

脂肪酶产生菌产酶条件的研究

曾璐¹, 林亲录¹, 王伟²

(1. 湖南农业大学食品科技与工程学院, 湖南 长沙 410128)

(2. 湖南谊信创汇农业实业有限公司质检部, 湖南 益阳 413000)

摘要: 对脂肪酶产生菌进行了筛选, 并对优势菌株杆菌的产酶条件进行研究。研究包括培养基组成(碳源、氮源、无机盐)、初始 pH 值等影响因素。通过正交试验, 获得了较为优化的脂肪酶产酶条件, 获得的最大酶活为 68.58 U/mL。

关键词: 脂肪酶产生菌; 产酶条件; 酶活

中图分类号: TQ925⁺.6; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)07-0015-05

Researched on Conditions of the Enzyme Production by a Lipase-producing Strain

ZENG Lu¹, LIN Qin-lu¹, WANG Wei²

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

(2. Quality inspection department of Hunan Yixin Chuanghui agricultural industry Co., Ltd, Yiyang 413000, China)

Abstract: The lipase-producing strains were screened and the enzyme producing conditions by the selected bacillus which had high lipase producing ability were studied. The key factors, including culture medium composition and initial pH value, were optimized by the orthogonal experiment and under the optimized conditions, the maximal lipase activity reached 68.58 U/mL.

Key words: lipase-producing strain; enzyme producing condition; lipase activity

脂肪酶作为生物催化剂可催化由不同底物出发的水解和合成反应, 这些反应通常具有高底物专一性, 区域性或对映选择性, 使脂肪酶成为有机合成中重要的生物催化剂^[1]。

近 10 年来, 微生物脂肪酶在各种不同行业也得到了广泛的应用, 主要是利用脂肪酶的水解和合成反应。首先, 脂肪酶水解反应是指脂肪酶催化脂肪或脂水解为其组成脂肪酸和甘油或醇, 以此应用脂肪酶的方面及行业包括^[2]: 脂肪水解、脂肪酸提纯、三甘酯结构的测定、皮革生产、纸浆和造纸、加酶洗涤剂、食品成分、医学应用、底纸脱墨等; 其次, 应用脂肪酶合成作用的包括低中相对分子质量脂、聚脂、手性化合物的合成、油脂改性、药物和化妆品等。

本文主要对脂肪酶产生菌进行筛选, 并对其优势菌株产酶条件进行优化, 为脂肪酶的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

收稿日期: 2007-04-18

作者简介: 曾璐 (1983-), 女, 硕士研究生

杆菌、球菌、霉菌、酵母菌均为实验室自行筛选获得, 仅做镜下形态分类。

1.2 培养基筛选优势产生菌用培养基

三羧酸甘油酯 2%; NH₄NO₃ 0.3%; CaCl₂ 0.02%; KH₂PO₄ 0.1%; MgSO₄ · 7H₂O 0.05%; NaCl 0.05%。

1.3 培养条件

50 mL 培养基装于 250 mL 三角瓶中, 恒温式摇床 200 r/min, 培养 60 h。

1.4 脂肪酶活力的测定方法

底物采用乳化系统: 三羧酸甘油酯于 2% 聚乙烯醇溶液以 1:3 比例混合后, 高速均浆, 成为乳白色均匀稳定的乳化液; 缓冲液采用 0.05 mol/L 的甘氨酸缓冲液。随着脂肪酶的作用, 对底物进行分解, 用碱滴定游离脂肪酸, 求得脂肪酶的活力; 在测定条件下, 以每分钟分解底物释放出 1 μmol 游离脂肪酸所需的酶量定义为一个脂肪酶活力单位 (U)。

具体做法如下^[3]: 在三角瓶中, 准确加入以下反应体系: 底物 1 mL、甘氨酸缓冲液 5 mL、蒸馏水 3 mL、酶液 1 mL, 充分混匀, 40 °C 水浴 15 min。准确加入无水乙醇 10 mL, 终止反应, 加入酚酞试剂 5 滴, 用 0.05 mol/L NaOH 标准液滴定。

酶活力计算公式: 脂肪酶活力(单位/mL)=($V_1 - V_2$)
 $\times 0.05 \times 1000 / 15$

式中: V_1 - 试料溶液滴定值; V_2 - 对照滴定值; 0.05 - 标准 NaOH 摩尔量 (mol/L)

1.5 试验筛选方法

1.5.1 优势脂肪酶产生菌的筛选

以实验室菌株的相关参数为依据, 通过测定各自在最适反应条件下的产酶率及生长情况等指标, 以确定较合适的研究对象。

方法如下: 将筛选菌种用培养基, 配制后灭菌冷却, 在超净工作台上接入各菌株一环, 在各自的最适培养条件下, 用 200 r/min 的恒温式摇床培养, 60 h 后取样测定酶活并观察菌体生长情况。

表 1 所用各脂肪酶产生菌的相关参数

种类	镜下形态	最适产酶 pH	最适产酶温度/°C
杆菌	细小的杆状	5~8	35~60
球菌	球状, 聚集成串	4~8	35~50
霉菌	丝状交织	3.6~7.5	30~50
酵母菌	椭圆球体	6~7	40~50

1.5.2 试验所用培养基的筛选

设定各培养基 (见表 2), 配制各培养基, 加塞灭菌, 在无菌操作台上接入优势菌各一环, 恒温式摇床 200 r/min, 同步培养 60 h, 取样测定酶活,

表 2 培养基及其组成

培养基种类	组成/(g/L)
组合培养基	葡萄糖 20.0; KH_2PO_4 2.0; NaCl 0.1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2; 尿素 0.5; 酵母膏 0.5
牛肉膏蛋白胨培养基	牛肉膏 3.0; 蛋白胨 10.0 NaCl 5.0
YPD 液体培养基	酵母膏 10.0; 蛋白胨 20.0; 葡萄糖 20.0 葡萄糖 10.0; 橄榄油 20.0; 尿素 2.0;
假丝酵母培养基	K_2HPO_4 2.1; KH_2PO_4 6.0; MgSO_4 0.1; 肌醇 4×10^{-6}
基本培养基	KH_2PO_4 4.5; K_2HPO_4 10.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0; NaAc · 2H ₂ O 0.5

1.5.3 产生菌产酶的单因素条件 (碳源、氮源、无机盐) 筛选

确定培养基中的其他组分不变, 仅对单一的因素条件进行种类替换, 并进行试验, 同步培养 60 h 后, 取样测定酶活。

2 试验结果与分析

2.1 优势产生菌的筛选

为对影响脂肪酶的各个因素进行分析, 从本实验室保存由土壤中分离得到几株脂肪酶产生菌中进一步

筛选产酶能力较好及成长情况较好的菌株进行了研究, 酶活及生长情况见表 3。

表 3 各菌株产酶率及菌种生长情况

菌株	产酶条件	酶活/(U/mL)	澄清情况	发酵液颜色
酵母菌	pH7, 45°C	18.00	浑浊	乳白色
球菌	pH7, 40°C	18.33	很浑浊	乳白色
霉菌	pH7, 40°C	18.93	较清亮	无色
杆菌	pH7, 40°C	19.53	较浑浊	灰白色

注: 采用培养基为 1.2 培养基成分

由表 3 可以看出, 在各自最适培养条件下, 各菌种在酶活, 表现现象上, 表现各不相同。就酶活方面, 在 60 h 后, 杆菌表现了较强的产酶能力, 酶活高达 19.53 U/mL; 在表现现象上, 浑浊度和乳白色现象, 也可以指示产酶能力的大小。由此, 选定杆菌作为试验研究的对象, 针对于该杆菌, 对其产酶条件进行优化。

2.2 试验所用培养基的确定

培养基作为利用人工方法将适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的各种营养物质混合配制而成的营养基质, 对微生物的生长繁殖、产物积累等有相当大的影响。不同的微生物有适合他们生长的最佳培养基, 同时为了获得各种不同的产物, 培养基的成分也会有所不同。综合考虑这两个方面, 针对杆菌产脂肪酶这一目的, 对各种不同的培养基进行了考察研究, 产酶结果见表 4, 从中获取产酶率较高的培养基用于后续研究。

表 4 培养基对产酶的影响

培养基种类	酶活/(U/mL)	表现情况
组合培养基	23.33	浑浊、乳白色
牛肉膏蛋白胨培养基	21.36	浑浊、黄色
YPD 液体培养基	20.67	略浑浊、淡黄色
假丝酵母培养基	18.33	浑浊、微黄色、白色球状
基本培养基	22.10	略浑浊、蛋清色

由表 4, 可以明显看到不同的培养基对杆菌产脂肪酶有较大的影响。可以看出, 组合培养基是最适合于杆菌生长并产脂肪酶的一种培养基, 因此, 将组合培养基作为条件优化的研究培养基。

2.3 酵母产酶条件的单因素分析

通过上面的试验, 已经确定了培养基种类, 为了研究能使该杆菌获得高产脂肪酶的培养条件, 对以下各条件进行单个的研究确定。

2.3.1 培养基中碳源的确定

碳源是培养基组成成分中重要的一环, 是供给菌种生命活动所需要的能量和构成菌体细胞以及代谢产

物的物质基础,通常用作碳源的物质主要是糖类、脂肪及某些有机酸等。

2.3.1.1 单一碳源对产酶的影响

拟订了几种单一碳源(葡萄糖、淀粉、蔗糖、蓖麻油、三羧酸甘油酯),同步考察它们对酵母菌产酶的影响,结果见表5。

表5 培养基中单一碳源的确定

碳源	酶活/(U/mL)	表观现象
葡萄糖	20.97	浑浊、酱色
淀粉	19.00	浑浊、微黄、产气
蔗糖	17.17	浑浊、微酱色、产气
蓖麻油	24.33	浑浊、乳黄色
三羧酸甘油酯	26.70	浑浊、乳白色

通常作为碳源的有碳水化合物和油类等其他物质,由表5可知,油类碳源(蓖麻油和三羧酸甘油酯)能够诱导杆菌产生较高的酶活,碳水化合物中以葡萄糖较适合,因此单一碳源的选择可以选定以上三种。

2.3.1.2 复合碳源对产酶的影响

通过考察单一碳源对产酶的影响,发现有的碳源能够诱导脂肪酶的产生,而有的碳源可以使杆菌迅速繁殖,为了满足以上两个条件,试用复合碳源进行试验,结果见表6。

表6 复合碳源对脂肪酶产率的影响

葡萄糖含量/%	三羧酸甘油酯含量/%	酶活/(U/mL)
0.1	1.0	20.9
	2.0	22.83
	4.0	28.58
0.5	1.0	18.0
	2.0	19.47
	4.0	21.20
1.0	1.0	17.59
	2.0	19.06
	4.0	16.23

从表6中可以看出,一定组合的碳源能够大幅度地提高杆菌的脂肪酶产酶率,对于工业化生产有较大的帮助。

2.3.2 培养基中氮源的确定

氮源主要是用来构成菌体细胞物质和代谢产物,即蛋白质及氨基酸之类的含氮代谢物,在脂肪酶产生过程中,氮源对其组成和酶活有很大的影响,通常所用的氮源可以分为有机氮源和无机氮源两类。根据试验要求及酵母菌自身的特点,选用有机氮源(豆饼粉、蛋白胨)、无机氮源(硫酸铵、硝酸铵、尿素)。其试验结果见表7。

表7 培养基中氮源的确定

氮源	酶活/(U/mL)	表观情况
硫酸铵	37.33	较浑浊、酱色
硝酸铵	29.93	较浑浊、酱色
尿素	20.07	较清亮、暗黄色
豆饼粉	36.50	浑浊、灰黑色、产气
蛋白胨	37.67	浑浊、灰黑色、产气

在表7中可知,无机氮源中硫酸铵和有机氮源中豆饼粉、蛋白胨,都获得了较高的酶活,是适用于杆菌产脂肪酶的,但是尿素作为无机氮源,产酶率却很低。以上说明在脂肪酶产生中,有机氮源较无机氮源有利于脂肪酶的产生。

2.3.3 培养基中无机盐的确定

无机盐是微生物生命活动所不可缺少的物质,具有构成菌体成分、作为酶的组成部分或者维持酶的活性、调节渗透压、pH值、氧化还原电位等功能,并且不同的无机盐对脂肪酶还存在有抑制或者催化其活性的作用。

本试验主要考察钠盐和钾盐的无机盐组合对产酶的影响,通过改变组合培养基中的无机盐成分后,接入酵母菌培养,其结果见表8。

无机盐组合: A: K_2HPO_4 3.75 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L; B: K_2HPO_4 5.0 g/L, KH_2PO_4 2.0 g/L; C: K_2HPO_4 6.25 g/L, KH_2PO_4 2.5 g/L; D: K_2HPO_4 5.0 g/L, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 2.0 g/L; E: Na_2HPO_4 5.0 g/L, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 2.0 g/L。

表8 培养基中无机盐的确定

无机盐组合	酶活/(U/mL)	表观现象
组合A	33.33	较浑浊、浅酱色
组合B	37.00	较浑浊、酱黑色
组合C	41.06	较浑浊、酱黑色
组合D	35.21	较浑浊、酱黑色
组合E	34.18	较浑浊、酱黑色

在各无机盐组合的培养试验中,组合C具有最高的酶活41.06 U/mL,说明一定量的磷酸钾盐对脂肪酶的产生有很大的影响,钠盐与钾盐的组合对于脂肪酶的产生影响不算太大,有可能与所选用的含量配比有一定的关系。

2.3.4 培养条件中初始pH值的确定

各种不同的微生物都有其适合于生长繁殖的初始pH值。为探讨pH值的影响,在组合培养基配制后,采用NaOH和HCl对其pH值进行调整,培养测定酶活,结果见表9。

表9 初始 pH 值的确定

初始 pH 值	酶活/(U/mL)
5.5	19.00
6.0	14.67
6.5	14.67
7.0	15.33
7.5	16.00

由表 9 可知, 脂肪酶酶活随初始 pH 值增大有所下降, 在 pH 7.5 时略有回升, 通过试验, 可以确定该杆菌在偏酸性条件下, 能够获得较高的产酶率。

2.4 产脂肪酶条件参数优化

依据单因素试验, 设计正交试验, 因素水平见表 10, 结果见表 11。

表 10 碳源、氮源、无机盐、初始 pH 值因素水平表

水平	A(碳源)	B(氮源)	C(无机盐)	D(初始 pH 值)
1	葡萄糖	硫酸铵	组合 B	5.5
2	蓖麻油	蛋白胨	组合 C	7.0
3	三羧酸甘油酯	豆饼粉	组合 D	7.5
4	淀粉	硝酸铵	组合 E	6.0

表 11 酵母菌发酵产脂肪酶 L₁₆ (4⁵) 正交试验结果分析表

试验号	A	B	C	D	E	酶活/(U/mL)
1	1	1	1	1	1	61.37
2	1	2	2	2	2	58.27
3	1	3	3	3	3	41.33
4	1	4	4	4	4	36.53
5	2	1	2	3	4	51.00
6	2	2	1	4	3	49.00
7	2	3	4	1	2	44.00
8	2	4	3	2	1	35.67
9	3	1	3	4	2	34.67
10	3	2	4	3	1	44.33
11	3	3	1	2	4	32.83
12	3	4	2	1	3	42.90
13	4	1	4	2	3	55.33
14	4	2	3	1	4	57.40
15	4	3	2	4	1	38.00
16	4	4	1	3	2	37.17
k ₁	49.38	50.09	45.09	51.42	44.84	
k ₂	44.92	52.25	47.54	45.54	43.53	
k ₃	38.68	39.04	42.27	43.46	47.14	
k ₄	46.98	38.07	45.05	39.55	44.44	
R	10.70	24.18	5.27	11.87	3.61	

表 12 酵母菌发酵产脂肪酶试验结果方差分析

误差来源	自由度	平方和	均方	F 值	F _{0.05}
A	3	251.8330	83.9443	8.885	9.28
B	3	669.6763	223.2254	23.6280*	9.28
C	3	55.7642	18.5881	1.9675	9.28
D	3	294.1642	98.0548	10.3789*	9.28
误差	3	28.3425	9.4475		
总合	15	1299.7805			

表 12 为正交实验的方差分析结果, 可知对脂肪酶产酶影响大的是氮源和初始 pH 值, 其次是碳源也有较大的影响, 而无机盐的影响较小。由极差分析可知产脂肪酶较高的条件是 A₁B₂C₂D₁。并以此为条件做重复试验, 试验结果见表 13。

表 13 产脂肪酶最佳工艺条件结果分析

碳源	氮源	无机盐	初始 pH 值	酶活/(U/mL)
葡萄糖	蛋白胨	组合 C	5.5	68.58

(下转第 21 页)