一株毛霉 (*Mucor* sp.)。

2.2 毛霉 M_2 的产酶条件

2.2.1 碳源对产酶的影响: 以摇瓶复筛培养基为基础, 由不同浓度的各种碳源代替其中的可溶性淀粉, 28℃, 培养 96h, 测其酶活性, 结果见表 1。从表 1 可以看出: 以 0.5% 的蔗糖为碳源时效果最好, 酶活可达 18.5u/ml。碳源的浓度对产酶影响很大, 多数易代谢碳源(葡萄糖、乳糖、果糖、蔗糖等)都表现一定的对酶合成的阻遏作用。对此调控作用有待更深入的研究。

表1 碳源对产酶的影响

碳源	浓度 (%)	酶活 (u/ml)
可溶性淀粉	0.5	11
	1	14
玉米粉	0.5	10
	1	6
蔗 糖	0.5	18.5
	1	12
甘露醇	0.5	2
	1	4
乳 糖	0.5	2.5
	1	1
木 糖	0.5	5
	1	8
葡萄糖	0.5	7.5
	1	5.5
果 糖	0.5	6
	1	3.5

表2 氮源对产酶的影响

氮源	浓度 (%)	酶活 (u/ml)
黄豆粉	4	9
酵母膏	4	4
蛋白胨	4	5
硫酸铁铵	4	0
尿素	4	2.5
$NaNO_3$	4	2.5
$(NH_4)_2SO_4$	4	2.5
NH_4Cl	4	4
黄豆粉	2	
$(NH_4)_2SO_4$	0.1	15.5
黄豆粉	2	
$NaNO_3$	0.1	7.5

2.2.2 氮源对产酶的影响:以摇瓶复筛培养基为基础,加入各种不同氮源。从表2可以看出:以2%的黄豆粉和0.1%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 复合效果最好。

2.2.3 培养温度及培养时间对产酶的影响:在以上实验基础上,改良摇瓶发酵培养基,在26℃、28℃和30℃三个不同温度中分别培养 M_2 ,测得在28℃培养时较适于产酶。然后在28℃,分别培养不同时间,定时测其酶活,培养96h时,酶活可达18.5u/ml。

2.2.4 初始pH对产酶的影响:用HCl和NaOH调节摇瓶发酵培养基的初始pH在5.0~8.0范围,28℃,培养96h,测其酶活力,初始pH在6.5时,酶活最高。

2.2.5 通气量对产酶的影响:采用300ml三角瓶,装入不同量的摇瓶发酵培养基,起始pH6.5,28℃,培养96h后测酶活,结果表明,装液量在50~75ml之间产酶水平最高。

2.2.6 吐温和咪唑啉对产酶的影响:有报道吐温可以促进产酶^[2],咪唑啉抑制产酶^[3]。为此,我们在培养基中分别添加了0.1%的吐温80和0.1%的咪唑啉,研究了它们对 M_2 产酶的影响。结果发现吐温80抑制产酶,而咪唑啉则促进产酶。

2.3 M_2 脂肪酶的性质

2.3.1 酶作用最适温度:在40~60℃温度范围内分别测定同一酶液的脂肪酶活性。该酶的最适反应温度为50℃。

2.3.2 酶作用最适pH:在pH5.0~10.0范围内,50℃,测定该酶在不同的pH缓冲体系中的活性。酶的最适pH为8.0。

2.3.3 酶的热稳定性:取一定酶液分别置于50℃、60℃及70℃的恒温水浴中处理80min,每隔10min取样测定残存酶活力(用未处理的酶液作对照),结果见图1,50℃保温80min酶活性损失很少。

2.3.4 酶的pH稳定性:酶液在pH5.0~10.0的各种缓冲溶液中,4℃保持24h,然后调回pH至8.0。测定残留酶活,结果见图2,该酶在pH7.0~10.0的范围内较稳定。

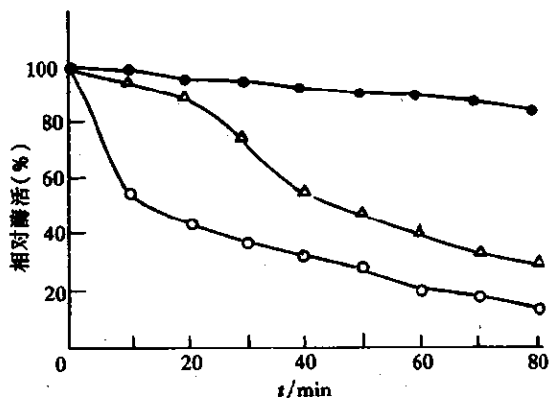


图1 酶的热稳定性。

●—50℃; △—60℃; ○—70℃

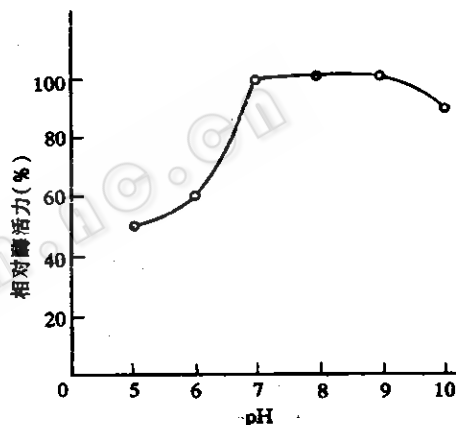


图2 酶的pH稳定性

2.3.5 金属离子对酶活力的影响:用0.05mol/L pH8.0的Tris-HCl缓冲液代替反应系统中的0.05mol/L pH8.0的磷酸缓冲液,分别加入各

表3 金属离子对酶活性的影响

金属离子(10^{-3} mol/L)	相对酶活(%)
None	100
Na^+	85.8
K^+	123.8
Ca^{2+}	142.9
Mg^{2+}	142.9
Fe^{2+}	152.4
Mn^{2+}	57.1
Cu^{2+}	85.7
Zn^{2+}	9.5

种金属离子 ($1 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$) 至反应体系中, 混合保温 15min 后, 测其酶活力, 结果 (表 3) 表明, Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 对酶有激活作用, Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 表现为抑制, 其中 Zn^{2+} 的抑制作用最明显。

以前的有关耐热碱性脂肪酶的报道主要局限于细菌, 见于 Yongxiang Wang^[4]、Yoshitaka^[5]、Shuen-Fuh Lin^[6]、施巧琴等^[7]的报道, 而对于真菌, 国内外尚未有文章发表。我们筛选的这株毛霉 M_2 , 最适作用温度较高 (50°C), 最适作用 pH 在碱性一侧, 并且在 pH7.0~10.0 的范围内, 酶相当稳定, 有关酶的分离纯化、动力学性质、酶组分分析等方面的研究工作正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] 李建武, 张高芳, 李令媛. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994, 311~312.
- [2] Handelesman T. J Gen Appl Microbiol, 1994, 40(5): 435~443.
- [3] 吴松刚, 谢新东, 黄建忠等. 微生物学报, 1997, 37(1): 32~39.
- [4] Yongxing Wang, Kailash C, Srivastava. J Fern Bioeng, 1995, 79(5): 433~438.
- [5] Yoshitake K, Haruo M, Shinjiro I. Agric biol chem, 1982, 46(7): 1743~1750.
- [6] Lin Shuenfuh, Chiou Chienming. J Appl. Environ Microbiol, 1996, 62(3): 1093~1095.
- [7] 施巧琴, 陈若莹, 许晴怡等. 微生物学报, 1992, 32(6): 425~431.

STUDIES ON LIPASE FROM A *MUCOR* SP.

Xiao Chunling^{1,2} Song Xin¹ Qu Yinbo¹

(¹State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

(²Department of Biology, Jian Teacher's College, Jian 343009)

Abstract A Fungal strain (*Mucor* sp) M_2 producing lipase was screened from oilysoil. The optimized medium consists of (%): soybean flour 4.0, sucrose 0.5, olive oil 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, K_2HPO_4 0.2, MgSO_4 0.01, pH6.5. The optimal conditions for producing lipase: pH6.5, 28°C , 96h. This lipase has an optimum temperature of 50°C , an optimum pH of 8.0. It is stable in the pH range of 7.0~10.0. Metal ions, such as Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} can activate this enzyme.

Key words *Mucor* sp., Condition for producing lipase, Properties of lipase