

# 合成己酸乙酯脂肪酶产生菌的筛选及产酶条件

卢世珩 刘光烨 江跃林 黄德英 吴衍庸

(中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

**摘要** 从27株脂肪酶产生菌中筛选到能由乙醇和己酸合成己酸乙酯的菌株8株。其中 *Rhizopus* sp. H-3 菌株脂肪酶活力为50—60u/ml, 全细胞在有机溶剂中的酯化率可达己酸的91%。H-3产酶的最适碳源为淀粉或葡萄糖。6%黄豆饼粉加4%蛋白胨复合氮源有利于酶活力的增加。

**关键词** 脂肪酶, 酯化, *Rhizopus* sp. H-3

从本世纪初发现微生物脂肪酶以来, 该酶已成为酶工业生产的主要产品之一。目前脂肪酶的逆反应酯化的研究已显示出潜力, 它不但可催化合成甘油脂肪酸酯, 而且还能合成其它酯类<sup>[1]</sup>。在浓香型曲酒酿造的特定环境下, 各种芳香酯类的形成与微生物酯酶的作用有关<sup>[2]</sup>。本文报道合成浓香型酒主体香味己酸乙酯的脂肪酶产生菌 H-3 的分离筛选及其产酶条件的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

从国内各名优白酒厂的酒曲和窖泥中分离的菌株以及我所原保存的部分菌株进行筛选。从北方某酒厂酒曲中, 分离到一株菌产酶活性高, 合成己酸乙酯能力强, 作供试菌。

### 1.2 分离培养基及方法

**1.2.1 细菌分离:** 培养基(%) : 蛋白胨 1.5, 酵母膏 0.5, NaCl 0.5, 10%三丁酸甘油酯乳化液 4, 琼脂 1.5, pH7.0—7.5, 1kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 30分钟。平板分离, 32—34℃培养 2—5天, 挑取周围透明圈较大的单菌落。

**1.2.2 霉菌及酵母分离:** 用麦芽汁琼脂培养基, 平板分离, 28℃培养 2—3天, 挑取单菌落。

### 1.3 筛选培养基及方法

**1.3.1 细菌培养基**用营养肉汁, 旋转式摇床 150r/min、32—34℃培养 48小时, 6000r/min

离心, 上清液(即酶液)供测定。

**1.3.2 霉菌及酵母初筛培养基(%) :** 黄豆饼粉 2, 蛋白胨 1, 可溶性淀粉 1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1, pH5.0—6.0 旋转式摇床 150r/min 28℃培养 66小时, 以同样的方法取上清液供测定。

**1.3.3 初筛:** 采用琼脂平板透明圈法: 用3%聚乙烯醇(PVA-124, 日本进口分装)溶液制备含100g/L三丁酸甘油酯的乳化液。在225ml Tris-HCl缓冲液(pH8.0)中加三丁酸甘油酯乳化液 25ml 和 1.2%琼脂, 1kg/cm<sup>2</sup> 20分钟灭菌。在无菌的平皿中倒入上面的热溶液, 凝固后, 打出直径7mm小孔, 注入50μl的酶液, 32℃保温 24小时。测定透明圈大小, 取圈大清晰者进行复筛。

### 1.4 脂肪酶活力测定方法

用橄榄油乳化液法测定。一个酶活单位是在pH7.0、37℃条件下, 每分钟释放1mmol游离脂肪酸的量<sup>[3]</sup>。

### 1.5 菌体干重测定

菌体由发酵液离心得到, 有蒸馏水洗涤, 105℃烘干, 称重。

### 1.6 合成己酸乙酯能力的筛选

选具脂肪酶活力的菌株的酶液和全细胞进行酯化。酯化反应在带玻璃塞的容器中进行, 温

度 33—34℃。反应完成后,加入适量的丙酮-乙醇(1:1V/V)混合液终止反应。用 0.1mol/L NaOH 溶液滴定合成反应中消耗的脂肪酸量,计算酯化率<sup>[4]</sup>。

1.7 酯化产物己酸乙酯的测定:用 SC-6 型气相色谱仪测定。氢焰检测, H<sub>2</sub> 流速 40ml/min, 空气流速 50ml/min, 载气 N<sub>2</sub> 1.8kg/cm<sup>2</sup>, 柱温 100℃, 用乙酸正丁酯作内标, 误差 5%。

## 2 结果和讨论

### 2.1 产酶菌株的分离和筛选

共分离和收集到霉菌 30 株、酵母菌 10 株和细菌 35 株。用透明圈法初筛, 得到具有脂肪酶活力的霉菌 17 株、酵母菌 2 株和细菌 8 株。经复筛后, 选脂肪酶活力较高的菌株测定其合成己酸乙酯的能力。

### 2.2 合成己酸乙酯菌株的确认

2.2.1 酶液对己酸乙酯的合成: 乙醇和己酸的加量分别为 1.37mol/L 和 0.08mol/L, 34℃ 酯化 7 天。产物用气相色谱仪测定 (图 1)。

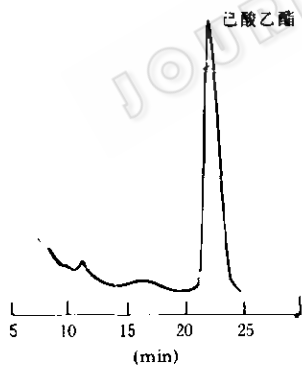


图 1 H-3 菌株合成的己酸乙酯色谱图

从表 1 可以看出, 除白地霉外, 大多数霉菌能合成己酸乙酯, 其中根霉, 红曲霉中具有合成能力的菌株多, 且合成能力较强。白地霉 AS.2361, Ge-1 的酶活分别为 112.5u/ml, 16.0u/ml, 但它们不能合成己酸乙酯。两株酵母和三株细菌的酶活力低, 同时也不能合成己

酸乙酯。

表 1 合成己酸乙酯的脂肪酶产生菌

菌株	脂肪酶活力 (u/ml)	己酸乙酯含量 (mg/L)
<i>Monascus</i> sp. M-108	2.40	492.15
<i>Monascus</i> sp. M-109	2.50	762.35
<i>Rhizopus</i> sp. H-1	14.50	263.72
<i>Rhizopus</i> sp. H-2	20.00	793.80
<i>Rhizopus</i> sp. H-3	15.00	759.90
<i>Rhizopus</i> sp. H-5	11.50	359.69
<i>Aspergillus</i> sp. A-3	0.25	411.43
<i>Aspergillus</i> sp. A-4	0.25	0
<i>Geotrichum</i> sp. AS 2.361	112.50	0
<i>Geotrichum</i> sp. Ge-1	16.00	0
<i>Mucor</i> sp. Mu-14	0.38	344.99
<i>Saccharomyces</i> sp. Y-1	1.75	0
<i>Saccharomyces</i> sp. Y-3	1.25	0
<i>Bacillus</i> sp. B-3	1.25	0
<i>Bacillus</i> sp. B-5	1.50	0
<i>Bacillus</i> sp. B-7	0.75	0

2.2.2 全细胞催化酯合成: 选己酸乙酯合成能力强的菌株的全细胞, 在有机溶剂中进行乙醇和己酸的酯化。加 0.5mol/L 乙醇, 0.25mol/L 己酸, 干细胞用量 0.5g, 34℃ 酯化 72 小时终止反应, 测酯化率 (表 2)。

表 2 全细胞在有机相中对乙醇和己酸的酯化

菌株	酯化率 (%)
M-108	43.75
M-109	50.00
H-2	90.41
H-3	91.78
Mu-14	35.13

全细胞在有机相中的酯化率较高, 有的菌株可达 90% 以上, 说明有机相有利于合成反应的进行。

综合上面的实验, 我们选取了生长快、脂

肪酶活性高, 酶液及全细胞催化合成己酸乙酯能力强的菌株 *Rhizopus* sp. H-3, 作培养条件对产酶及菌体生长影响的试验。

### 2.3 培养条件对菌株 H-3 的影响

**2.3.1 氮源:** 以筛选培养基为基础, 改变其氮源, 加量 2%。结果表明, 豆饼粉和蛋白胨有利于产酶, 尿素对产酶及菌体生长均不利(表 3)。

表 3 氮源对产酶及菌体生长的影响

氮源	脂肪酶活力 (u/ml)	菌体干重 (mg/ml)
蛋白胨	6.0	5.50
黄豆饼粉	8.5	8.50
酵母膏	2.5	6.38
尿素	0	0.25

**2.3.2 碳源:** 改变基础培养基的碳源, 加量 1%。结果表明, 糊精、蔗糖、三丁酸甘油酯不利于产酶(表 4)。

表 4 碳源对产酶及菌体生长的影响

碳源	脂肪酶活力 (u/ml)	菌体干重 (mg/ml)
淀粉	14.5	6.00
葡萄糖	19.5	8.75
糊精	4.5	6.25
蔗糖	1.0	4.13
麦芽糖	8.8	8.50
橄榄油	12.0	9.75
三丁酸甘油酯	1.4	3.13
豆油	15.0	9.50
牛油	22.0	11.13
菜油	15.0	9.13

**2.3.3 复合氮源:** 在基础培养基中, 以蛋白胨 1、2、3、4、5、6% 和黄豆饼粉 2、4、6% 组成复合氮源。以黄豆饼粉 6% 和蛋白胨 4% 的复合氮源组合最好, 发酵液脂肪酶活力可达 51.6u/ml, 菌体干重可达 26.75mg/ml。

**2.3.4 初始 pH:** 在初始 pH 不同的培养基

(%, 淀粉 1, 黄豆饼粉 6, 蛋白胨 4,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1,  $K_2HPO_4$  0.2) 中, 以初始 pH5.0—6.5 对产酶及菌体生长均较好; pH 7.0 以上, 产酶及菌体生长下降(表 5)。

表 5 初始 pH 对产酶及菌体生长的影响

初始 pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
脂肪酶活力 (u/ml)	61.3	63.8	61.9	64.4	55.0	56.0	44.0
菌体干重 (mg/ml)	27.50	28.13	32.00	27.3	24.35	15.38	16.13

**2.3.5 培养温度:** 最适培养温度为 28—30℃, 酶活可达 50—60u/ml, 菌体干重可达 26.00—27.00mg/ml。

**2.3.6 通气量:** 在 250ml 三角瓶中分别装培养液 20、30、40、50ml。结果表明, 不同通气量对酶活及菌体生长影响不大。

综上所述, 菌株 H-3 的适宜培养基 (%): 淀粉 1, 黄豆饼粉 6, 蛋白胨 4,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1,  $K_2HPO_4$  0.2 中, pH5.5—6.5。在 28—30℃、150r/min 旋转式摇床上培养, 发酵液脂肪酶活力可达 64.4u/ml, 菌体干重可达 27.30mg/ml。

有关 *Rhizopus* sp H-3 菌株脂肪酶的纯化、酶的性质及其对醇、酸的酯化, 正在进一步研究中。

### 参 考 文 献

- [1] 徐家立. 蛋白酶和脂肪酶的研究、生产和应用. 见张树政, 王修垣主编: 工业微生物学成就. 北京: 科学出版社. 1988. 82—84.
- [2] 吴衍庸等. 食品与发酵工业. 1990, 5: 1—4.
- [3] 相迟孝亮等. 黄文涛译. 酶应用手册. 上海: 上海科学技术出版社. 1989, 204.
- [4] Ibrahim C O, et al. Agric Biol Chem. 1987, 51 (8): 2153—2159.
- [5] Shelley A W. J Microb Methods. 1987, 6 (3): 123—137.

**STUDIES ON SELECTION OF LIPASE-PRODUCING MICROORGANISM  
AND LIPASE PRODUCTION AND ETHYL CAPROATE  
SYNTHESIS BY *RHIZOPUS* SP. RH-3**

Lu Shiheng Liu Guangye Jiang Yuelin Huang Deying Wu Yanyong

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

**Abstract** *Rhizopus* sp. RH-3 was found to produce large amount of lipase (50—64 u/ml). The esterification rate of its whole cells was 91% of caproic acid in organic solvent. The medium for high yield of lipase was composed (%) of soluble starch 1, defatted soybean meal 6, peptone 4,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1, and  $K_2HPO_4$  0.2.

**Key words** Lipase, Esterification, *Rhizopus* sp. RH-3