研究论文

# 非酿酒酵母菌在自然发酵过程中产脂肪酶特性

徐亚男， 李 琦， 肖 婧， 倪永清， 单春会， 史学伟*

（石河子大学 食品学院，新疆 石河子 832000）

**摘要**：通过研究新疆葡萄自然发酵过程中分离鉴定的24株酵母菌，对不同菌株的产脂能力进行研究，通过对其酶活测定得到高产脂肪酶菌株Y13。通过对其进行产脂肪酶学特性研究，利用酶学特性进一步优化发酵培养条件，得出最适培养温度为39 ℃，最适pH为7.0，$Ca^{2+}$可促进酶的发酵，最适培养时间为65 h。

**关键字**：非酿酒酵母菌；脂肪酶；酶学性质

**中图分类号**：TQ 925.6　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)09—0976—05

# Research on Characteristics of Lipase Production in Non-Saccharomyces Natural Fermentation Process

*XU Yanan*， *LI Qi*， *XIAO Jing*， *NI Yongqing*， *SHAN Chunhui*， *SHI Xuewei**

（College of Food Science，Shihezi University，Shihezi 832000，China）

**Abstract**：By studying the natural fermentation of grape Xinjiang isolation and identification of 24 yeast，lipid production capacity of different strains to study. Getting them through high-yield lipase activity measured strain Y13. Through its research capacity fat enzymatic properties，the use of enzymatic properties further optimized fermentation conditions：optimum temperature is 39 ℃，the optimum pH is 7.0，$Ca^{2+}$ can promote enzyme fermentation，the optimal incubation time is 65 h.

**Keywords**：non-saccharomyces，lipase，enzymatic properties

非酿酒酵母是一类自然存在于葡萄酒发酵过程中的微生物，其代谢物对酒的香气、风味等感官特征有很重要的影响[1]。酿酒酵母和非酿酒酵母都参与酒精发酵过程，其中非酿酒酵母的脂肪酶产量高于酿酒酵母[2]，通常都是在发酵初期存在。脂肪酶是重要的工业酶制剂品种之一[3]，可以催化解脂、酯交换、酯合成等反应，广泛应用于油脂加工、食品、医药、日化等工业。不同来源的脂肪酶具有不同的催化特点和催化活力。脂肪酶可以降解来自葡萄和酵母菌自溶的脂质，释放脂肪酸来改善葡萄酒的品质[4]。葡萄酒生产中常用的脂肪酶多是来源于细菌或者丝状真菌，但是其通常是不确定的复杂的酶的混合物，对葡萄酒可能存在某些不利影响。脂肪酶是一种特殊的酯键水解酶[5]，它可作用于甘油三酯的酯键，使甘油三酯降解为甘油二酯、单甘油酯、甘油和脂肪酸。目前国内外对野生微生物脂肪酶的研究与开发较为活跃。脂肪酶可以应用于生产生活的各个方面[6]，尤其在新疆葡萄酒的生产中有着广泛

**收稿日期**：2013-12-02

**基金项目**：兵团青年创新基金项目(2013CB011)；兵团工业科技攻关项目(P20136500002-1146)。

* **通信作者**：史学伟(1980—)，男，甘肃会宁人，工学博士，主要从事食品生物技术研究。E-mail：shixuewei226@126.com

的应用，脂肪酶作用后释放出的链较短的脂肪酸，增加和改进食品的风味和香味，可以增进葡萄酒的香气成分，改善酒的品质，因此对脂肪酶的特性的研究十分必要。

作者通过对非酿酒酵母中高产脂肪酶菌株的筛选、酶活测定，最终得到高产脂肪酶菌株 Y13。此研究为提高果酒品质奠定了基础，并对丰富酿造果酒菌种资源及扩大果酒市场占有率具有重要的推动作用。因此研究非酿酒酵母菌在新疆葡萄自然发酵过程中产脂肪酶特性亦十分有必要。

## 1 试验材料

### 1.1 菌种及试剂

实验室保藏的 24 株酵母菌株，其生长发育树见图 1。

本试验所使用化学试剂均为色谱纯及分析纯，由天津市巴斯夫化学试剂厂生产。

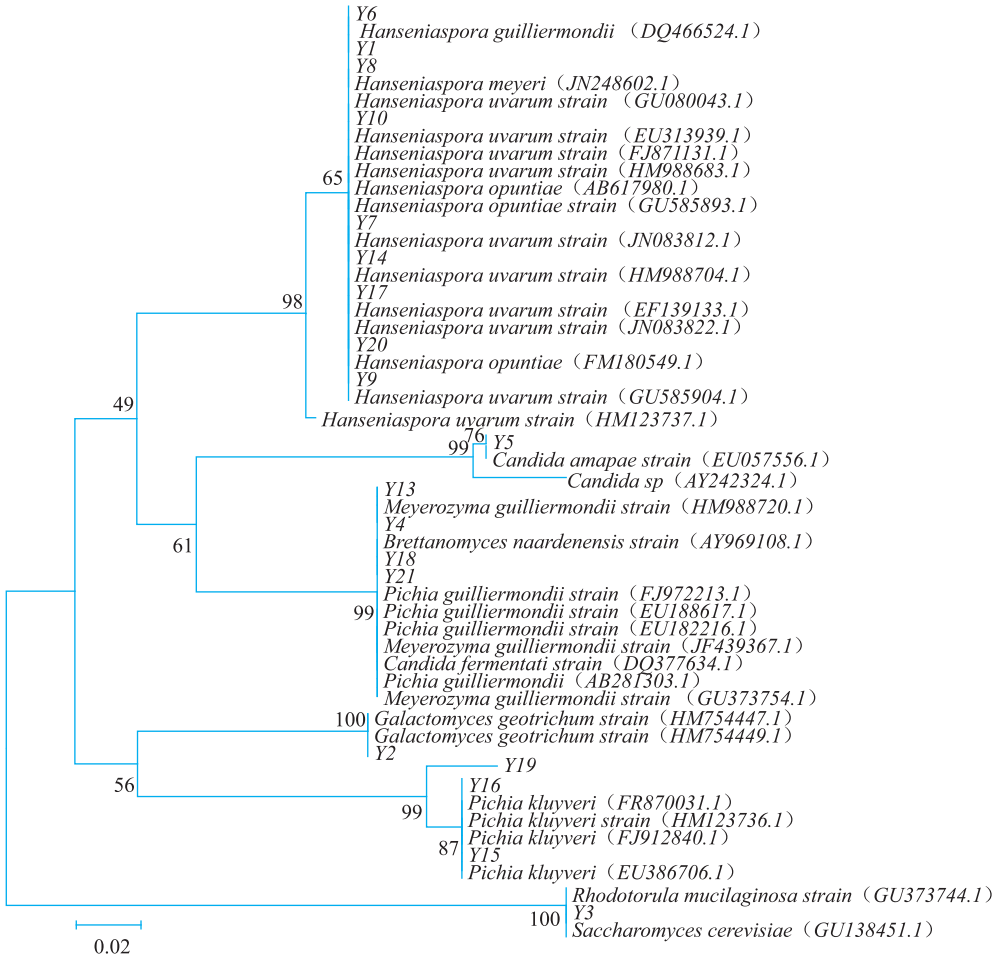



**图 1 系统发育树**

**Fig. 1 Phylogenetic tree**

### 1.2 培养基

**1.2.1 YPD 培养基** 葡萄糖 2.0 g/dL，蛋白胨 2.0 g/dL，酵母浸粉 1.0 g/dL；蒸馏水配制，自然 pH 值，121 ℃高压灭菌 20 min。

**1.2.2 初筛培养基 1** 蛋白胨 1.0 g/dL，酵母粉 0.5 g/dL，NaCl 0.5 g/dL，$CaCl_2$ 0.01 g/dL，Tween80 1.0 g/dL，琼脂 1.5 g/dL；pH 7.2。

**1.2.3 初筛培养基 2** 蛋白胨 1.0 g/dL，葡萄糖 0.5 g/dL，硝酸铵 0.1 g/dL，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g/dL，NaCl 0.05 g/dL，$K_2HPO_4$ 0.1 g/dL，琼脂 2 g/dL，橄榄油乳化液 1.2 g/dL，罗丹明 B 0.1 g/dL。

**1.2.4 种子培养液** 葡萄糖 10 g/dL，蛋白胨 5 g/dL，$K_2HPO_4$ 1.0 g/dL，$MgSO_4$ 0.5 g/dL；pH 7.2。

**1.2.5 发酵培养基** 葡萄糖 10 g/dL，牛肉浸膏 10 g/dL，$K_2HPO_4$ 2.0 g/dL，$MgSO_4$ 0.3 g/dL，橄榄油乳化液

10 g/dL;pH 7.5。详见文献[7]。

## 2 试验方法

### 2.1 菌株活化及扩增培养

**2.1.1 菌株活化** 将 4 ℃保藏的酿酒酵母菌株,分别接种于 YPD 液体管培养基中,在 30 ℃下培养 48 h 活化。

**2.1.2 扩增培养** 将活化的菌株按体积分数 5%的接种量接于已装有 100 mL YPD 培养基的三角瓶中,于 28 ℃、180 r/min 摇床扩增培养 72 h。

### 2.2 菌株产酶鉴定

酵母菌接种于初筛培养基 1 平板上,37 ℃培养 4 d。脂肪酶能分解 Tween80 在菌落周围形成的白色透明圈。

酵母菌接种于初筛培养基 2 平板上,37 ℃培养 4 d。产脂肪酶的菌株会出现橘黄色荧光圈,挑选荧光圈大的进行复筛。

### 2.3 发酵条件优化

对筛选出的菌株进行产脂肪酶学特性研究,利用酶学特性优化发酵培养条件。

### 2.4 脂肪酶粗酶液的提取及酶活测定

挑取菌种接入装有 50 mL 种子培养液的 250 mL 的三角瓶中培养 48 h。种子培养液按体积分数 5%接种量接种于装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 的三角瓶中培养。收集发酵液,4 ℃下 10 000 r/min 离心 10 min,获得上清液作为粗酶液。

在试验温度和试验 pH 下,每分钟释放 1 μmol 脂肪酸的酶量定义为一个酶活力单位 (μmol/(min·mL)),以 U 表示 。用 NaOH 滴定法进行酶活测定[8]。

### 2.5 脂肪酶酶学特性研究方法

分别选取测定温度、pH、金属离子、培养时间对酶活的影响为单因子,进行单因素试验,计算公式如下:

$$酶活力(U/mL)=\frac{V-V_0}{t\times n}\times M \quad (1)$$

式(1)中:$V$ 为滴定样液消耗的 NaOH 体积(mL),$V_0$ 为滴定空白样消耗的 NaOH 体积 (mL),$t$ 为反应时间(min),$n$ 为酶液体积(mL),$M$ 为滴定用的 NaOH 溶液的浓度(mol/mL)。

## 3 结果与分析

### 3.1 产脂肪酶菌株鉴定

经试验,通过肉眼观察和紫外灯照射观察发现,Y9、Y13、Y19、Y21 透明圈和荧光圈比较明显,可以判定 Y9、Y13、Y19、Y21 这 4 株菌株可以产生脂肪酶,结果见图 2。

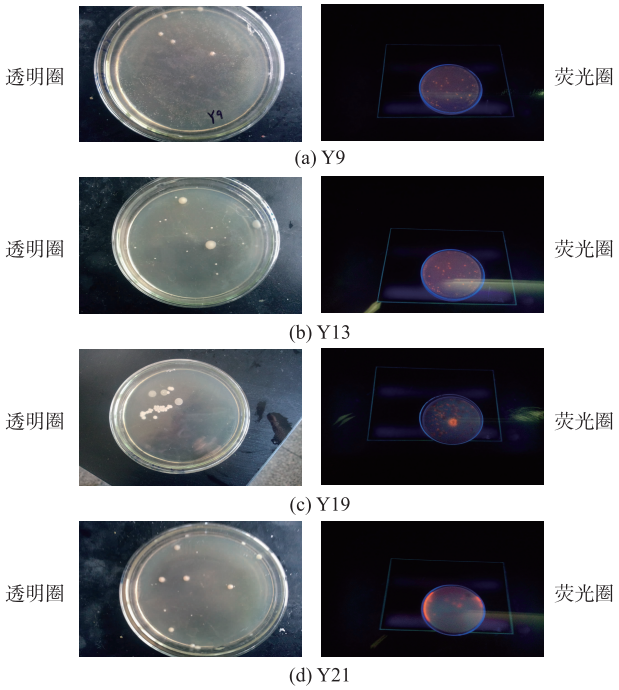



**图 2 Y9、Y13、Y19、Y21 透明圈和荧光圈比较结果**

**Fig. 2 Compare the results transparent and fluorescent ring of Y9、Y13、Y19、Y21**

透明圈直径越大酶活越高[9]。由表 1 根据透明圈的直径大小的比较可得,透明圈的直径大小 Y19<Y21<Y9<Y13,因此 Y13 酶活最高。

**表 1 鉴定结果**

**Table 1 Authentication**

| 酵母菌 | 透明圈直径/mm |
|---|---|
| Y9 | >6 |
| Y13 | >8 |
| Y19 | >4 |
| Y21 | >5 |

### 3.2 脂肪酶酶学特性

**3.2.1 温度对酶活的影响** 将酶液分别在 0 ℃、10 ℃、20 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃中保温 30 min,在 35 ℃下测定其酶活力(其他条件为标准发酵条件)。结果见图 3。

由图 3 可知,0~40 ℃脂肪酶的酶活一直在升高,脂肪酶保持较高的稳定性,在 40 ℃以上时,脂肪酶的酶活迅速下降,这是因为 40 ℃以上酶已变性失活。因此脂肪酶在 40 ℃左右最为稳定。

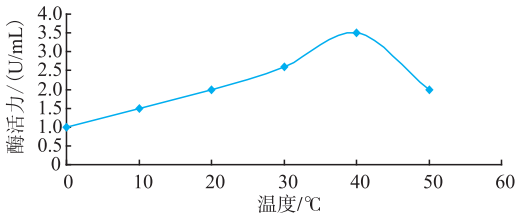



图 3　温度对酶活的影响

**Fig. 3　Influence of temperature on enzyme activity**

**3.2.2　pH 对酶活的影响**　在酶活液中分别加入 pH 为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的缓冲液，在 35 ℃下测定酶活力(其他条件为标准发酵条件)。结果见图 4。

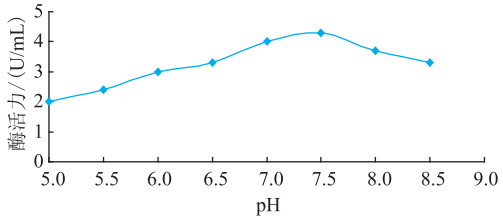



图 4　pH 对酶活的影响

**Fig. 4　Effect of PH on enzyme activity**

由图 4 可知，在 pH 为 5.0~7.5 范围内，酶活力一直升高，pH 超过 7.5，酶活力下降。脂肪酶在 pH 7.0~7.5 范围内稳定性好，显示较高活性，可见该脂肪酶为中性脂肪酶[10]。

**3.2.3　金属离子对酶活的影响**　将 $Fe^{2+}$、$Cu^{2+}$、$Mn^{2+}$、$Ca^{2+}$、$Na^{+}$、$K^{+}$、$Zn^{2+}$、$Mg^{2+}$分别加入到酶液中，在 35 ℃下测定酶活(其他条件为标准发酵条件)。结果见图 5。

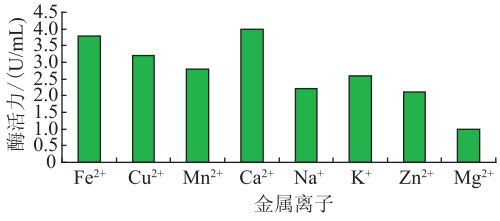



图 5　金属离子对酶活的影响

**Fig. 5　Effect of metal ion on enzyme activity**

由图 5 可知，不同的金属离子对酶活的影响不同。$Fe^{2+}$、$Cu^{2+}$、$Ca^{2+}$对酶有明显的激活作用；$Mn^{2+}$、$Na^{+}$、$K^{+}$、$Zn^{2+}$对酶有微弱的激活作用；而 $Mg^{2+}$对酶具有一定的抑制作用。其中，$Ca^{2+}$对酶的激活作用最显著。

**3.2.4　培养时间对酶活的影响**　将酶液分别培养 24、36、48、60、72、84 h，35 ℃下测定酶活(其他条件为标准发酵条件)，结果见图 6。

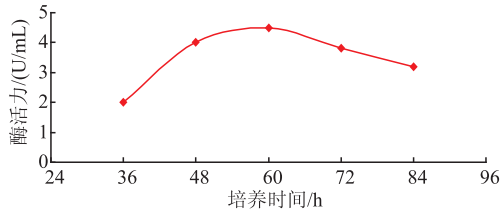



图 6　培养时间对酶活的影响

**Fig. 6　Effect of culture time on enzyme activity**

由图 6 可知，培养时间在 36~60 h 产酶能力随培养时间的增加而增加，自 60 h 开始减少，产酶能力最大培养时间在 60 h 左右。

## 3.3　发酵条件的优化

通过单因素实验得出：产酶的最适温度为 40 ℃，最适 pH 为 7.0~7.5，$Fe^{2+}$、$Cu^{2+}$、$Ca^{2+}$对酶有明显的激活作用，$Ca^{2+}$作用最明显，最适培养时间为 60 h。

根据单因素试验，选取影响力较大的 4 个因素进行正交试验，结果见表 2。

表 2　正交试验结果

**Table 2　Orthogonal test results**

| 处理号 | *A* 温度 | *B* pH | *C* 金属离子 | *D* 培养时间 | 酶活力/(U/mL) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1(39 ℃) | 1(6.5) | 1($Fe^{2+}$) | 1(55 h) | 3.3 |
| 2 | 1(39 ℃) | 2(7.0) | 2($Cu^{2+}$) | 2(60 h) | 3.9 |
| 3 | 1(39 ℃) | 3(7.5) | 3($Ca^{2+}$) | 3(65 h) | 4.2 |
| 4 | 2(40 ℃) | 1(6.5) | 2($Cu^{2+}$) | 3(65 h) | 3.3 |
| 5 | 2(40 ℃) | 2(7.0) | 3($Ca^{2+}$) | 1(55 h) | 3.7 |
| 6 | 2(40 ℃) | 3(7.5) | 1($Fe^{2+}$) | 2(60 h) | 3.0 |
| 7 | 3(41 ℃) | 1(6.5) | 3($Ca^{2+}$) | 2(60 h) | 3.5 |
| 8 | 3(41 ℃) | 2(7.0) | 1($Fe^{2+}$) | 3(65 h) | 3.3 |
| 9 | 3(41 ℃) | 3(7.5) | 2($Cu^{2+}$) | 1(55 h) | 3.0 |
| $K_{1j}$ | 11.4 | 10.1 | 9.6 | 10 | |
| $K_{2j}$ | 10 | 10.9 | 10.2 | 10.4 | |
| $K_{3j}$ | 9.8 | 10.2 | 11.4 | 10.8 | |
| $k_{1j}$ | 3.8 | 3.37 | 3.2 | 3.3 | |
| $k_{2j}$ | 3.3 | 3.63 | 3.4 | 3.47 | |
| $k_{3j}$ | 3.27 | 3.4 | 3.8 | 3.6 | |
| $R_j$ | 0.53 | 0.26 | 0.6 | 0.3 | |

比较本实验中的 4 个因素中 $R_j$ 的大小，可以看出影响因素 $A>C>D>B$。优化组合为$A_1B_2C_3D_3$。即高产脂肪酶菌株最优培养条件为：培养温度 39 ℃，pH 为 7.0，培养时间为 65 h，添加适量 $Ca^{2+}$。

## 4 结 语

通过产脂肪酶试验,根据透明圈和荧光圈的有无,以及透明圈直径的大小,确定 Y13 是脂肪酶高产菌株。通过单因素试验和正交试验优化得酶的最适培养温度为 39 ℃, 最适 pH 为 7.0,$Ca^{2+}$促进酶的发酵,最适培养时间为 65 h,温度是产酶试验的最大影响因素。

脂肪酶可以应用于食品工业的各个方面,例如用于有机相合成的具有转酯化或酯化功能的脂肪酶的规模化生产,对于酶催化合成精细化学品和手性化合物有重要意义。食品工业利用酶作用后释放出的链较短的脂肪酸,增加和改进食品的风味和香味;利用脂肪酶催化的醇解和酯化反应来生产各种香精酯,作调料剂;用有 1,3-专一性的微生物脂肪酶提高食用油营养价值和增加食用油的花色品种[11],制备代可可酯等高档油脂;另外,脂肪酶还可以用于酒类的去浊除渣,改善面包品质,改善蛋白质的发泡等方面。因此产脂肪酶菌株不仅可以应用于葡萄酒的生产、改善酒的香气成分、提高葡萄酒的品质, 而且还可以广泛应用于其他食品工业,增加食品风味,提高食品的品质。

## 参考文献:

[1] Yadavdn,Paykipe,Khanm A,et al. Effect of freeze-thaw cycles and additives on rheological an d sensory properties of ready to bake:Frozen chapaties[J]. **International Journal of Food Science and Technology**,2008,43:1714-1720.

[2] Ukait,Urade R. Cooperation of phosphatidylcholine with endogenous lipids of wheat flour for an increase in dough volume[J]. **Food Chemistry**,2007,102:225-231.

[3] Collarc,Andreup,Martinez-Anayam A. Interactive effects of flour,starter and enzyme on bread dough machinability[J]. **European Food Research and Technology**,1998,207:133-139.

[4] Lilbaek H M,Broe M L,Hoier E,et al. Improving the yield of mozzarella cheese by phospholipase treatment of milk[J]. **Journal of Dairy Science**,2006,89:4114-4125.

[5] 吴华昌,由耀辉,卢中申,等. 脂肪酶应用于白酒催陈的初探[J]. 中国酿造,2011(3):75-77.
WU Huachang,YOU Yaohui,LU Zhongshen,et al. Application of lipsase in the aging of liquor [J]. **China Brewing**,2011(3):75-77.(in Chinese)

[6] 李蓓,衣杰荣. 腐乳在发酵过程中脂肪酶活力变化研究[J]. 食品工业科技,2011(10):261-263.
LI Bei,YI Jierong. Evolution of lipase activity during sufu ripening process [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2011(10):261-263.(in Chinese)

[7] 甘争艳,阿依木妮沙,吾满江,等. 假丝酵母脂肪酶 Li-pase AY 30G 催化红花油水解研究[J]. 化学工程与装备,2011(7):25-26.
GAN Zhengyan,A Yi Munisha,WU Manjiang,et al. Candida lipase AY 30G catalytic hydrolysis of safflower oil [J]. **Chemical Engineering & Equipment**,2011(7):25-26.(in Chinese)

[8] 康建波,胡士恒,王亚男,等. 脂肪酶催化玉米油合成脂肪酸乙酯工艺研究[J]. 现代化工,2012,32(7):47-49.
KANG Jianbo,HU Shiheng,WANG Yanan,et al.Optimization of lipase-catalyzed synthesis of fatty acid ethylester from corn oil [J]. **Modern Chemical Industry**,2012,32(7):47-49.(in Chinese)

[9] Kulthidak,Patoomratanat,Emmanuelle M,et al. pH-imprinted lipase catalyzed synthesis of dextran fatty acid ester [J]. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**,2007,47(3):135-142.

[10] 孙国政,甘伯中,张卫兵,等. 天祝牧区牦牛乳酥油中产脂肪酶菌株筛选及产酶条件的研究[J]. 食品工业科技,2010,31:195-199.
SUN Guozheng,GAN Bozhong,ZHANG Weibing,et al. Screening lipase-producing microorganisms from yak butter of TIanzhu pasturing area and study on its fermentation conditions [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2010,31:195-199.(in Chinese)

[11] Kur sheva A V,Lit vinenko I V. Spectrofluorometric studies of the aromatic hydrocarbons in the bottom sediments and water mass of the western sector of the arctic region[J]. **Oceanology**,2009,49(5):707-714.