

# 脂肪酶产生菌黑曲霉 ZW-1 复合诱变育种研究

朱琪, 王维, 兰时乐\* (湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128)

**摘要** [目的]对脂肪酶产生菌黑曲霉 ZW-1 进行复合诱变育种研究。[方法]以脂肪酶产生菌黑曲霉 ZW-1 为出发菌株,通过紫外线、微波及硫酸二乙酯进行复合诱变得变异株,对筛选出的变异株产生的脂肪酶活力进行测定。[结果]试验选育到 1 株脂肪酶产量较高的变异株 8632;在适宜条件下,该菌株产生的脂肪酶活力达 104.62 IU/ml,比出发菌株提高了 125.86%;遗传稳定性试验表明该突变株具有良好的传代稳定性。[结论]该研究为满足脂肪酶在工业生产中的需求提供了科技支持。

**关键词** 脂肪酶;诱变育种;黑曲霉;DES;微波诱变

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)18-07796-04

## Study on Compound Mutation Breeding of Lipase-producing Strain *Aspergillus niger* ZW-1

ZHU Qi et al (College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

**Abstract** [Objective] The aim was to study the compound mutation breeding of lipase-producing strain *Aspergillus niger* ZW-1. [Method] Using the lipase-producing strain *A. niger* ZW-1 as starting strain, mutants were obtained and selected by the compound mutation of ultraviolet, microwave and diethyl sulfate (DES), and the lipase activity of mutants were determined. [Result] A mutant strain 8632 was bred with high yield of lipase; the activity of lipase produced by that strain reached 104.62 IU/ml under suitable conditions, and it was about 125.86% higher than that of the starting strain; the genetic stability experiment showed that the mutant 8632 had good genetic stability after 5 times of sub-culture. [Conclusion] The study provided scientific support to meet the needs of lipase in industrial production.

**Key words** Lipase; Mutation breeding; *Aspergillus niger*; DES; Microwave mutation

脂肪酶全称为三酰甘油水解酶,是一类能催化天然油脂水解成甘油和脂肪酸的酶类,广泛存在于动物、植物和微生物中。目前脂肪酶的来源主要是由微生物发酵产生<sup>[1-5]</sup>。脂肪酶作为重要的工业用酶,其商业价值很值得挖掘。但目前工业用脂肪酶的酶活力较低,难以满足工业生产需求。通过筛选新的高产菌株和采用一定的手段提高酶活力是目前的主要手段。该研究以脂肪酶产生菌黑曲霉 ZW-1 (*Aspergillus niger* ZW-1) 为出发菌株,进行紫外线、微波及 DES 诱变处理,从而得到脂肪酶活性显著提高且遗传性状稳定的突变株,旨在为满足工业生产中脂肪酶的需求提供科技支持。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 出发菌种。**黑曲霉 ZW-1 (*Aspergillus niger* ZW-1) 由湖南农业大学生物科学技术学院微生物实验室分离保存。

**1.1.2 培养基。**斜面培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 ml,pH 值自然;筛选培养基(%):橄榄油乳化液 10,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1,KCl 0.05,NaCl 0.1,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05,FeSO<sub>4</sub> 0.01,1.6% 溴甲酚紫 0.1,琼脂 1.5,pH 6.5~7.0;种子液培养基(%):葡萄糖 3,豆饼粉 2,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05,FeSO<sub>4</sub> 0.02,KCl 0.5,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1,pH 自然;发酵培养基(%):橄榄油 3,蔗糖 6,豆饼粉 2,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02,KCl 0.05,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5,pH 7.0~7.2。

**1.1.3 磷酸缓冲液配制。**分别将 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 配制成 2 mol/L 的母液,然后按一定比例混合,用 pH 计调节溶液的酸碱度至 7.2,备用。

**1.1.4 显色剂配制。**准确称量 5.000 0 g 醋酸铜固体,溶解

至一定量的蒸馏水(<100 ml)中,充分溶解混合后用滤纸过滤除去不溶物,用 100 ml 容量瓶定容,最后用吡啶调节 pH 值至 6.1,即制得 pH 6.1 的 5% 醋酸铜溶液。

### 1.2 方法

**1.2.1 孢子悬浮液制备。**取在 30 ℃ 下培养 4 d 的试管斜面菌种,用无菌水洗下孢子,倒入装有适量玻璃珠的 100 ml 无菌水中,振荡打散,用无菌脱脂棉过滤,并通过适当稀释,在诱变处理前使孢子浓度为 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> 个/ml。

**1.2.2 紫外线诱变。**选取 15 W 的紫外线灯管,在距离 30 cm 处,按不同的辐照时间(10~180 s),对孢子悬浮液进行辐照处理。取经 UV 处理的孢子悬浮液涂布于筛选培养基平板上,30 ℃ 培养 3 d,进行菌落计数,计算 UV 不同辐照时间的致死率。

致死率(%)=(对照菌落数-处理菌落数)/对照菌落数×100%

**1.2.3 微波诱变。**参照文献[6]中的方法;选取经 UV 诱变后酶活最高的突变株为出发菌株,按“1.2.1”方法制备孢子悬浮液,按不同的辐照时间和辐照功率对孢子悬浮液进行辐照处理,用冰浴法消除微波的热效应。将处理后的孢子悬浮液涂布于筛选培养基上,30 ℃ 培养 3 d,进行菌落计数。根据对照平板上的菌落数,计算微波不同辐照时间和辐照功率的致死率。

**1.2.4 硫酸二乙酯(DES)诱变。**选取经微波诱变后酶活最高的突变株为出发菌株,按“1.2.1”方法制备孢子悬浮液。取 32 ml pH 7.0 的磷酸缓冲液,加入 8 ml 孢子悬浮液和不同体积的 DES 原液,使 DES 终浓度分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%,30 ℃ 恒温条件下振荡 30 min 后,分别于 1 ml 处理液中加入 0.5 ml 25% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶液终止反应,适当稀释后,涂布于筛选培养基平板上,30 ℃ 培养 3 d,进行菌落计数,并计算致死率。

**作者简介** 朱琪(1993-),女,湖南常德人,专业:生物工程。\*通讯作者,副教授,硕士生导师,从事微生物资源与利用方面的研究,E-mail:hulanshl@126.com。

**收稿日期** 2013-06-02

选取合适 DES 浓度诱变得到的酶活最高的突变株为出发菌株,固定 DES 诱变浓度,于 30 ℃ 下分别振荡处理不同时间,再分别于 1 ml 处理液中加入 0.5 ml 25%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液终止反应,适当稀释后,涂布于筛选培养基平板中,30 ℃ 培养 3 d,进行菌落计数,并计算致死率。

**1.2.5 突变株的筛选。**选取变色圈于菌落直径之比大于 1.5 的突变株接种于斜面培养基上,培养至成熟后,接种于液体种子培养基中,30 ℃、180 r/min 恒温振荡培养 24 h 后,按 10% (V/V) 接种量接种至发酵培养基中,30 ℃、180 r/min 条件下恒温振荡培养 6 d,测定酶活。

### 1.2.6 酶活测定。

(1)粗酶液制备。取培养好的发酵液于 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液,制得粗酶液。

(2)酶活测定。参照文献[7]中的方法测定脂肪酶酶活力。

脂肪酶酶活力单位(IU)定义:将在 37 ℃ 水浴中,每分钟催化水解脂肪产生 1  $\mu\text{mol}$  脂肪酸所需的酶量定义为一个脂肪酶活力单位(IU)。

酶活计算公式: $X = (xV)/tv$

式中, $X$  为脂肪酶活力(U/ml); $x$  为脂肪酸浓度( $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ); $V$  为脂肪酸溶液的体积(ml); $v$  为酶液的用量(ml); $t$  为作用时间(min)。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外线的诱变效果

**2.1.1 紫外线诱变对 ZW-1 孢子的致死率。**以脂肪酶产生菌 ZW-1 为出发菌株,通过紫外线对其孢子悬浮液进行辐照处理,辐照时间分别为 0、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180 s,经辐照处理后,孢子致死率与辐照时间的关系见图 1。从图 1 可知,随着紫外线辐照时间的延长,孢子致死率逐渐增加,当紫外线辐照处理 ZW-1 孢子 180 s 时,孢子致死率达 92.5%,说明出发菌株 ZW-1 的孢子对 UV 较为敏感。

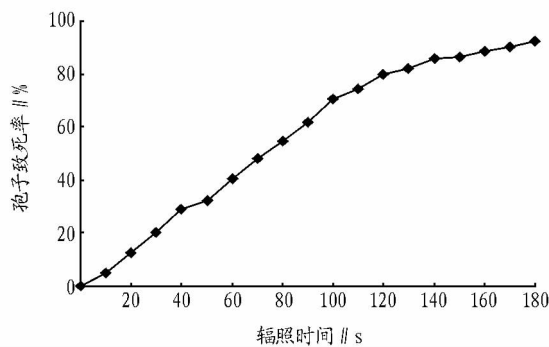


图 1 紫外线辐照对 ZW-1 孢子致死率的变化曲线

**2.1.2 紫外线诱变效果。**紫外线诱变后,在分离培养基上挑选变色圈与菌落直径之比大于等于 1.5 ( $\text{Hc} \geq 1.5$ ),并且生长快、孢子丰满的 6 株菌株编号,经液体发酵后测定其酶活,结果见表 1。从表 1 可看出,当  $\text{Hc} = 1.58$  时,液体发酵后脂肪酶活力最高,达 64.55 IU/ml,比原始菌株酶活力提高 39.36%。因此,选用编号为 17413 的变异株作为下一轮诱变

的出发菌株。

表 1 6 株变异菌株的脂肪酶活

菌株	Hc	酶活力 // IU/ml
ZW-1	1.70	46.32
18621	2.01	25.65
16422	2.39	23.22
17411	3.60	57.26
17412	1.69	22.00
17413	1.58	64.55
16421	1.92	60.91

### 2.2 微波诱变效果

#### 2.2.1 微波功率对脂肪酶产生菌诱变的影响。

(1)微波功率对脂肪酶产生菌孢子的致死率。以突变株 17413 为出发菌株,将孢子悬浮液分别在 180、360、540、630、900 W 不同输出功率下辐照 60 s(采用冰浴法消除微波热效应),得到辐照功率与孢子致死率的关系(图 2)。由图 2 可知,随着微波辐照功率的增加,突变株 17413 的孢子致死率也随之增加。当输出功率为 900 W 时,孢子致死率达 94.8%。

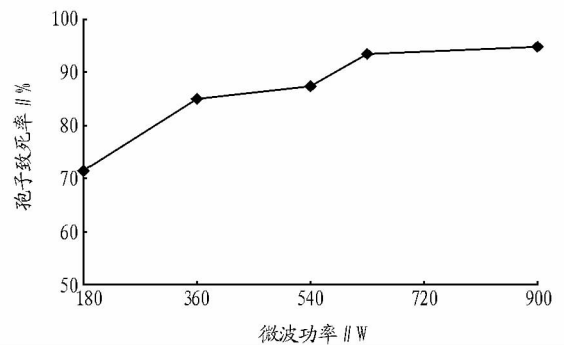


图 2 孢子致死率随不同微波功率处理的变化曲线

(2)微波输出功率对脂肪酶产生菌的诱变效果。从筛选平板上挑选  $\text{Hc} > 1.5$  的突变菌株 6 株,接种于液体发酵培养基中,经培养后测定酶活,结果见表 2。从表 2 可看出,筛选平板上孢子致死率在 40% ~ 80% 范围内的 6 株变异株,经液体发酵后菌株之间的酶活力相差较大。变异株 1129 和 1107 的酶活分别为 78.99 和 78.38 IU/ml,较出发菌株分别提高了 26.22% 和 25.25%,但变异株 1129 在筛选平板上生长较快,且色素产生量少,孢子颜色较浅而丰满,因此,选择变异株 1129 作为下一轮诱变的出发菌株。从孢子致死率和  $\text{Hc} \geq 1.5$  的变异株的数量 2 个因素考虑,输出功率为 540 W 是适宜的诱变功率。

表 2 微波功率诱变效果

菌株	Hc	酶活力 // IU/ml
17413	1.58	64.55
1741	1.58	62.58
1107	2.67	78.38
1125	2.52	27.48
1129	2.52	78.99
1134	2.48	18.96
1136	3.05	66.99

### 2.2.2 微波辐照时间对脂肪酶产生菌诱变的影响。

(1) 辐照时间对脂肪酶产生菌孢子的致死率。以变异株 1129 为出发菌株,在微波输出功率为 540 W 的条件下对其孢子悬浮液进行辐照处理,辐照时间分别为 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 s,得到孢子致死率与辐照时间的关系见图 3。图 3 表明,随着微波辐照时间的延长,脂肪酶产生菌出发菌株 1129 孢子致死率也随之增加。当辐照时间为 90 s 时,孢子致死率达 80% 以上。由于微波辐照过程中分子的剧烈运动产生大量的热,导致孢子悬浮液温度上升,辐照时间越长,孢子悬浮液的温度越高,从而提高了孢子的致死率。但由于微波热效应的存在,可能导致获得细胞正突变的几率下降。

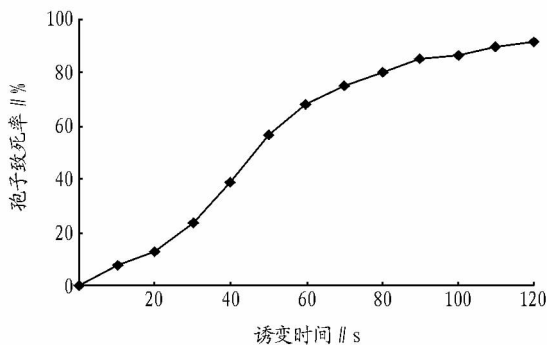


图3 孢子致死率随不同处理时间的变化曲线

(2) 微波辐照时间对脂肪酶产生菌的诱变效果。在辐照不同时间的筛选平板上挑选到  $Hc > 1.5$  的菌落 41 个,选择其中生长速度快、孢子颜色浅且不产色素的突变株 6 株并编号,并分别接种于液体培养基中发酵培养后测定酶活,结果见表 3。从表 3 可看出,在 6 个变异株中,变异株 7532 的酶活最高,达 87.50 IU/ml,比出发菌株提高了 14.81%。因此,选择变异株 7532 作下一轮诱变的出发菌株。

表3 微波辐照时间对脂肪酶产生菌的诱变效果

菌株	Hc	酶活力 / IU/ml
1129	2.52	76.21
6511	2.15	67.59
6512	1.74	20.18
7521	1.61	17.75
7511	2.42	7.42
7532	2.20	87.50
7531	2.52	37.81

### 2.3 硫酸二乙酯(DES)对脂肪酶产生菌诱变的影响

**2.3.1 DES 浓度对脂肪酶产生菌孢子的致死率。**以微波诱变处理得到的突变株 7532 为出发菌株,分别向孢子悬浮液中加入浓度为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 的 DES,30 °C 条件下恒温振荡 30 min 后,涂布于筛选培养基上,计数菌落数并计算孢子致死率,结果见图 4。图 4 表明,随着 DES 处理浓度的增加,脂肪酶产生菌的孢子致死率也随之增加。当 DES 浓度达 2.5% 时,孢子致死率达 95.2%。

**2.3.2 DES 浓度对脂肪酶产生菌的诱变效果。**从 DES 处理浓度为 1.5% ~ 2.0% 的筛选平板上(孢子致死率 40% ~

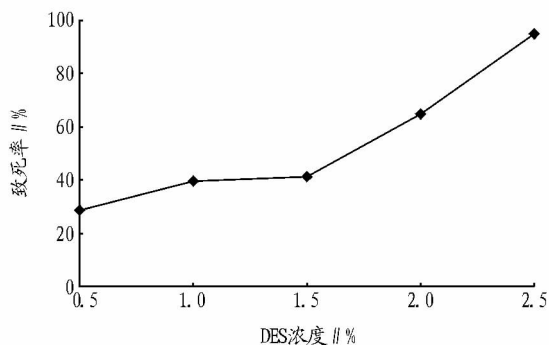


图4 孢子致死率随不同 DES 浓度的变化曲线

70%) 挑选长势较好、不产色素、变色圈直径与菌落直径之比  $Hc \geq 1.5$  的 5 个菌落,接种于液体发酵培养基中发酵后测定酶活,结果见表 4。由表 4 可知,变异株 3522 的酶活力达 94.57 IU/ml,较出发菌株提高了 16.14%。因此,选择变异株 3522 作为下一轮诱变的出发菌株。综合孢子致死率及正突变率考虑,选用 DES 浓度为 2% 作为下一轮诱变浓度。

表4 DES 浓度诱变效果

菌株	Hc	酶活力 / IU/ml
7532	2.20	81.43
2512	1.75	66.87
2431	1.87	75.18
3522	2.30	94.57
4412	1.68	65.42
5311	2.71	74.81

**2.3.3 DES 处理时间对菌株致死率的影响及突变株的筛选。**以变异株 3522 为出发菌株,在 2% DES 浓度下分别处理 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 min 后,以 25%  $Na_2S_2O_3$  溶液终止反应,适当稀释后涂布于筛选培养基上,计数菌落数并计算孢子致死率,结果见图 5。从图 5 可知,在 2% DES 浓度下,随着处理时间的延长,孢子致死率逐渐增加。当连续处理 60 min 时,孢子致死率达 91.7%。为筛选到更多的突变株,选择孢子致死率在 40% ~ 90% 范围内,且  $Hc$

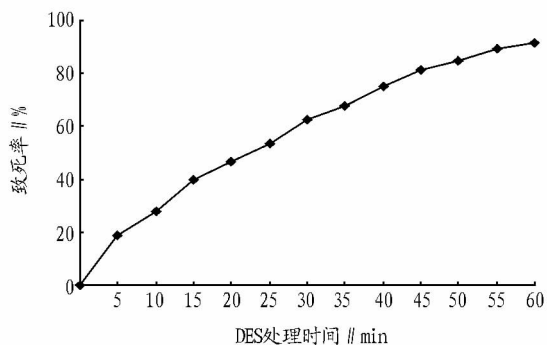


图5 孢子致死率随不同处理时间的变化曲线

$\geq 1.8$  的菌株进行液体发酵培养,测定酶活。结果见表 5。从表 5 可知,在 DES 处理 15 ~ 55 min 时间内挑选的 7 株变异株中,最高酶活达 104.62 IU/ml,其中部分菌株的酶活低于出发菌株,即  $Hc$  的大小与酶活不一定存在对应关系,原因可能为:除变色圈测定不够精确外,还存在培养条件、营养成

分、pH 值变化等原因。变异株 8632 的酶活力较出发菌株 3522 提高了 9.98%，较原始菌株 ZW-1 提高了 125.86%。

表 5 硫酸二乙酯处理时间的诱变效果

菌株	Hc	酶活力//IU/ml
3522	2.30	95.13
3611	1.84	86.41
4532	2.31	56.25
6570	2.53	96.32
8623	1.96	104.62
9621	2.92	82.54
9632	3.01	95.69
1061	2.01	52.18

**2.4 突变株 8632 的遗传稳定性** 将选育到得突变株 8632 在斜面培养基上连续传代 5 代后,在适宜条件下进行培养,3 次重复,测定酶活,得到 1~5 代的平均酶活分别为 105.20、103.57、108.6、102.34、104.76 IU/ml。SPSS 13.0 统计分析表明:变异株 8632 脂肪酶活力经 5 次连续传代后在  $P=0.05$  范围内无显著变化,说明变异菌株 8632 具有良好的遗传稳定性。

### 3 结论

(1) 该试验以从自然界中分离出的野生脂肪酶产生菌

(上接第 7741 页)

胁迫较敏感,其大小可反映植物 PSII 受伤害的程度<sup>[16]</sup>。近年来,该指标被逐渐应用到评价耐荫树木、药用植物对光环境的适应性研究<sup>[17]</sup>。试验中忽地笑最大荧光效率在 30℃ 下最低,表明高温使 PSII 反应中心光能转换效率下降,出现了光抑制现象,而该温度下初始荧光与非光化学猝灭数值增大,表明忽地笑将过剩光能通过热耗散的形式消耗。这是一种自我保护机制以适应环境变化。综上所述,忽地笑在 20~25℃ 范围内光能利用率最高。它对光照要求不严,对弱光和强光均可有效利用,适应性较强。因此,在选择忽地笑林下栽培环境时,可以选择光照较充足的地块。忽地笑可以充分发挥利用光能的潜力,达到增产、增收的目的。

### 参考文献

- [1] 全妙华,陈东明,何吉.石蒜属植物忽地笑的光合特性研究[J].西南农业学报,2010(3):694-699.
- [2] 鲍厚松,张鹏,张海珍,等.沙床栽培中施肥对忽地笑生长量及净光合速率的影响[J].南京林业大学学报:自然科学版,2012(5):61-65.
- [3] 全妙华,李爱民,陆金婷,等.遮荫对石蒜属植物忽地笑光合特性的影响[J].中国农学通报,2011(10):144-148.
- [4] LIU K, TANG C F, ZHOU S B, et al. Comparison of the photosynthetic characteristics of four *Lycoris* species with leaf appearing in autumn under field conditions[J]. *Photosynthetica*, 2012, 50(4): 570-576.
- [5] 叶子飘.光合作用对光响应新模型及其应用[J].生物数学学报,2008(4):710-716.
- [6] 叶子飘.光响应模型在超级杂交稻组合-Ⅱ优明 86 中的应用[J].生态学报,2007(8):1323-1326.

ZW-1 为出发菌株,经过紫外线、微波及硫酸二乙酯(DES)复合诱变后,其酶活力有较大提高,在合适条件下发酵,突变株 8632 的酶活力为 104.62 IU/ml,比原始出发菌株 ZW-1 的酶活力(46.32 IU/ml)提高了 125.86%。

(2) 将突变株 8632 连续传代 5 代,液体发酵后所得结果经 SPSS 13.0 统计学分析表明,其酶活力在  $P=0.05$  范围内无显著性差异,说明突变株 8632 的遗传性状稳定。

### 参考文献

- [1] REETZ MANFRED T. Lipases as practical biocatalysts[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, 6(2): 145-150.
- [2] 胡朝阳,韦晗宁,李春苑.产脂肪酶菌株的筛选及酶学特性研究[J].广西农业生物科学,2006,25(3):261-268.
- [3] 吴松刚,谢新东,黄建忠,等.类产碱单胞菌耐热碱性脂肪酶的研究[J].微生物学报,1997,37(1):32-39.
- [4] 吴松刚.碱性脂肪酶研究进展及其产业化对策[J].华工科技市场,2001,24(2):18-20.
- [5] MAIA M D, HEASLEY A, CAMARGO DE MORAIS, et al. Effect of culture conditions on production by *fusarium solani* in batch fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 76(1): 23-27.
- [6] 兰时乐,李立恒,王晶,等.微波诱变结合化学诱变选育纤维素酶高产菌的研究[J].微生物学杂志,2007,27(1):22-25.
- [7] 江慧芳,王雅琴,刘春国.三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进[J].化学与生物工程,2007(8):72-73.
- [8] LIU Y Q, SUN X Y, WANG Y, et al. Effects of shades on the photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence parameters of *Urtica dioica* [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(8): 3457-3464.
- [9] 贺安娜,姚奕.虎耳草冬季净光合速率、蒸腾速率日变化及其影响因子分析[J].西南农业学报,2011(4):1298-1302.
- [10] 吴飞燕,伊力塔,李修鹏,等.不同光照强度对石栎幼苗叶绿素含量及叶绿素荧光参数的影响[J].东北农业大学学报,2012(4):88-92.
- [11] 宋丽莉,赵华强,朱小倩,等.高温胁迫对水稻光合作用和叶绿素荧光特性的影响[J].安徽农业科学,2011,39(22):13348-13353.
- [12] 翟洪波,呼和收仁,周梅,等.不同年龄华北落叶松光合、蒸腾生理生态特征的研究[J].内蒙古农业大学学报:自然科学版,2010(2):66-71.
- [13] 王斌,赵慧娟,巨波,等.不同温度、湿度水平下沼泽小叶桦光合日动态初步研究[J].上海交通大学学报:农业科学版,2011(6):42-45.
- [14] 宫璇,张如莲,曹红星,等.4个椰子品种光合、蒸腾作用日变化特征及影响因素[J].热带作物学报,2011(2):221-224.
- [15] 王红梅,黄金艳,李凤梅,等.不同西瓜材料光响应曲线特性分析[J].中国瓜菜,2013(1):7-12.
- [16] ALLEN D J, ORT D R. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(1): 36-42.
- [17] 莫亿伟,郭振飞,谢江辉.温度胁迫对柱花草叶绿素荧光参数和光合速率的影响[J].草业学报,2011(1):96-101.
- [18] 杨志玲,杨旭,谭梓峰,等.林药间作系统石蒜叶绿素及其荧光参数日变化特征[J].江西农业大学学报,2011(2):322-327.
- [19] WANG X Z, DUAN A G, BAO E J, et al. Dynamic change laws of chlorophyll fluorescence parameters in different parts of leaves of *Ginkgo biloba* [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(4): 530-532, 536.
- [20] 许培磊,焦竹青,王振兴,等.五味子休眠前叶片的叶绿素荧光参数变化研究[J].华北农学报,2012(S1):209-212.
- [21] 杨贤松,许晖,谢海伟.温度对银杏叶片叶绿素荧光动力学参数的影响[J].光谱实验室,2012(6):3479-3482.