

低温脂肪酶菌株的诱变筛选及酶学特性研究

王兴吉, 贾仁洁, 王克芬, 刘文龙* (山东隆科特酶制剂有限公司, 山东省酶制剂发酵技术重点实验室, 山东临沂 276400)

摘要 以本公司菌种保藏室的产脂肪酶黑曲霉菌株 AG007 作为出发菌株, 通过常温常压等离子体 (ARTP) 诱变筛选得到突变株 A45-72, 其产脂肪酶的活力较 AG007 提高了 86%。再对 A45-72 进行亚硝基胍 (NTG) 复合诱变, 得到突变菌株 GH-73, 其摇瓶发酵酶活达到 2 350 U/mL, 较出发菌株 AG007 提高了 1.2 倍, 将 GH-73 传到第 10 代, 其产酶较稳定。摇瓶中添加 2.5% 橄榄油作为诱导剂时, 产酶能力达到 2 875 U/mL。通过酶学特性研究发现, 其最适作用温度为 30 ℃, 且在 0 ℃ 左右保留 30% 的活性, 是一种低温脂肪酶。

关键词 常温常压等离子体; 亚硝基胍; 复合诱变; 低温脂肪酶

中图分类号 S-3 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)01-0001-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.01.001

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Study on Screening of Cold-adapted Lipases Producing Strains and Properties of Lipase

WANG Xing-ji, JIA Ren-jie, WANG Ke-fen et al (Shandong Longda Bio-products Co., Ltd., Shandong Key Laboratory of Fermentation Technology, Linyi, Shandong 276400)

Abstract With the strain for the production of lipase AG007 isolated in the company culture chamber as the original strain, the original strains AG007 were mutated by ARTP, then the new strain A45-72 was screened and their lipase productivity was 86% higher than before. Another new strain Gh-73 was screened after the strain A45-72 was mutated by NTG, the flask fermentation enzyme activity reached 2350 U/mL, 1.2 times higher than the original strain AG007. When the GH-73 was propagated to the 10th generation, their lipase productivity was stable. When 2.5% olive oil was added as an inducer, the lipase production ability reached 2875 U/mL. Based on the studying of properties, it was a cold-adapted lipase, the optimal temperature of the lipase was 30 ℃. Activity of lipase was 30% at 0 ℃.

Key words Atmospheric and room temperature plasma; Nitroguanidine; Composite matagenesis; Cold-adapted lipase

脂肪酶 (*Lipase*, EC3.1.1.3) 是一类具有特殊酯键的水解酶^[1], 它能够催化长链脂肪酸甘油酯的水解, 也能够催化该反应的逆反应, 除此之外, 许多微生物分泌的脂肪酶还能够催化酯交换反应、酸解反应、醇解反应、氨解反应和酯化反应等^[2-3]。

微生物脂肪酶是指能够分解或合成高级脂肪酸及丙三醇形成的甘油三酸酯酯键的酶。微生物脂肪酶种类较多, 具有比动物脂肪酶更广泛的温度和 pH 作用范围, 便于工业化生产。目前, 它是一种重要的工业用酶, 主要应用于食品风味及香味的改进、油脂的水解、低等油脂的改性、皮革绢纺的脱脂、添加于化妆品及洗涤剂中等。特别是在有机合成工业及油脂化工行业中, 酶催化的反应具有耗能低、条件温和及成品质量高等优点, 具有巨大的应用潜力。

目前, 工业上应用的脂肪酶主要是高温和中温脂肪酶, 酶的最适作用温度一般在 40 ℃ 左右或者更高, 并且在 0 ℃ 左右基本丧失活性^[4-6]。低温酶在较低温度条件下仍然具有比较高的酶活, 热稳定性下降^[7], 因而在食品、洗涤、环保等方面具有广泛的应用。另外, 低温脂肪酶还具有热不稳定性特点, 这对于某些工业性的生物催化来说是有益的, 例如, 在食品的加工过程中, 能够在温度较低条件下快速使酶失去活力, 进而避免在酶的热处理失活过程中对食品造成营养损失^[8]。

低温脂肪酶是指最适反应温度在 30 ℃ 左右, 并且在 0 ℃ 附近仍然具有一定催化活力的脂肪酶^[9]。现在低温脂

肪酶产生菌大多数来自南北两极和大洋底部等长期处于低温的环境中^[10]。尽管产脂肪酶的微生物容易发现, 可是, 寻找到适合工业生产的脂肪酶生产菌株及其发酵条件却比较困难, 而通过传统的诱变筛选能很大程度上提高脂肪酶的产量, 使许多脂肪酶实现工业化生产。以本公司菌种室保藏的黑曲霉菌株 AG007 作为出发菌株, 采用 ARTP 和亚硝基胍复合诱变的手段, 获得了一株遗传稳定性良好的高产脂肪酶菌株, 并且对其酶学性质进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料 试验菌株, 黑曲霉 AG007, 本公司菌种室保藏。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基。 葡萄糖 1.500%、玉米浆 2.000%、硫酸铵 0.500%、硫酸镁 0.100%、磷酸二氢钾 1.500%、氯化钙 0.050%、氯化钙 0.600%、磷酸氢二钾 2.500%、硫酸亚铁 0.030%。

1.2.2 富集培养基。 葡萄糖 1.500%、酪素水解物 1.000%、橄榄油乳化液 1.500%、硫酸铵 0.500%、硫酸镁 0.100%、磷酸二氢钾 1.500%、氯化钙 0.050%、氯化钙 0.600%、磷酸氢二钾 2.500%、硫酸亚铁 0.030%。

1.2.3 平板初筛培养基。 牛肉膏 0.300%、蔗糖 1.000%、硫酸镁 0.030%、胰蛋白胍 0.300%、磷酸二氢钾 0.100%、酵母膏 0.100%、橄榄油乳化液 2.500%、0.100% 去氧胆酸钠。

1.2.4 斜面培养基。 蔗糖 3.000%、硝酸钠 0.200%、硫酸亚铁 0.010%、硫酸镁 0.025%、磷酸氢二钾 0.100%、氯化钾 0.050%、硫酸亚铁 0.001%、琼脂 1.300%。

1.2.5 摇瓶复筛培养基。 玉米淀粉 6.000%、玉米粉 1.500%、豆饼粉 2.000%、蔗糖 0.800%、麸皮 2.000%、玉米浆 1.600%、磷酸氢二钾 0.200%、硫酸镁 0.250%、硫酸铵

基金项目 国家重点研发计划 (2017YFB0308400-01-05)。

作者简介 王兴吉 (1970—), 男, 山东沂水人, 高级工程师, 从事酶制剂生产与开发。* 通信作者, 工程师, 硕士, 从事酶制剂生产与开发研究。

收稿日期 2018-08-17

0.300%、硝酸钠 0.800%、氯化钙 0.020%、橄榄油 2.000%。

1.2.6 Tris 缓冲液 (pH 7.0)。马来酸 2.500%、氢氧化钠 2.000%、硫酸铵 0.200%、硫酸镁 0.020%、二水氯化钙 0.025%。

1.3 试验方法

1.3.1 孢子悬液的制备。取一只新鲜培养的斜面,加入 20 mL 生理盐水,用无菌铁铲将其表面的孢子刮下,并将其转移至装有玻璃珠的三角瓶中,置于摇床上振荡打散 30 min,用无菌脱脂棉过滤,滤液于 10 000 r/min 离心 5 min,弃上清,菌体用适量的生理盐水重悬,调整孢子浓度在 $10^6 \sim 10^7$ [11]。

1.3.2 ARTP 诱变。取 10 μ L 制备好的孢子悬液均匀涂布于载片中央,用无菌镊子将载片转移至 ARTP 系统操作室旋转台上的对应孔位上,将照射距离调整为 2 mm,气流量

10SLM,功率 100 W,然后设置不同的照射时间进行诱变 [12]。

1.3.3 亚硝基胍诱变。

1.3.3.1 亚硝基胍 (NTG) 溶液的配制。在生物安全柜中称取 0.035 g 亚硝基胍于 15 mL 无菌离心管中,加入 10 mL Tris 缓冲液,将离心管置于热水中待亚硝基胍完全溶解,制成 NTG 母液。

1.3.3.2 诱变方法。在无菌三角瓶中分别按表 1 加入制备好的孢子悬液、NTG 母液及 Tris 缓冲液 (其中,0#为对照组,1#、2#和 3#为试验组)。然后将三角瓶于 30 $^{\circ}$ C 条件下振荡反应 30 min,反应后将三角瓶里面的液体转移至 50 mL 离心管中,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 45 mL Tris 缓冲液重悬,10 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,再加入 45 mL Tris 缓冲液冲洗,反复冲洗 3 次,以除去残留的 NTG,最后加入 5 mL Tris 缓冲液和 5 mL 50%甘油重悬菌体。

表 1 NTG 诱变体系

Table 1 The system of NTG mutagenesis

试验组 Test group	孢子悬液 Spore suspension//mL	NTG 母液 NTG mother liquor//mL	Tris 缓冲液 Tris buffer//mL	总体积 Total volume//mL	NTG 终浓度 NTG terminal concentration// μ g/mL
0#	2	0	18	20	0
1#	2	1	17	20	175
2#	2	2	16	20	350
3#	2	3	15	20	525

1.3.4 脂肪酶活力的测定方法。用聚乙烯醇橄榄油乳化液法测定 [13],一个酶活定义为在测定条件下,每分钟释放 1 μ mol 脂肪酸所需要的酶量。

1.3.5 筛选方法。

1.3.5.1 初筛方法。将诱变后的菌悬液接种到添加酪素水解物的富集培养基中,30 $^{\circ}$ C,200 r/min 条件下富集培养 2 h。将富集培养结束的菌悬液稀释至适当的倍数涂布平板,30 $^{\circ}$ C 条件下培养 3 d,观察各个菌落周围油脂水解圈的大小及菌落形态,选取水解圈较大或菌落形态发生变化的菌株转接至斜面培养基中。

1.3.5.2 复筛方法。挑取斜面长好的菌种接入种子培养基中,30 $^{\circ}$ C,200 r/min 条件下培养 3 d。将长好的种液按 10% 接种量转接到发酵摇瓶中,30 $^{\circ}$ C,220 r/min 条件下培养 5 d。发酵结束时,将发酵液于 10 000 r/min 条件下离心 5 min,取上清测定酶活。

2 结果与分析

2.1 ARTP 诱变结果

2.1.1 ARTP 诱变时间的确定。气流量 10SLM,功率 100 W,将经 ARTP 处理不同时间的孢子悬液进行适当稀释后涂布于筛选平板上,30 $^{\circ}$ C 条件下培养 3 d,计算不同照射时间的致死率及正突变率,选择合适的诱变时间。

试验结果表明,随着诱变时间的延长,致死率逐渐增加,当诱变时间为 40 s 时,致死率达到 99% 以上。通过计算正突变率发现,当诱变时间为 30 s 时,致死率达到 86.7%,而正突变率为 25%,此时继续增加诱变时间正突变率随之降低,所以试验中将诱变时间选为 30 s。

2.1.2 ARTP 诱变筛选结果。经过 ARTP 诱变,共筛选到 10 株酶活提高较大的突变菌株。摇瓶复筛结果表明,这 10 株

表 2 不同 ARTP 照射时间的致死率

Table 2 Mortality with different ARTP time

诱变时间 Mutagen time s	致死率 Mortality %	测定菌数 Measured bacterial counts//株	正突变菌数 Positive mutation strain//株	正突变率 Positive mutation ratio//%
20	65.30	200	0	0
25	78.90	200	0	0
30	86.70	200	50	25.0
35	95.70	198	32	16.2
40	99.80	202	20	9.9
45	99.90	210	5	2.4
50	99.99	200	0	0

正突变菌株遗传性稳定,其酶活提高比例及产孢子结果如表 3 所示。试验结果可以发现,该 10 株突变菌株产孢子的量比对照菌株都有不同程度地减少,其中突变菌株 A45-72 酶活提高了 86%,产孢子量最少,所以将其选为下一步 NTG 复合诱变的出发菌株。

表 3 ARTP 筛选结果

Table 3 Results of ARTP

菌株编号 Strain No.	酶活提高比例 Increasing proportion of enzyme activity//%	产孢子多少 Spores production
A3-15	67	++++
A5-17	56	+++
A21-16	73	+++
A23-1	55	++++
A35-17	68	+++
A37-5	59	+++
A42-56	75	++++
A45-72	86	++
A56-63	65	+++
A73-52	76	+++

注:产孢子多少分为 5 个等级,分别为++++、++++、+++、++、+

Note:Spores production was divided into 5 levels:++++、++++、+++、++、+

2.2 NTG 诱变结果

2.2.1 NTG 诱变剂量的选择。在诱变时间为 30 min 的条件下,不同 NTG 浓度下的致死率如表 4 所示。试验结果可以看出,随着 NTG 浓度的提高,致死率逐渐增加。通过计算正突变率发现,随着 NTG 浓度的增加,正突变率先上升后下降,当 NTG 终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时正突变率最高,此时致死率为 80.7%,继续增加 NTG 浓度,正突变率会相应的降低,所以试验中选择 NTG 终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 4 NTG 最佳诱变浓度的确定

Table 4 Determination of the optimal concentration of NTG mutagenesis

NTG 浓度 NTG conc- entration $\mu\text{g}/\text{mL}$	致死率 Mortality//%	测定菌数 Measured bacterial counts//株	正突变菌数 Positive mutation strain//株	正突变率 Positive mutation ratio//%
20	35.7	200	10	5.0
25	80.7	207	65	31.4
30	99.7	221	40	18.1

2.2.2 NTG 诱变筛选结果。通过 NTG 诱变筛选到一株酶活提高较大的突变株 GH-73,该突变菌株的摇瓶发酵酶活达到 2 350 U/mL,相对于原始菌株酶活提高了 1.2 倍。该菌株的生长速度比原始菌株要慢,不产孢子。

2.3 突变菌株遗传稳定性研究 将突变菌株 GH-73 连续进行 10 代培养,以测定其遗传稳定性,试验结果如表 5 所示,该菌株 10 次传代酶活均在 2 200 U/mL 以上,表明该突变菌株的遗传稳定性较好。

表 5 菌株 GH-73 遗传稳定性结果

Table 5 Genetic stability experiments results of strain GH-73

菌株编号 Strain No.	发酵时间 Fermentation time h	酶活 Enzyme activity U/mL
GH-73	122	2 350
第 1 代 1th generation	117	2 287
第 2 代 2th generation	120	2 456
第 3 代 3th generation	115	2 357
第 4 代 4th generation	123	2 275
第 5 代 5th generation	117	2 478
第 6 代 6th generation	120	2 433
第 7 代 7th generation	121	2 357
第 8 代 8th generation	125	2 289
第 9 代 9th generation	118	2 375
第 10 代 10th generation	119	2 450

2.4 诱导剂对菌株 GH-73 产酶的影响

2.4.1 油脂种类对菌株 GH-73 产酶的影响。某些微生物只有在诱导物存在时才能产生脂肪酶^[14],采用以上摇瓶发酵培养基,在培养基中添加不同种类 2% 油脂作为诱导剂,采用上述发酵方法测定酶活,结果如表 6 所示。可以看出,诱导剂为橄榄油时,诱变菌株 GH-73 摇瓶发酵酶活最高,酶活为 2356 U/mL,表明以橄榄油作为诱导剂时该菌株产脂肪酶活力最高。

表 6 油脂种类对菌株 GH-73 产酶的影响

Table 6 Effect of different additive oils on lipase production by strain GH-73

序号 No.	油脂种类 Types of oil	酶活 Enzyme activity	序号 No.	油脂种类 Types of oil	酶活 Enzyme activity
1	大豆油	2 017	7	棉籽油	1 678
2	玉米油	1 909	8	菜籽油	1 679
3	棕榈油	1 543	9	蓖麻油	1 547
4	橄榄油	2 356	10	亚麻油	1 657
5	花生油	2 017	11	椰子油	1 900
6	葵花油	1 897			

2.4.2 橄榄油的添加量对菌株 GH-73 产酶的影响。以橄榄油作为诱导剂,在上述摇瓶发酵培养基中添加不同用量,采用上述发酵方法测定酶活,结果如图 1 所示。可以看出,在一定的浓度范围内,随着橄榄油添加量的增加,酶活随之增加,当添加量为 2.5% 时,产酶最高,酶活为 2 875 U/mL。此时,再继续增加橄榄油的添加量,菌株产脂肪酶的活力降低。所以,发酵摇瓶中橄榄油的最佳添加量为 2.5%。该试验结果与 Gupta 等^[15]报道的结果相符,油脂浓度的添加量会影响菌株产脂肪酶的能力,随着油脂浓度的升高,菌株产脂肪酶的活力相应上升,但是当油脂添加量过高时,又会抑制脂肪酶的生产。

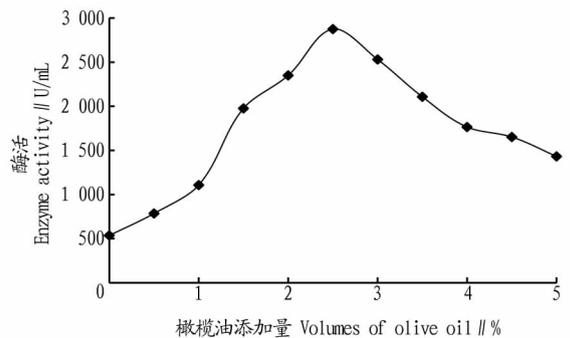


图 1 橄榄油添加量对菌株 GH-73 产酶的影响

Fig. 1 Effect of different volumes of olive oil on lipase production by strain GH-73

2.5 菌株 GH-73 酶学特性研究 在 0~50 $^{\circ}\text{C}$ 范围内测定同一酶液的脂肪酶活力,结果如图 2 所示,该酶最适温度为 30 $^{\circ}\text{C}$,并且在 0 $^{\circ}\text{C}$ 左右具有一定的催化活性。在 0~30 $^{\circ}\text{C}$ 随

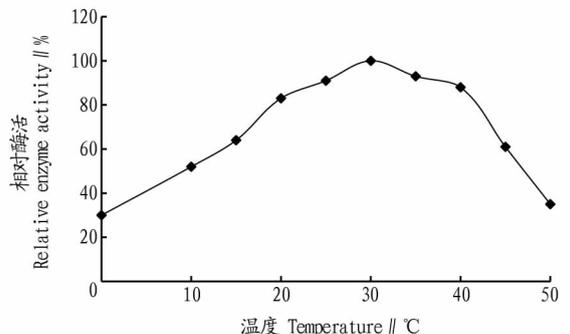


图 2 酶最适作用温度

Fig. 2 Optimal reaction temperature of lipase

- [18] 姜琳,王有婧,周薇,等. 植物抵抗盐胁迫的生理机制[J]. 北方园艺, 2016(23):190-194.
- [19] 张会丽,许兴,朱林. 不同青贮玉米品种耐盐性比较[J]. 河南农业科学, 2017,46(9):30-36,44.
- [20] 张俊霞,刘晓鹏,向极钎. 植物抗氧化系统对逆境胁迫的动态响应[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2015,33(4):435-439.
- [21] 王婧泽,高树仁,孙丽芳,等. 3个玉米自交系对盐胁迫的生理响应及耐盐性评价[J]. 干旱地区农业研究, 2017,35(2):89-95.
- [22] 贾丹莉,杨治平,郭军玲,等. 6种玉米品种耐盐性筛选[J]. 中国农学通报, 2017,33(11):1-8.
- [23] 魏岚岚. 不同玉米品种对盐胁迫的生理响应[J]. 黑龙江农业科学, 2017(3):27-29.
- [24] 李亮,高明波,于清涛. 耐盐玉米自交系的鉴定[J]. 黑龙江农业科学, 2017(2):14-17.
- [25] 贾鹏燕,田福平,刘一帆,等. 短期盐胁迫对苦苣菜幼苗叶片抗逆生理指标的影响[J]. 西北植物学报, 2017,37(7):1303-1311.
- [26] 邢建宏,潘德灼,谭芳林,等. NaCl 胁迫对秋茄根系渗透调节物质含量的影响[J]. 生态环境学报, 2017,26(11):1865-1871.
- [27] 张岩,许兴,朱永兴,等. ABA 响应植物盐胁迫的机制研究进展[J]. 中国农学通报, 2015,31(24):143-148.
- [28] 高山,孙作峰,李莹,等. 水杨酸(SA)和脱落酸(ABA)对盐胁迫玉米幼苗生长的影响[J]. 分子植物育种, 2017,15(10):4159-4164.
- [29] CAI R H, DAI W, ZHANG C S, et al. The maize WRKY transcription factor ZmWRKY17 negatively regulates salt stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. *Planta*, 2017,246(6):1215-1231.
- [30] 孙丽芳,胡凯凤,邓杰,等. 玉米 DNA 去甲基化酶 ROS1 生物信息学及盐胁迫下表达分析[J]. 分子植物育种, 2017,15(9):3393-3400.
- [31] 孙丽芳,胡凯凤,高树仁,等. 盐胁迫诱导玉米苗期 DNA 甲基化变异的研究[J]. 核农学报, 2017,31(4):627-634.
- [32] 朱红菊,刘文革,赵胜杰,等. NaCl 胁迫下二倍体和同源四倍体西瓜幼苗 DNA 甲基化差异分析[J]. 中国农业科学, 2014,47(20):4045-4055.
- [33] 陆许可,王俊娟,王德龙,等. 盐胁迫下棉花全基因组 DNA 甲基化图谱构建及其甲基化特征变化分析[C]//中国棉花学会. 2015 年全国棉花青年学术研讨会论文集汇编. 安阳:中国棉花杂志社, 2015:1.
- [34] 唐颖,高步红,杨世龙. 基于质谱的差异蛋白质组学技术在植物逆境胁迫研究中的应用[J]. 四川林业科技, 2017,38(5):28-32.
- [35] 苑泽宁,于丽杰. 植物对非生物胁迫响应的蛋白质组学研究进展[J]. 生物学教学, 2015,40(1):8-10.
- [36] 雷震,裴玉贺,赵美爱,等. 盐胁迫下玉米叶片差异蛋白的双向电泳分析[J]. 玉米科学, 2013,21(3):82-86.
- [37] SUN X C, WANG Y, XU L, et al. Unraveling the root proteome changes and its relationship to molecular mechanism underlying salt stress response in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8:1192.
- [38] YOUSUF P Y, AHMAD A, AREF I M, et al. Salt stress-responsive chloroplast proteins in *Brassica juncea* genotypes with contrasting salt tolerance and their quantitative PCR analysis [J]. *Protoplasma*, 2016,253(6):1565-1575.
- [39] YU B, LI J N, KOH J, et al. Quantitative proteomics and phosphoproteomics of sugar beet monosomic addition line M14 in response to salt stress [J]. *Journal of proteomics*, 2016,143:286-297.
- [40] 张昆,李明娜,曹世豪,等. 植物盐胁迫下应激调控分子机制研究进展[J]. 草地学报, 2017,25(2):226-235.
- [41] WANG C L, LU G Q, HAO Y Q, et al. *ABP9*, a maize bZIP transcription factor, enhances tolerance to salt and drought in transgenic cotton [J]. *Planta*, 2017,246(3):453-469.
- [42] 决登伟,桑雪莲,舒波,等. 玉米泛素结合酶基因 *ZmUBC-76* 的功能分析[J]. 热带作物学报, 2017,38(8):1507-1511.
- [43] 决登伟,桑雪莲,舒波,等. 玉米 WRKY 转录因子非生物胁迫的表达分析[J]. 广东农业科学, 2017,44(1):15-22.
- [44] 李国良,李孟军,刘子会,等. 玉米热激转录因子基因 *ZmHsf06* 表达提高拟南芥耐盐性[J]. 河北农业大学学报, 2016,39(2):34-40.
- [45] 陈娜,迟晓元,潘丽娟,等. MYB 转录因子在植物盐胁迫调控中的研究进展[J]. 植物生理学报, 2015,51(9):1395-1399.
- [46] 袁进成,宋晋辉,马海莲,等. 转玉米 *ZmABI3-L* 基因增加拟南芥的抗旱和耐盐性[J]. 草业学报, 2016,25(2):124-131.
- [47] 足木热木·吐尔逊,陈勋基,陈果,等. 玉米 *ZmCPK9* 基因在非生物胁迫下的表达分析[J]. 新疆农业科学, 2017,54(9):1606-1612.
- [48] 韩赞平,陈彦惠,郭书磊,等. 玉米抗逆基因 *ZmqLTC3-1* 的克隆及功能分析[J]. 作物杂志, 2016(4):47-55.
- [49] 姜志磊,刘艳芝,韦正乙,等. 玉米耐盐基因 *ZmHKT1;5* 在烟草中的功能验证[J]. 玉米科学, 2017,25(5):32-39.

(上接第 3 页)

着温度的升高酶活相应上升,当温度超过 40℃ 时,酶活迅速下降,表明该突变菌株产生的脂肪酶为低温脂肪酶。

3 结论

通过 ARTP 和 NTG 复合诱变,筛选出一株酶活提高 1.2 倍的高产菌株 GH-73,该菌株不产孢子,生长速度相对于对照菌株有所变慢,摇瓶酶活力达到 2 350 U/mL,10 次传代后酶活力维持在 2 300 U/mL 左右,遗传稳定性好。

以橄榄油作为诱导剂时,该菌株产脂肪酶活力最高,并且在一定的浓度范围内,随着橄榄油添加量的增加,酶活增加,当添加量为 2.5% 时产酶最高,酶活为 2 875 U/mL。此时,再继续增加橄榄油的添加量,菌株产脂肪酶的活力降低。所以,发酵摇瓶中橄榄油的最佳添加量为 2.5%。

对该菌株进行酶学特性研究发现,其最适作用温度为 30℃,且在 0℃ 左右保留 30% 的活性,是一种低温脂肪酶,因此,在食品、洗涤、医药和环保等领域有着良好的应用前景。

参考文献

- [1] HIRAZUMI A, FURUSAWA E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumor activity [J]. *Phytother Res*, 1999,13(5):380-387.
- [2] DAVIS B G, BOYER B. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis [J]. *Nat Prod Rep*, 2001,18:618-640.
- [3] JAEGER K E, REETZ M T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1998,16(9):396-403.
- [4] CHAHINIAN H, VANOT A, IBRIK A, et al. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of a partial acylglycerol lipase [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000,64(2):215-222.
- [5] ZHU K, JUTILA A, TUOMINEN E K J, et al. Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001,1547(2):329-338.
- [6] 孙宏丹,孟秀香,贾莉,等. 微生物脂肪酶及其相关研究进展[J]. 大连理工大学学报, 2001,23(4):292-295.
- [7] FELLER G, THIRY M, ARPIGNY J L, et al. Lipases from psychrotrophic antarctic bacteria [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1990,66(1/2/3):239-243.
- [8] CHOO D W, KURIHARA T, SUZUKI T, et al. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. Strain B11-1: Gene cloning and enzyme purification and characterization [J]. *Applied and environmental microbiology*, 1998,64(2):486-491.
- [9] 林学政,边际,何培青. 极地微生物低温适应性的分子机制[J]. 极地研究, 2003,15(1):75-82.
- [10] ARPIGNY J L, LAMOTTE J, GERDAY C. Molecular adaptation to cold of an Antarctic bacterial lipase [J]. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 1997,3:29-35.
- [11] 郑铁曾,涂提坤,王建华,等. 产 β -半乳糖苷酶菌株的分离和筛选[J]. 微生物学通报, 1981(6):258-260.
- [12] 范新蕾,肖成建,顾秋亚,等. ARTP 诱变选育葡萄糖氧化酶高产菌株及发酵条件优化[J]. 工业微生物, 2015,45(1):15-19.
- [13] 曾璐,林亲录,王伟. 脂肪酶产生菌产酶条件的研究[J]. 现代食品科技, 2007,23(7):15-18,21.
- [14] 段俊英,韩静淑,柴明,等. 解脂假丝酵母变株(19-2)胞内脂酶的研究[J]. 微生物学通报, 1983(3):106-109.
- [15] GUPTA R, GUPTA N, RATHI P. Bacterial lipase: An overview of production, purification and biochemical properties [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004,64(6):763-781.