

脂肪酶产生菌 *Geotrichum* sp. AS 2.1135 产酶条件及酶一般性质的研究

谢舜珍 吴琼发 徐家立

(中国科学院微生物研究所, 北京)

在 92 株能同化油的地霉属菌株中, *Geotrichum* sp. AS2.1135 菌株产脂肪酶活力为 50—60u/ml, 对其产酶条件的研究表明, 不饱和长链脂肪酸和油类有利于酶的形成。在 4% 豆饼粉作为有机氮源的培养基中, 加入 0.2% 尿素, 酶活力显著增加, 酶活达 150u/ml。用聚乙二醇橄榄油乳化系统测定酶的作用最适 pH 为 8.0, 最适温度为 40—42℃。在 pH4—9 时 5℃ 下存放 24 小时, 或在 pH 5 和 8 时 45℃ 保持 15 分钟, 酶活力不变。

关键词 脂肪酶

自 1957 年 Foster 等^[1]发现白地霉 (*Geotrichum candidum*) 脂肪酶 (EC3·1·1·3) 以来, Iwai 等曾报道白地霉产生脂肪酶需要脂类物质^[2], Tsujisaka 等报道了白地霉脂肪酶的性质^[3], 并与几种真菌脂肪酶在性质上进行了比较^[4]。本文除报道 *Geotrichum* sp. AS2.1135 产生脂肪酶的条件及酶的一般性质外, 还比较了它和解脂假丝酵母脂肪酶的性质^[5]。

材料和方法

(一) 菌种

本试验采用的 92 株地霉属菌株, 均系中国科学院微生物所八室提供。

(二) 脂肪酶活力测定方法

按 Tomizuka 的方法^[6]。

(三) 油同化平板法

在含有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%、 K_2HPO_4 0.1%、 KH_2PO_4 0.3%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、植物油(橄榄油或菜籽油)0.5%、琼脂 1.5%(本文所用浓度均为 W/V%)的平板上, 接种待测菌株, 在 28℃ 培养 24 小时, 观察生长情况。

(四) 摇瓶筛选方法

于 250ml 三角瓶中加 40ml 培养液(鱼肝油 2%、 KH_2PO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、橄

榄油 0.5%) 15 磅 30 分钟灭菌, 接种待测菌一环, 28℃ 200r/min 旋转摇床培养 24 小时, 测定发酵液脂肪酶活力。

(五) 硫酸铵盐析及脱盐酶液制备

取 48 小时的培养液, 1300r/min 冷冻离心 15 分钟, 上清液中加入饱和度为 60% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析过夜, 离心, 沉淀溶于适量的蒸馏水中, 水流透析直至无 NH_4^+ 。该硫酸铵脱盐酶液用于酶的一般性质试验。

(六) 菌体生长量测定

取定量的发酵液, 用新华滤纸抽滤除去液体, 将沉淀用蒸馏水洗二次, 抽干, 菌体在 105℃ 下干燥至恒重。

结果和讨论

(一) 油同化与产酶的关系

以油为唯一碳源进行 92 株菌的同化试验, 观察生长情况并测定经摇瓶培养后的酶活力, 结果见表 1。在能同化油的菌株中, 具有脂肪酶活力的占半数以上, 其中 AS2.1135 酶活力较高, 为 50—60u/ml, 故用该菌株进行试验。根据表 1 结果提出在菌种初选时, 以能同化油作为本属菌株

本文于 1985 年 5 月 23 日收到。

表 1 同化油与产酶的关系

Table 1 Relation between assimilation of oils and lipase activity

菌株 Strain	株数 No. of strain	产酶株数 No. of strain of lipase production	产酶株数占同化油株数的百分率 (%) No. of strain of lipase production percent
白地霉 <i>G. candidum</i>	5	5	62.5
地霉属 <i>G. sp.</i>	84	49	58.3
合计 Total	92	54	58.6

初选指标之一。

(二) 氮源对酶形成的影响

在 K_2HPO_4 0.1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、橄榄油 0.5% 的基础培养液中, 加 2% 的各种氮源, 结果见表 2。动植物的有机氮源和尿素都有利于酶的形成。

表 2 氮源对酶形成的影响

Table 2 Effect of nitrogen sources on lipase production

氮源 Nitrogen source	脂肪酶活力 Lipase activity (u/ml)
大豆蛋白 Soya peptone	55
鱼 肝 油 Fish peptone	50
黄豆饼粉 Soybean meal	17.5
聚 肽 粉 Polypeptone	57.5
尿 素 Urea	20
不 加 None	0

(三) 碳源对酶形成的影响

在鱼肝油为 2%、 K_2HPO_4 0.1%、 KH_2PO_4 0.3%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% 的基础培养液中, 加入 0.5% 的各种碳源, 测定结果见表 3。液态油和长链不饱和脂肪酸有利于酶的形成。

表 3 碳源对酶形成的影响

Table 3 Carbon sources on lipase production

碳源 Carbon source	脂肪酶活力 Lipase activity (u/ml)
棕榈酸 Palmitic acid	0
桂 酸 Lauric acid	0
肉豆蔻酸 Myristic acid	0
硬脂酸 Stearic acid	0
亚油酸 Linoleic acid	40
油 酸 Oleic acid	65
豆 油 Soya oil	55
橄榄油 Olive oil	55
棉籽油 Cotton seed oil	50
菜籽油 Rape seed oil	55
蓖麻油 Castor oil	40
甘油三油酸脂 Triolein	55
三丁酸脂 Glycerol tributyrat	0
甘 油 Glycerol	0
油酸 + 甘油 Oleic acid + Glycerol	0
葡萄糖 Glucose	0
不加 None	0

(四) 甘油浓度对酶形成的影响

为观察不同浓度的甘油对酶形成的影响, 用与表 3 相同的基础培养液, 在其中加油酸 0.5%, 再加入各种浓度的甘油, 结果见表 4。随着甘油浓度的增大, 菌体量增加, 对酶形成的抑制作用更明显。

表 4 甘油浓度对酶形成的影响

Table 4 Effect of concentration of glycerol on lipase production

甘油浓度 (W/V)% Concentration of glycerol	0	0.3	0.6	0.95	1.5
脂肪酶活力 Lipase activity u/ml	75	65	40	0	0
菌 体 量 Growth value mg/ml	8.3	9.0	12.75	14.95	16.5

(五) 培养液组成对比对酶形成的影响

试验采用 $L_9(3^4)$ 正交表, 比较了 (A) (B) 两组培养液组成配比, 结果如图 1 所

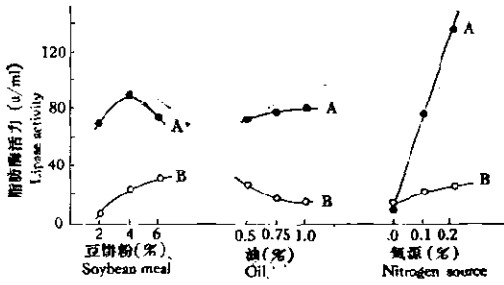


图1 培养液组成对酶形成的影响

Fig 1 Effect of component of medium on lipase production

A: 豆饼粉 Soybean meal 2, 4, 6%, 橄榄油 Olive oil 0.5, 0.75, 1.0%, 尿素 Urea 0, 0.1, 0.2%;
B: 豆饼粉 Soybean meal 2, 4, 6%, 橄榄油 Olive oil 0.5, 0.75, 1.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0, 0.1, 0.2%

示。

(六) 尿素浓度对酶形成的影响

在豆饼粉为 4.0%，橄榄油 0.75%， KH_2PO_4 0.1%， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% 的培养液中，加入不同浓度的尿素，结果见图 2。

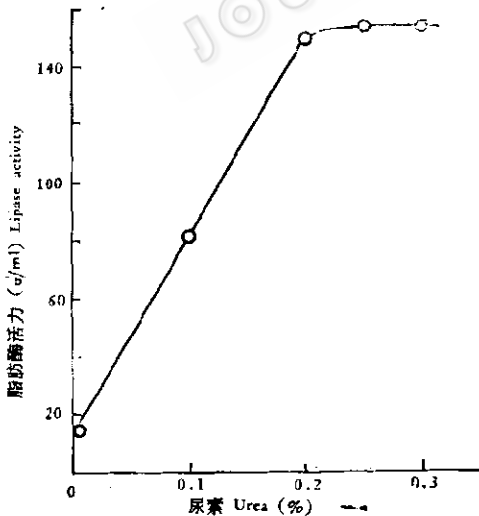


图2 尿素浓度对酶形成的影响

Fig. 2 Effect of concentration of urea on lipase production

图 1 和图 2 的结果表明，在豆饼粉为 4.0%、橄榄油 0.75%、 KH_2PO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、尿素 0.2% 组成的培养液中培养，发酵液的脂肪酶活力可达 150 u/ml。

(七) 脂肪酶性质

1. 酶作用最适 pH: 用 0.1 M pH4—10 的各种缓冲液与橄榄油乳化液在 40℃ 水浴中保温 10 分钟，测定酶活力，结果如图 3 所示。酶作用最适 pH 为 8.0。

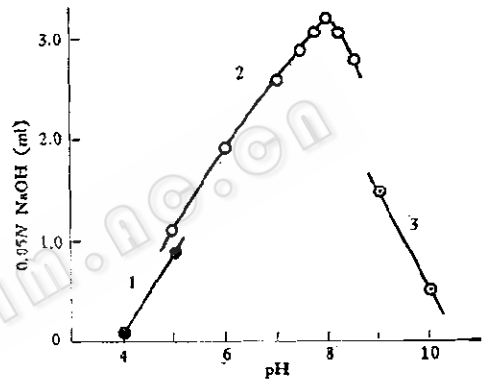


图3 脂肪酶活力的最适 pH

Fig 3 Optimum pH for lipase activity

1. pH4—5 为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 McIlvaine buffer solution
2. pH5—8.5 为磷酸缓冲液 Phosphate buffer solution
3. pH9—10 为甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 Glycine-sodium hydroxide buffer solution

2 酶作用最适温度: 按照脂肪酶活力的测定方法，在不同温度下测定酶活力，结果如图 4 所示。酶作用最适温度为 40—42℃。

3. 酶的 pH 稳定性: 酶液与等体积的 0.1M pH 2—10 的各种缓冲液混匀后，分别在 5℃ 和 40℃ 存放 24 小时后，用 0.2 M pH 7.8 的磷酸缓冲液稀释，然后测定酶活力，结果见图 5。在 pH4—9 时 5℃ 下存放 24 小时，仍保留酶活性；在 pH 5—7 时 40℃ 下存放 24 小时，保留 80% 酶活力。

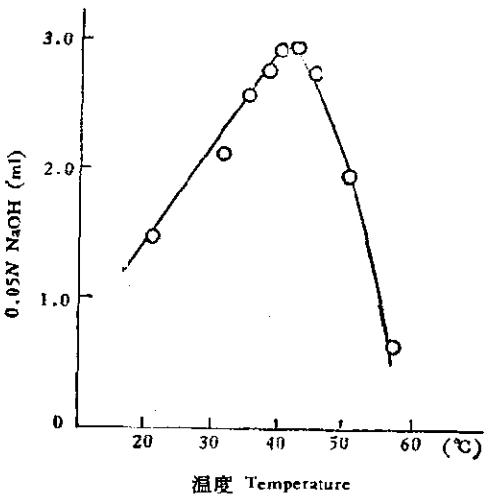


图 4 脂肪酶活力的最适温度
Fig. 4 Optimum temperature for lipase activity

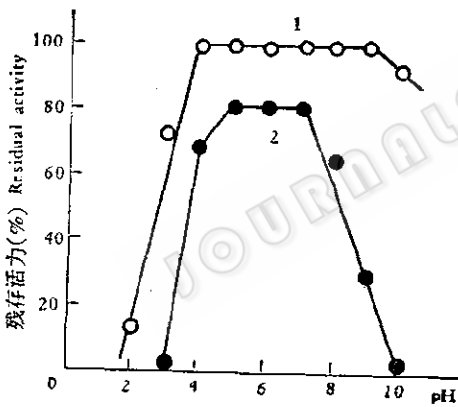


图 5 pH 对脂肪酶活力稳定性的影响
Fig. 5 Effect of pH on lipase stability
1. 5°C 下存放 24 小时 At 5°C for 24h
2. 40°C 下存放 24 小时 At 40°C for 24h

4. 酶的热稳定性: 酶液分别与 0.1 M pH 5.0 和 8.0 的磷酸缓冲液在不同温度下保持 15 分钟, 立即取出放在冰浴中冷却后, 测定酶活力, 结果见图 6。在 45°C 下保持 15 分钟, 酶活力不变。在 pH 5.0 时 55°C 15 分钟, 残存酶活力为 60%, 在 pH 8.0 时 55°C 15 分钟, 残存酶活力为 20% 左右。

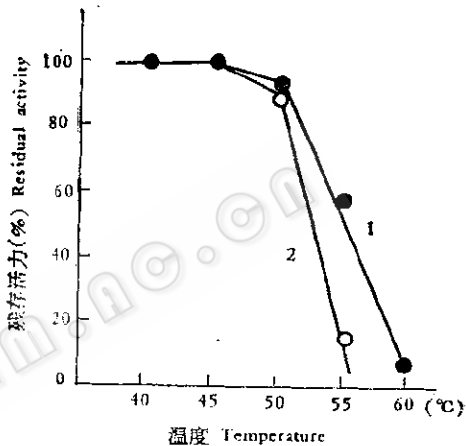


图 6 温度对脂肪酶稳定性的影响
Fig. 6 Effect of temperature on lipase stability
1. pH 5.0
2. pH 8.0

(八) 酶性质比较

地霉脂肪酶与解脂假丝酵母脂肪酶^[6]性质比较见表 5。二者基本性质相似, 在油脂水解中应用多酶体系, 有共同使用的可能性, 正在进行试验研究。

表 5 两种脂肪酶性质比较

Table 5 Comparison of the properties of two lipases

脂肪酶 Lipase	最适 pH Optimum pH	最适温度 Optimum temperature	pH 稳定范围 The range of pH stability	热稳定性 Thermostability
地霉脂肪酶 (from <i>G. sp.</i> AS 2.1135)	8.0	40—42°C	4—9 (5°C, 24h)	45°C (pH 5.8, 15min)
解脂假丝酵母脂肪酶 (from <i>C. lipolytica</i>)	7.8	40°C	4—8 (5°C, 48h)	40°C (pH 5.5, 20min)

参 考 文 献

- [1] Foster, E. M. et al.: Principles of Dairy Microbiology, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N., p. 40, 1957.
- [2] Iwai, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 37(4): 929—931, 1973.
- [3] Tsujisaka, Y. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 37(6): 1457—1464, 1973.
- [4] Tsujisaka, Y. et al.: 科学 & 工業, 58(2): 60—69, 1984.
- [5] 中国科学院微生物研究所脂肪酶组: 中国微生物学会论文摘要汇编, p. 132, 1979 年。
- [6] Tomizuka, N. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 30(6): 576—584, 1966.

STUDIES ON LIPASE PRODUCTION FROM *GEOTRICHUM* SP. AND ITS PROPERTIES

Xie Shunzhen Wu Qiongfa Xu Jiali
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Geotrichum sp. strain AS 2.1135 was capable of assimilation of oil and was found to produce large amount of lipase 150 u/ml. Obtained result showed that some sorts of oil and unsaturated long chain fatty acids were effective on lipase production. The lipase activity was increased by addition of organic N(0.2% urea) into the merium containing 4% soy-bean meal, 0.75% olive oil, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (W/V). Optimum pH for the hydrolysis of olive oil was 8.0 by

means of using a polyvinyl alcohol emulsified system. Optimum temperature of lipase reaction was 40°C to 42°C. The lipase activity was stable in the range of pH 4 to 9 at 5°C for 24 h, and was stable below 45°C for 15 min at pH 5 and 8, respectively.

Key word

Lipase