微生物学报 32 (6): 425—431, 1992
Acta Microbiologica Sinica

醋酸钙不动杆菌产生的耐热碱性脂肪酶的研究*

施巧琴 陈若莹 许晴怡 吴松刚
(福建师范大学微生物工程研究所，福州 350007)

从福建省福州市郊区土壤中分离筛选到一株活力强的作用温度高的碱性脂肪酶野生型菌株：醋酸钙不动杆菌 F-1903。该菌产酶培养基组成(%)：大豆粉 2.0、玉米浆 1.0、糊精 1.0、磷酸氢二钾 0.5、硝酸钠 0.5。产酶最适条件：发酵培养基起始 pH9.0，温度 26℃，周期 28 小时。酶作用最适温度 54℃，最适 pH9.2。Ca^{2+} 对酶有激活作用，EDTA 有抑制作用。

关键词 醋酸钙不动杆菌；耐热碱性脂肪酶

脂肪酶作为生物催化剂，已广泛用于疾病治疗、食品发酵、轻工产品脱脂和化工产品生产。然而由于工业用酶在某些生产工艺中抗碱抗热性能差而失活，易受产物和抑制剂的抑制，半衰期短以及工艺要求的温度和 pH 不在酶反应的最适温度和 pH 范围内等缺陷而限制了该酶的应用范围。耐热碱性脂肪酶的研究在国外已有一些报道，例如日本在假单孢菌(*Pseudomonas*)、产碱杆菌(*Alcaligenes*)、腐质菌(*Humicola lanuginosa*)无色杆菌(*Achromobacter*)等微生物中筛选到有关的菌株。但我国在这方面尚属空白。因此，进一步开发这一领域的工作是十分必要的。我们首次分离到 F-1903 菌株，并研究了他的生物学特性，产酶条件及一般酶学性质。

材料和方法

(一) 培养基

1. 斜面培养基(%)：蛋白胨 0.5、酵母浸出汁 0.5，可溶性淀粉 0.5，K_2HPO_4 0.1，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02，pH8.0，1kg/cm² 灭菌 25 分钟。

2. 色素脂肪分离培养基(%)：(1)葡萄糖 0.2，可溶性淀粉 0.5，蛋白胨 0.5，酵母浸出汁 0.5、K_2HPO_4 0.1，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02，$NaNO_3$0.2，1kg/cm² 灭菌 25 分钟。(2)豆油 5ml，维多利亚蓝 4mg，在 60℃ 下溶解于豆油中，然后与(1)组培养基混合，分别调节 pH8.0 和 9.5，在 50℃ 下摇匀制成色素脂肪平板。

3. 摇瓶筛选培养基(%)：黄豆饼粉 2.0，玉米浆 1.0，小麦粉 1.0，K_2HPO_4 0.5，$NaNO_3$0.5，pH9.0，1kg/cm² 灭菌 25 分钟。

(二) 分离与筛选方法

1. 分离采用色素脂肪平板法。将土壤样品适当稀释，吸取一定量稀释液加入到色素脂肪平板上，35℃培养 48 小时，菌落周围产生蓝绿色圈者，表明脂肪被酶水解成脂肪酸。将菌落移至斜面培养。

2. 筛选：(1) 初筛：测定方法见文献[1]，其中不同的是以甘油三丁酸酯为底物制成

本文于 1991 年 2 月 2 日收到。
*本项目系 1989 年福建省重点科研项目。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

琼脂板两块，取同一菌株发酵液分别加入到两块琼脂板上的孔穴内，然后分别置于45℃和60℃下保温24小时，测量水解圈直径，取圈大而清晰的菌落进行复筛。(2) 复筛：酶活力采用 NaOH 定量测定法[1]，其中不同的是酶水解温度54℃维持10分钟。酶活力计算是将样品所消耗的 NaOH 毫升数减去对照毫升数之差，乘以50，再乘以稀释倍数。

结果和讨论

(一) 野生型菌株的筛选

通过色素脂肪培养基平板分离，获得细菌724株，经摇瓶初筛，其中能产碱性脂肪酶的菌株532株，占总测试菌株的70%以上。从福建省土壤样品中筛选到耐热碱性脂肪酶产生菌16株。分离获得的产酶菌株，不同地区酶活力分布不同，武汉地区分离的菌株96%酶活力在5—50u/ml，4%在50—100u/ml；福建地区酶活力5—100u/ml，占42%；100—150u/ml，占31%。

经多次复筛，编号为F-1903是一株能产生作用温度高的碱性脂肪酶菌株，其酶活较强，达180—200u/ml。该菌经中国科学院微生物研究所鉴定系醋酸钙不动杆菌（*Acinetobacter calcoaceticus*）。

(二) F-1903菌的形态、生理特性

1. 形态：菌体通常为近似于球形的短粗杆菌，6—12小时呈球形、短杆形并存，24小时以后呈球形，并成短链状(见图1)，无鞭毛，没有芽孢，革兰氏阴性；菌落圆形，直径在

表1 F-1903生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of F-1903

生理生化反应 Physiological and biochemical reaction	结果 Results
生长温度和pH范围 The range of growth temperature and pH	28℃—32℃生长良好，pH6—10生长良好 Excellent growth between 28℃—32℃ and pH6—10
油脂水解 Fat hydrolysis	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	水解能力很差 Slowly hydrolysis
明胶水解 Gelatin hydrolysis	水解速度慢 Slowly hydrolysis
葡萄糖发酵 Oxidation-fermentation	产酸量少，不产气 Trace of acid production, no gas production
吲哚试验 Indole production	−
H_2S 试验 H_2S production	−
硝酸盐还原 Nitrate reduction	−
酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	−
甲基红试验 Methyl red test	+

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.0—3.5mm，低凸起，表面光滑，有光泽，不透明，粘性。

2. 生理特性：见表 1。

（三）产酶条件

产酶条件试验中的培养条件与初筛培养条件相同。采用斜面培养 20 小时制备的菌悬液（约 1×10^{10} 个/ml），接种量为 4%（v/v）。试验中以摇瓶发酵培养基为基础培养基，在 250ml 三角瓶中装量 25ml。

1. 氮源：在基础培养基中加入折算纯氮量相同的有机氮代替黄豆饼粉及无机氮源代替 $NaNO_3$，结果如表 2 所示。有机氮源以黄豆饼粉、无机氮源以 $NaNO_3$ 的酶活最高，其次是尿素。

2. 碳源：以折算纯碳量相同的碳源代替基础培养基中的小麦粉，试验结果见表 3。

3. 培养基起始 pH：用 HCl 和 NaOH 调

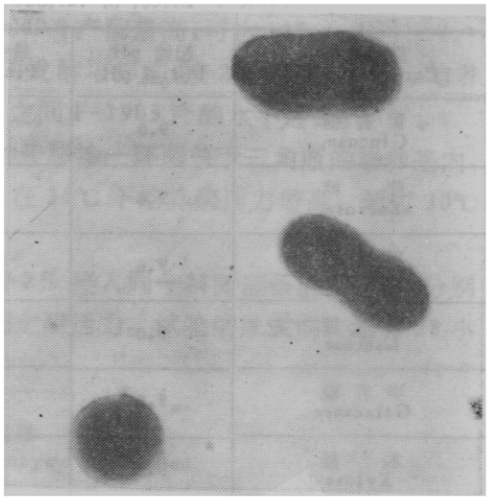

图 1　F-1903 细胞培养 10 小时（×20000）
Fig. The cells of the strain F-1903 Culture for 10h (20000)

表 2　氮源对产酶的影响
Table 2　Effect of various nitrogen compounds on enzyme production

氮源种类 Nitrogen sources	起始 pH Initial pH	最终 pH Final pH	生物量(湿重) Biomass (g/100)	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
黄豆饼粉 Soy bean cake meal	9.0	8.5	10.0	180
花生饼粉 Peanut cake meal	9.0	7.9	8.0	120
酵母粉 Yeast powder	9.0	7.8	8.5	135
蛋白胨 Peptone	9.0	7.8	8.1	160
牛肉膏 Beef extract	9.0	7.9	8.4	140
硝酸钠 $NaNO_3$	9.0	8.5	10.1	180
硫酸铵 $(NH_4)_2SO_4$	9.0	6.1	6.5	105
尿素 Urea	9.0	8.4	7.1	165
硝酸铵 NH_4NO_3	9.0	8.1	7.8	160
氯化铵 NH_4Cl	9.0	6.7	8.6	125
磷酸氢二铵 $(NH_4)_2HPO_4$	9.0	7.0	8.6	158

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

表3 碳源对产酶的影响

Table 3 Effect of various carbohydrates on enzyme production

碳源种类 Carbohydrates	起始 pH Initial pH	最终 pH Final pH	生物量(湿重) Biomass (g/100)	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
葡萄糖 Glucose	9.0	6.0	7.1	75
蔗糖 Sucrose	9.0	7.1	7.8	120
麦芽糖 Maltose	9.0	6.9	7.7	33.5
乳糖 Lactose	9.0	6.9	7.4	60
半乳糖 Galactose	9.0	6.0	8.1	70
木糖 Xylose	9.0	6.0	5.8	65
果糖 Fructose	9.0	7.2	10.1	140
甘露糖 Mannose	9.0	6.7	8.8	104
糊精 Dextrin	9.0	8.5	10.2	135
可溶性淀粉 Soluble starch	9.0	8.0	8.5	140
小麦粉 Wheat flour	9.0	8.5	10.7	185
大米粉 Rice meal	9.0	7.4	7.7	60
玉米粉 Corn meal	9.0	7.8	7.9	155

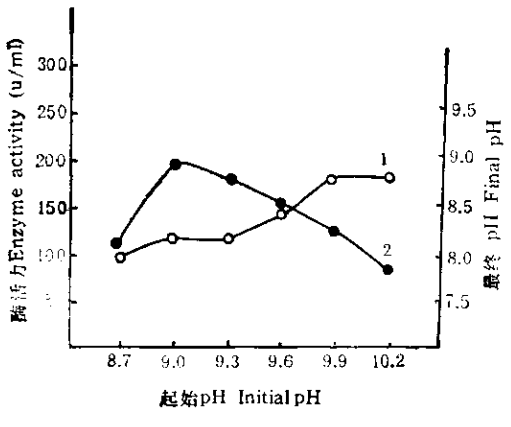

图2 pH 对产酶的影响

Fig. 2 Effect of initial pH on the enzyme production

1. pH; 2. 酶活力 Activity

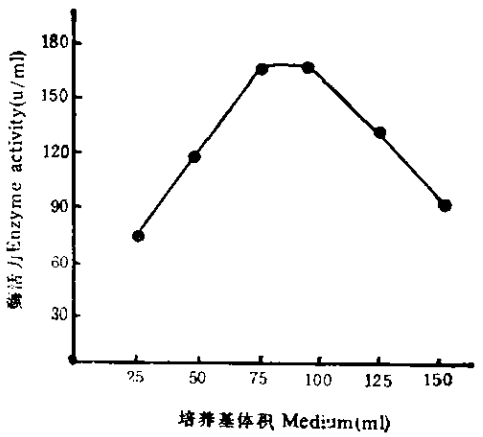

图3 通氧量对产酶的影响

Fig. 3. Effect of aeration rate on the enzyme production

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

节发酵培养基的 pH，灭菌后用同一制备的菌悬液接种，振荡培养后，测定发酵液的酶活力。试验结果如图 2 所示。F-1903 培养基起始 pH9.0 产酶最高，可达 195u/ml。

4. 通氧量：采用 500ml 三角瓶，装入不同量的发酵培养基，按 2% 菌悬液接种，培养后测定发酵液酶活，图 3 表明，装量为 75—100ml 之间 F-1903 产酶水平最高。

5. 培养温度：每次采用培养 20 小时的斜面种子移接一环菌苔于三角瓶的培养基内，不同温度下振荡培养后测定酶活力，结果见图 4，在 26℃ 下培养酶活力最高，超过 30℃ 以上，酶活力显著降低。

6. 产酶时间：在同一装量的发酵培养基中，按 2% 接入同一斜面制备的菌悬液，分别振荡培养 24、26、28、30、32 和 36 小时，取发酵液测定酶活力。试验结果表明，培养 28 小时产酶量最高(表 4)。

表 4　产酶时间过程

Table 4　The time course of enzyme production

培养时间 Cultural time (h)	22	24	26	28	30
起始 pH Initial pH	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
酶活力 Enzyme activity (u/ml)	80	110	155	185	145
最终 pH Final pH	7.2	7.6	7.8	8.2	8.5

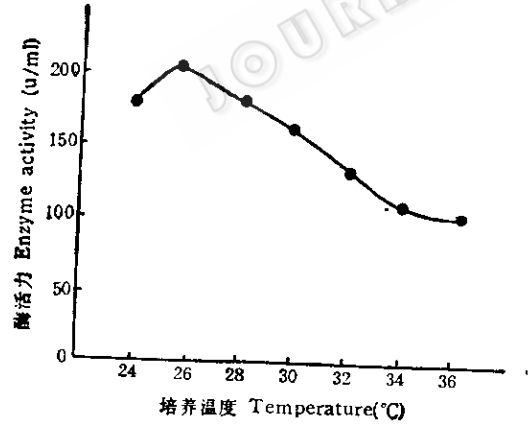

图 4　培养温度对产酶的影响

Fig. 4　Effect of cultural temperature on the enzyme production

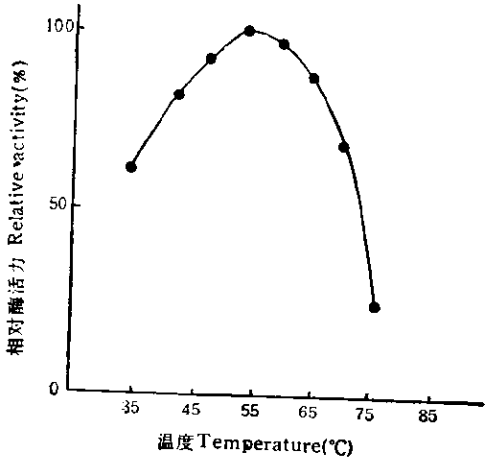

图 5　温度对酶活力的影响

Fig. 5　Effect of temperature on the enzyme activity

(四) 酶的性质

1. 酶反应的最适温度：在 35℃—75℃ 不同温度下测定酶活力，结果见图 5。在 54℃ 对酶活力最高。

2. 酶的热稳定性：分别取稀释后的酶液 1ml 加入到反应体系中，置于不同温度的恒

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

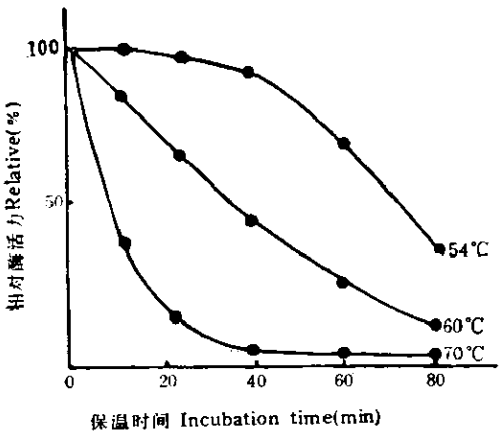

图6 温度对酶稳定性的影响
Fig. 6 Effect of temperature on the enzyme stability

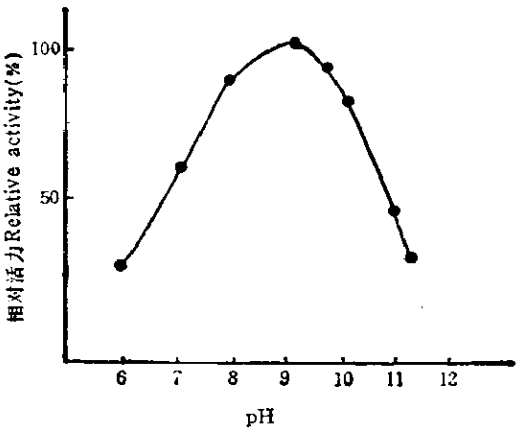

图7 pH对酶活力的影响
Fig. 7 Effect of pH on the enzyme activity
pH5.0 缓冲液用 0.1mol/L 柠檬酸和 2mol/L Na_2HPO_4 配成；pH6.0—8.0 的缓冲液用 0.05mol/L KH_2PO_4 和 NaOH 配成；pH9.0—12.0 的缓冲液用 0.05mol/L 甘氨酸和 NaOH 缓冲液配成。
pH5 buffer was made by 0.1mol/L citric acid and 0.2mol/L Na_2HPO_4; pH6—8 by 0.05mol/L KH_2PO_4 and NaOH; pH9—12 buffer by 0.05mol/L glycocoll and NaOH.

温水浴中处理，每隔 20 分钟取样，迅速冷却，测定残余酶活力(用未经处理的酶液作对照)。结果(图 6)表明，由 F-1903 产生的脂肪酶在 54℃ 80 分钟仍保持 40% 的活力，70℃ 严重失活。

3. 酶反应的最适 pH：在反应体系中加不同 pH 缓冲液(橄榄油乳化液也用相应 pH 缓冲液制备)，54℃ 反应 10 分钟，取样测定酶活力。该酶最适反应 pH 为 9.2(图 7)。

4. 酶的 pH 稳定性：在各试验管内加入酶液 2ml，分别加入等量前述不同 pH 缓冲液，置 4℃ 冰箱 24 小时，用甘氨酸和 NaOH 缓冲液稀释 10 倍，并使 pH 调回到 9.2，各取 1ml 稀释液，置 54℃ pH9.2 条件下测定酶活力，结果由 F-1903 产生的脂肪酶在 pH7.5—10.5 是稳定的(图 8)。

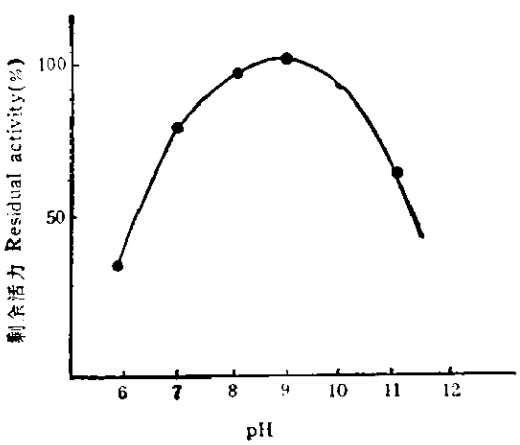

图8 酶的 pH 稳定性
Fig. 8 Stability of enzyme at different pH values

5. 金属离子对酶活性的影响：将表 5 中的 10 种无机盐类以一定量加入到酶反应系统中测定对酶活力的影响。试验结果(表 5)说明，Ca^{2+} 对酶有一定的激活作用，Na^+ 对酶活无影响，EDTA 有抑制作用，表 5 中的金属离子对酶都有不同程度抑制

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表5　金属离子对酶活性的影响

Table 5　Effect of various metal ions on enzyme activity

金属盐* Metallic salt	相对酶活 Relative activity (%)
None	100.0
NaCl	100.0
KCl	66.7
$CaCl_2$	111.0
$MgSO_4$	44.4
$FeSO_4$	22.2
$BaCl_2$	66.7
$ZnSO_4$	4.4
$MnCl_2$	11.1
$CuSO_4$	22.2
EDTA	66.7

* Conc: 10^{-3} mol/L

作用，它们抑制顺序为 Zn^{2+}、$Mn^{2+} > Fe^{2+}$、$Cu^{2+} > K^+$、Ba^{2+}、Mg^{2+}。

参　考　文　献

[1] Nakamura, M. et al.: 武田研究所报 35:1, 1976。

[2] 施巧琴：微生物学通报，8(3)：108，1981。

[3] Gisela, K. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(1):211, 1987.

[4] Stead, D.: *J. Dairy Res.*, 51: 123, 1984.

[5] Roy, R. N.: *J. Appl. Bact.*, 49:265, 1980.

[6] Speck, M. L. et al.: *J. Dairy Sci.*, 59:786, 1976.

[7] Aisaka, L.: *J. Biochem.*, 89(3): 817, 1981.

[8] Ainma, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 36:893, 1972.

STUDIES ON THERMOSTABLE ALKALINE LIPASE IN *ACINETOBACTER CALCOACETICUS*

Shi Qiaoqin　Chen Ruoyin　Xu Qingyi　Wu Songgang

(Institute of Microbiological Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou 350007)

A bacteria strain F-1903 was isolated from Fujian province soil, which produced alkaline lipase with high activity and high activiting temperature.

The medium for the strain to produce lipase was composed of (%): soy bean meal 2.0, corn-steep liquor 1.0, dextrin 1.0, K_2HPO_4 0.5, $NaNO_3$ 0.5. The optimal conditions for lipase production were initial pH 7.0, culture temperature 26°C for 28h.

The enzyme activity is optimal at pH 9.2 and at 54°C, which was increased by Ca^{2+}, while inhibited by EDTA.

Key words　*Acinetobacter calcoaceticus*; Thermostable alkaline lipase

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn