

## 烟色红曲霉耐热解脂酶的形成及特性\*

刘光桦 卢世珩 江跃林 吴衍庸

(中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

**摘 要** 烟色红曲霉 (*Monascus fuliginosus*) M-101 菌株经麦麸固态培养生成耐热脂肪酶和酯酶。产酶的适宜条件为: 培养温度 30℃, 初始 pH 3.0—3.5, 麸曲初始含水量 75%。培养 4—5 天后, 脂肪酶活力可达 207u/g, 酯酶活力达 14.6u/g。粗酶试验表明, 脂肪酶和酯酶的最适反应温度为 50℃, 脂肪酶最适反应 pH 为 6.0, 酯酶最适反应 pH 为 6.8。酯酶耐热性略高于脂肪酶, 在 55℃ 处理 1 小时和 45℃ 处理 24 小时, 两种酶活力基本不变。

**关键词** 烟色红曲霉, 耐热解脂酶

红曲霉用于生产食用色素, 也可作为糖化酶制剂的生产菌种。早期研究发现泸型酒大曲中有红曲霉存在, 一般认为红曲霉在曲酒酿造中起糖化作用。近年来我们发现泸型红曲霉可催化己酸乙酯合成, 因而还具有窖内生香的功能<sup>[1]</sup>。据文献报道, 短碳链香酯的生物合成与解脂酶——脂肪酶和酯酶有关<sup>[2-4]</sup>。本文报道泸型红曲霉 M-101 菌株脂肪酶和酯酶的生成条件及特性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌种

试验菌株 M-101, 由本组从名优曲酒厂大曲中分离, 鉴定为烟色红曲霉 (*Monascus fuliginosus*)。

#### 1.2 培养基和培养方法

斜面培养基为麦芽汁琼脂, 产酶培养采用麦麸固体培养基。将菌种接入麦芽汁琼脂于 32℃ 培养 2 天后, 转入麦麸固体培养基, 在 32℃ 培养 4—5 天。

#### 1.3 粗酶制备

成熟麸曲经通风干燥后, 用 10 倍量 (V/W) pH6.4、0.05mol/L 磷酸缓冲液于室温浸提 6 小时。过滤收集滤液, 于 6000r/min 离心 15 分钟, 将上清液用 60% 饱和度  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  盐析过夜, 于 13000r/min 离心 20 分钟, 将沉淀溶解于少量蒸馏水中, 透析脱盐后即为粗酶液, 可用作酶的一般特性研究。产酶条件试验时麸曲也可不风干, 用 5 倍量 (V/W) 蒸馏水浸提, 离心后测定解脂酶活力。

#### 1.4 酶活力测定

\* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1993 年 9 月 28 日收到。

用橄榄油作底物测定脂肪酶活力,反应按改进山田法进行<sup>[5]</sup>。在规定的实验条件下,每分钟释放出  $1\mu\text{mol}$  游离脂肪酸所需酶量定为一个脂肪酶活力单位。

酯酶测定参照 Westlake 的方法<sup>[6]</sup>,将含  $1\text{ mmol/L}$  对硝基苯乙酸酯的磷酸缓冲液 ( $0.05\text{ mol/L}$ ,  $\text{pH}6.4$ )  $2.3\text{ ml}$  和粗酶液  $0.2\text{ ml}$  混合,置  $50^\circ\text{C}$  水浴中振荡反应 10 分钟,释放出的对硝基苯酚用分光光度计在  $405\text{ nm}$  处测定。在反应条件下,每分钟释放出  $1\mu\text{mol}$  对硝基苯酚定为一个酯酶活力单位。

## 2 结果

### 2.1 M-101 菌株解脂酶的生成条件

**2.1.1 脂肪酶和酯酶的生成:** M-101 菌株在液态和固态培养基中均能旺盛生长,但仅固态培养有胞外解脂酶形成。图 1 表示麦麸培养时的产酶进程,酯酶活力在 108 小时后趋于平缓,脂肪酶则在 120 小时后达最高,培养期间酶浸出液的 pH 值变化不大。在麦麸培养基中添加三酸甘油酯类,三丁酸甘油酯对脂肪酶和酯酶生成有刺激作用,橄榄油只刺激脂肪酶生成,如表 1 所示。

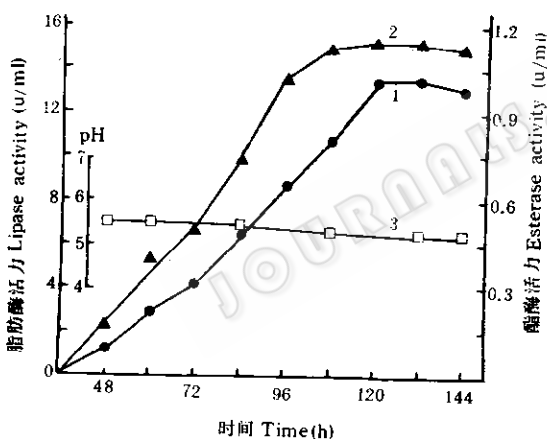


图 1 解脂酶生成的时间过程

Fig. 1 Time course of lipolytic enzyme production

1. Lipase activity;
2. Esterase activity;
3. pH.

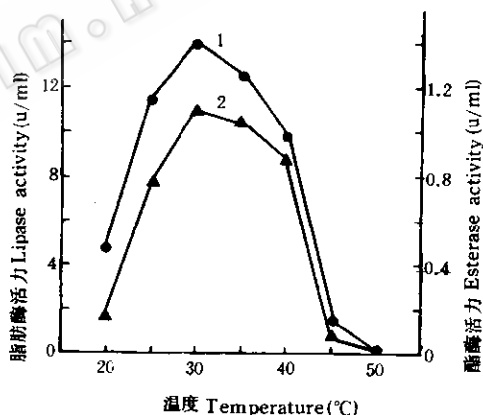


图 2 温度对解脂酶生成的影响

Fig. 2 Effect of temperature on lipolytic enzyme production

1. Lipase activity;
2. Esterase activity.

**2.1.2 温度对解脂酶生成的影响:** 试验结果示于图 2。脂肪酶和酯酶生成的温度曲线基本一致,产酶最适温度均为  $30^\circ\text{C}$ ,适宜温度在  $28-32^\circ\text{C}$  之间。低温 ( $20^\circ\text{C}$ ) 下菌株生长缓慢,只有少量酶生成,超过  $45^\circ\text{C}$  不生长,说明 M-101 菌株为典型中温菌。

**2.1.3 培养基初始 pH 的影响:** 试验 pH 范围为  $3.0-8.0$ 。产酶结果为: 初始 pH 从  $3.0$  增加到  $5.5$ ,脂肪酶生成量变化不大,继续增加 pH 值则酶生成量逐渐下降,初始 pH 为

8.0时的酶生成量为pH 5.5时的54%。酯酶的结果亦与此相似。

表 1 甘油三酯对解脂酶生成的影响

Table 1 Effect of triglycerides on lipolytic enzyme production

甘油三酯 Triglycerides (0.5%)	脂肪酶活力 Lipase activity (u/g)	酯酶活力 Esterase activity (u/g)
橄榄油 Olive oil	168	7.6
三丁酸甘油酯 Tributyrin	176	12.1
大豆油 Soya oil	122	9.9
菜籽油 Rape seed oil	120	9.6
不加 None	156	9.8

2.1.4 麸曲含水量的影响：用测定干燥麸曲酶活力的方法比较培养基水份含量对解脂酶生成的影响。麦麸和水的重量比分别为1：0.5、1：0.8、1：1、1：1.5和1：2。M-101菌株脂肪酶和酯酶的生成随水份增加而增加，基质和水份比为1：2（含水量75%）的脂肪酶生成量较1：0.8（含水量53%）的生成量增加2.4倍，酯酶生成量也增加1倍。表明M-101菌株生长和产酶需要较多水份。

2.1.5 通气量的影响：水份增加会使固体培养基通透性减小，氧含量降低。M-101菌株需较多水份说明其对氧的需求不高。为确定通气量对解脂酶生成的影响，用500ml三角瓶装入数量不等的培养基以控制通气量。培养结果说明M-101菌株生成解脂酶时，对通气量无严格要求。基质量40g—80g，酯酶活力基本一致，继续增加基质用量则酶生成下降。脂肪酶生成规律与酯酶相似，但基质用量少时脂肪酶生成量反而略低，如表2所示。

表 2 基质用量对解脂酶生成的影响

Table 2 Effect of substrate amount on lipolytic enzyme production

基 质 用 量 Substrate amount (g)	40	50	60	70	80	90
脂肪酶活力 Lipase activity (u/ml)	11.0	11.3	12.8	13.7	12.5	10.0
酯酶活力 Esterase activity (u/ml)	0.99	0.95	0.93	0.93	0.95	0.80

2.2 M-101 菌株解脂酶的特性

2.2.1 反应温度对解脂酶活力的影响：试验温度范围为25—70℃，M-101菌株脂肪酶和酯酶的最适反应温度均为50℃。酯酶温度反应范围较宽，其温度反应曲线较为平缓；脂肪酶的温度范围较窄，其温度曲线较为陡峭，说明两种解脂酶对温度的反应有一定差异（图3）。

2.2.2 解脂酶的热稳定性：酶液在不同温度水浴中分别处理1小时和24小时，再在

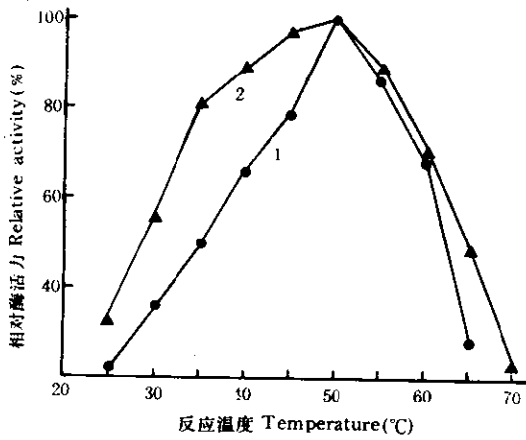


图3 反应温度对解脂酶活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature on lipolytic enzyme activity  
1. Lipase activity;  
2. Esterase activity.

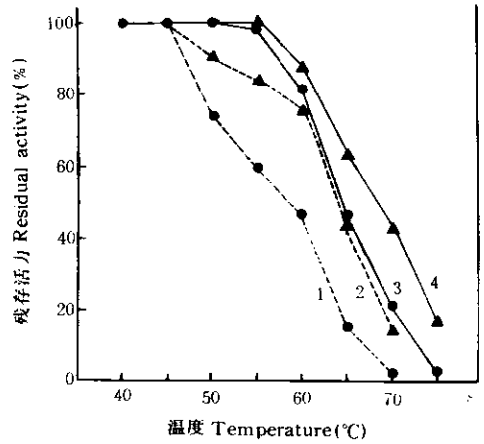


图4 解脂酶的热稳定性

Fig. 4 Thermostability of lipolytic enzymes  
(—: Treated for 1 h; ---: Treated for 24 h)  
1, 3. Lipase activity;  
2, 4. Esterase activity.

50℃测定残存活力，结果示于图4。酶液在40—55℃保温1小时，脂肪酶和酯酶活力基本无损失；65℃处理1小时，两种酶的活力都保存60%左右。酶液在40℃和45℃处理24小时，两种酶的活力都保存100%，在60℃处理24小时，酯酶活力保存75%，而脂肪酶的活力仅保存50%。显示二者均有较高的耐热性，但酯酶的耐热性高于脂肪酶。

**2.2.3 pH 对解脂酶活力的影响：**pH 值从4.0—5.5，采用 McIlvaine 缓冲液，pH 值为5.5—8.5，用磷酸缓冲液调节，浓度均为0.1 mol/L。结果显示两种酶对pH的反应有显著差异。脂肪酶的pH范围宽，在整个试验pH范围内均显示活力，其最适pH为6.0；酯酶的pH反应范围狭窄，最适pH为6.8。pH值从6.4—6.8仅上升0.4，酯酶活力却相差60%以上，如图5所示。

**2.2.4 解脂酶的pH稳定性：**各种pH值的含酶缓冲液在4℃保存24小时后，分别在pH6.0和6.8测定残存脂肪酶和酯酶的活力。脂肪酶在pH3.5—7.5间、酯酶在4.5—7.5保存100%酶活力。

### 3 讨论

红曲霉 M-101 菌株脂肪酶最适反应温度为 50℃，较 Samad 的嗜热根霉 (*Rhizopus rhizopodiformis*) 脂肪酶 (45℃) 略高<sup>[8]</sup>，但低于 Arima 分离的嗜热羊毛状腐质霉 (*Humicola lanuginosa*) (60℃)<sup>[9]</sup>；其耐热性与前者相似并高于后一种脂肪酶。霉菌是商品脂肪酶制剂的主要来源，但大多数霉菌只生成中温脂肪酶<sup>[10]</sup>。因而 M-101 菌株耐热脂肪酶在酶制剂工业上具有应用前景。另据报道，米黑毛霉 (*Mucor miehei*) 和黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 等也同时生成脂肪酶和酯酶，用于食品增香时两种酶的组成比例对

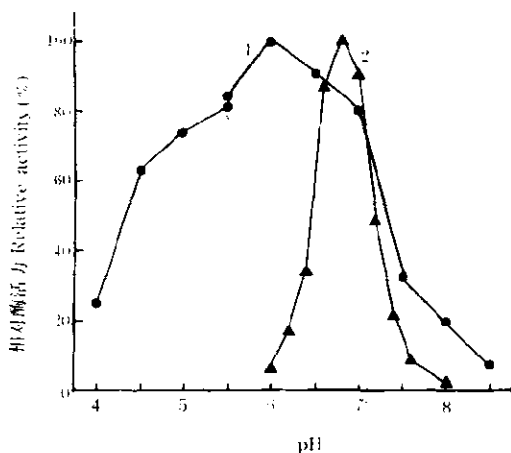


图5 pH对解脂酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on lipolytic enzyme activity

1. Lipase activity;
2. Esterase activity.

食品风味影响极大<sup>[7]</sup>。红曲霉 M-101 菌株的两种解脂酶的组成比例在曲酒成香中是否也起到类似作用, 有待研究。

### 参 考 文 献

- [1] 吴衍庸, 郭世则, 卢世珩, 等. 食品与发酵工业, 1990, 5: 1—3.
- [2] 陈思斌, 肖熙佩. 酵母生物化学, 济南: 山东科学技术出版社, 1990. 292—306.
- [3] Langrand G, Rondot C, Triantaphylides C *et al.* *Biotechnol Lett*, 1990, 12 (8): 581—586.
- [4] Schermers H, Duffus J, Macleod A. *J Inst Brew*, 1976, 82: 170—174.
- [5] 山田浩一, 町田晴夫. 日本农芸化学会誌, 1962, 36: 858—864.
- [6] Westlake K, Mackie R, Dutton M. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53 (3): 587—592.
- [7] Feldman L, Dooley J. US Patent, December 27, 1977, 4, 065, 580.
- [8] Samad M, Salleh A, Razak C *et al.* *World J Microbiol Biotech*, 1990, 6 (4): 390—394.
- [9] Arima K, Liu W, Beppu T. *Agric Biol Chem*, 1972, 36: 1913—1917.
- [10] Ota Y. Lipases in Microorganisms. In: Laskin A I ed. *CRC Handbook of Microbiology*. 2nd ed. Florida: CRC Press Inc, 1987. 8: 285—294.

## PRODUCTION AND CHARACTERISTICS OF THERMOSTABLE LIPOLYTIC ENZYMES FROM *MONASCUS FULGINOSUS*

Liu Guangye Lu Shiheng Jiang Yuelin Wu Yanyong

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610041)

**Abstract** Thermostable lipase and esterase were produced by *Monascus fuliginosus* strain M-101 in solid-state fermentation. The optimal conditions for enzyme production were incubation temperature of 30°C, initial pH value of 3.0 to 5.5, moisture level of 75% and incubation time of 4 to 5 days. The yield of lipase and esterase was 207 u/g and 14.6 u/g, respectively. Assay of the crude enzyme showed that optimal temperature for lipase and esterase was 50°C, but maximum activity of lipase occurred at pH 6.0 and esterase at pH 6.8. Both enzymes almost retained 100% activity after treated at 55°C for 1 hour and 45°C for 24 hours.

**Key words** *Monascus fuliginosus*, Thermostable lipolytic enzymes