

# 碱性脂肪酶的研究

## 1. 菌株的分离和筛选\*

施巧琴

(山西省生物研究所,太原)

碱性脂肪酶是在碱性条件下水解脂肪分子中甘油酯键的一种分解代谢酶。国外从60年代后期陆续有关于碱性脂肪酶研究的报道<sup>[1-3]</sup>。国内至目前尚未见到由微生物中筛选到这类酶的报道,本文主要介绍从霉菌和细菌中,筛选产碱性脂肪酶菌株的研究结果。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 菌株的分离

1. 分离霉菌培养基的成份为(%)：牛肉膏0.3, 葡萄糖0.3, 蛋白胨0.4, 琼脂2.0, 大豆油5.0, 维多利亚蓝4毫克, 用 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 调pH至8.0。

2. 分离细菌培养基的成份为(%)：牛肉膏5.0, 蛋白胨5.0, 琼脂2.0, 大豆油5.0, 维多利亚蓝4毫克, 用 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 调pH至10.0。维多利亚蓝于60℃水浴溶解在大豆油后,与培养基其

他成份混匀倒入平皿。

3. 菌株分离：吸取一定量各种试样稀释后的悬液,在以上琼脂平板上涂布培养。27℃,3—5天培养后则形成菌落,这时如在其周围产生蓝绿色圈者,表明脂肪被水解成脂肪酸。将这样的菌落移接到 Czapeck 斜面培养基上。

#### (二) 菌株的初筛培养基

1. 初筛采用的三种培养基,见表1。

2. 表面培养：取新鲜斜面上的孢子一环转接到盛有10毫升培养基的管内,27℃培养24小时,培养液倒入平皿,静止培养3—4天,最后加入5毫升pH10.0的0.05M甘氨酸-NaOH缓冲液,过滤取滤液供测定。

3. 酶活力的测定和初筛方法：采用琼脂平板透明圈法,由甘油三丁酸酯、阿拉伯胶、pH

\* 本文承胡光烈教授审阅;李惠萍、沈余拴、刘伟光同学参加了工作;李辉同志参加部分工作;本所维生素C研究组提供部分土样。

表 1 初筛培养基

重量(%) 成份	配方号	1	2	3
	黄豆粉		2.0	2.0
玉米浸泡液			2.0	3.0
尿素	0.1			0.5
葡萄糖				1.0
可溶性淀粉	2.0		1.0	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5		0.5	
NaNO <sub>3</sub>			0.5	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1			
KCl				0.05
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1			0.05
大豆油				1.0
pH		10.0	10.0	7.0
灭菌		115°C, 10分	120°C, 20分	115°C, 20分

10.0 甘氨酸缓冲液制成乳化液作为基质。取该乳化液 10 毫升，pH 10.0 甘氨酸缓冲液 90 毫升，琼脂 1.2 克制成厚度 2 毫米的琼脂平板并作成直径 3 毫米的圆孔。取上述滤液 10 微升滴入孔内，30°C 保温 48 小时后观察并测量水解圈的直径，取圈大而清晰的菌株进行复筛。

(三) 菌株的复筛方法

1. 液体振荡培养：取孢子一环接到盛有 30 毫升培养液的 250 毫升三角瓶内，于 27°C，200 转/分旋转式摇瓶机上进行培养。霉菌培养时间为 66 小时，细菌为 36 小时。起始 pH 霉菌为 7.0，细菌为 10.0，采用初筛的 2 号培养基。

2. 酶活性测定：采用琼脂平板透明圈和 NaOH 定量滴定相结合的方法定量。反应液的组成为：橄榄油乳化液 5 毫升；pH 9.4 0.05M 甘氨酸缓冲液 4 毫升；酶液（或稀释酶液）1 毫升。橄榄油乳化液由 pH 10.0 甘氨酸缓冲液配成 4% 聚乙烯醇溶液，取 75 毫升，加橄榄油 25 毫升，放组织捣碎机内乳化 10 分钟。将以上反应液放入 100 毫升的三角瓶内，37°C 水浴作用 10 分钟，用丙酮：乙醇（1:1）混合液 20 毫升终止反应，酚酞液作指示剂，用 0.05N NaOH 溶液进行电位滴定。设空白对照，酶活力的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 5，再乘稀释倍数。其意义为一分钟释放出游离的一微克分子的脂肪酸所需酶量为一个单位。

实验结果

将分离得到的 435 株霉菌，188 株细菌，用三种培养基以表面培养法进行初筛，结果见表 2。

表 2 说明，对霉菌来说，2 号筛选培养基比 1、3 号更适于筛选产碱性脂肪酶菌株。

经过初筛，得到产碱性脂肪酶，作用 pH 9-10 相对活性较高的霉菌 9 株，细菌 7 株。在不同条件下产酶活的情况见表 3 和 4。

上述结果表明，大部分霉菌在 pH 7.0 培养基中产酶最高。在 pH 10.0 的培养基中进行表面培养时，其表层能生长部分菌丝体，并产生一定量的酶。但如进行摇瓶振荡培养，却几乎不

表 2 碱性脂肪酶产生菌株的筛选

结果* 培养基号	菌类及项目	霉 菌					占总株数 (%)	细 菌					占总株数 (%)
		总株数	+++	++	+	○		总株数	+++	++	+	○	
1		179	4	51	53	71	60.3						
2		435	31	151	168	85	80.0	99	12	33	53	1	98.9
3		230	22	68	58	82	64.3	89	5	21	62	1	98.9

\* 表示酶活高低为：+++ 表示透明圈直径在 1 厘米以上；++ 为直径 0.5—1.0 厘米；+ 为直径在 0.5 厘米以下；○ 为无透明圈。

表3 霉菌在不同 pH 时生长和产酶情况

*生长与酶活 菌株号	培养型式 和条件	表面培养及 pH			摇瓶发酵及 pH	
		10	8	7	10	7
846		++ 1.0	++ 1.2	++ 1.1	0 0	++ 7.5
670		+ 0.7	++ 0.9	++ 1.1	0 0	++ 9.5
700		+ 0.5	+++ 1.3	+++ 1.6	0 0	+++ 13.0
653		++ 1.1	+++ 1.4	+++ 1.5	0 0	+++ 13.0
679		++ 1.2	++ 1.2	+++ 1.6	+ 微	+++ 12.2
698		++ 1.2	+++ 1.6	+++ 1.8	0 0	+++ 14.0
697		++ 1.1	++ 1.1	+++ 1.5	0 0	+++ 11.5
689		++ 1.1	+++ 1.4	+++ 1.9	0 0	+++ 15.5
596		++ 1.2	+++ 1.5	+++ 2.5	+ 微	+++ 25.5

\* 菌体生长表示法: +++很稠; ++中等; +稀。透明圈酶活性用厘米/直径表示。摇瓶培养液酶活性用单位/毫升表示。试验用2号培养基。

表4 细菌菌株的产酶情况

结果 菌株号	酶活指标及 培养pH	表面培养透明 圈直径(厘米/ 直径)及 pH		发酵液酶活 力(单位/毫 升)及 pH
		10	7	
691		0.7	1.2	5.5
939		0.9	1.1	8.0
791		0.7	1.3	6.0
677		1.1	1.1	9.0
760		1.1	0.4	9.5
780		1.0	0.5	8.0
797		0.3	0.6	3.5

长菌丝,也不产酶。而细菌与霉菌都采用表面培养法筛选,如培养基的pH7.0时,霉菌所产生的碱性脂肪酶比细菌高,反之如采用摇瓶培养,在pH 10.0时,细菌的碱性脂肪酶产量高,霉菌几乎不生长。经进一步筛选后得到一株产酶活性较高且稳定的霉菌菌株,编号为596。

## 讨 论

为了不使产碱性脂肪酶的菌株在筛选中遗

漏,对初筛培养基的设计既考虑到产酶最适 pH 和酶作用 pH 接近的微生物,也考虑到产酶最适 pH 远离酶的作用 pH 的微生物。复筛结果说明,得到的霉菌大部分产酶最适 pH 是远离作用 pH 的,而细菌则是相近。

霉菌和细菌一样能产生碱性脂肪酶,但由于大多数霉菌适合在偏酸性的环境中生长。因此不能形成足够量的菌体,就不可能产生酶。

从所采得土样分离到的 623 株菌中,霉菌具有产碱性脂肪酶活力的菌株占 60—80%,细菌几乎 100%。其中以 596 霉菌产酶活力最高。

## 参 考 文 献

- [1] 山田浩一: 公開特許公报,特開昭 48-88277 1973。
- [2] 町田晴夫: 特許公报,特昭 49-32080, 1974。
- [3] 国生纯孝ら: 公開特許公报,特開昭 53-59093, 1978。

## 第 8 卷第 2 期更正

1. 第 54 页,表 1 中,736 菌的细胞大小(微米)“1-1.2×2.3-400”应为“1-1.2×2.3-4.0”。
- “特征”一栏中,“甘露糖”应为“甘露醇”。
2. 第 95 页,“第八届……”应为“第十三届……”。
3. 第 97 页左倒数第 6 行“用土量”应为“用工量”。