

# 解脂假丝酵母变株 (19-2) 胞内脂酶的研究

段俊英 韩静淑 柴明 何秀良 张宪武

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

19-2 变株是一株能利用正癸烷产生癸二酸的微生物<sup>[1]</sup>。我们用聚丙烯酰胺凝胶电泳法探讨了该菌及其诱变菌株的脂酶谱。现报道如下。

## 材 料 和 方 法

### 一、菌株

酵母 19-2, 经紫外线、氮芥、亚硝基胍等处理后选育得到 19-2 变株。

### 二、酶制剂的制备方法

1. 菌体培养: 培养基(%): 醋酸钠 3.6; 玉米浆 1.2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2; 尿素 0.1; 分装于 500 毫升三角瓶中, 每瓶 50 毫升,  $110^\circ\text{C}$  灭菌 20 分钟, 接种, 置于旋转摇床上 (偏心距 7cm, 转速 120 rpm)。 $28^\circ\text{C}$  培养 40 小时。

2. 收集菌体: 离心收集菌体, 菌体用 0.2% 的氯化钾溶液洗涤二次备用。

3. 酶提取物的制备: 菌体中加入 0.2M 磷酸钾缓冲液 (1:2) 及少量玻璃粉, 冰浴中 20KC

超声波破碎 45 分钟, 25000rpm 离心 20—25 分钟, 上清液即酶提取物。用于电泳测定及酶活试验。

### 三、脂酶活力分析

脂酶活力的测定参照 Kazuo Aisaka 等<sup>[2]</sup>和 Y. Ota<sup>[3]</sup> 的方法。

基质乳化液的制备: 取 1 克橄榄油加至 9 ml 3% 的聚乙烯醇水溶液中, 混合液置超声波破碎器中, 20KC 乳化 5 分钟, 使乳化液均匀、稳定备用。

反应系统加乳化液 2ml, 缓冲液 2ml, 酶液 0.5ml, 用水补足到总容积 5ml, 50 毫升三角瓶中  $30^\circ\text{C}$  保温 15 分钟, (加酶液前预保温 15 分钟,  $30^\circ\text{C}$ ) 取出加入 10ml 丙酮-乙醇溶液 (1:1V/V) 终止反应。对照加入煮沸后的酶液或将酶液加入已有丙酮-乙醇溶液的反应混合物中。

酶活力单位的定义: 作用后的反应混合物用 0.05N 的 NaOH 滴定所生成的酸, 每消耗 0.01ml 0.05N 的 NaOH 为一酶活力单位。

酶蛋白质氮的测定采用 Folin 法<sup>[4]</sup>。

了测定, 结果见图 2。

## 结 果

### 一、19-2 菌及其诱变菌株的菌体、发酵液及酶提取物中脂酶的分布

结果见表 1 及图 1。

表 1 不同固体中脂酶活力\*

菌株名称	项目	各部分名称	酶活力单位
19-2	菌体悬液		50
	发酵液		—
	酶提取物		57
	菌体碎片		2.5
19-2 诱变株	菌体悬液		150
	发酵液		—
	酶提取物		138
	菌体碎片		6.5

\* 反应系统: 2ml 乳化基质, 2ml 0.2M 磷酸缓冲液 (pH7.5), 0.5ml 酶液, 0.5ml 蒸馏水。30°C 作用 15 分钟。在比较二株菌的酶活力时, 均先将菌体悬液中的菌数调整到  $1-5 \times 10^8$  个, 酶液含氮量 8.5mg/ml。

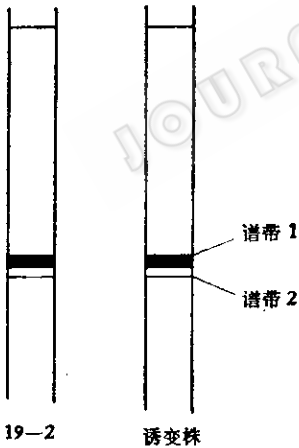


图 1 19-2 菌及其诱变菌株的脂酶谱

结果表明, 该菌株的脂酶不是胞外酶, 酶活力主要存在于酶提取物中, 诱变菌株的脂酶活力比 19-2 菌约高二倍。

### 二、脂酶活力的最适 pH

我们对二个菌株脂酶活力的最适 pH 进行

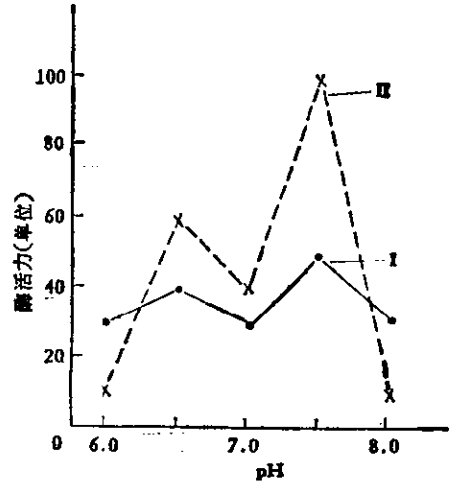


图 2 产酶活力与 pH 的关系\*

\* 图中 I 为 19-2 菌; 2 为诱变菌。

结果表明, 二株菌的脂酶活力在 pH7.5 和 6.5 时均有二个酶活力高峰。以 pH7.5 时脂酶活力较高。

### 三、不同温度对酶活力的影响

二个菌株的酶活力在 30°C 和 40°C 出现二个高峰, 见图 3。

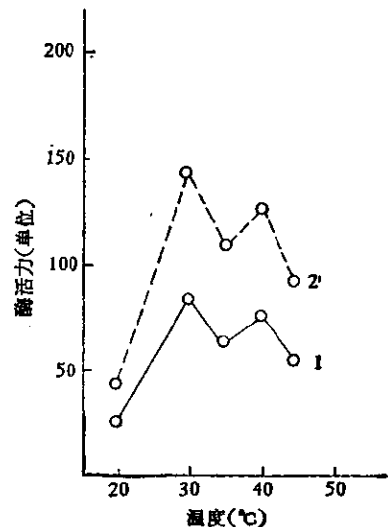


图 3 温度与酶活力的关系

\* 图示同上。

#### 四、生长素与脂酶活力的关系

我们探讨了生物素、菸酸、泛酸钙、叶酸、维生素 B<sub>6</sub>、B<sub>1</sub> 对酶活力的影响。结果发现维生素 B<sub>1</sub> 对酶活力的产生有刺激作用,而菸酸、生物素和泛酸钙则有抑制作用,见图 4。

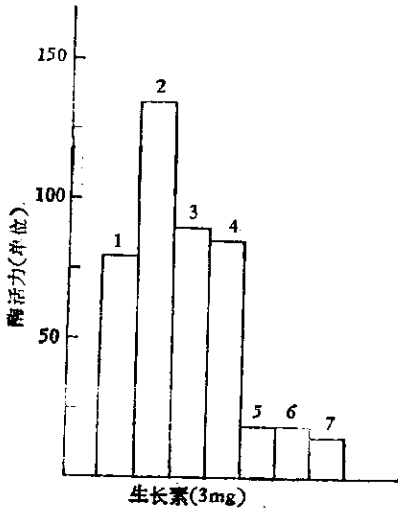


图 4 各种生长素与产酶活力关系\*

\* 图中 1 为对照, 2 为维生素 B<sub>1</sub>, 3 为维生素 B<sub>6</sub>, 4 为叶酸, 5 为菸酸, 6 为生物素, 7 为泛酸。

#### 五、不同浓度维生素 B<sub>1</sub> 对产酶活力影响

结果见图 5。

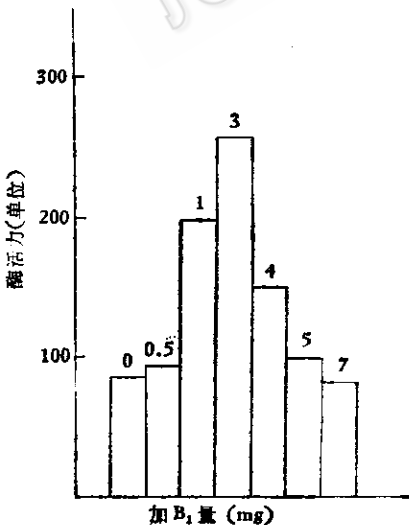


图 5 不同量的维生素 B<sub>1</sub> 对产酶活力的影响

结果表明, 加入 1—4mg 维生素 B<sub>1</sub> 对产酶

活力有促进作用, 其中以加入 3mg 作用最强。

#### 六、牛胆酸钠对产酶活力的影响

我们于反应系统中加牛胆酸钠至 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08%, 0.1% 浓度, 结果见图 6。

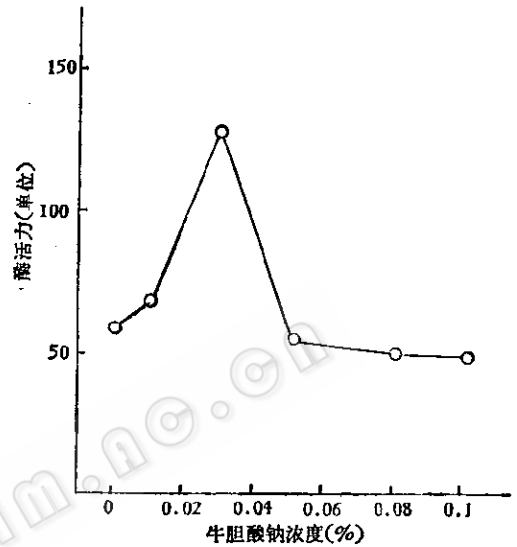


图 6 不同量牛胆酸钠对产酶活力影响

结果表明加入牛胆酸钠至 0.03%, 对产酶活力有良好活化作用。

## 讨 论

有些微生物胞内含有二或三种不同性质的脂酶<sup>[5,6]</sup>。试验表明, 19-2 菌株具有较强的解脂能力。它不产生胞外脂酶, 而胞内脂酶活力强, 其诱变菌株的胞内酶活力比 19-2 菌株高几乎二倍。聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定表明有二条脂酶带, 而酶活力最适 pH 和温度都具有二个相似的高峰。为弄清二条带各自的条件, 我们采用制备电泳法分别切取了诱变菌株的二条脂酶带, 洗脱并分别置于 pH6.5 和 7.5 反应系统中, 30℃ 测定二个酶带的酶活力, 带 1 (图 1 中宽带) 在 pH7.5 时酶活力为 30 单位, pH6.5 时酶活力甚微。带 2 (图 1 中窄带) 在 pH6.5 时为 5 个单位, pH7.5 时酶活力甚微, 说明酶带 1 与产酸

相关,符合营养菌体的最适产酸 pH 范围<sup>[1]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院林业土壤研究所, 沈阳市有机化工厂: 微生物学报, 19(1):64—70, 1979.
- [2] K. Aisaka and O. Terada: *Agr. Biol. Chem.*, 43: 2125—2129, 1979.
- [3] Ota and K. Yamada: *Agr. Biol. Chem.*, 30:

351—358, 1966.

- [4] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951.
- [5] M. Iwai and Y. Tsujisaka: *Agr. Biol. Chem.*, 38: 1241—1247, 1974.
- [6] M. Iwai and Y. Tsujisaka: *ibid*, 36: 1249—1254, 1974.

---

\* 戴莲韵同志协助聚丙烯酰胺凝胶电泳的分析。