

链霉菌 Z94-2 碱性脂肪酶产生条件及酶学性质*

周晓云¹ 黄建宁² 欧志敏¹ 王慧中³ 王荣伟¹

(¹ 浙江工业大学生物工程系 杭州 310014)

(² 浙江省农业科学院微生物研究所 杭州 310021)

(³ 杭州师范学院生物系 杭州 310012)

摘 要:在 152 株脂肪酶产生菌中,链霉菌 Z94-2 产脂肪酶活力为 596u/mL,其最适培养基(g/L)为:糊精 10、黄豆饼粉 30、尿素 10、K₂HPO₄ 0.5、MgSO₄ 0.5、NaCl 1 和 AEO₉ 0.5,产酶的最适条件为:初始 pH 9.5~10.0,在 26℃ 培养 48h。用 PVA 橄榄油乳化系统测定该酶的最适 pH 9.8,最适温度 37℃,在 pH 8.6~10.2 于 5℃ 存放 24 h,酶活力不变。0.14mol/L 的氯化钙有较大的激活作用。

关键词:碱性脂肪酶,链霉菌,产酶条件,酶学性质

中图分类号:Q936, Q556⁺.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)01-0075-79

已报道的碱性脂肪酶产生菌大多数属细菌、霉菌和酵母^[1~5]。本文从土样中筛选出一株产酶活力较高的链霉菌 Z94-2,在非离子表面活性剂 AEO₉ 存在时,产酶活力达 596u/mL,是一株很有开发前景的碱性脂肪酶产生菌。迄今为止有关放线菌作为碱性脂肪酶产生菌,国内还未见报道。

1 材料和方法

1.1 菌株

链霉菌 Z94-2,来源于杭州土壤,野生菌经 UV、DES 和 Co⁶⁰诱变选育 5 代后获得。

1.2 培养基

斜面培养基:高氏培养基。种子培养基(g/L):黄豆饼粉 10,尿素 10,糊精 10, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄ 0.5, NaCl 1。产酶培养基(g/L):黄豆饼粉 40,尿素 10,糊精 10, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄ 0.5, NaCl 1。

1.3 培养条件

装量 40mL/250mL 三角瓶,摇床转速 200r/min,培养温度 26℃,移种 10%,培养周期 48 h。

1.4 酶活力测定

参照文献[6],酶活力测定以橄榄油为底物,pH 9.8,温度 37℃。酶活单位的定义为

* 浙江省科委重点项目和浙江省自然科学基金项目(397040)

作者简介:周晓云(1942-),男,江苏省无锡人,浙江工业大学生物工程系教授,现主要从事生物化工学科的研究

收稿日期:1998-07-28, **修回日期:**1999-01-19

在上述条件下,每分钟产生 $1\mu\text{mol}$ 脂肪酸的酶量, 定为一个脂肪酶国际单位。

2 结果

2.1 碳源对产酶的影响

改变产酶培养基中碳源的种类, 分别对以淀粉、糊精、菜油和麸皮四种主要农副产品和工业产品作为碳源进行了试验, 结果见表 1。试验结果表明, 以 1% 糊精作为碳源时脂肪酶活力最高。

2.2 氮源对产酶的影响

改变产酶培养基中氮源的种类, 分别对 NaNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、蛋白胨、黄豆饼粉和尿素作为氮源进行了试验, 结果见表 2。

该试验结果表明, 尿素、黄豆饼粉、蛋白胨是该菌适合产酶的氮源, 由于蛋白胨价格较高, 采用尿素和黄豆饼粉作为氮源较为合适。

2.3 碳氮培养基正交试验

选用适合产酶的糊精、尿素和黄豆饼粉作为碳氮源, 试验结果见表 3。从正交试验结果可知, 产酶活力最佳的培养基为 1% 尿素、3% 黄豆饼粉和 1% 糊精, 从极差 R 的结果可知影响该菌种产酶的最重要因素是糊精, 其次是尿素。

2.4 培养温度对产酶的影响

分别从 22°C 到 34°C 每间隔 2°C 进行了培养温度对产酶的影响试验, 试验结果表明, 26°C 为该菌株的最适培养温度。

2.5 初始 pH 值对产酶的影响

分别对培养基 pH8.0 到 pH10.5 进行初始 pH 对产酶的影响试验, 结果表明, 培养基初始 pH9.5~10.0 时产酶活性最高。

表 1 不同碳源对产酶的影响

Table 1 Effect of various carbon sources on lipase production

Carbon source	$c(\text{carbon source})/\%$	Lipase activity/(u/mL)
Starch	0.5	74
	1.0	109
	1.5	88
Dextrin	0.5	102
	1.0	248
	1.5	190
Rape oil	0.2	54
	0.5	85
	0.8	67
Bran	1.0	49
	2.0	73
	3.0	56

表 2 不同氮源对产酶的影响

Table 2 Effect of various nitrogen sources on Lipase production

Nitrogen source	$c(\text{carbon source})/\%$	Lipase activity/(u/mL)
NaNO_3	0.1	83
	0.5	94
	0.8	71
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1	64
	0.5	88
	1.0	52
Pepton	0.5	88
	1.0	164
	1.5	105
Soybean meal	1.0	112
	3.0	160
	5.0	97
Urea	0.5	133
	1.0	205
	1.5	145

表 3 碳氮正交试验

Table 3 Orthogonal test of carbon source and nitrogen source

Number of test	Urea/%	Soybean meal/%	Dextrin/%	Lipase activity/(u/mL)
1	0.5	1.0	0.5	80
2	1.0	1.0	1.0	220
3	1.5	1.0	1.5	170
4	0.5	2.0	1.0	188
5	1.0	2.0	1.5	125
6	1.5	2.0	0.5	133
7	0.5	3.0	1.5	125
8	1.0	3.0	1.0	251
9	1.5	3.0	0.5	220
k_1	131	157	144	
k_2	200	149	221	
k_3	174	200	140	
k_4	69	51	81	

2.6 表面活性剂对产酶的影响

以 Tween80、AEO₉(脂肪醇聚氧乙烯醚)、LAS(十二烷基苯磺酸钠)、TX-10(壬基酚聚氧乙烯醚)、AES(十二烷基三聚乙醇磺酸钠)和 AOS(α -烯炔磺酸钠)进行了产酶影响试验。发现以 AEO₉ 和 TX-10 两种非离子表面活性剂对产酶有很大的促进作用,其中 0.05% AEO₉ 可使酶活提高到 596u/mL,0.08% TX-10 可使酶活提高到 525u/mL。

2.7 脂肪酶的酶学性质

2.7.1 酶作用的最适 pH:用 0.05mol/L pH8.0~10.6 的各种缓冲液与橄榄油乳化剂在 37℃ 水浴中保温 15min,测定酶活性,结果如图 1 所示。酶的最适 pH 为 9.8。

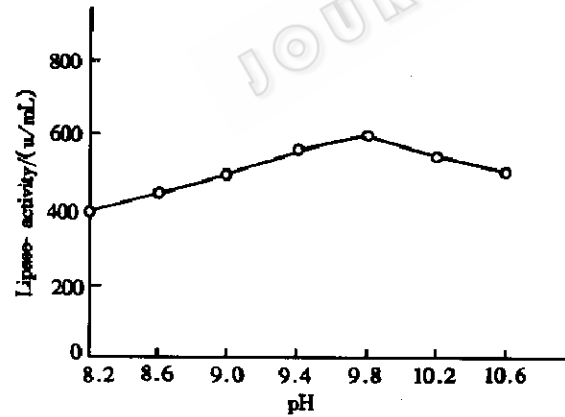


图 1 脂肪酶酶活的最适 pH
Fig. 1 Optimum pH for lipase

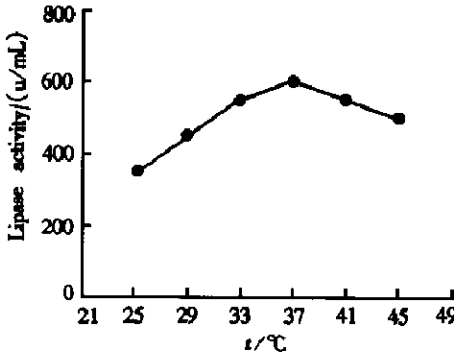


图 2 脂肪酶酶活的最适温度
Fig. 2 Optimum temperature for lipase activity

2.7.2 酶作用的最适温度:按照碱性脂肪酶的测定方法。测定其在不同温度下的酶活力,结果如图 2 所示。酶的最适温度为 37℃。

2.7.3 酶的 pH 稳定性:取酶液与等量的不同 pH 缓冲液分别于 5℃ 和 40℃ 存放 24h,以 pH9.8 的甘氨酸缓冲液测定其酶活。结果见图 3。在 pH8.6~10.2 时 5℃ 存放 24h,仍保

持原有的酶活力;在 pH8.6~10.2 时 40℃ 存放 24h, 保持 70% 活力。

2.7.4 酶的热稳定性:酶液在 pH9.8 的甘氨酸缓冲液中分别在不同温度保持 1h, 立即取出放在冰浴中冷却后, 测定其酶活。结果见图 4。在 40℃ 存放 30min 保持酶活力不变, 在 55℃ 存放 30min, 残存酶活性为 70%。

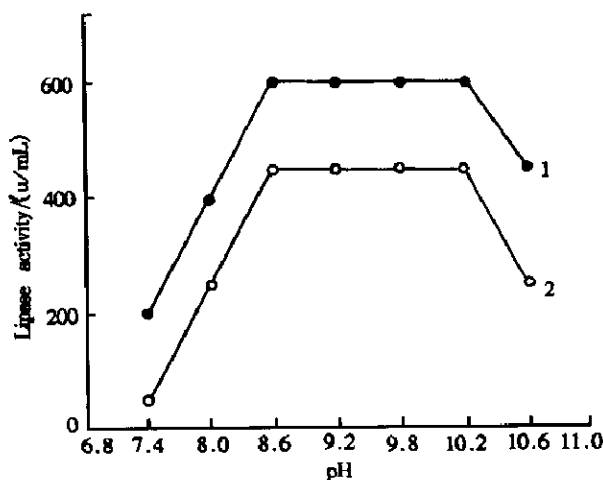


图3 pH对脂肪酶稳定性的影响

Fig.3 Effect of pH on lipase stability

1.5°C for 24h; 2. 40°C for 24h.

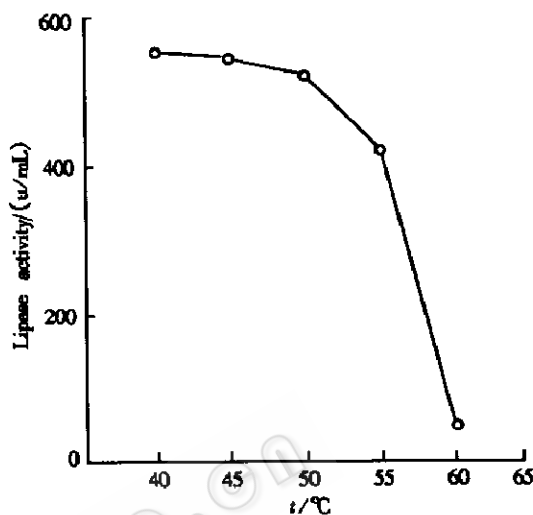


图4 温度对脂肪酶稳定性的影响

Fig.4 Effect of temperature on lipase stability

2.7.5 金属离子对酶活的影响:考察了 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Co^{2+} 对酶的影响, 发现 Ca^{2+} 有激活作用, 当 Ca^{2+} 浓度为 0.09~0.18mol/L 浓度时, 酶活激活后为原酶活的 2.5~2.8 倍。除 Cu^{2+} 对该酶有严重的抑制作用外, 其他金属离子对酶活影响不大, 在低温度时还有激活作用。

3 讨论

作者报道了放线菌产生碱性脂肪酶的产酶条件和酶的性质, 链霉菌 Z94-2 是在 pH9.5 的橄榄油(经乳化)为唯一碳源的琼脂平板上分离获得, 经物理与化学方法多次诱变处理得到的一株高产耐碱性脂肪酶产生菌, 有关此放线菌的分类鉴定将再作研究。与其他微生物脂肪酶一样, 该放线菌脂肪酶亦是诱导酶, 但该菌株产酶对菜油的要求是亚适量, 这与报道的细菌和霉菌一样^[4,7]。链霉菌 Z94-2 脂肪酶与其他微生物脂肪酶一样, Ca^{2+} 是一种很好的激活剂, 但本文测定酶活没有参照其他资料^[4]用 Ca^{2+} 作激活剂, 如采用激活剂测定的酶活均要提高 2.5~2.8 倍。

非离子表面活性剂 AEO₉ 和 TX-10 对链霉菌 Z94-2 是很好的产酶促进剂, 表面活性剂对提高酶产量的作用机理尚不完全清楚^[6], 一种认为表面活性剂能增加细胞的渗透性, 使细胞内的酶容易透过细胞分泌出来, 提高酶的产量; 另一种认为表面活性剂能保护酶活性因而使酶的产量增加。

参 考 文 献

- [1] Nishio T, Chikano T, Kamimura M, et al. *Agric Biol Chem*, 1987, 51(1):186~186.
- [2] Tham A, Robaiza Z. Production of alkaline lipase from *Bacillus* sp. and its use in detergent formulation. In: *Proc Malays Bio Chem Biochem. Aoc K Conf*, 1993, 18th:81~85.
- [3] 陶文沂, 邹显章, 向瑞春, 等. *微生物学报*, 1990, 30(3):216~222.
- [4] 黄建忠, 施巧琴, 郑毅, 等. *工业微生物*, 1995, 25(4):10~14.
- [5] 吴松刚, 谢新东, 黄建忠, 等. *微生物学报*, 1997, 37(1):32~39.
- [6] 周晓云. *酶技术*. 北京:石油工业出版社, 1995, 235~242.
- [7] Ibrahim C, Nishio N, Naqai S. *Agric Biol Chem*, 1987, 51(8):2145~2151.

CONDITIONS OF ENZYME PRODUCTION AND PROPERTIES OF ALKALINE LIPASE BY *STREPTOMYCES* Z94-2

Zhou Xiaoyun¹ Huang Jianning² Ou Zhimin¹ Wang Huizhong³ Wang Rongwei¹

(¹ Department of Biology Engineering, Zhejiang University of Technology, HangZhou 310014)

(² Institute of Microbiology, Zhejiang Academy of Agriculture Sciences, HangZhou 310021)

(³ Department of Biology, Hang Zhou Normal College, Hangzhou 310012)

Abstract: An alkaline lipase producing strain *streptomyces* Z94-2 was selected from 152 lipase producer. The optimal medium composition for the producing lipase is (g/L): soybean meal 30, urea 10, dextrin 10, KH_2PO_4 0.5, NaCl 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, AEO₉ (nonionic surfactant) 1. The optimal conditions for lipase producing are initial pH9.5~10.0, shaken at 26℃, for 48h, a maximal lipase activity of reached 596(u/mL). The optimal activity at pH9.8 and at 37℃, respectively. The lipase was stable at pH8.6~10.2 and below 60℃, and the lipase was highly activated by 0.14 mol/L CaCl_2 .

Key words: Alkaline lipase, *Streptomyces*, Conditions of enzyme production, Properties of enzyme