

## 类产碱假单胞菌耐热碱性脂肪酶的研究\*

吴松刚 谢新东 黄建忠 施巧琴

(福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

**摘要** 从福建省福州市温泉澡堂污水浸润土壤中分离筛选到一株耐热碱性脂肪酶产生菌——类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) F331。产酶最适条件为: 碳源小麦粉, 氮源豆粕粉, 起始培养 pH9.4 ~ 9.5, 培养温度 24 ~ 26 °C, 培养周期 32 ~ 34h。经硫酸铵盐析、Sephrose 4B 和 Sephadex G-200 柱层析得到纯化的酶组分。该酶最适作用温度 50 °C, 最适作用 pH 10.0, 60 °C 保温 80 min 酶活基本不损失, 在 pH 7.0 ~ 10.0 范围内酶蛋白稳定;  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  对酶有激活作用,  $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  对酶活有抑制作用。该酶分子量 45700。

**关键词** 类产碱假单胞菌, 耐热碱性脂肪酶, 产酶条件, 酶学性质

由于脂肪酶在食品、轻化工和医药等领域的广泛应用, 碱性耐热脂肪酶已成为国内外脂肪酶研究的一个重要方向。无色杆菌, 产碱杆菌、嗜热链球菌、荧光假单胞菌、金黄色葡萄球菌、莓实假单胞菌、华根霉、圆弧青霉以及醋酸钙不动杆菌<sup>[1~9]</sup>等产生的脂肪酶均见报道。丹麦 Novo-Nordisk 和荷兰 Gist-Brocades 等公司都已成功研制出洗涤用碱性脂肪酶及其复合酶, 解脂假丝酵母和扩展青霉碱性脂肪酶已在我国投入生产并在皮革皮毛工业中得到了应用。本文报道了耐热碱性脂肪酶产生菌——类产碱假单胞菌 F331 的产酶条件及其酶学特性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 分离土样

从福州、厦门、惠安、寿宁、龙岩、武平长汀及连城等地区的温泉、油脂化工厂、肉联厂、农贸市场及菜园采集土样 126 份, 供分离用。

#### 1.2 类产碱假单胞菌 F331

从福州温泉澡堂污水浸润土壤中分离所得, 经中国科学院微生物研究所鉴定, 现保存于我院菌种室。

#### 1.3 培养基及培养条件

**1.3.1 平板分离培养基 (%)**: 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 0.5, 氯化钠 0.05, 豆油 0.5, 维多利亚蓝 0.01, 琼脂 2.0。pH 10.0。

**1.3.2 斜面培养基 (%)**: 蛋白胨 0.5, 酵母浸膏 0.5, 氯化钠 0.3, 磷酸氢二钾 0.1, 琼

\* 福建省 1991 年重点科研项目。

本文于 1995 年 10 月 16 日收到。

脂 2.0。pH 10.0。

**1.3.3 摇瓶种子培养基 (%)**: 蛋白胨 0.5, 酵母浸膏 0.5, 氯化钠 0.3, 硫酸镁 0.05, 磷酸氢二钾 0.05。pH 10.0, 250 ml 三角瓶分装 25 ml。

**1.3.4 摇瓶产酶培养基 (%)**: 蛋白胨 1.0, 葡萄糖 0.5, 硫酸镁 0.01, 氯化钠 0.05, 磷酸氢二钾 0.01。pH 10.0, 500 ml 三角瓶分装 60 ml。

**1.3.5 培养条件**: 将斜面菌种接种于种子培养基中, 28 °C 摇瓶培养 (250 r/min) 12h, 以 10% 接种量接入 60 ml 产酶培养基 (500 ml 三角瓶) 于 26 °C (300 r/min) 培养 36 h。

## 1.4 耐热碱性脂肪酶产生菌的筛选分离

将土壤稀释液涂皿于分离培养基上, 50 °C 培养 3 d, 菌落周围产生蓝绿色圈者为碱性脂肪酶产生菌, 挑取至斜面扩大培养, 摇瓶复筛。

## 1.5 酶活力测定

参见施巧琴<sup>[10]</sup>方法, 以橄榄油作底物。

## 1.6 蛋白质浓度测定

按 Lowry 法<sup>[11]</sup>测定。

## 1.7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

采用不连续垂直板状电泳系统, 分离胶浓度 10%, 浓缩胶浓度 5%, 含 0.1% SDS, 采用 Tris-HCl 缓冲体系。

## 1.8 酶分子量测定

按 King J.<sup>[12]</sup>垂直板状 SDS-PAGE 方法进行。

# 2 结果

## 2.1 类产碱假单胞菌 F331 的分离筛选

从 126 份不同类型的土壤中, 筛选分离到 380 株分解橄榄油菌株, 将其中水解圈相对大且透明的 7 株进一步摇床复筛, 结果表明菌株 F331 产酶能力最强, 达 26.4 u/ml。F331 菌株经中国科学院微生物研究所鉴定为类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)。

## 2.2 类产碱假单胞菌 F331 的产酶条件

**2.2.1 碳源对产酶的影响**: 改变产酶培养基中碳源的种类, 所试的 16 种碳源均可作为产酶培养基的碳源, 其中以小麦粉效果最好 (表 1)。

**2.2.2 不同氮源对产酶的影响**: 改变产酶培养基中氮源种类, 结果表明所试 14 种氮源均可作为产酶培养基氮源, 其中以黄豆饼粉和  $\text{NaNO}_3$  效果最佳 (表 2)。

**2.2.3 产酶的最适温度**: 共设置了 20 °C、22 °C、24 °C、26 °C、28 °C 和 30 °C 6 个温度梯度试验, 结果表明产酶的最适温度为 24 ~ 26 °C。

**2.2.4 培养基起始 pH 对产酶的影响**: 在所试的 pH 梯度范围内, 产酶培养基起始 pH 在 9 ~ 10 范围内产酶最高, 酶活达 26.5 u/ml。

**2.2.5 摇瓶装置对产酶的影响**: 在 500 ml 的三角瓶中加入 50 ~ 150 ml 产酶培养基, 结果表明每瓶装量 60 ml 最适合该菌株在本实验条件下产酶。

表 1 不同碳源对产酶的影响

Table 1 Effect of carbon sources on the enzyme production

碳 源 Carbon source (0.5%)	酶 活 Activity/u · ml <sup>-1</sup>	碳 源 Carbon source (0.5%)	酶 活 Activity/u · ml <sup>-1</sup>
空 白 No addition	4.8	麦芽糖 Maltose	20.0
葡萄糖 Glucose	15.0	木 糖 Xylose	18.4
果 糖 Fructose	23.2	纤维二糖 Callobiose	17.6
甘露糖 Mannose	19.1	蜜二糖 Melibiose	17.4
半乳糖 Galactose	18.4	小麦粉 Wheat flour	24.6
乳 糖 Lactose	20.8	玉米粉 Corn flour	23.9
山梨糖 Sorbitol	20.3	可溶性淀粉 Soluble starch	22.9
蔗 糖 Sucrose	14.5	糊 精 Dextrin	23.7

表 2 不同氮源对产酶的影响

Table 2 Effect of nitrogen sources on the enzyme production

氮 源 Nitrogen source (1.0%)	酶 活 Activity/u · ml <sup>-1</sup>	氮 源 Nitrogen source (1.0%)	酶 活 Activity/u · ml <sup>-1</sup>
空 白 No addition	0	硝酸铵 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	22.9
蛋白胨 Peptone	18.6	硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	22.2
酵母浸膏 Yeast extract	19.6	磷酸氢二铵 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	22.0
牛 肉 膏 Beef extract	20.3	碳酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	18.4
酪 素 Casein	21.5	硝酸钠 $\text{NaNO}_3$	23.4
尿 素 Urea	20.5	豆 饼 粉 Defatted soybean flour	24.4
氯化铵 $\text{NH}_4\text{Cl}$	21.7	花生饼粉 Defatted peanut flour	23.7

2.2.6 表面活性剂对产酶的影响: 于产酶培养基中加入不同种类表面活性剂, 结果表明 (表 3), 聚氧乙烯十六烷基醚、聚氧乙烯十二烷基醚、聚氧乙烯辛基苯基醚及吐温 40 可不同程度提高产酶量, 而咪唑啉则抑制产酶。

2.2.7 产酶周期: 图 1 揭示了类产碱假单胞菌 F331 最适产酶周期为 30~35 h。

## 2.3 酶的提取与纯化

2.3.1 粗酶的制备: 发酵液于 4000 r/min 离心 15 min。将上清液进行硫酸铵沉淀, 60% 饱和度硫酸铵即可沉淀 96.9% 酶蛋白。

2.3.2 Sepharose 4B 柱层析: 上述  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀物溶于适量的 0.05 mol/L Gly-NaOH (pH 9.2) 缓冲中, 经 Sephadex G-25 柱层析 (1.2×20 cm) 脱盐, 收集有蛋白组分的洗脱液进行 Sepharose 4B 柱层析。按常规方法装柱 (2×40 cm), 充分洗涤除去未被吸附的杂蛋白, 再用 0.05 mol/L Gly-NaOH (pH 9.2) 洗脱, 流速 15 ml/h, 分部收集

表 3 表面活性剂对产酶的影响

Table 3 Effect of surfactants on the lipase production

表 面 活 性 剂 Surfactant (0.1%)		酶 活 Activity / u · ml <sup>-1</sup>
对 照	No addition	19.8
聚氧乙烯十二烷基醚	Polyoxyethylene lauryl ether	22.8
聚氧乙烯辛基苯基醚	Polyoxyethylene octylphenyl ether	28.8
聚氧乙烯十六烷基醚	Polyoxyethylene letyl ether	29.5
吐温 40	Tween 40	28.5
吐温 60	Tween 60	18.4
吐温 80	Tween 80	18.8
司斑 20	Span 20	18.4
司斑 40	Span 40	18.4
司斑 80	Span 60	19.3
咪唑啉	ImidazolinyI	16.9

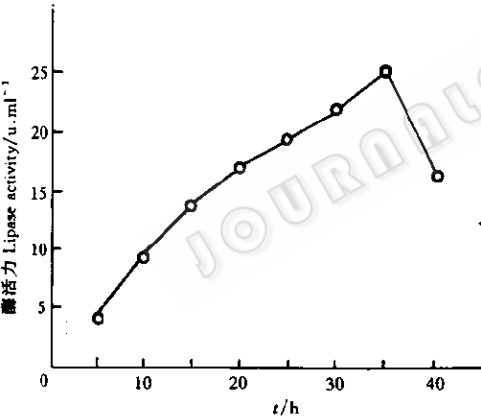


图 1 F33I 菌株的产酶周期

Fig.1 The time course of the lipase production

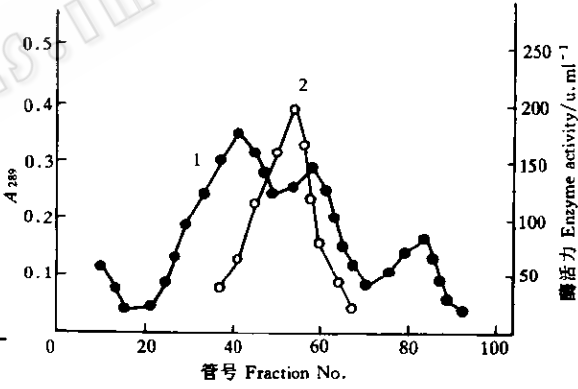


图 2 脂肪酶的 Sepharose 4B 柱层析图

Fig.2 Chromatogram of lipase on Sepharose 4B column  
1. 吸光度  $A_{280}$ ; 2. 酶活力 Enzyme activity.

3 ml/管，收集活性组分，供进一步纯化。洗脱曲线见图 2。

2.3.3 Sephadex G-200 柱层析：将收集的有酶活组分加至已平衡的 Sephadex G-200 柱 (1.8×65 cm) 上，层析柱静水压为 10 cm 水柱，流速 10 ml / h，洗脱液为 0.05 mol / L Gly-NaOH (pH 9.2) 缓冲液，分部收集 4 ml / 管，合并有酶活的组分，洗脱曲线见图 3。表 4 概括了脂肪酶的主要纯化步骤。

2.4 脂肪酶的酶学特性

表 4 类产碱假单胞菌脂肪酶的纯化

Table 4 Purification of the lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

步 骤 Step	总 酶 活 Total activity /u	总 蛋 白 Total protein /mg	比 活 Specific activity /u · mg <sup>-1</sup>	酶回收率 Recovery /%	纯化倍数 Purification (fold)
培养滤液 Culture filtrate	53828	27600	1.95	100	1
硫酸铵盐析 Ammonium sulfate precipitation	52153	20125	2.59	96.9	1.33
Sephacrose 4B chromatography	34755	903	38.5	64.6	19.72
Sephadex G-200 Chromatography	18375	330	55.7	34.1	28.6

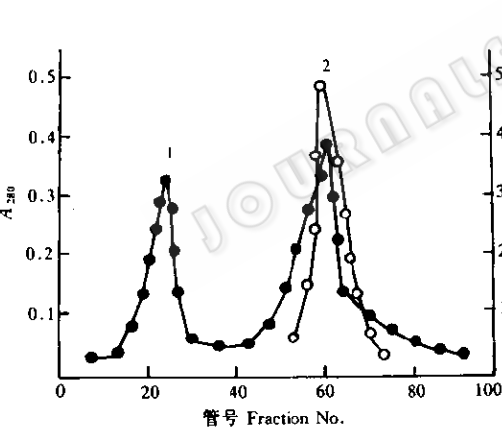


图 3 脂肪酶的 Sephadex G-200 柱层析图  
Fig.3 Chromatogram of lipase on Sephadex  
G-200 column

1. 吸光度  $A_{280}$ ; 2. 酶活力 Enzyme activity.

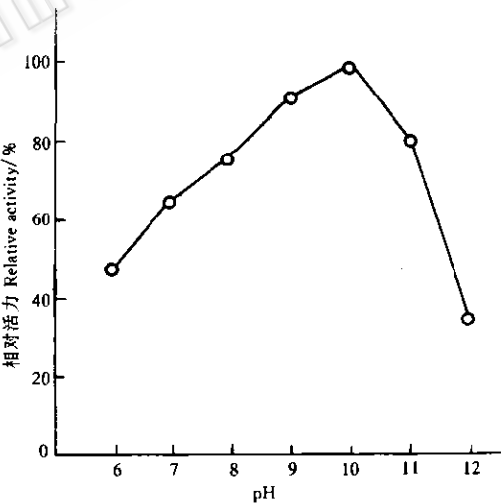


图 4 酶作用最适 pH  
Fig.4 The optimal reaction pH of purified lipase

2.4.1 酶作用最适 pH: 配制 pH 6 ~ 8 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, pH 9 ~ 11 甘氨酸-氢氧化钠 (0.05 mol /L) 缓冲液, 以橄榄油为底物测定不同 pH 值条件下酶活力。结果 (图 4) 表明, 酶作用的最适 pH 为 10.0。

2.4.2 酶作用最适温度: 在 40 ~ 60 ℃ 不同温度下测定同一酶液的脂肪酶活性, 其它

反应条件相同，测得酶最适作用温度为 50℃（图 5）。

**2.4.3 酶的 pH 稳定性：**取稀释酶液 2 ml 和等量各种不同 pH 的缓冲液于 4℃ 保持 24 h，然后调回 pH 至 9.2，测定残留酶活。结果（图 6）表明，酶蛋白的 pH 稳定范围在 7.0～10.5 之间。

**2.4.4 酶的热稳定性：**取 20 ml 酶液分别置于不同恒温水浴处理 80 min，每隔 10 min 取样测定残存酶活力（用未经处理的酶液作对照）。结果如图 7 所示。60℃ 保温 80 min

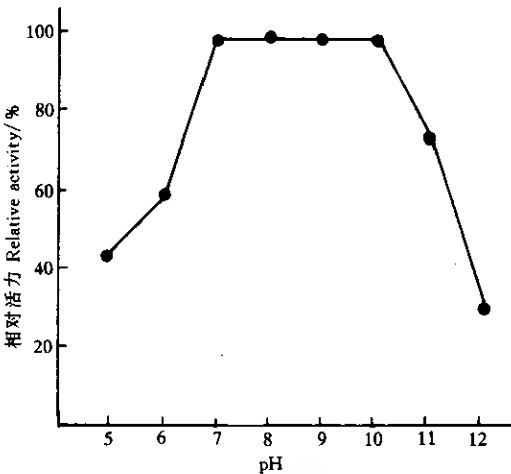


图 6 pH 对酶活力的影响

Fig.6 Effect of pH on the lipase activity

pH 5.0 缓冲液用 0.1 mol/L 柠檬酸和 2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  配成；pH 6.0～8.0 缓冲液用 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 NaOH 配成；pH 9.0～12.0 缓冲液用 0.05 mol/L 甘氨酸和 NaOH 配成。

pH 5.0 buffer was made by 0.1 mol/L citric and 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 6.0～8.0 buffer by 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and NaOH; pH 9.0～12.0 buffer by 0.05 mol/L glycine and NaOH.

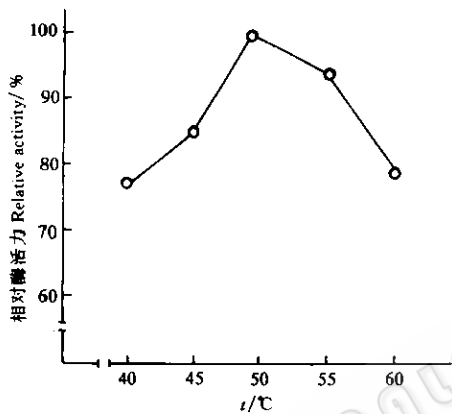


图 5 酶作用的最适温度

Fig.5 The optimal reaction temperature of purified lipase

后，酶活性基本不损失；70℃ 保温 80 min 后，酶保留 50% 以上活性；80℃ 保温

表 5 金属离子对酶活性的影响

Table 5 Effect of metallic ions on lipase

金属离子 * Metal ions	相对酶活 Relative activity / %	金属离子 * Metal ions	相对酶活 Relative activity / %
None	100	$\text{Co}^{2+}$	69
$\text{Ca}^{2+}$	157	$\text{Fe}^{2+}$	63
$\text{Mg}^{2+}$	123	$\text{Cu}^{2+}$	33
$\text{K}^{+}$	107	$\text{Zn}^{2+}$	54
$\text{Li}^{+}$	108	$\text{Mn}^{2+}$	82
$\text{Na}^{+}$	105		

\* Metal ions conc.:  $10^{-3}$  mol / L.

80 min 后, 酶活性只残留 10% 活性。

**2.4.5 金属离子对酶活力的影响:** 将酶液与各种离子 ( $1 \times 10^{-3}$  mol/L) 混合置 30 °C 保温 30 min, 取样测定残留酶活力, 以不加金属离子试验为对照。结果 (表 5) 表明,  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  对酶活力有较强的激活作用;  $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{K}^{+}$  和  $\text{Li}^{+}$  具有微弱激活作用, 而  $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  则表现为不同程度的抑制作用。

**2.4.6 酶分子量的测定:** 磷酸酯酶 b 等 4 种标准蛋白经不连续 SDS-PAGE 电泳, 其相对泳动率与分子量显示出很好的线性关系 (图 8)。将脂肪酶样品与标准蛋白于同一条件下电泳, 测得该酶的分子量为 45 700。

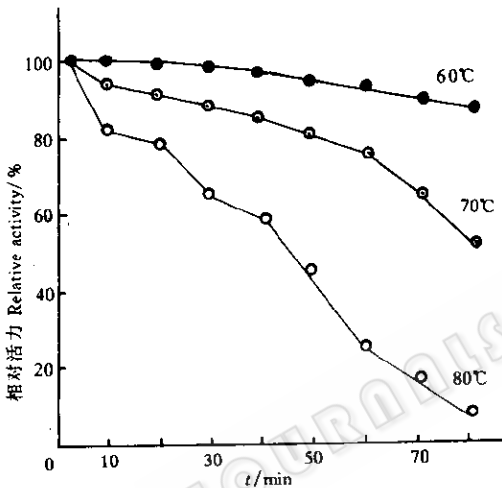


图 7 温度对酶稳定性的影响

Fig.7 Effect of temperature on the lipase stability

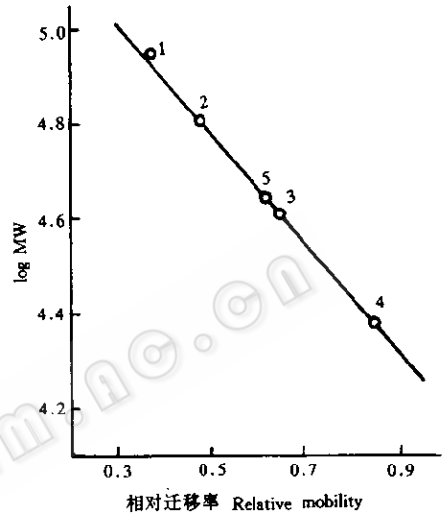


图 8 脂肪酶分子量的测定

Fig.8 Molecular weight of lipase determined by SDS-PAGE

1. 磷酸酯酶 b Phosphorylase b (94 000); 2. 白蛋白 Albumin (67 000); 3. 肌动蛋白 Actin (43 000); 4. 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase (30 000); 5. 纯酶 Purified lipase.

### 3 讨论

类产碱假单胞菌 F331 产生的碱性脂肪酶其最适作用温度和 pH 比文献中报道的黑曲霉<sup>[13]</sup>、毛霉<sup>[14]</sup>、圆弧青霉<sup>[15]</sup>、日本根霉<sup>[16]</sup>、荧光假单胞菌<sup>[17]</sup>、莓实假单胞菌<sup>[18]</sup>及醋酸钙不动杆菌<sup>[9]</sup>都高, 酶的热稳定性和 pH 稳定性较广泛, 具有开发应用前景。

### 参 考 文 献

- [1] Susumu Okumura, Mieko Iwai, Yoshio Tominaga. *Agric Biol Chem*, 1984, **48**: 2805 ~ 2808.
- [2] Machida F, Fulumoto J. *Biochem Biophys Acta*, 1968, **154**: 586 ~ 591.
- [3] Yoshitaka Kokusho, Haruo Machida, Shinjiro Iwasaki. *Agric Biol Chem*, 1982, **46**: 1159 ~ 1164.
- [4] Yoshitaka Kakusho, Haruo Machida, Shinjiro Iwasaki. *Agric Biol Chem*, 1982, **46**: 1743 ~ 1750.

- [5] Watanabe N, Ota Y, Minoda Y *et al. Agric Biol Chem.* 1977, **41**: 1356.
- [6] Kosugi Y, Suzuki H. *J Ferm Technol*, 1973, **51**: 895.
- [7] Demoraes J, Chandan R C. *J Food Sci*, 1982, **47**: 1579 ~ 1583.
- [8] Sonnet P E, Baillargeon M W. *J Chem Ecol*, 1987, **13**: 1279 ~ 1292.
- [9] 施巧琴, 陈若莹, 许晴怡, 等. 微生物学报, 1992, **32** (6): 425 ~ 431.
- [10] 施巧琴. 微生物学通报, 1981, **8** (3): 108 ~ 110.
- [11] Lowry O H, Rosebrough H J, Farr A L *et al. J Biol Chem*, 1951, **193**: 265 ~ 275.
- [12] King J, Laemmli U K. *J Mol Biol*, 1971, **62**: 465 ~ 477.
- [13] Ota Y, Watanabe N, Minoda Y *et al. Agric Biol Chem*, 1968, **32**: 290.
- [14] Nagaoka K, Yamaada Y. *Agric Biol Chem*, 1973, **37**: 2791 ~ 2798.
- [15] Iwai M. *Agric Biol Chem*, 1975, **39**: 1063.
- [16] Aisaka K, Terada O. *J Biochem*, 1981, **89**: 817.
- [17] Sugiura M, Isobe M. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1975, **23**: 681 ~ 687.
- [18] Toshiyuki Bishio, Tadehide Chikano, Minoru Kaninura. *Agric Biol Chem*, 1987, **51**: 181 ~ 186.

## STUDIES ON THERMOSTABLE AND ALKALINE LIPASE FROM *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES*

Wu Songgang Xie Xindong Huang Jianzhong Shi Qiaolin

(College of Biological Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou 350007)

**Abstract** A strain of bacterium producing large amount of alkaline and thermostable exolipase was isolated from soils and was identified as *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. The optimal conditions for lipase production were: wheat flour as nitrogen source and soybean flour as carbon source in medium, initial pH 9.4 ~ 9.5, culture temperature 24 ~ 26 °C for 34 h. The lipase was purified by means of ammonium sulfate precipitation and chromatography with Sepharose 4B and Sephadex G-200. Its molecular weight was estimated to be about 45 700 by SDS-PAGE. The optimal pH and temperature for hydrolysis of olive oil were 10.0 and 50 °C respectively. The lipase was stable below 60 °C, lost 40% of its activity at 70 °C, remained 10% of its activity at 80 °C. Different metal ions showed adverse effects on the lipase activity.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  increased lipase activity, whereas  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  caused inhibition.

**Key words** *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, Thermostable-alkaline lipase, Conditions for producing lipase, Properties of lipase