

# 土壤中中性脂肪酶菌株分离选育及其酶学性质研究\*

叶明 谭炜 施恒寿

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009)

## ISOLATION AND BREEDING OF STRAIN OF NEUTRAL LIPASE FROM SOIL AND ITS ENZYMOLOGICAL PROPERTIES

Ye Ming Tan Wei Shi Hengshou

(College of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009 China)

关键词 脂肪酶活性; 诱变; 产酶条件; 正交试验; 酶学性质

中图分类号 Q939.96 文献标识码 A

脂肪酶是用来催化酯类化合物的分解、合成和酯交换的酶, 具有高度的化学选择性和立体异构性, 可广泛应用于轻纺、皮革、化妆品、洗涤剂、医药以及食品等领域<sup>[1]</sup>。随着研究的深入, 脂肪酶还被应用于石油污染土壤的生物修复<sup>[2]</sup>、柴油替代品的合成、旧报纸的脱墨、含油污水的处理<sup>[3]</sup>等方面, 可见脂肪酶在环保领域也具有良好的应用前景。

由于微生物脂肪酶具有广泛的作用 pH、作用温度范围和对底物的专一性, 使其在酶学理论研究及实际应用中具有非常重要的意义。土壤是微生物的大本营, 土壤微生物在能源循环中扮演着重要的角色<sup>[4]</sup>, 不同土壤环境中微生物的种类和数量及其产生的脂肪酶往往不尽相同, 而且直接从土壤中分离出的菌株产生的脂肪酶其性能往往不能完全满足工业化生产的需要。从土壤中筛选到优良的菌株并对其进行遗传改造, 使其具有生产价值, 是人们努力的方向<sup>[5]</sup>。本研究从不同的含油土壤中分离出产脂肪酶菌株, 筛选出产酶活性较高的菌株进行紫外-亚硝基胍的复合诱变, 获得高产诱变菌株, 并进一步研究其产酶条件和酶学性质, 为微生物脂肪酶的生产 and 应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

从合肥工业大学北门口、工大北门大排挡、工大怡园饭店出污口、肉联厂油菜地、肉联厂出污口等地方采集土样 7 份。

### 1.2 培养基

富集培养基、初筛培养基、复筛培养基参见文献 [6], 略作修改。传代培养基: 蛋白胨 10 g 酵母膏 5 g 橄榄油 1 g NaCl 5 g 琼脂 15 g H<sub>2</sub>O 1 000 ml

### 1.3 产脂肪酶菌株的分离与筛选

取土样 5 g 加入到一个盛有 95 ml 无菌水并装有玻璃珠的锥形瓶中, 振荡 10 min 即成 10<sup>-2</sup> 土壤稀释液。菌株的富集培养、初筛、复筛参见文献 [6]。

### 1.4 菌株鉴定

参照《真菌鉴定手册》<sup>[7]</sup>对 J 菌株进行鉴定。

### 1.5 脂肪酶活性测定

将发酵液过滤, 3 000 r min<sup>-1</sup> 离心 10 min 取上清液, 按照参考文献 [8] 的橄榄油底物乳化法测定酶活性。在 40℃、pH 7.0 的条件下水解橄榄油产生 1 μmol 游离脂肪酸的酶量定义为 1 个活力单位 (U)。

\* 安徽省自然科学基金项目 (050430502) 资助

作者简介: 叶明 (1959~), 男, 安徽怀宁人, 博士, 教授, 硕士生导师。主要从事微生物资源与应用研究。E-mail: yeming123@sina.com

收稿日期: 2007-02-31; 收到修改稿日期: 2007-05-28

## 1.6 紫外与亚硝基胍复合诱变

**1.6.1 孢子悬液的制备** 依据参考文献[9]的方法制成  $1 \times 10^8$  个  $\text{mL}^{-1}$  的孢子悬液。

**1.6.2 紫外诱变** 取 5 ml 孢子悬液于无菌平板中, 用紫外灯 (20 W、253.7 nm), 间距为 30 cm, 分别照射 15 s、30 s、45 s、60 s 和 75 s。在照射过程中孢子悬液用磁力搅拌器进行搅拌。

**1.6.3 亚硝基胍 (NTG) 诱变** 将 1 ml 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  NTG 和 1 ml 0.1  $\text{mol L}^{-1}$  pH 6.0 的磷酸缓冲液加入到 1 ml 上述孢子悬液中, 轻微摇晃。诱变时间分别为 30 min、45 min、60 min、90 min 和 120 min。到达处理时间, 立即进行稀释, 终止反应, 然后将  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  稀释度进行平板涂布, 28°C 恒温培养。

## 1.7 J-7 菌株产脂肪酶条件优化

分别以碳源、氮源、温度和 pH 值为考察因素, 每个因素对应 4 个水平并增加空列, 采用  $L_{16}(4^4)$  的正交试验方案研究这 4 个因素对菌株产酶的影响。所有处理为 3 个重复。

## 1.8 脂肪酶酶学性质

酶作用的最适温度, 酶作用的最适 pH, 酶的热稳定性, 酶的 pH 稳定性 (以上处理均为 3 个重复), 其方法参见文献 [10], 并略作修改。

## 1.9 遗传稳定性试验

对菌株 J-7 连续传代 5 代, 测定酶活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株筛选

对 7 份土样分别进行初筛、复筛, 获得了 10 株产脂肪酶活性较高的菌株, 经过多次分离纯化, 筛选出的菌株中酶活性最高达 22.2  $\text{U mL}^{-1}$ , 命名为 J 菌株。

### 2.2 菌株鉴定

J 菌株菌落初为白色, 后变为灰褐色; 镜检见匍匐菌丝和假根, 菌丝无隔膜, 匍匐菌丝不发达, 假根色淡, 量少。孢囊梗浅褐色, 形成伞状聚合, 长 0.5~2 mm。孢子囊球形, 直径 125~250  $\mu\text{m}$ , 囊轴球形, 褐色, 平滑, 高 40~70  $\mu\text{m}$ , 直径 65~95  $\mu\text{m}$ 。孢子球形, 灰褐色, 直径 4.5~7.0  $\mu\text{m}$ 。根据《真菌鉴定手册》初步鉴定其为少根根霉 (*Rhizopus arrhizus*)。

### 2.3 诱变育种

对 J 菌株进行不同剂量的紫外与亚硝基胍的复合诱变, 选取诱变后致死率大于 90% 的几个处理的菌株, 28°C、180  $\text{r min}^{-1}$  摇瓶培养 4 d 测其脂肪酶酶活性, 结果所选取菌株中, 有 3 株出现负突变, 8 株出现正突变。其中酶活性最高达到了 77.4  $\text{U mL}^{-1}$ , 为 J-7 菌株, 其诱变剂量为 UV 45 s NTG 45 min。

### 2.4 产酶条件的优化

对 J-7 菌株在不同处理下所产脂肪酶酶活性数据进行极差分析, 结果见表 1。

表 1 正交试验结果<sup>1)</sup>

实验号	氮源 <sup>2)</sup>	pH	碳源 <sup>3)</sup>	温度	空列	酶活性 ( $\text{U mL}^{-1}$ )	实验号	氮源 <sup>2)</sup>	pH	碳源 <sup>3)</sup>	温度	空列	酶活性 ( $\text{U mL}^{-1}$ )
1	N1	P1	C1	T1	1	57.2	14	N4	P2	C3	T1	4	38.4
2	N1	P2	C2	T2	2	78.1	15	N4	P3	C2	T4	1	21.1
3	N1	P3	C3	T3	3	17.8	16	N4	P4	C1	T3	2	16.7
4	N1	P4	C4	T4	4	12.2	$K_1$	165.3	143.9	114.0	164.6	120.6	
5	N2	P1	C2	T3	4	48.9	$K_2$	115.1	136.6	196.5	164.3	129.3	
6	N2	P2	C1	T4	3	11.7	$K_3$	99.1	87.9	104.0	91.8	101.8	
7	N2	P3	C4	T1	2	20.6	$K_4$	100.1	111.2	65.1	58.9	127.9	
8	N2	P4	C3	T2	1	33.9	$k_1$	41.3	36.0	28.5	41.2	30.2	
9	N3	P1	C3	T4	2	13.9	$k_2$	28.8	34.2	49.1	41.1	32.3	
10	N3	P2	C4	T3	1	8.4	$k_3$	24.8	22.0	26.0	23.0	25.5	
11	N3	P3	C1	T2	4	28.4	$k_4$	25.0	27.8	16.3	14.7	32.0	
12	N3	P4	C2	T1	3	48.4	R	16.5	14.0	32.8	26.5	6.8	
13	N4	P1	C4	T2	3	23.9							

1) N1、N2、N3、N4 分别代表蛋白胨、黄豆粉、硫酸铵、硝酸铵; P1、P2、P3、P4 分别代表 pH 5、7、9、11; C1、C2、C3、C4 分别代表葡萄糖、橄榄油、淀粉、牛肉膏; T1、T2、T3、T4 分别代表 23°C、28°C、33°C、38°C;  $K_1$ 、 $K_2$ 、 $K_3$ 、 $K_4$  分别表示各因素在水平 1、2、3、4 下的酶活性之和;  $k_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$ 、 $k_4$  分别为  $K_1$ 、 $K_2$ 、 $K_3$ 、 $K_4$  的均值; R 为极差; 2) 40  $\text{g L}^{-1}$ ; 3) 20  $\text{g L}^{-1}$

从表 1 可见,影响脂肪酶酶活性的因素的主次顺序为:碳源、温度、氮源、pH;脂肪酶产生的最佳条件为:发酵培养基以  $20 \text{ g L}^{-1}$  橄榄油作碳源,  $40 \text{ g L}^{-1}$  蛋白胨作氮源,发酵液起始 pH 7.0,发酵温度  $28^\circ\text{C}$ 。

## 2.5 酶学性质

### 2.5.1 酶作用的最适温度

脂肪酶酶活性与温度之间的关系如图 1 所示。结果表明,  $40^\circ\text{C}$  时酶活性最高,  $50^\circ\text{C}$  时仍有较高的酶活性,超过  $50^\circ\text{C}$ ,酶活性下降较快。因此酶作用的最适温度为  $40^\circ\text{C}$ 。

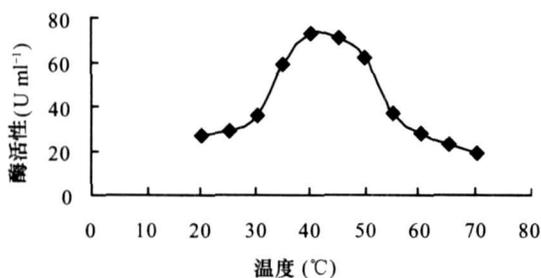


图 1 酶作用的最适温度

### 2.5.2 酶作用的最适 pH

由图 2 可知, J-7 菌株产生的脂肪酶在 pH 7.0 时酶活性最高 (为  $74.4 \text{ U m l}^{-1}$ ),可见此酶作用的最适 pH 为 7.0。

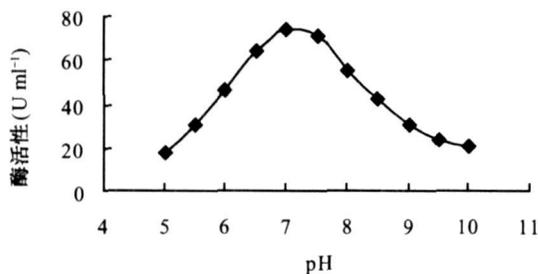


图 2 酶作用的最适 pH

### 2.5.3 酶的热稳定性

以不经处理的酶的相对酶活性为 100%,其余酶活性折算成百分数,对保温时间作图 (图 3)。

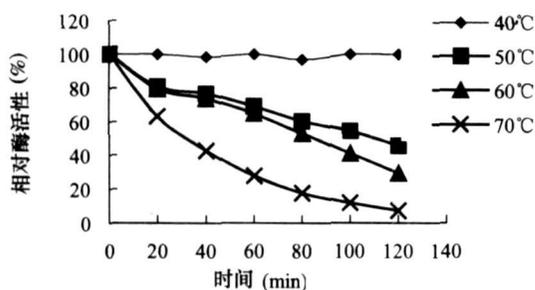


图 3 酶的热稳定性

可以看出, J-7 菌株产生的脂肪酶在  $40^\circ\text{C}$  保温 2 h 基本不失活,  $50^\circ\text{C}$  保温 2 h 保留酶活性 45.5%,  $60^\circ\text{C}$  保温 80 min 后还有 52.9% 的酶活性,  $70^\circ\text{C}$  保温 20 min 后,仍有 63.2% 的酶活性,这表明该酶有一定的耐热性。

### 2.5.4 酶的 pH 稳定性

以最适 pH 的相对酶活性为 100%,其余酶活性折算成百分数。可以看出,在 pH 6.5~7.5 之间酶活性变化较平缓,低于 pH 6.5 高于 pH 7.5 时酶活性下降很快 (图 4)。

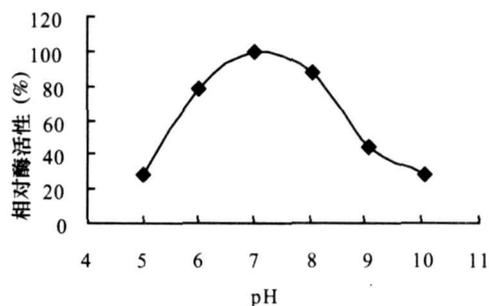


图 4 酶的 pH 稳定性

## 2.6 J-7 菌株产脂肪酶遗传稳定性

对菌株 J-7 连续传代 5 次,酶活性均保持在  $73.3 \sim 76.7 \text{ U m l}^{-1}$  之间 (图 5),说明其具有良好的遗传稳定性。

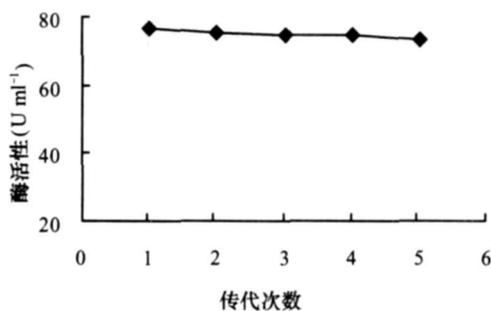


图 5 J-7 菌株产脂肪酶遗传稳定性

## 3 讨论

本研究从土壤中筛选出一株酶活性较高的产中性脂肪酶菌株 J 对其进行紫外与亚硝基胍的复合诱变,成功地选育出了一高产菌株 J-7,其酶活性达到  $77.4 \text{ U m l}^{-1}$ ,较出发菌株提高了 235%,较国内相关文献 [10 11] 所报道的脂肪酶酶活性均有所提高,说明用紫外-亚硝基胍复合诱变的方法选育高产脂肪酶菌株是可行的。

J-7菌株最适产酶条件为橄榄油  $20 \text{ g L}^{-1}$ , 蛋白胨  $40 \text{ g L}^{-1}$ , 起始 pH 7.0 温度  $28^\circ\text{C}$ ; 其脂肪酶在 pH 6.5~7.5之间活性稳定, 在  $40^\circ\text{C}$ 保温 2 h, 基本不失活,  $70^\circ\text{C}$ 时保温 20 min后, 仍有 63.2%的酶活性。可见, J-7菌株所产生的脂肪酶为中性脂肪酶, 且有较高的耐热性, 可望应用于轻纺、油脂、食品、医药以及废纸的脱墨等领域。

## 参考文献

- [ 1 ] Burkert JFM, Maugeri F, Rodrigues M I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresour. Technology*, 2004, 91: 77~84
- [ 2 ] 刘五星, 骆永明, 腾应, 等. 石油污染土壤的生物修复研究进展. *土壤*, 2006, 38(5): 634~639
- [ 3 ] Nildfer C, EhfS. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2004, 20: 193~197
- [ 4 ] Liu BR, Jia GM, Chen J *et al.* A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere*, 2006, 16(1): 18~24
- [ 5 ] 刘智, 李顺鹏. 甲基对硫磷降解菌 DLL-1的诱变育种. *土壤学报*, 2003, 40(2): 293~300
- [ 6 ] Gecemir C, Roberto G J, Tasso M S. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2006, 22: 881~885
- [ 7 ] 魏景超. *真菌鉴定手册*. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 1~66
- [ 8 ] Lin aa V M G, Krieger N, Mitchell D A, *et al.* Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 18: 65~71
- [ 9 ] Nutan D M, Kulkushan B B, Ulka S P, *et al.* Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCM 1207 in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 2031~2034
- [ 10 ] 高修功, 张克昌, 曹淑桂. 脂肪酶产生菌的选育及产酶条件的优化. *微生物学报*, 1998, 38(4): 313~317
- [ 11 ] 邹文欣, 刘慧, 郁文焕. 脂肪酶产生菌 *Serratia liquefaciens* 的分离及其酶性质的研究. *南京大学学报*, 1996, 32(4): 714~717