

白地霉一新变种的鉴定及其脂肪酶的研究

王美英 徐家立

(中国科学院微生物研究所,北京)

从各种加工厂采集的污泥、废水样品中,分离出 157 株菌落呈白色,绒毛状或粉状,皮膜型或脂泥型有脂肪酶活力的菌株。经筛选,获得一株产生高活力脂肪酶的菌株——S863,其发酵液酶活力达 400u/ml。

对 S863 菌株进行了形态、培养特征、生理生化特性等鉴定,认为是个新变种,定名为白地霉利用 D-阿拉伯糖变种 (*Geotrichum candidum* var. *D-arabinosum*)。

S863 菌株发酵液的离心上清液,经乙醇沉淀,丙酮脱水干燥,得到脂肪酶粗制剂。它在聚乙烯醇橄榄油乳化液系统中,水解橄榄油的最适 pH 为 7.6,最适温度为 43℃,在 pH 5—9 范围内 5℃ 下存放 24 小时及 pH 7.6 40℃ 保温 15 分钟,酶活力均未见损失。

关键词 白地霉;脂肪酶

在自然界分布很广的白地霉能产生脂肪酶,但它需要有脂类物质作诱导^[1],白地霉这一特性引起了各国学者的兴趣。

1947 年,Popova 等人发现白地霉 (*Oidium lactis*) 具有合成脂肪的能力^[2]。1951 年,Purko 等人发现白地霉 (*Geotrichum candidum*) 可水解奶油释放出水溶性的有机酸^[3]。1952 年,Nelson 发现白地霉能产生脂肪酶,并对其性质进行了研究^[4],他还研究了营养因子对白地霉的生长和产生脂肪酶的影响^[5]。1973 年,Tsujisaka 等人发表关于白地霉脂肪酶的纯化、结晶和性质的文章^[6]。1986 年,谢舜珍等人对白地霉属脂肪酶的产生和性质也进行了研究^[7]。

本文报道从含油脂的加工厂污泥和废水中分离到的高活力脂肪酶产生菌的分类鉴定结果^[8-11]及其产生的脂肪酶的性质。

材料和方 法

(一) 菌种来源

157 株菌均从北京的油脂加工厂污泥、毛皮加工厂废水、粉丝加工厂废水、乳制品厂废水等样品中分离得到。

(二) 分离培养基及方法

1. 液体聚集培养基 (%): NH_4Cl 0.5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.35, KH_2PO_4 0.15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, NaCl 0.05, 酵母膏 0.02, 橄榄油 2, 装管、灭菌。每管接入少量样品,28℃ 培养 5—7 天,培养液混浊,表面长白醭,移入第二管,连续聚集三次。

2. 固体平板培养基 (%): NH_4Cl 0.2, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.1, KH_2PO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, NaCl 0.05, 酵母膏 0.02, 蛋白胨 1, 橄榄油 2, 琼脂 2, 灭菌。聚集样品平板分离,28℃ 培养 2—4 天,挑取白色,毛状或粉状,脂泥型或皮膜型的单菌落。

3. 分解脂肪培养基: 按《常见与常用真菌》的方法^[12]。

(三) 筛选培养基及方法

本文于 1987 年 4 月 29 日收到。

承蒙方心芳先生审阅本文并提出宝贵意见,黄河和乐静姝同志对菌种鉴定工作给予帮助,特此致谢。

1. 分解油脂的初筛培养基(%)：蛋白胨 2, NH_4NO_3 0.5, 橄榄油 3, 装管, 灭菌。单菌落接入试管, 28℃ 培养 5 天, 利用油脂者, 进行复筛。

2. 摇瓶复筛培养基(%)：蛋白胨 2, NH_4NO_3 0.5, 橄榄油 0.5, 装瓶, 灭菌。接种一环测定菌, 28℃ 220r/min 旋转摇床培养 24 小时, 测定发酵液脂肪酶活力。

(四) 脂肪酶活力测定方法

按 Tomizuka 的方法^[11]。

(五) 酶液的制备

培养基(%)：蛋白胨 4, NH_4NO_3 0.5, 橄榄油 1, pH6, 250ml 三角瓶装 40ml 培养液, 灭菌。接种菌一环, 28℃ 220r/min 旋转摇床培养 48 小时, 培养液离心, 除去菌体, 上清液即为酶液。

(六) 粗酶粉的制备

取 48 小时培养液的上清液先放入冰箱 -18℃ 半小时, 取出在冰浴(-4℃)加 2 倍体积冷酒精静置半小时, 13000r/min 冷冻离心, 沉淀用丙酮洗脱, 离心, 沉淀物在室温(20℃)下自然干燥, 即为粗酶粉。

结果和讨论

(一) 菌株筛选

从各种油脂加工厂污泥和废水等处分离到 157 株, 在麦芽汁固体培养基上菌落

白色、绒毛状或粉状, 皮膜型或脂泥型的产脂肪酶的菌株, 结果见表 1。

(二) 菌种鉴定

从 157 株菌中筛选到一株高活力脂肪酶产生菌株——S863, 将此菌株进行鉴定。

1. 形态特征:

(1) 麦芽汁培养 28℃ 1 天产生白色膜, 毛绒状, 韧不易下沉, 液清, 真菌丝, 有的有两叉分枝, 横隔少, 菌丝宽 2.5—9 μm , 一般为 3.5 × 7 μm , 裂殖, 节孢子单个或连接成链, 长筒形, 个别圆形。末端圆头, 刚断裂者为齐头(图 1)。

(2) 麦芽汁琼脂斜面划线培养 28℃ 3 天, 菌落白色, 毛状, 皮膜型, 菌丝及节孢子形状与麦芽汁中的近似。

(3) 麦芽汁琼脂悬滴培养 28℃ 14 小时, 节孢子发芽形成菌丝, 有横隔膜, 悬滴边缘处有菌丝断裂为节孢子(图 2)。22 小时一部分菌丝上端断裂成节孢子链(图 3)。

(4) 在麦芽汁琼脂上 28℃ 培养 3 天, 菌落直径 30—40mm, 5 天为 50—60mm,

表 1 从不同来源分离产脂肪酶的菌株

Table 1 Lipase producing strains with various activity isolated different habitats

菌株来源 Strain origin	脂肪酶活力 Lipase activity(u/ml)			
	2—5	5—50	50—200	>200
油脂加工厂污泥 Oil processing factory mud	26	5	—	1
毛皮加工厂废水 Fur processing factory waste water	24	9	—	—
粉丝加工厂废水 Vermicelli processing factory waste water	27	8	—	—
乳制品厂废水 Milk products factory waste water	21	7	1	—
其他 Other	19	8	1	—
总数 Total	117	37	2	1

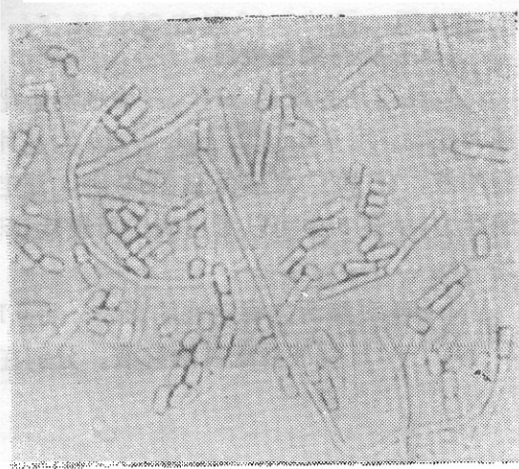


图1 S863 菌株在麦芽汁 28°C 培养
24 小时(×320)

Fig. 1 In malt extract 28°C, 24h

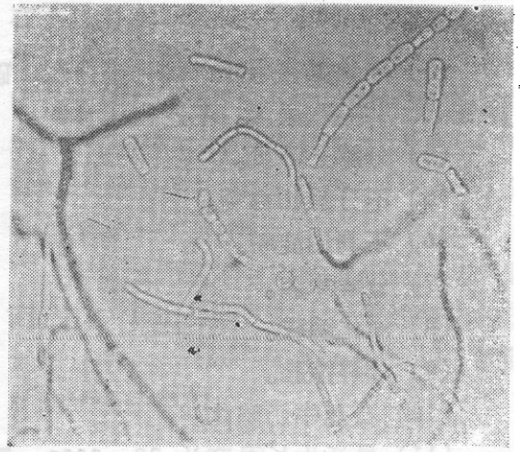


图3 S863 菌株悬滴培养 22 小时(×320)

Fig. 3 In hanging drop 22h

培养 5 天菌落白色, 绒毛状, 均匀, 有同心圈和放射线, 中心有突起(图 4)。

2. 生理生化特征:

(1) 同化糖类: 同化葡萄糖(生酸)、乳糖(生酸)、D-阿拉伯糖(生酸)、半乳糖(生酸)、木糖(生酸)、蜜二糖(不生酸)、甘露糖(不生酸)、果糖(不生酸)。不同化麦芽糖、蔗糖、L-阿拉伯糖、纤维二糖、棉子糖、山梨糖、肝糖、鼠李糖、核糖、太罗糖、松三糖。

(2) 同化醇类: 同化乙醇(生酸)、甘油(生酸)、山梨醇(生酸)、甘露醇(生酸弱), 不同化赤藓醇、侧金盞醇、卫矛醇、肌

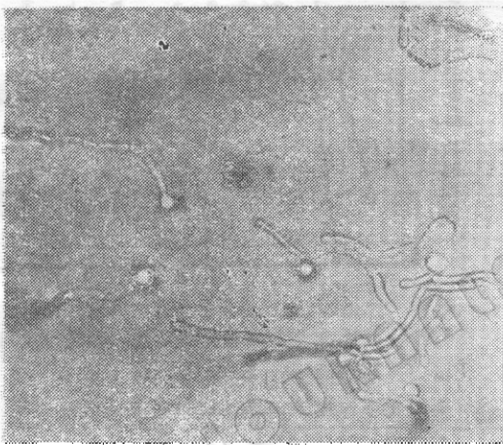


图2 S863 菌株悬滴培养 14 小时(×320)

Fig. 2 In hanging drop 14h

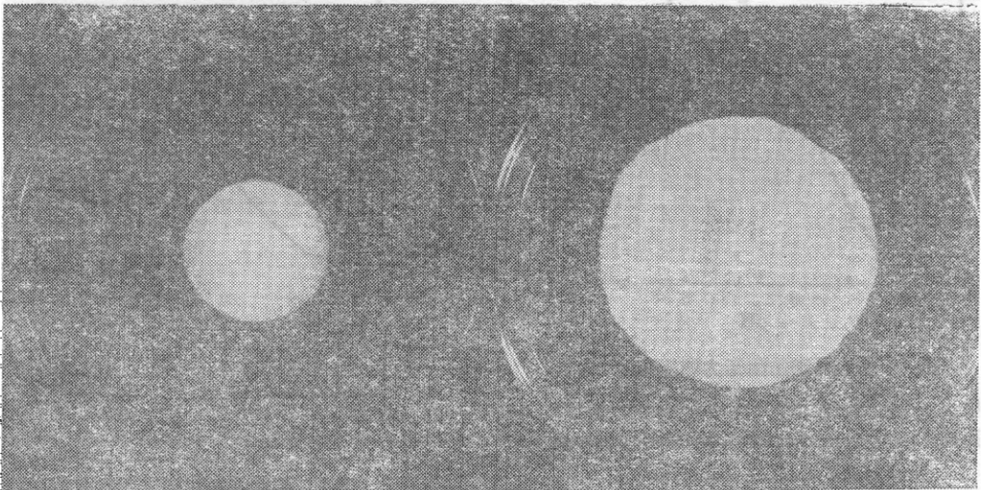


图4 麦芽汁琼脂培养 3 天或 5 天的巨大菌落(×0.8)

Fig. 4 Giant colonies in malt agar 3 or 5 d.

醇。

(3) 同化氮化合物: 同化蛋白胨、硫酸铵、天门冬素、尿素。不同化硝酸钾。

(4) 分解七叶灵。

(5) 不分解杨梅苷。

(6) 不利用淀粉。

(7) 分解果胶。

(8) 液化明胶。

(9) 分解油脂。

(10) 石蕊牛奶酪化。

(11) 最适生长温度为 28—33℃, 最高生长温度为 37℃。

从该菌株的形态特征来看, 与白地霉 (*Geotrichum candidum* Link) 基本相同, 生理生化特性大致也与白地霉相同。唯有在同化糖的种类上, S863 菌株同化 D-阿拉伯糖并产酸, 而白地霉不同化。我们把 S 863 菌株定名为白地霉利用 D-阿拉伯糖变种 (*Geotrichum candidum* var. *D-arabinosum*)。

(三) 脂肪酶的性质

1. 酶作用的最适 pH: 以橄榄油乳化液为底物, 用 0.1mol/L pH 4—10 的各种缓冲液, 在 40℃ 水浴保温 10 分钟, 测定酶活力, 从图 5 中可以看出酶作用最适 pH 为 7.6。

2. pH 对酶活力稳定性的影响: 将 0.1 M pH 2—11 缓冲液配制的酶液, 分别在

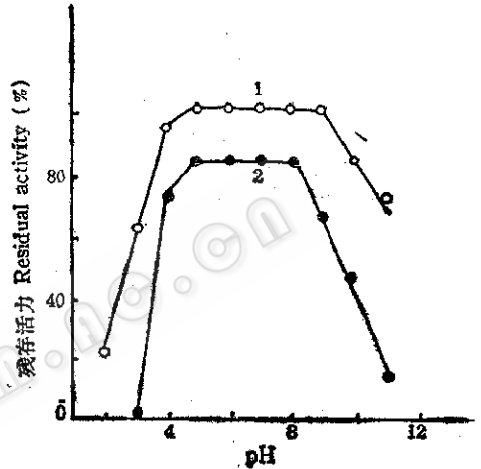


图 6 pH 对脂肪酶活力稳定性的影响
Fig. 6 Effect of pH on lipase stability

1. 5℃下存放 24 小时 At 5°C for 24h
2. 30℃下存放 24 小时 At 30°C for 24h

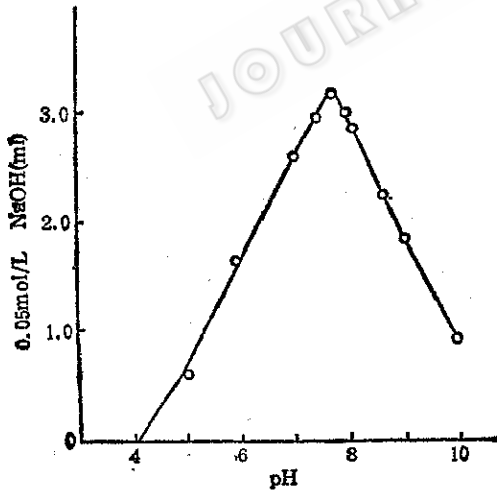


图 5 pH 对脂肪酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on lipase activity

缓冲系统: pH 4—9 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液
McIlvaine buffer solution
pH 8—10 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液
Glycine-sodium hydroxide buffer solution

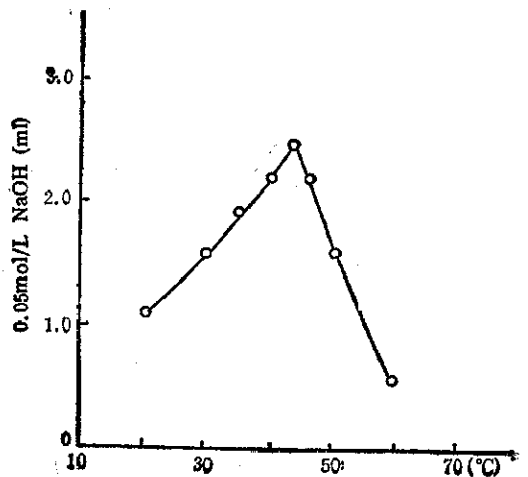


图 7 温度对脂肪酶活力的影响

Fig. 7 Effect of temperature on lipase activity

5℃ 和 30℃ 存放 24 小时后, 用 0.2mol/L pH 7.6 缓冲液稀释, 然后测定酶活力, 结果见图 6。该酶在 pH 5—9, 5℃ 下存放 24 小时仍保留酶活力, pH 5—8, 30℃ 下存放 24 小时保留 83% 的酶活力。

3. 酶作用的最适温度: 用脂肪酶活力的测定方法, 在不同温度下测定酶活力结果, (图 7) 说明该酶作用的最适温度为 43℃。

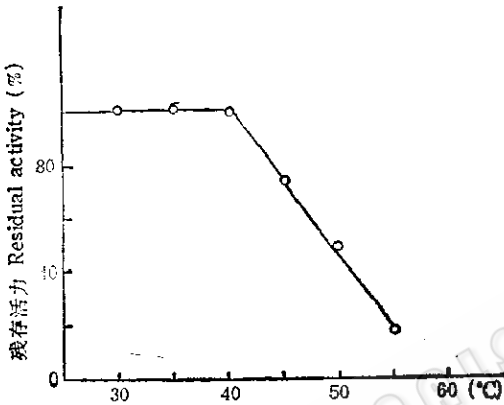


图 8 温度对脂肪酶活力稳定性的影响

Fig. 8 Effect of temperature on lipase stability

4. 温度对酶活力稳定性的影响: 将酶液分别与 0.1mol/L pH 7.6 的磷酸缓冲液

在不同温度下保温 15 分钟, 立即取出放在冰浴中冷却后测定酶活力。结果(图 8)说明, 此酶在 pH 7.6 40℃ 保持 15 分钟酶活力不变, 45℃ 15 分钟保持 75% 的活力, 50℃ 15 分钟保持 50% 的活力, 55℃ 15 分钟还保留 19% 的活力。

对该酶的基本性质的初步研究结果表明, 它与 Tsujisaka^[6] 等人报道的纯化的白地霉 (*Geotrichum candidum* Link) 的脂肪酶的性质类似。

参 考 文 献

- [1] Iwai, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 37(4): 929—931, 1973.
- [2] Popova, E. M. et al.: *Mikrobiologiya*, 16: 51, 1947.
- [3] Purko, M. et al.: *J. Dairy Sci.*, 34: 477, 1951.
- [4] Nelson, W. O.: *ibid.*, 35: 455, 1952.
- [5] Nelson, W. O.: *ibid.*, 36: 143, 1953.
- [6] Tsujisaka, Y. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 37(6): 1457, 1973.
- [7] 谢舜珍等: *微生物学报*, 26(3): 260, 1986。
- [8] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组:《常见与常用真菌》, 科学出版社, 北京, 1973。
- [9] 方心芳等: *微生物学报*, 12(1): 64, 1966。
- [10] Weijman, A. C. M.: *Ant. Van Leeuwenh.*, 45: 119, 1979.
- [11] Gucho, E.: *ibid.*, 45: 199, 1979.
- [12] Tomizuka, N. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 30(6): 576, 1966.

IDENTIFICATION OF NEW VARIETY OF *GEOTRICHUM CANDIDUM* AND THE PROPERTIES OF LIPASE PRODUCED FROM THIS STRAIN

Wang Meiyong Xu Jiali

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

A strain of S863 with high lipase activity was isolated from a sampling mud from the oil processing factory. Its lipase activity reached 400u per milliter of culture fluid.

Based on the studies of morphological cultural, physiological and biochemical characteristics, the strain S863 was assigned as *Geotrichum candidum* var. ***D-arabinosum***.

The activity keep of the crude enzyme on olive oil was at pH 7.6, 43°C and was stable in the range of pH 5 to 9 when incubated at 5°C for 24h, and not inactivated until 40°C at pH 7.6 for 15 min.

Key words

Geotrichum candidum; Lipase