

文章编号: 1674-5566(2012)05-0911-06

土壤中脂肪酶产生菌的筛选、鉴定及发酵条件的优化

衣杰荣¹, 王允绍¹, 张兆斌², 李晓晖¹

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 爱普香料集团股份有限公司, 上海 201809)

摘要: 从上海地区富含油性的土壤中, 以橄榄油为唯一碳源进行富集培养, 以罗丹明 B 为指示剂的平板进行初筛, 摇瓶复筛得到产脂肪酶菌株 51-43。通过对 51-43 进行形态学观察, 以及 18S rDNA 特征片段比较分析, 初步确定 51-43 为黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。通过单因素实验和正交实验, 对黑曲霉 51-43 产脂肪酶的发酵条件进行优化。确定其最优发酵条件为: 蛋白胨 2.35%, 小麦粉 1%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $CaCl_2$ 0.01%, NH_4Cl 1%, Tween-80 0.5%, 橄榄油 1%, pH 7.0。此培养基在 28 °C, 160 r/min 的条件下发酵培养 72 h, 脂肪酶水解活力达到 19.28 U/mL, 是初始发酵培养基条件下所得脂肪酶活性的 2.21 倍。

脂肪酶 (Lipase EC3.1.1.3) 全称为三酰基甘油酯基水解酶 (triacylglycerol acylhydrolase), 是一类特殊的酯键水解酶, 主要水解由甘油和 12 碳原子以上的不溶性长链脂肪酸形成的甘油三酯^[1-2]。工业用脂肪酶常见的包括假丝酵母、根霉、青霉和假单胞菌等产生的脂肪酶。其中黑曲霉是一种公认安全使用的微生物 (GRAS), 并且黑曲霉脂肪酶具有 1, 3-位选择性, 其最适底物脂肪酸碳链长度为 $C_6 \sim C_{12}$, 所以黑曲霉脂肪酶非常适合应用于食品加工生产^[3-6]。另外黑曲霉脂肪酶在洗涤剂、造纸、化妆品、制药、前体化合物的合成和手性化合物的拆分等方面都有广泛的用途, 是一种非常重要的工业酶^[7]。最新发现黑曲霉脂肪酶能够酰基化多糖 (纤维素)、分解赭曲霉毒素 A, 进一步拓宽了其应用领域^[8-9]。

本实验从富含油脂的土壤中筛选到一株产脂肪酶的菌株, 经鉴定为黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 命名为黑曲霉 51-43, 并通过单因素实验

研究亮点: 脂肪酶在食品加工中具有广泛的应用, 黑曲霉脂肪酶具有 1, 3-位选择性, 其最适底物脂肪酸碳链长度为 $C_6 \sim C_{12}$, 非常适合于食品加工生产。本研究从土壤中筛选到了一株产脂肪酶黑曲霉菌株, 通过正交试验优化, 显示黑曲霉 51-43 有很大的产酶潜力, 具有一定的研究应用价值。

关键词: 黑曲霉; 脂肪酶; 发酵条件; 正交实验

中图分类号: TS 201.3

文献标志码: A

和正交实验对该菌株的产酶条件进行了优化, 获得其最佳产酶发酵条件, 为后续产脂肪酶菌株的菌种改良以及其应用于工业化生产等工作提供了依据。

1 材料与amp;方法

1.1 样品采集

取自上海地区富含油性的土壤, 如上海吴淞肉联厂、上海海洋大学大学食堂下水道、泥城粮油店、河道污泥和餐厅厨房清洗处污泥等, 共 100 份。

1.2 试剂和药品

罗丹明 B 购自生工生物工程 (上海) 有限公司, 橄榄油 (化学纯)、聚氯乙烯、蔗糖、蛋白胨等其他试剂均为国药集团化学试剂有限公司生产的分析纯试剂, 花生油、菜籽油、豆油、芝麻油和花椒油为市场采购。

收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2011-12-21

基金项目: 爱普科创基金 (D8006100007)

作者简介: 衣杰荣 (1969—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为食品生物技术。E-mail: jryi@shou.edu.cn

通讯作者: 李晓晖, E-mail: xhli@shou.edu.cn

1.3 主要仪器

仪器有:组织捣碎机,上海安亭科学仪器厂;台式高速离心机,德国贺力氏 Thermo Heraeus Pico 17;超净工作台,北京科宇翔贸易有限公司;高压灭菌锅,Hitachi 公司。

1.4 培养基

1.4.1 富集培养基

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, NH_4NO_3 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 橄榄油 1%, pH 7.0。

1.4.2 平板初筛培养基

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, NH_4NO_3 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, pH 7.0。临用前再加入灭菌后的橄榄油聚乙烯醇乳化液 10 mL 和罗丹明 B 显色剂 1 mL。

1.4.3 复筛培养基

蛋白胨 2.35%, 蔗糖 1%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 橄榄油 1.5%, pH 7.0。

1.4.4 斜面培养基

PDA 培养基。

1.5 方法

1.5.1 富集培养

称取 5 g 土样溶于 10 mL 无菌水中,震荡均质;接种 1 mL 上清液于 20 mL 液体富集培养基中,在 30 °C、180 r/min 摇床上振荡培养 2 d 后,转接 1 mL 菌悬液于 20 mL 液体富集培养基中,连续富集 3 轮。观测发酵液油脂变化,选择油脂基本消失的菌液进行初筛培养。

1.5.2 初筛培养

接种 1 mL 富集菌液于 9 mL 无菌水中进行稀释,取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 梯度菌液各 200 μL ,在罗丹明 B 显色培养基中涂布,30 °C 培养 2~3 d。观察微红色透明水解圈直径大小,通过观察水解圈大的菌株平板划线分离,将单菌落用 PDA 斜面放入 4 °C 冰箱保存^[10]。

1.5.3 复筛培养

在装有 30 mL 复筛培养基(容量为 250 mL 的三角瓶)中接种一环新鲜的初筛保存菌,于 30 °C、180 r/min 摇床振荡培养 72 h。

1.5.4 酶活的测定

将发酵液 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按照参考文献[11]的橄榄油底物乳化法测定酶活性。在 40 °C、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)。

1.5.5 菌种鉴定

参考《真菌鉴定手册》^[12],用显微镜观察、记录真菌菌落形态、颜色、有无色素、分生孢子的产生情况等特征,对菌株进行鉴定。利用 CTAB 法提取真菌基因组,18S rDNA 进行 PCR 扩增,将测序结果提交到 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,并进行同源性分析^[13]。

1.5.6 单因素条件对产酶的影响

分别以不同的碳源、氮源、诱导物、初始 pH、金属离子接种量和表面活性剂为考察因素,以得到产脂肪菌株最优的发酵产酶条件。

1.5.7 正交试验

对产脂肪酶菌株影响较大的 4 个因素,对其进行 4 因素 3 水平的设计,选择其最优的组合。

2 结果与分析

2.1 菌种的筛选

经过初筛、摇瓶发酵复筛实验,选取其中菌落呈黑色,水解圈最大直径为 13.2 mm(图 1),且酶活力为 8.73 U/mL 的 51-43 菌株作为出发菌株进行菌种鉴定及发酵条件优化。

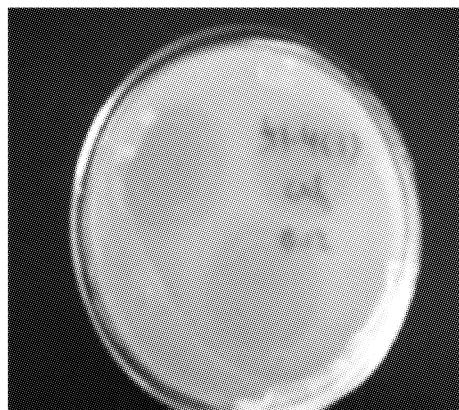


图 1 菌株 51-43 在鉴别培养基上的菌落形态
Fig.1 Colony morphology of strain 51-43 in the differential medium

2.2 菌种的鉴定

将筛选到的菌株 51-43 划线于 PDA 培养基上,28 °C 培养 3 d,观察单菌落形态。生长迅速,初为白色,后变成鲜黄色直至黑色厚绒状。其背面无色或中央略带黄褐色。通过进行显微镜观

察,51-43 菌株有隔菌丝和较粗的厚壁分生孢子梗,顶囊球形,呈黑色,表面上以辐射状着生初生小梗和次生小梗(图 2)。将所得 DNA 序列与 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,菌株 51-43 序

列与黑曲霉(*Aspergillus niger*, GenBank 登录号: HQ379853.1)的 18S rDNA 序列有 99% 的相似性。经表型鉴定和 18S rDNA 同源序列比较,初步鉴定其为黑曲霉。

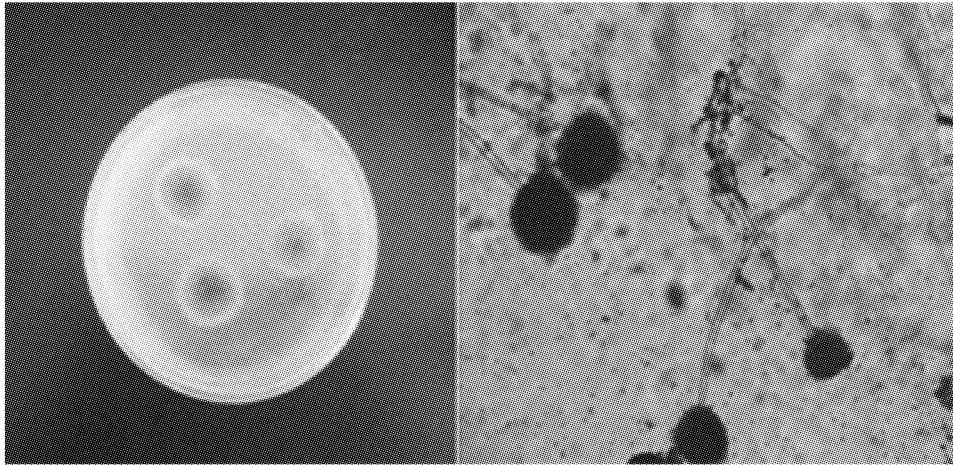


图 2 菌株 51-43 在 PDA 培养基上的菌落形态及镜检照片

Fig. 2 Colony morphology and microscopy photos of strain 51-43 in the PDA medium

2.3 单因素条件对产酶的影响

2.3.1 不同碳源对产酶的影响

碳源是微生物生长的重要成分,对菌体的代谢产酶有重要影响。从表 1 中可以发现小麦粉、

玉米粉及糊精利于黑曲霉 51-43 产酶,其中小麦粉最适合其发酵产酶,最大酶活可以达到 11.72 U/mL,而可溶性淀粉和麸皮不利于该菌株产酶。

表 1 不同碳源对黑曲霉 51-43 产脂肪酶的影响

Tab. 1 Effect of different carbon sources on the lipase production of *Aspergillus niger* 51-43

碳源	小麦粉	玉米粉	可溶性淀粉	糊精	葡萄糖	蔗糖	麸皮
酶活力/(U/mL)	11.72	11.17	5.56	10.17	7.26	8.73	6.76

2.3.2 不同氮源对产酶的影响

氮源分为有机氮源和无机氮源,一般微生物比较容易利用有机氮源。从图 3 可知,酪素和蛋白胨对产酶有较好的促进作用,但酪素比较昂贵,从经济角度考虑选择蛋白胨为最优的有机氮源。而无机氮源 NH_4Cl 对产酶有利,酶活比 NaNO_3 高 2.9 倍,说明氨态氮易于被该菌株利用。

2.3.3 不同诱导物对产酶的影响

分别考察了 6 种油脂对 51-43 菌株产酶的影响。从图 4 可知,1.5% 橄榄油对菌株产酶最有利,最大酶活可以达到 11.07 U/mL,而豆油的诱导效果仅次于橄榄油,因其价格便宜并且容易购买,在工业生产上可以作为其诱导物。

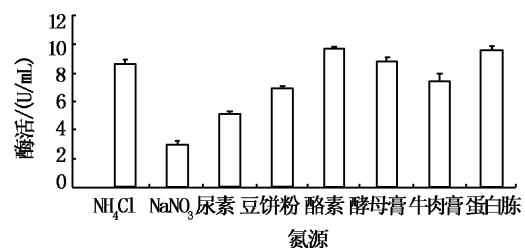


图 3 不同氮源对黑曲霉 51-43 产脂肪酶的影响
Fig. 3 Effect of different nitrogen sources on the lipase production of *Aspergillus niger* 51-43

2.3.4 初始 pH 对产酶的影响

使用精密 pH 计将发酵液调成不同的 pH,研究其产酶情况。从图 5 可知,当 pH 为 7.0 时对菌株产酶最高,而初始 pH 在 6.5 ~ 7.5 的范围内

适宜产酶。

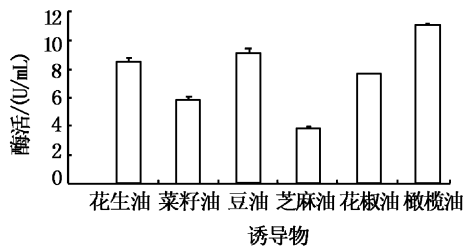


图4 油脂诱导物对黑曲霉 51-43 产脂肪酶的影响
Fig.4 Effect of different oil inducers on the lipase production of *Aspergillus niger* 51-43

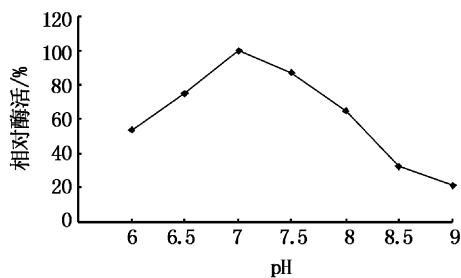


图5 不同初始 pH 对黑曲霉 51-43 产脂肪酶的影响
Fig.5 Effect of different initial pH on the lipase production of *Aspergillus niger* 51-43

2.3.5 金属离子对产酶的影响

从图6可见金属离子对黑曲霉 51-43 影响非常大, Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 明显抑制其产酶, 而 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 Mg^{2+} 明显对该菌株产酶有促进作用, 并且其中以 Ca^{2+} 为最佳。

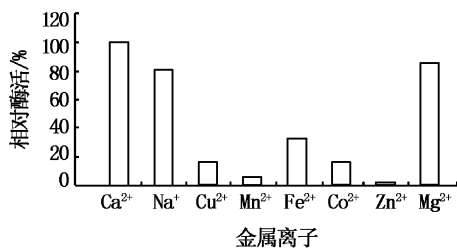


图6 不同金属离子对黑曲霉 51-43 产脂肪酶的影响
Fig.6 Effect of different metal ions on the lipase production of *Aspergillus niger* 51-43

2.3.6 不同接种量对产酶的影响

不同的接种量对黑曲霉产脂肪酶的能力影响很大。将黑曲霉 51-43 活化后制成每毫升含 1×10^8 个孢子的悬液, 分别取 0.05 mL、0.1 mL、0.5 mL、1 mL 和 1.5 mL, 加入到发酵培养基中。从图7分析可以得到 0.5 mL 是最适接种量。

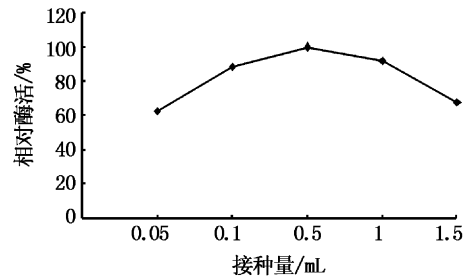


图7 不同接种量对黑曲霉 51-43 产脂肪酶的影响
Fig.7 Effect of different inoculum on the lipase production of *Aspergillus niger* 51-43

2.3.7 添加表面活性剂对产酶的影响

通过加入 1% 表面活性剂 Tween-80、TritonX-100 和 SDS, 研究其对产酶的影响。从图8我们可以看出 Tween-80 对黑曲霉 51-43 有促进其产生脂肪酶的能力, 其最大酶活可以达到 12.85 U/mL。而 Triton X-100 以及 SDS 都不利于其产酶。

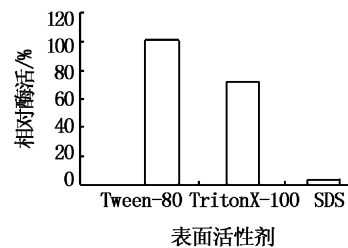


图8 不同表面活性剂对黑曲霉 51-43 产脂肪酶的影响
Fig.8 Effect of different surfactants on the lipase production of *Aspergillus niger* 51-43

2.4 正交试验

根据单因素试验的结果, 选择四因素三水平对发酵培养基进行正交试验(表2)。从表3分析得出, 不同的试验因子对菌株产酶的影响次序: $\text{CaCl}_2 > \text{NH}_4\text{Cl} > \text{Tween-80} > \text{橄榄油}$ 。从图9可以得出最佳的培养基配方: 蛋白胨 2.35%, 小麦粉 1%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, CaCl_2 0.01%, NH_4Cl 1%, Tween-80 0.5%, 橄榄油 1%。在最优发酵培养基组成和发酵条件下, 测定发酵液酶活。结果表明: 初始发酵培养基条件下所得脂肪酶的酶活为 8.73 U/mL, 而优化条件下所得脂肪酶的酶活为 19.28 U/mL, 是优化前酶活的 2.21 倍。

表2 黑曲霉 51-43 发酵培养基的正交试验表
Tab.2 Orthogonal design for fermentation medium of *Aspergillus niger* 51-43

实验号	CaCl ₂ /%	Tween-80 /%	橄榄油 /%	NH ₄ Cl /%	酶活 / (U/mL)
1	0.01	0.05	0.5	1	15.88
2	0.01	1	1	2	12.39
3	0.01	1.5	1.5	3	13.39
4	0.03	0.5	1	3	14.20
5	0.03	1	1.5	1	11.12
6	0.03	1.5	0.5	2	10.52
7	0.05	0.5	1.5	2	7.46
8	0.05	1	0.5	3	7.50
9	0.05	1.5	1	1	11.06

3 讨论

目前适用于食品生产的脂肪酶种类不多,而有良好的食用安全性的黑曲霉脂肪酶的研究显得尤为重要。本实验室从周边土壤中筛选出一

株黑曲霉 51-43。通过单因素分析得出,小麦粉为最佳碳源,蛋白胨为最佳有机氮源,NH₄Cl 为最佳的无机氮源。Mg²⁺、Ca²⁺ 对该菌株有促进作用,Tween-80 的添加可以提高其脂肪酶酶活。而添加油脂起到了一定的诱导作用,其中 1% 橄榄油的诱导效果最好。经过正交试验确定其最佳的发酵培养条件,优化后的酶活从 8.73 U/mL 提高到 19.28 U/mL。

表3 黑曲霉 51-43 的正交试验结果分析

Tab.3 Analysis of *Aspergillus niger* 51-43 orthogonal design

实验因子	均值 1	均值 2	均值 3	极差
CaCl ₂	13.887	11.947	8.673	5.214
Tween-80	12.513	10.337	11.657	2.176
橄榄油	11.300	12.550	10.657	1.893
NH ₄ Cl	12.687	10.123	11.697	2.564

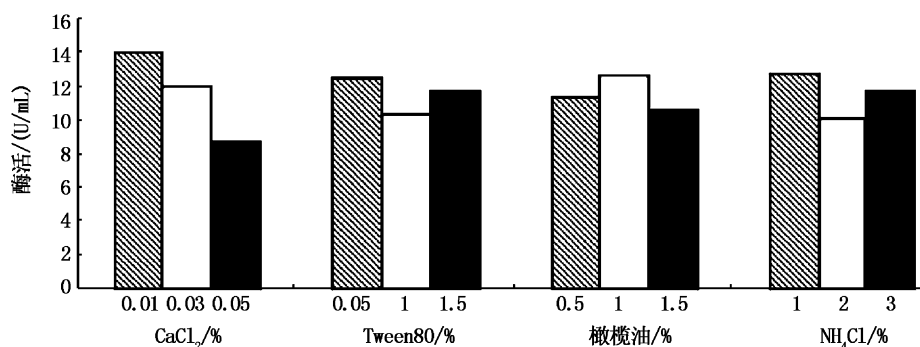


图9 黑曲霉 51-43 的正交试验效应图

Fig.9 Effect curve of *Aspergillus niger* 51-43 orthogonal design

目前国内报道的黑曲霉产脂肪酶的酶活力比较低,任丽虹和周应揆^[14] 研究发现一株黑曲霉脂肪酶优化后发酵酶活力最高达 16.4 U/mL。NUTAN 等研究发现 *Aspergillus niger* NCIM 1207 可以产生酸性脂肪酶,通过对该菌株进行紫外诱变,使产酸性脂肪酶能力提高了 7 倍,达到 41 IU/L^[15],表明通过诱变手段来提高黑曲霉酶活是可行的。培养基优化结果显示黑曲霉 51-43 有很大的产酶潜力,对其菌种诱变选育及酶学性质的研究工作正在进行中,以期提高其产脂肪酶能力,使其能够符合工业生产的要求。

参考文献:

- [1] PANDEY A, BENJAMIN S, SOCCOL C R, et al. The realm of microbial lipases in biotechnology [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1999, 29: 119-131.
- [2] 陈贵元,季秀玲,林连兵,等. 低温脂肪酶产生菌筛选与鉴定、产酶条件及酶学性质研究[J]. *云南大学学报:自然科学版*, 2010, 32(1): 108-113.
- [3] NAMBOODIRI V M, CHATTOPADHYAYA R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger* [J]. *Lipids*, 2000, 35(5): 495-502.
- [4] XU X B. Production of specific structured triacylglycerols by lipase catalyzed reactions: a review [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2000, 102(4): 287-303.
- [5] FU X, ZHU X, GAO K, et al. Oil and fat hydrolysis with lipase from *Aspergillus sp.* [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1995, 72(5): 527-530.
- [6] FERNÁNDEZ-LORENTE G, ORTIZ C, SEGURA R L, et al. Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 92(6): 773-779.

- [7] FABIANO J C, DANIELLE B L, GABRIELA A M, et al. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 67: 163 - 171.
- [8] YANG K, WANG Y J, KUO M I. Effects of substrate pretreatment and water activity on lipase catalyzed cellulose acetylation in organic media [J]. *Biotechnology Progress*, 2004, 20(4): 1053 - 1061.
- [9] STANDER M A, BORNSCHEUER U T, HENKE E, et al. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2000, 48(11): 5736 - 5739.
- [10] 李祖义, 朱明华, 冯清, 等. 胞外脂酶活力的检测法 [J]. *微生物学通报*, 1990, 17(2): 85 - 88.
- [11] LIMAA 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 [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 18: 65 - 71.
- [12] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 科学技术出版社, 1979.
- [13] 夏金兰, 张瑞永, 张倩, 等. 一株纤维素降解菌的分离、鉴定及降解特性初步研究 [J]. *湖南师范大学学报: 自然科学版*, 2008, 31(4): 86 - 90.
- [14] 任丽虹, 周应揆. 脂肪酶产生菌的筛选及一株黑曲霉产脂肪酶最适条件研究 [J]. *工业微生物*, 1996, 26(1): 23 - 26.
- [15] NUTAN D M, KULBHUSHAN B B, ULKA S P, et al. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 2031 - 2034.

The screening, identification and fermentation conditions optimization of soil lipase producing strain

YI Jie-rong¹, WANG Yun-shao¹, ZHANG Zhao-bin², LI Xiao-hui¹

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Apple Flavor & Fragrance Group Co., Ltd, Shanghai 201809, China)

Abstract: Strain 51-43 was isolated using olive oil as sole carbon source in enrichment culture, while Rhodamine B as indicator from rich oil soil around Shanghai city. Strain 51-43 was identified as *Aspergillus niger* according to morphological observation and the partial 18S rDNA sequence analysis. The fermentation conditions of *Aspergillus niger* 51-43 lipase were optimized through the single factor and the orthogonal experiments. The optimal fermentation medium was composed of 2.35% peptone, 1% wheat flour, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.01% CaCl₂, 1% NH₄Cl, 0.5% Tween - 80 and 1% olive oil, pH 7.0. Under the fermentation condition of 28 °C, 160 r/min, 72 h, the lipase activity could reach 19.28 U/mL, which was 2.21 times the original culture medium.

Key words: *Aspergillus niger*; lipase; fermentation; orthogonal experiments