

阿氏假囊酵母 (*Eremothecium ashbyii*) Du-32 脂肪酶的研究*

沈永强 刘慈俊 张景六 王丽雯

(上海植物生理研究所微生物室, 上海)

阿氏假囊酵母 (*Eremothecium ashbyii*) Du-32 有较高的脂肪酶活力。在豆饼粉、玉米浆、豆油、 KH_2PO_4 培养基中发酵 26 小时, 脂肪酶活力达每毫升发酵液 400 单位。

油脂能诱导脂肪酶的形成。在发酵中加入葡萄糖则产生“葡萄糖效应”而抑制脂肪酶的生成。不同油脂诱导之脂肪酶对不同底物反应的相对速度不同, 说明可能存在不同类型的脂肪酶。

Du-32 脂肪酶的最适 pH 为 8.0—8.5。在 pH 5.0—8.0 间酶活力基本稳定。酶反应最适温度为 40℃。酶的热稳定性在 55℃ 时 10 分钟失活, 50℃ 时 20 分钟失活, 40℃ 时 4 小时失活, 28℃ 时 44 小时失活。在聚乙烯醇乳化系统中, 牛胆酸钠能提高脂肪酶活力, 而 CaCl_2 则无作用。

对 Du-32 脂肪酶在乳品增香和绢丝原料脱脂上的应用进行了初步试验, 显示出在工业生产上应用的可能性。

脂肪酶对分解三甘油酯的特异性较低。由于酶的不稳定性、底物的水不溶性等问题, 较长时期以来, 脂肪酶的研究进展很慢。五十年代后期, 脂肪酶进一步纯化, 对脂肪酶本质的研究取得了较大的发展^[1-4]。

许多微生物都能产生脂肪酶, 真菌如毛霉 (*Mucor*)、根霉 (*Rhizopus*)、青霉 (*Penicillium*)、曲霉 (*Aspergillus*)、核盘霉 (*Sclerotinia*)、地霉 (*Geotrichum*) 等; 细菌如假单胞杆菌 (*Pseudomonas*)、无色杆菌 (*Achromobacter*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*); 酵母如圆酵母 (*Torulopsis*)、假丝酵母 (*Candida*) 等均已报道。一些微生物的脂肪酶已高度纯化或结晶, 并已大量生产^[4,5]。

脂肪酶制剂目前在医药上用为消化剂, 在日化工业上用为洗涤及助洗剂, 在食品工业中用作制造干酪及乳制品增香,

其它如饲料、酿造、皮革、纺织等各方面的应用也正在研究中。

阿氏假囊酵母 (*Eremothecium ashbyii*) Du-32 (简称 Du-32) 能利用油脂为唯一碳源发酵生产核黄素, 因此对其油脂利用途径的研究, 很可能有助于提高核黄素的产量。本文主要报告 1968 年我们对 Du-32 脂肪酶的发酵及诱导生成条件的初步工作, 并对 Du-32 脂肪酶的性质及应用作一些观察和探讨。

材料和方法

一、菌种和培养条件

1. 阿氏假囊酵母 (*Eremothecium ashbyii*)

* 乳品增香等应用试验和上海益民食品一厂、上海日用化学工业研究所共同协作进行。绢丝原料脱脂试验和上海绢纺二厂协作进行。

本文于 1973 年 8 月 5 日收到。

Du-32 是经紫外线和放线菌素 D 复合因素诱变得到的突变株。

2. 斜面培养基 葡萄糖 1%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.015%, 琼脂 2%, pH 6.8。培养基于 121℃ 灭菌 20 分钟。

3. 种子培养基 葡萄糖 1%, 蛋白胨 0.5%, 玉米浆 1%, NaCl 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.015%, CaCO_3 0.05%, pH 6.8。培养基于 500 毫升三角瓶中盛 75 毫升, 121℃ 灭菌 20 分钟。

4. 发酵培养基 豆饼粉 3%, 玉米浆 3%, KH_2PO_4 0.2%, 豆油 0.1%, pH 6.8。培养基在 500 毫升三角瓶中盛 100 毫升, 于 121℃ 灭菌 20 分钟。

斜面移植后, 在 28℃ 恒温培养 7 天。种子及发酵均置于 28℃ 恒温室于往复式 (100 次/分) 摇床上振荡培养。种子培养 30 小时, 此时菌体生长旺盛, 产生少量黄色的核黄素。发酵接种量为 3%。过滤除去菌体之发酵液即为脂肪酶溶液。

二、脂肪酶活力测定

脂肪酶活力测定参照 Ota 和 Yamada 方法^[6], 略作更改, 具体方法如下。

(一) 试剂

(1) 橄榄油乳化液 2% 聚乙烯醇 75 毫升, 橄榄油 25 毫升。混合后以声波击碎器 (20 KC) 乳化两分钟。乳化液均匀、稳定。

(2) 缓冲液 0.2M 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 缓冲液 pH 8.0, 或 0.2M 磷酸缓冲液 pH 8.0。

(二) 测定方法

取 2 毫升乳化液、2 毫升缓冲液和 0.5 毫升蒸馏水, 混合均匀, 在 40℃ 恒温水浴中保温 15 分钟, 加入 0.5 毫升脂肪酶溶液, 迅速搅拌均匀并计时, 在 40℃ 下反应 15 分钟, 用 10 毫升 1:1 之乙醇-丙酮混合溶剂终止反应, 然后以 0.05N NaOH 溶液滴定至中性, 以酚酞为指示剂。煮沸失活酶溶液为空白对照。

每毫升脂肪酶溶液在上述反应系统中反应 15 分钟所产生之酸, 以 0.05N NaOH 滴定, 每消耗 0.01 毫升 NaOH 溶液即定为 1 酶活力单位。

结果和讨论

一、发酵培养基对脂肪酶形成的影响

(一) 不同碳源和氮源的比较 我们比较了多种天然碳源和氮源对脂肪酶发酵的影响, 结果 (表 1) 说明, 该酵母利用鱼粉培养基产酶量最高, 花生饼粉及豆饼粉次之, 在米糠饼粉、玉米粉、玉米芯粉、糊精、明胶中几乎不产生。看来, 含一定量油脂的原料做为培养基, 脂肪酶产量较高。利用明胶和骨胶这两种相似之蛋白质, 菌体生长均较旺盛, 但脂肪酶活力差别很大, 很可能是骨胶中尚含有少量油脂。

表 1 不同碳源、氮源对脂肪酶形成的影响

碳、氮源	菌体生长情况	脂肪酶活力 (单位/毫升)	脂肪酶相对活力 (%)
花生饼粉	++	180	100
米糠饼粉	+++	0	0
玉米粉	++	20	11
酵母粉	++	140	77.7
糊精	+++	10	5.5
玉米芯粉	+	10	5.5
明胶	+++	10	5.5
骨胶	+++	80	44.5
鱼粉	++	200	110
麸皮	+	140	77.7
豆饼粉	++	180	100

发酵培养基: 玉米浆 1.5%, KH_2PO_4 0.2%, 豆油 0.1%, 碳、氮源 1.5%, pH 6.8, 发酵 24 小时。

菌体生长情况: +++ 生长旺盛, ++ 良好, + 较差。

(二) 不同量玉米浆、豆饼粉及 KH_2PO_4 对脂肪酶形成的影响 为便于生产上使用价格低廉的原料, 我们根据上述结果初步选择豆饼粉、玉米浆为发酵培养基基本成份。结果说明, 玉米浆、豆饼粉分别为 3.0%, KH_2PO_4 为 1% 时, 对脂肪酶形成最为有利 (表 2)。

Du-32 脂肪酶的发酵过程如图 1 所示。发酵 26 小时每毫升发酵液脂肪酶活

表 2 不同量玉米浆、豆饼粉及 KH_2PO_4 对形成脂肪酶的影响

项 目	含量 (%)	菌体生长情况	脂肪酶活力 (单位/毫升)	脂肪酶相对活力 (%)
玉米浆	0.5	++	100	55.5
	1.0	+++	140	77.7
	3.0	+++	220	122
	5.0	++++	210	117
豆饼粉	0.5	++	100	55.5
	1.0	++	110	61
	3.0	++	200	111
	5.0	++	20	11
KH_2PO_4	0.1	+++	140	77.7
	0.5	++	160	89
	1.0	++	180	100
对 照		++	180	100

对照培养基成分: 玉米浆 1.5%, 豆饼粉 1.5%, KH_2PO_4 0.2%, 豆油 0.1%, pH 6.8。

菌体生长情况: ++++ 极旺盛, +++ 旺盛, ++ 良好。

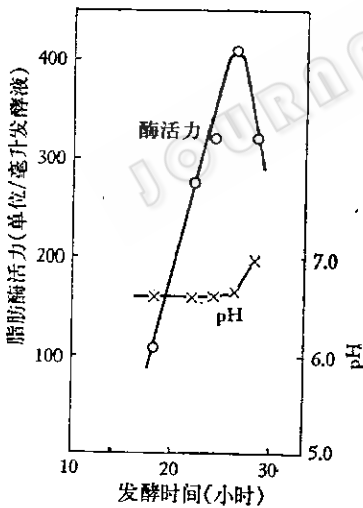


图 1 Du-32 脂肪酶的发酵过程

力最高可达 400 单位。多次重复试验证明,在发酵过程中脂肪酶迅速形成的时期,发酵液 pH 基本保持恒定,发酵 24—26 小时脂肪酶活力达到高峰,以后 pH 开始上升,酶活力很快下降,发酵 36 小时的酶活

力是最高峰的 50% 左右,48 小时是 30%,至发酵 72 小时,在发酵液中已基本测不出脂肪酶活力。这个现象和有些微生物的脂肪酶发酵不同^[7],可能是由于在发酵过程中产生了某些抑制酶活力的因素所致。Smith 和 Alford 曾在草莓假单胞杆菌(*Pseudomonas fragi*)和白地霉(*Geotrichum candidum*)脂肪酶的研究中,观察到脂肪酸尤其是不饱和脂肪酸强烈抑制脂肪酶活力^[8]。Du-32 脂肪酶在发酵过程中活力迅速下降,是不是由于脂肪酶反应的产物脂肪酸的抑制作用,或其它原因,尚待进一步研究。

(三)微量元素对脂肪酶发酵的影响
多种金属离子能激活或抑制脂肪酶。我们在发酵培养基中加入各种金属离子,培养 24 小时后测定脂肪酶活力。结果表 3 指出, Mg^{++} 能较明显地促进脂肪酶的形成, Ba^{++} 、 Co^{++} 无甚影响,而 Ca^{++} 则呈明显的抑制作用(表 3)。

表 3 微量元素对脂肪酶合成的作用

金属离子	浓 度 (M)	脂肪酶活力 (单位/毫升)	脂肪酶相对活力 (%)
不 加	—	210	100
Ca^{++}	10^{-2}	140	66.6
Mg^{++}	10^{-3}	240	114
Fe^{+++}	10^{-3}	150	71.5
Ba^{++}	10^{-3}	210	100
NH_4^+	10^{-2}	160	76
Co^{++}	10^{-5}	190	90.4

发酵基本培养基: 玉米浆 1.5%, 豆饼粉 1.5%, KH_2PO_4 0.2%, 豆油 0.1%, pH 6.8, 发酵 24 小时。

二、油脂对 Du-32 脂肪酶的诱导

油脂对 Du-32 脂肪酶形成有显著影响。在豆饼粉培养基中加入少量油脂,能促进脂肪酶的形成,但随着加油量的增加,脂肪酶量即迅速降低,呈现明显的抑制作用(表 4)。

表 4 豆油对 Du-32 脂肪酶形成的影响

加入豆油量 (%)	脂肪酶活力 (单位/毫升)	脂肪酶相对活力 (%)
0	240	100
0.1	260	108
0.25	60	25
0.5	20	8.3
1.0	20	8.3
1.5	10	4.2

由于豆饼粉内尚残留一定量的豆油，为准确测定脂肪酶发酵的最适油量，我们将培养基各成份用乙醚连续抽提四小时，以脱尽脂肪，然后再加入不同量的豆油或蛹油，观察脂肪酶的形成情况。结果如表 5，全脱脂培养基发酵后，没有脂肪酶活力。加入 0.1—0.2% 油脂，活力大大超过不脱脂黄豆粉对照，油量再增加，又明显地抑制了脂肪酶的形成。看来 Du-32 的脂肪酶是诱导生成。Ota 等^[9]比较了多种油脂对副解脂假丝酵母 (*Candida paraliopolytica*) 产生脂肪酶的诱导作用，指出饱和性和油脂是产生脂肪酶的主要诱导物，我们的结果也说明了这点。那么为什么油量增加又抑制脂肪酶活力呢？为什么 Du-32 菌株在含油量高达 5% 的培养基中，脂肪酶明显受抑

表 5 豆油和蛹油在全脱脂培养基中
对 Du-32 脂肪酶的诱导

油 脂	油 量 (%)	脂肪酶活力 (单位/毫升)
豆 油	0.1	—
	0.2	152
	0.5	8
蛹 油	0.1	182
	0.2	202
	0.5	0
全脱脂培养基	—	0
黄豆粉培养基	—	96

发酵基本培养基：脱脂黄豆粉 1.5%，脱脂蛋白肽 0.5%，脱脂玉米浆 1%，pH 6.8，发酵 24 小时。

制的情况下，还能很好的利用油脂进行核黄素发酵呢？原因还不清楚。山田等在柱状假丝酵母 (*Candida cylindracea*) 脂肪酶发酵中，曾观察到油量增加抑制脂肪酶的类似现象，推测这种抑制现象和“葡萄糖效应”相似，但也没有具体试验证明^[10]。

为进一步观察脂肪酶的诱导生成，在基本培养基中同时加入豆油和葡萄糖，则脂肪酶活力极大地受到抑制 (表 6)。Alford 和 Pierce^[11]，Locurto^[12] 在研究 *Pseudomonas fragi* 和葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 的脂肪酶的产生条件时，发现葡萄糖和培养基的其它组份混合灭菌，则明显抑制脂肪酶合成，如分别进行灭菌，则可解除葡萄糖的抑制作用。说明葡萄糖和磷酸盐、氨基酸等组份，在高温消毒时所生成的化合物抑制了脂肪酶的形成。我们的试验是把葡萄糖和其他组份分开灭菌后加入的，因此对脂肪酶的抑制，就不是由于葡萄糖和其它组份的化合所引起的，而是“葡萄糖效应”。在微生物中葡萄糖抑制诱导酶产生的“葡萄糖效应”是普遍存在的，这种抑制作用，是菌体代谢调节控制的一种比较经济的途径。这个现象也进一步证明了 Du-32 的脂肪酶是诱导酶^[19]。

表 6 葡萄糖对脂肪酶合成的抑制作用

葡 萄 糖 (%)	豆 油 (%)	脂肪酶活力 (单位/毫升)
0	0.1	240
0.5	0.1	20
0.5	0.25	0
0.5	0.5	10

三、Du-32 产生不同类型脂肪酶的探讨

脂肪酶对底物分子结构的特异性很低，不同来源的脂肪酶分解各种脂肪的相对速度也不相同，这说明存在着不同类型的脂肪酶。Singer 曾提出区别不同类型脂

表 7 豆油、蛹油诱导产生之脂肪酶对四种底物水解的相对速度

底物 诱导物 酶活力	橄 榄 油		三 油 酸 甘 油 酯		豆 油		三 乙 酸 甘 油 酯	
	酶 活 力 (单位/毫升)	相 对 活 力 (%)	酶 活 力 (单位/毫升)	相 对 活 力 (%)	酶 活 力 (单位/毫升)	相 对 活 力 (%)	酶 活 力 (单位/毫升)	相 对 活 力 (%)
豆油 0.2%	152	83	246	93	182	92	66	118
蛹油 0.1%	182	100	258	100	196	100	56	100
全脱脂对照	0	0	32	12	14	7	38	67

发酵条件同表 5 注。

肪酶的一些方法。如酶在提纯过程中对不同底物水解的相对速度不变,说明只有一种脂肪酶;或以酸、碱、加热等方法使酶部分失活,如对不同底物水解的相对速度发生变化,则说明存在不同类型的脂肪酶^[13]。Qi 等从皮壳青霉 (*Penicillium crustosum*) 的培养液中分离得三种对不同底物水解速度不同的脂肪酶,其中 I、II 型已结晶,并在一定条件下两个酶可以相互转换^[14]。我们比较了豆油、蛹油所诱导生成的脂肪酶,在四种底物上测定酶活力,结果(表 7)指出:两种诱导物所产生之脂肪酶,在不同类型的底物上反应的相对速度不同。以橄榄油、三油酸甘油酯、豆油等不饱和脂肪酸甘油酯为底物,蛹油诱导之脂肪酶活力高于豆油诱导之脂肪酶;以饱和的三乙酸甘油酯为底物,结果则相反。因此我们推测二种油脂所诱导之脂肪酶很可能是不同类型的。

不同底物诱导产生不同类型的脂肪酶,不仅有理论意义,而且也有实用价值。我们曾试验以不同底物(包括饱和、不饱和、动物、植物油脂等)诱导产生之脂肪酶作用于黄油,不但增加了黄油的香味,而且所产生香味的类型也有区别,经在食品中试用后效果良好,为改变食品香味类型提供了新的可能的途径。

在绢丝原料脱脂上应用 Du-32 脂肪酶脱脂的初步结果表明,在酶反应的最适条

件下作用一定时间,可以脱除绢丝原料中的大部分蛹油,如和蛋白酶脱胶联合使用,效果更为明显。

四、Du-32 脂肪酶的一些性质

(一)最适 pH 磷酸缓冲液、Tris 缓冲液和不同 pH 对 Du-32 脂肪酶活力的影响如图 2,其最适 pH 在 8.0—8.5。Tris 缓冲液比磷酸缓冲液在相同 pH 时脂肪酶活力稍高。

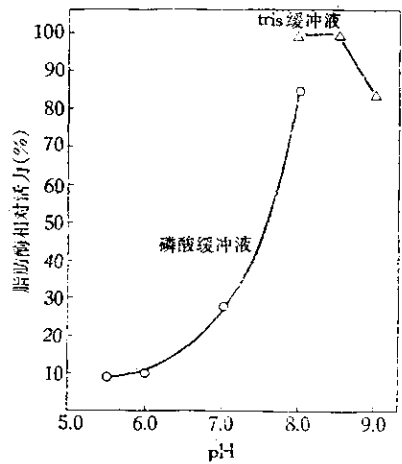


图 2 Du-32 脂肪酶的最适 pH

(二)对 pH 的稳定性 将脂肪酶溶液分别调节 pH 为 7.8、7.2、6.5、6.0、5.5、5.0、4.5、4.0。在 10—15℃ 保温 40 小时,脂肪酶活力变化如图 3。pH 在 5.0—8.0 间影响不大,pH 4.5 以下就很不稳定。

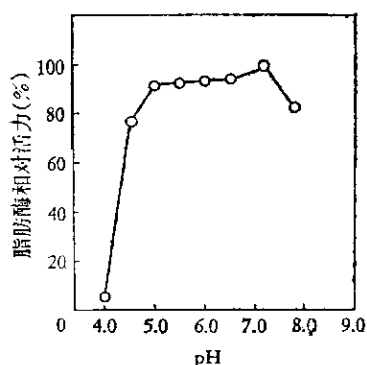


图3 pH对Du-32脂肪酶稳定性的影响

(三)最适温度 在聚乙烯醇乳化系统中,以橄榄油为底物,在 pH 8.0 时,酶反应的最适温度为 40°C (图 4)。

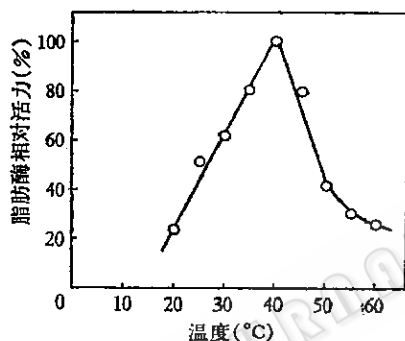


图4 Du-32脂肪酶的最适温度

(四)热稳定性 Du-32 脂肪酶对热的稳定性如图 5 所示,将酶液保温 10 分

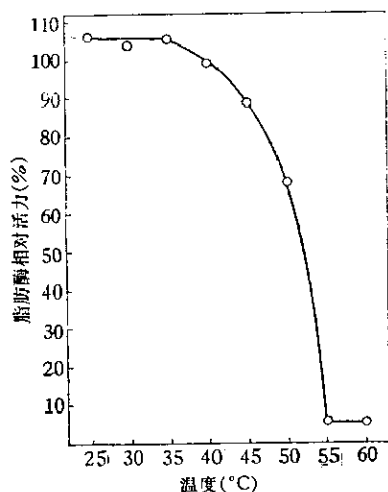


图5 Du-32 脂肪酶的热稳定性

钟,在 25—40°C 基本不影响活力,在 45°C 以上酶活力即显著下降,55°C 以上则基本丧失活力。

酶溶液在不同温度下的失活时间如图 6 所示,在 50°C 下 20 分钟失活,40°C 经 4 小时失活,28°C 经 44 小时失活,10°C 以下脂肪酶可保持活力在两周以上。

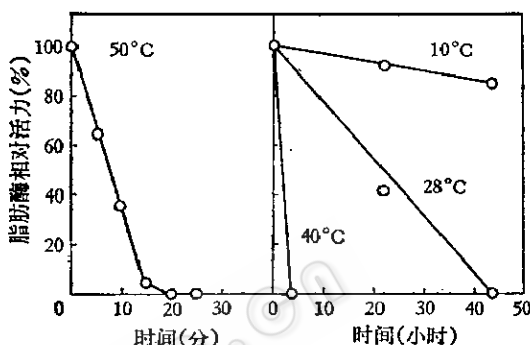


图6 Du-32 脂肪酶在不同温度下酶的失活情况

(五)激活剂和金属离子对脂肪酶活力的影响 牛胆酸钠对 Du-32 脂肪酶的激活作用十分明显,在聚乙烯醇乳化系统中加入 0.01% 牛胆酸钠,则显著地提高酶活力(图 7),当浓度增加至 0.1%—0.3% 时,因乳化系统被破坏,酶活力不能测定。胆盐对脂肪酶的激活作用,有人认为是由于胆盐的表面活性作用增加了乳化效

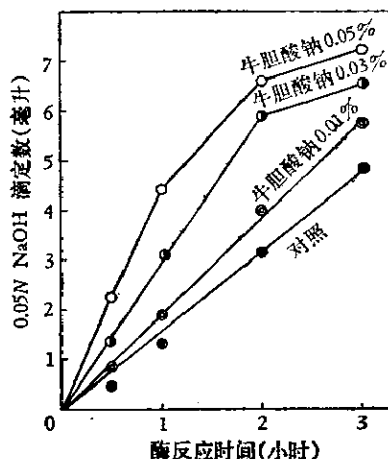


图7 牛胆酸钠对 Du-32 脂肪酶的激活作用

果^[2]。可是有许多表面活性剂有很好的乳化效果,但对脂肪酶却有强烈的抑制作用。Ota 和 Yamada 曾对胆盐和钙离子对 *Candida paraliopolytica* 脂肪酶的激活作用进行研究,认为可能是牛胆酸钠等阴离子表面活性剂和油、水乳化后,表面活性剂存在于界面,疏水性基团溶于油层,亲水性基团在水中解离而带负电,酶分子尤其是活性中心周围带正电,因而靠 Coulomb 力和底物分子在界面结合,从而提高了酶的活力,而一些阳离子表面活性剂可能和上述反应相反,因而呈抑制作用^[15,16]。

钙离子能激活脂肪酶,据认为由于钙离子能和脂肪酸生成不溶解的钙皂,因而促进酶反应的进行^[17]。Wills 认为钙离子能维持脂肪酶的稳定性,用络合剂除去钙离子,则酶的热稳定性就很差,因此推测钙离子是脂肪酶的一个组成成份^[18]。我们试验了 CaCl_2 对 Du-32 脂肪酶的作用,在 0—1% 范围内,对脂肪酶并无激活作用,增加至 3%,则酶活力受抑制。上述结果跟 Ota 和 Yamada^[15] 在研究 *C. paraliopolytica* 的脂肪酶时所观察到的情况相同。在聚乙烯醇乳化系统中,牛胆酸钠能激活脂肪酶,而钙离子则无作用。看来 *E. ashbyii* 和 *C. paraliopolytica* 同属酵母,因此脂肪酶的一些性质亦相类似。

参 考 资 料

- [1] Desnuelle, P. and Savary, P.: *J. Lipid Res.*, 4:369, 1963.
- [2] Wills, E. D.: *Adv. Lipid Res.*, 3:197, 1965.
- [3] 东俊彦: 高分子, 16: 1220, 1967.
- [4] 太田安美: 化学と生物, 6: 205, 1968.
- [5] Liu, W. H., Beppu, T. and Arima, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 36:1919, 1972.
- [6] Ota, Y. and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 30:351, 1966.
- [7] Khan, I. M., Dill, C. W., Chandan, R. C. and Shahani, K. M.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 132:68, 1967.
- [8] Smith, J. L. and Alford, J. A.: *Appl. Microbiol.*, 14:699, 1966.
- [9] Ota, Y., Suzuki, M. and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 32:390, 1968.
- [10] 山田浩一, 町田晴夫, 东俊彦, 小出章夫, 植田克子: 日本农化, 37: 645, 1963.
- [11] Alford, J. A. and Pierce, D. A.: *J. Bact.*, 86:24, 1963.
- [12] Locurto, R. B.: *Boll. Ist. Sieroter. Milan.*, 45:329, 1966.
- [13] Singer, T. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 18:229, 1948.
- [14] Oi, S., Sawada, A. and Satomura, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 31:1357, 1967.
- [15] Ota, Y. and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 30:1030, 1966.
- [16] Ota, Y. and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 31:809, 1967.
- [17] Schönhedder, F. and Volqvartz, K.: *Acta Physiol. Scand.*, 10:62, 1945.
- [18] Wills, E. D.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 40:481, 1960.
- [19] Paigen, K. and Williams, B.: *Adv. Microbial. Physiol.* (Rose, A. H. and Wilkinson, J. F. ed.), 4:251—318, 1970.

STUDIES ON THE LIPASE OF *EREMOTHECIUM* *ASHBYII* Du-32

SHEN YUNG-CHIANG, LIU TZU-CHÜN,

CHANG CHING-LU AND WANG LI-WÊN

(*Institute of Shanghai Plant Physiology, Shanghai*)

Eremothecium ashbyii Du-32 produced a maximum amount of lipase (about 400 units/ml broth) when grown at 28°C for 26 hours in a soybean meal-corn steep liquor, soybean oil and KH_2PO_4 medium at pH 6.8. Lipids were required for the induction of lipase production by the fungus. Glucose strongly inhibited the lipase formation in the oil medium, most likely due to the "glucose effect". The relative rate of hydrolysis of four assay substrates by enzyme preparations induced with different lipid materials varied with the in-

ducing materials used, indicating the presence of more than one type of the lipase.

The enzyme possessed an optimum pH at 8.0, and appeared to be fairly stable at pH 5.0—8.0. The optimum temperature was 40°C. Heating at 55°C for 10 minutes, 50°C for 20 minutes, 40°C for 4 hours and 28°C for 44 hours destroyed the enzyme activity entirely.

In polyvinyl alcohol emulsion system, sodium taurocholate showed conspicuous activating effect, but CaCl_2 had no effect on the lipase activity.