

胞外脂酶活力的检测法

李祖义 朱明华 冯青 耿昌根*

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海)

摘要 介绍一种含一定浓度的橄榄油和 Rhodamine B 的琼脂平板脂酶检测法。该方法适用于筛选产脂酶的微生物菌种、检测菌体发酵液中脂酶活力以及其它样品中脂酶活力的大小。在该平板上, 产脂酶菌体的菌落外围有微红色水解带。脂酶溶液浓度的对数与水解圈直径呈很好的线性关系。与滴定法及比色法相比较, 该平板检测法简便、可靠、灵敏。

关键词 胞外脂酶; 平板检测; 橄榄油; Rhodamine B.

脂酶是类脂化合物合成、分解和酯交换的催化剂, 它具有化学选择性又具有立体化学选择性^[1], 因而脂酶被广泛地应用于有机化合物的化学合成、不对称合成、酯交换及消旋化合物

的拆分等方面。

有很多微生物能产生胞外脂酶。对脂酶重

* 上海师范大学 1989 年毕业班学生。

要性的认识促使人们对大量微生物菌种进行筛选,以期获得高产脂酶的菌种^[2]。因此,有关脂酶活力测定的方法引起包括生物化学家、微生物学家以及工厂企业家的广泛重视。测定的方法也不断得到改进,从传统的滴定法、比色法,进而发展到平板法,力求寻找一些简便可靠的方法。本文主要介绍一种新的平板检测方法,并以该法与滴定法及比色法进行了比较。

材料与方 法

(一) 材 料

1. 脂酶:来源于 *Candida cylindracea* (简称 CCL) 和 *Porcine pancreas* 的脂酶(简称 PPL)均为 Sigma 商品; *Pseudomonas* sp. 的胞外脂酶(简称 PSL)从 *Pseudomonas* sp. 发酵液中纯化获得。

2. 药品: 橄榄油 (Olive oil) 为进口分装试剂, Rhodamine B 为 B. D. H 试剂。其余试剂均为分析纯及化学纯。

(二) 方 法

1. 平板检测法的建立

(1) 培养基的配制: 含 1.0% 橄榄油溶液中,加入微生物生长所需营养成分:葡萄糖 2%,酵母膏 0.2%,蛋白胨 1.0%,琼脂 1.5%。待琼脂融化后,冷至 60℃ 左右,用组织匀浆器制成乳化液。灭菌 (1kg/cm², 20 分钟)后,每 100ml 乳化液中加入 Rhodamine B 溶液(经细菌漏斗过滤灭菌)1ml,趁热摇匀后倒平板。

(2) 微生物菌种以及酶液检测: 将待筛选菌种划线接于平板培养基(含营养成分), 28℃ 培养 24—48 小时。也可在检测平板培养基(不外加营养成分,平板厚度 4mm)上打孔,小孔直径为 3.5mm,大孔为 5.5mm,然后将待筛菌种发酵液(经离心除去菌体)或其它脂酶液定量吸入孔内,小孔加 30μl,大孔加 100μl,置 28℃ 保温 16 小时。

2. 滴定法: 参照 Watanabe^[3] 法进行。

3. 比色法: 参照 Dae Y. Kmon 和 Joon S. Rhee^[4] 的方法。

结 果

(一) 被筛选菌种在检测平板上的生长情况

将待筛选菌种接于检测平板, 28℃ 培养 24—48 小时后,菌生长良好,其中产脂酶菌种的菌落外围有微红色水解带,而不产脂酶的菌种则无。例如, *Pseudomonas* sp. 的菌落外围有微红色水解带,这是该菌产生的胞外脂酶作用平板中的底物所致。而 *Saccharomyces* sp. 为不产脂酶菌种,其外围无水解带存在。通过该方法对几十种菌种进行筛选,得到了几株产脂酶菌种,有的为高产菌株。

(二) 被筛选菌种发酵液在检测平板上的情况

对几十种菌种的发酵液在平板上保温后进行观察,发现产脂酶的菌种发酵液的孔的外围形成明显的白色略带红色水解带,而不产脂酶

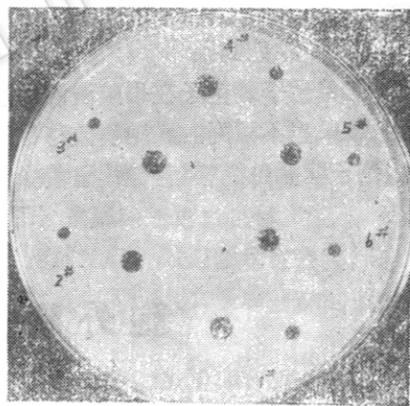


图 1 平板法检测发酵液脂酶活性

1. *Pseudomonas* sp.
2. *Geotrichum* sp.
3. *Rhizopus* sp.
4. *Saccharomyces* sp.
5. *Asp. niger*
6. *Candida* sp.

表 1 微生物发酵液的脂酶活力(用滴定法测定)

微生物菌种	脂酶活性 (u/ml)
<i>Pseudomonas</i> sp.	3.7
<i>Geotrichum</i> sp.	0.5
<i>Rhizopus</i> sp.	1.9
<i>Saccharomyces</i> sp.	0
<i>Asp. niger</i>	0.4
<i>Candida</i> sp.	0.2

的则无。图1即为6株菌种发酵液在检测平板上的情况，每一种发酵液用大、小两孔同时进行。从水解圈大小来看 $1>3>2, 5>6, 4$ 无水解圈。这与滴定法对这些发酵液进行测定的结果(表1)相一致，即 $1>3>2\approx 5>6>4$ 。

(三) 脂酶浓度与水解圈大小的关系

将两种发酵液(来自 *Pseudomonas* sp. 及 *Rhizopus* sp.) 稀释成不同的浓度，然后加 $30\mu\text{l}$ 于小孔，16小时后测量各浓度酶液所形成的水解圈直径。从图2可以清楚地看到，水解圈直径与酶液浓度(1.0units 以上的酶液)的对数呈很好的线性关系，水解圈的大小很好地反映出脂酶活性的高低。

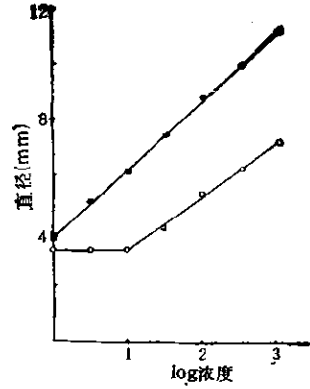


图2 水解圈直径与脂酶相对浓度的对数关系
Pseudomonas sp. ●—● *Rhizopus* sp. ○—○

(四) 平板检测法与滴定法及比色法的比较

对三种脂酶溶液(即 CCL, PPL, PSL) 稀释成不同的浓度，然后分别用平板检测方法、滴

定法及比色法测定各不同浓度的脂酶溶液的活性。结果表明(图3)，三种方法都较好地显示出各浓度脂酶溶液间的活力关系，其中平板检测法的线性关系又较滴定法及比色法为好。就活

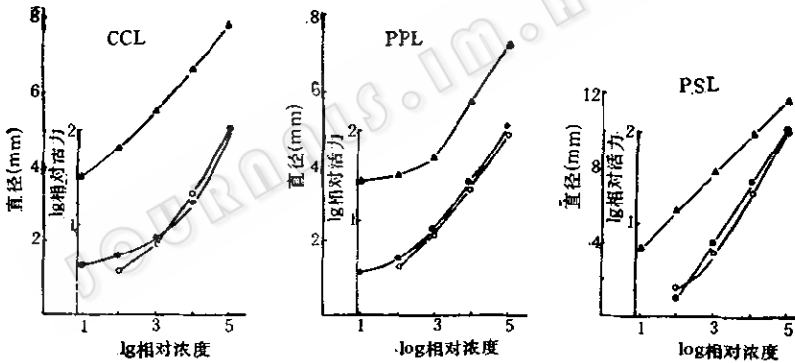


图3 用平板检测法、滴定法和比色法测定脂酶活力比较
平板法 Δ — Δ ，滴定法 \circ — \circ ，比色法 \bullet — \bullet

力测定的灵敏度而言，平板法和比色法较好，前者对三种酶液的实验最低浓度(约 $0.1-0.5\text{u}/\mu\text{l}\cdot\text{min}$) 都能显示其活力，后者对 CCL、PPL 的脂酶活力可测，而滴定法则不能测得这三种酶液最低浓度的脂酶活性，即滴定法的灵敏度相对较低。

讨 论

就脂酶活力测定方法而言，滴定法是传统使用方法，比色法也较常见。1986年，Dae Y.

Kmon 和 Joon S. Rhec^[4] 等对比色法加以改良。由于筛选产脂酶菌种的需要，以琼脂培养基为基础的方法得到重视。1987年，井上惠雄等^[5]使用含三丁酸甘油酯的琼脂培养基对一些微生物进行研究，发现产脂酶的菌种菌落外围产生透明带。但是，由于三丁酸甘油酯并非脂酶的专一性底物，还是酯酶的底物，因而人们对该方法的可靠性提出异议。他们指出^[5]，在脂酶检测系统中应该以对脂酶有专一性的脂肪(如橄榄油)作为底物，但是水解带很难观察到。

Kuimova 等^[6]曾报道用四氧化锇 (OsO_4) 浸涂来显示水解带。但是四氧化锇剧毒, 并且会使生长的微生物死亡, 因而该方法未获公认。1987年, Gisela Kouker 等^[7]用含三油酸甘油酯和荧光染料的琼脂平板对细菌及其培养液保温后可在 350nm 的紫外光下观察到荧光水解带, 但此水解带不能用肉眼观察到。我们的方法克服了上述三种平板方法的缺点, 既可靠(以橄榄油作底物), 又简便(无需 OsO_4 和紫外观察)。该方法的建立无疑给产脂酶菌种筛选提供了很大的便利。

该平板检测方法不仅优于现有的平板方法, 而且与滴定法、比色法相比较又有一些有利之处。从我们的实验结果来看, 该平板法比滴定法、比色法有更高的灵敏度。从整个测定过程来看, 比色法待反应结束后需对反应液中的游离脂肪酸加以抽提, 操作繁琐, 在待测样品很多的情况下(如产脂酶菌筛选、不同条件下脂酶

产生情况、纯化过程中各部分脂酶活力的测定等)尤不适宜。而平板法则相当简便, 只需在平板上打孔, 滴加入 30—100 μ l 酶液, 保温后观察即可。可见, 该平板法克服了滴定法的灵敏度不够、比色法的操作繁琐等缺点, 是一种简便、可靠、灵敏的脂酶检测新方法。

参 考 文 献

- [1] Sztajer, H. and Zboinska, E.: *Acta Biotechnol.*, 8 (2): 169, 1988.
- [2] Tripathi, G.: *Acta. Biotechnol.*, 8(2): 177, 1988.
- [3] Watanabe, N. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 41(8): 1353, 1977.
- [4] Dae Y. Kwon, Joon S. Rhee: *J. Am. Oil. Chem.*, 63(1): 89, 1986.
- [5] Shelley, A. W. et al.: *J. Microbiol. Methods*, 6: 123, 1987.
- [6] Kuimova, T. F. et al.: *Mikrobiologiya*, 44(2): 365, 1975.
- [7] Kouker, G. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(1): 211, 1987.
- [8] 公开特许公报, 昭 62-210987.