

魏计东,于爽,张庆芳,等. 海洋低温脂肪酶菌株的筛选鉴定、诱变育种及酶学性质研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(15):195-200.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.15.052

海洋低温脂肪酶菌株的筛选鉴定、 诱变育种及酶学性质研究

魏计东^{1,2}, 于爽^{1,2}, 张庆芳^{1,2}, 迟乃玉^{1,2}

(1. 大连大学生命科学与技术学院, 辽宁大连 116622; 2. 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心, 辽宁大连 116622)

摘要:以海泥、海水为样品,经初筛、复筛得到 1 株脂肪酶高产菌 FS119,测得酶活为 17.8 U/mL。通过形态学、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析,鉴定菌株 FS119 为液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*),对液化沙雷氏菌 FS119 进行物理化学合成诱变,筛选出 1 株高产诱变菌株 FS119-1,该菌株遗传性能稳定,酶活达到 24.9 U/mL,为原始菌株的 1.4 倍。该低温脂肪酶的最适反应温度为 30 ℃,0 ℃时仍然有酶活;最适 pH 值为 9,酸碱稳定性良好;K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Ba²⁺ 对脂肪酶的活性有明显促进作用,Cu²⁺、Mn²⁺、EDTA 对脂肪酶活性有严重抑制作用。

关键词:海洋;低温脂肪酶;鉴定;诱变;液化沙雷氏菌;酶学性质

中图分类号: Q556⁺.1;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)15-0195-05

脂肪酶(lipase,EC3.1.1.3),又称甘油三酯酯水解酶,是一类重要的工业酶,可以在油水界面上催化甘油三酯生成脂肪酸和甘油,以及甘油一酯和甘油二酯;广泛存在于动物、植物各种组织及微生物中,是最早研究的酶类之一^[1]。低温酶^[2]的定义是最适酶活温度在 30 ℃左右,在 0 ℃左右仍有一定的催化活性。低温酶主要是低温微生物生产,它们长期生活在低温环境中,例如南极、北极以及海洋底部等极端环境中^[3]。相比较中高温脂肪酶,低温脂肪酶的优势是在低温条件下(0~30 ℃)具有极高的催化活力和较低的热稳定性^[4];在工业上的优势在于酶的活化能和反应最适温度较低,可以节约资源、保护环境。低温脂肪酶具有高效、可低温下作用、作用周期短等优势^[5],在应用上具有中高温脂肪酶无法取代的优越性,因此在食品^[6]、轻纺^[7]、化妆品^[8]、洗涤剂^[9]、有机合成^[10]、环境治理^[11]以及医药^[12]等领域有广泛的应用前景。微生物脂肪酶种类多,作用温度及 pH 值范围比动、植物脂肪酶^[13-14],底物专一性高,且便于工业生产以获得较高纯度的酶制剂,已成为工业生产脂肪酶的主要来源。

本研究通过对海泥样品中微生物的分离筛选,获得 1 株产低温脂肪酶耐冷菌株;该菌株在低温下具有较高的活性,为提高该菌株的产酶量,应用物理化学合成诱变即紫外(UV)诱变与硫酸二乙酯(DES)诱变,并且研究了其酶学性质。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 试验菌株液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)

收稿日期:2017-03-04

基金项目:国家“863”计划(编号:2014AA093512)。

作者简介:魏计东(1991—),男,山东邹城人,硕士研究生,主要从事微生物与酶工程研究。E-mail:weijidongsk@163.com。

通信作者:迟乃玉,博士,教授,主要从事微生物与酶工程研究。Tel:(0411)87403861;E-mail:cny7566@126.com。

FS119 筛选自黄海大连长海县海域的海泥和海水样品,后经诱变得到高产诱变菌株 FS119-1,现由辽宁省海洋微生物工程技术研究中心保藏。

1.1.2 试剂及培养基 橄榄油聚乙稀醇乳化液^[15]:取 4% 聚乙烯醇和橄榄油按 3:1 的比例混合均匀,于 10 000 r/min 乳化 3 min,暂停 5 min 而后继续乳化 3 min。

富集培养基^[16]:(NH₄)₂SO₄ 0.1%,K₂HPO₄ 0.1%,NaCl 0.05%,MgSO₄·7H₂O 0.05%,FeSO₄·7H₂O 0.001%,酵母膏 0.5%,橄榄油 0.5%,pH 值自然。

平板分离培养基:(NH₄)₂SO₄ 0.1%,K₂HPO₄ 0.1%,NaCl 0.05%,MgSO₄·7H₂O 0.05%,FeSO₄·7H₂O 0.001%,琼脂 2%,pH 值为 8.0,121 ℃灭菌 20 min。橄榄油聚乙稀醇乳化液 121 ℃灭菌 20 min,取 12 mL 橄榄油聚乙稀醇乳化液加入到 100 mL 上述培养基中即为油脂同化培养基。

纯化培养基:牛肉膏 0.3%,蛋白胨 1.0%,NaCl 0.5%,琼脂 2.0%,pH 值 8.0。

种子培养基:蛋白胨 1.0%,酵母膏 0.5%,NaCl 0.1%,pH 值 8.0。

初始发酵培养基:(NH₄)₂SO₄ 0.1%,K₂HPO₄ 0.1%,MgSO₄·7H₂O 0.05%,葡萄糖 0.5%,橄榄油 1.0%,pH 值自然。

斜面保藏培养基:牛肉膏 0.3%,蛋白胨 1%,NaCl 0.5%,琼脂 2.0%,pH 值 8.0。

1.1.3 仪器与设备 LDZX-40BI 立式压力蒸汽灭菌锅:上海申安医疗器械厂;LTI-700 恒温培养箱:上海爱郎仪器有限公司;HZP-250 全温振荡培养箱:上海精宏实验设备有限公司;HD-1360 超净工作台:北京东联哈尔仪器制造有限公司;AL-204 电子天平:梅特勒-托利多仪器有限公司;RDY-SPIZ 型核酸电泳仪:北京荣阳静电科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的筛选 (1)富集培养:取 1 g 泥样或 1 mL 水样于 20 mL 带有玻璃珠的无菌水中,使沉积物悬浮,取悬浮液

1 mL 接种到 100 mL 的富集培养基三角瓶中,20 ℃ 150 r/min 培养 3 d 后转接 400 μ L 浑浊的菌液到新鲜的液体富集培养基中,连续富集 3 轮;(2)菌株的初筛:取 0.1 mL 富集菌液梯度稀释后涂布平板分离培养基进行初筛,20 ℃ 培养 3~7 d 后观察透明圈的大小;(3)菌株的纯化:挑取初筛培养基上菌落周围变色圈大的菌落,稀释涂布于纯化培养基上进一步纯化,得到纯化的单菌落;(4)菌株的复筛:将单菌落点种于分离培养基上,20 ℃ 培养 3 d,测量透明圈直径大小;将透明圈直径最大的菌株接入种子培养基中 150 r/min 培养 24 h,再以 6% 的接种量接到初始发酵培养基中,在不同温度下测定其发酵液酶活力。

1.2.2 菌株的鉴定 (1)形态学特征:参照文献[17-18],在菌落生长的平板上观察单菌落的形状、大小、透明度、颜色、边缘和表面特征。采用革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色和鞭毛染色,用光学显微镜观察菌体形状特征。(2)生理生化特征:参照文献[17-18],对 FS119 菌株进行生理生化鉴定,包括接触酶试验、葡萄糖氧化发酵试验、运动型试验、M. R 和 V. P 试验、柠檬酸盐试验、明胶液化试验、酯酶(油脂、Tween 80)试验、KOH 拉丝试验、好氧性试验、氧化酶试验、吡啶试验、硫化氢试验、淀粉试验、脲酶试验。(3)菌株 16S rDNA 序列分析:利用 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取 FS119 菌基因组 DNA。以菌株 FS119 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,而后将 PCR 产物交由上海生工生物工程有限公司测序,将测序结果提交到 GenBank 数据库中进行 Blast 序列比对,利用 MEGA 软件构建系统发育树。

1.2.3 脂肪酶活力测定 采用 NaOH 滴定法^[19]进行低温脂肪酶的筛选和酶活的测定;同时,选用 *p*-NPP 比色法进行验证。

碱滴定法测定脂肪酶酶活:发酵液经 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液测酶活。取 3 个 100 mL 锥形瓶,分别加入 4 mL 聚乙烯醇橄榄油乳化液,5 mL 0.05 mol/L, pH 值为 8 的磷酸盐缓冲液,其中 1 个锥形瓶作为对照样,提前加入 95% 乙醇 15 mL,于 30 ℃ 水浴锅中预热 5 min。向 3 个锥形瓶中加入 1 mL 酶液,立即混匀计时 10 min,向 2 个样品瓶中加入 15 mL 95% 乙醇终止反应。向 3 个锥形瓶中滴加 3 滴酚酞作为指示剂,用 0.05 mol/L NaOH 溶液滴定水解产生的游离脂肪酸,根据酶活公式计算酶活。酶活定义:1 mL 酶液于 30 ℃、pH 值 8 的条件下,水解脂肪 1 min 生成 1 μ mol 的脂肪酶所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位。

p-NPP 法^[20-21],脂肪酶 1 个单位的定义是:在 pH 值为 8、30 ℃ 条件下,作用 10 min,1 min 分解对硝基棕榈酸酯释放 1 μ mol 对-硝基酚(*p*-nitrophenol)所需的酶量。

1.2.4 紫外线-硫酸二乙酯复合诱变 (1)紫外线(UV)诱变:取 5 mL 菌悬液转于内径 90 mm 的装有灭菌转子的培养皿中,将平皿置于紫外灯正下方 18 cm 处的磁力搅拌器上,先将整个平皿照射 1 min 后,打开皿盖,开动磁力搅拌器^[22],每隔 5 s 定时取出菌液,于冰浴中保存 1 h;分别取未照射的空白液和照射不同时间段的菌液 0.1 mL 涂布于平板上,每个梯度涂布 3 个平板,用黑色胶袋包好于 20 ℃ 培养箱中培养 36 h,计算致死率(诱变后未存活的总细胞数与未诱变存活的总细胞数的百分比)和正突变率(产量高于出发菌株产量的数量

与诱变后存活的细胞数目的百分比),通过最高的正突变率选出最佳的紫外照射时间。

(2)硫酸二乙酯诱变:吸取 5 mL 菌悬液于大试管中,加入体积分数 2% 的硫酸二乙酯(DES)5 mL,在 20 ℃ 水浴条件下振荡,设定不同处理时间^[23]。用 0.85% 生理盐水适当稀释后涂布于油脂同化培养基上,每个平板上有 40~50 个菌落为宜。置于 20 ℃ 恒温培养箱中培养 36 h,根据生长出的菌落数计算致死率。

(3)紫外线-硫酸二乙酯复合诱变:根据紫外线与硫酸二乙酯单独诱变结果,确定最佳的紫外线照射时间和硫酸二乙酯处理时间,进行复合诱变。即将紫外线在最佳时间照射后,取诱变液 2 mL,立即加入硫酸二乙酯诱变剂,再继续进行诱变^[24]。稀释后涂布于油脂同化培养基上,用黑纸包好,于 20 ℃ 条件下恒温培养 36 h,根据透明圈直径与菌落直径比值大小和发酵培养酶活的测定初步挑选产酶高的菌株。

(4)遗传稳定性测定:对紫外线与硫酸二乙酯复合诱变筛选出的产酶最高的菌株进行连续 5 代传代培养,测定其酶活,并比较前后酶活力变化,确定诱变菌种的遗传稳定性。

1.2.5 粗酶液的制备 发酵液于 4 ℃ 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液作为粗酶液。向粗酶液中加入硫酸铵至 10% 饱和度,4 ℃ 放置 1 h,10 000 r/min 离心 20 min,向上清液继续加入硫酸铵至 80% 饱和度,4 ℃ 放置 24 h,15 000 r/min 离心 15 min,用 Tris-HCl 缓冲液溶解并透析过夜,直至除去 NH_4^+ ,经硫酸铵脱盐的低温脂肪酶用于酶初步性质研究。

1.2.6 酶学性质研究

12.6.1 酶最适作用温度 分别测定酶液在 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55 ℃ 条件下的相对酶活,做 3 组平行试验。

1.2.6.2 酶的热稳定性 将酶液分别置于 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55 ℃ 条件下处理 1 h,测定脂肪酶相对酶活,做 3 组平行试验。

1.2.6.3 酶最适作用 pH 值 在酶最适作用温度下,分别在 pH 值为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、10.5。Tris-HCl 缓冲体系中测定脂肪酶相对酶活,做 3 组平行试验。

1.2.6.4 酶的 pH 值稳定性 将酶液分别置于 pH 值为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 Tris-HCl 缓冲体系中处理 24 h,测定脂肪酶相对酶活,做 3 组平行试验。

1.2.6.5 金属离子与 EDTA 对酶活影响 在酶最适作用条件下,向酶反应体系中各加入各种金属阳离子 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 及乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA),使各反应体系中金属离子浓度为 10 mmol/L,测定脂肪酶相对酶活,做 3 组平行试验。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

对海水、海泥样品初筛和复筛,得到 7 株具有脂肪酶活力的菌株,测量透明圈直径大小,结果见表 1。获得 1 株直径比最大的菌株 FS119。在不同的温度(15、20、25、30、35、40 ℃)

测定其发酵液酶活力。由表 2 可知,菌株 FS119 在 20 ℃ 时酶活均达到最高,故此可以初步确定其为低温菌,最适培养温度为 20 ℃。

表 1 菌落透明圈直径比

序号	菌株编号	透明圈直径 (mm)	菌落直径 (mm)	直径比
菌株 1	FS102	37.5	17.5	2.14
菌株 2	FS119	31.5	8.5	3.71
菌株 3	FS201	28.0	15.0	1.87
菌株 4	FS202	30.0	15.0	2.00
菌株 5	FS311	28.0	16.0	1.75
菌株 6	FS315	14.0	10.0	1.40
菌株 7	FS316	14.0	7.0	2.00

表 2 菌株 FS119 在不同温度下的发酵液酶活

温度 (℃)	酶活(U/mL)	
	碱滴定法	p-NPP 法
15	4.3	0.9
20	17.8	7.4
25	12.9	5.2
30	8.7	4.0
35	4.9	1.8
40	1.8	0.5

2.2 菌株 FS119 的鉴定

2.2.1 菌株 FS119 形态学特征 菌株 FS119 菌落经革兰氏染色,由图 1 可知,菌落呈圆形菌落、呈乳白色、不透明、圆形稍突起,边缘整齐,表面光滑、湿润、黏稠、易挑起、质地较均匀,菌落各部分颜色一致;经光学显微镜观察菌株 FS119 为革兰氏染色阴性菌,菌体直杆状,单个或成对排列,两端较平直,端圆,直径为 0.5~0.8 μm,长 0.9~2.0 μm,无芽孢,有荚膜和鞭毛,能运动。

2.2.2 生理生化特征 参照《细菌系统鉴定手册》对菌株进

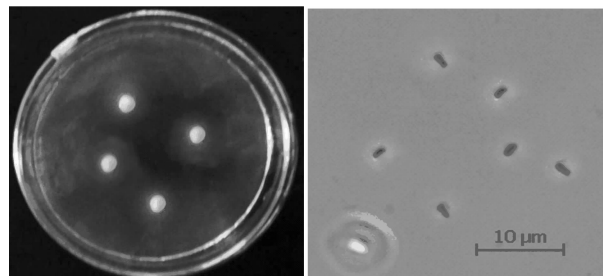


图 1 菌株 FS119 菌落形态及显微形态特征(100×)

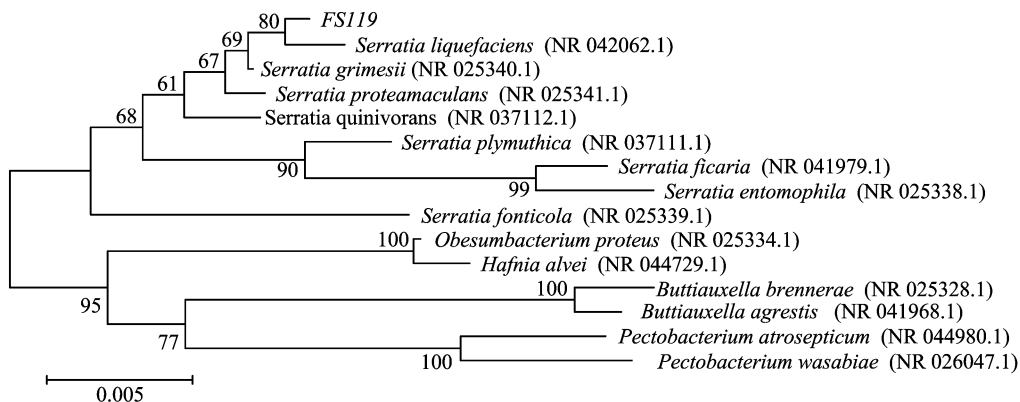


图 2 菌株 FS119 的 16S rDNA 序列系统发育树

行生理生化试验,结果见表 3。由表 3 可知,菌株 FS119 生理生化特征为:接触酶试验、葡萄糖的氧化发酵试验、运动型试验、M. R 和 V. P 试验、柠檬酸盐试验、明胶液化试验、酯酶(油脂、Tween 80)试验结果均为阳性;KOH 拉丝试验、好氧性试验、氧化酶试验、吡啶试验、硫化氢试验、淀粉试验、脲酶试验结果均为阴性。由生理生化试验结果可初步鉴定其为液化沙雷氏菌。

表 3 菌株 FS119 生理生化特征

项目	菌株反应
KOH 拉丝	-
好氧性	-
接触酶	+
氧化酶	-
葡萄糖的氧化发酵	+
运动型	+
吡啶	-
M. R 和 V. P 试验	+
柠檬酸盐	+
硫化氢	-
明胶液化	+
淀粉	-
酯酶(油脂、Tween 80)	+
脲酶	-

注:“+”阳性反应;“-”阴性反应。

2.2.3 16S rDNA 序列分析和系统发育树的构建 对菌株 FS119 进行 16S rDNA 序列鉴定,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,将提取到的基因组 DNA 作为模版进行 PCR 扩增。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果显示 PCR 扩增产物序列长度为 1 423 bp。将菌株 FS119 的 16S rDNA 序列输入 GenBank,与 FS119 的 16S rDNA 相似性高的菌株的 16s rDNA 序列进行同源性比较,对比结果用 Clustal X 进行多序列匹配比对,通过 MEGA 软件进行系统发育树分析,计算出序列的系统进化距离,构建系统发育树,结果见图 2。

2.3 菌株 FS119 的复合诱变

2.3.1 菌株 FS119 紫外线(UV)诱变 出发菌株 FS119 经紫外线照射不同时间的致死曲线如图 3 所示,紫外线照射不同剂量下的诱变效果如图 4 所示。由图 3、图 4 可知,随着照射时间的延长,负变率逐渐增大,不变率逐渐降低。照射时间为 30 s 时正变率最高,为 41%。确定紫外照射 30 s 为最佳诱变剂量,此时致死率达 87%。

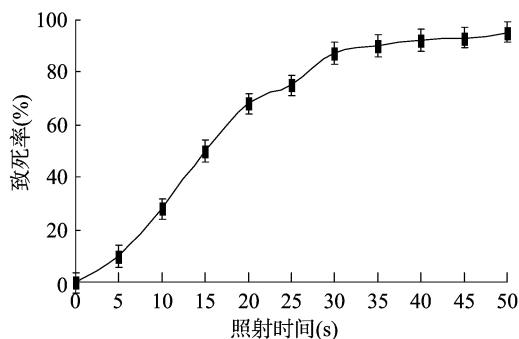


图3 菌株 FS119 紫外诱变致死率曲线

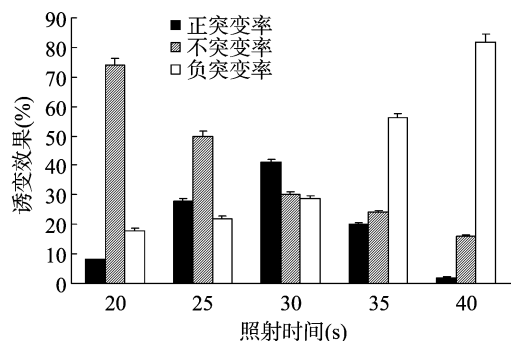


图4 菌株 FS119 紫外线照射不同剂量下的诱变效果

2.3.2 菌株 FS119 硫酸二乙酯 (DES) 诱变 出发菌株 FS119 经硫酸二乙酯处理不同时间的致死曲线如图 5 所示, 硫酸二乙酯诱变不同剂量下的诱变效果如图 6 所示。由图 5、图 6 可知随着照射时间的延长, 负突变率逐渐增大, 不变率逐渐降低。反应时间为 30 min 时正突变率最高, 为 43%。确定紫外照射 30 min 为最佳诱变剂量, 此时致死率达 92%。

2.3.3 菌株 FS119 紫外线与硫酸二乙酯复合诱变 将紫外

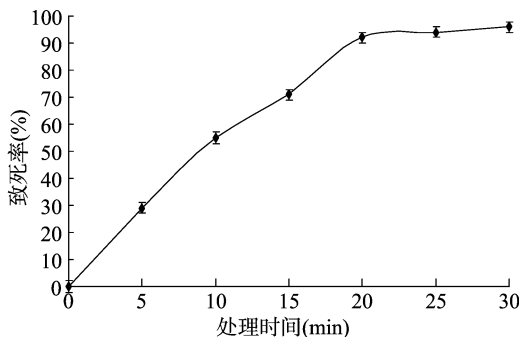


图5 菌株 FS119 硫酸二乙酯诱变致死率曲线

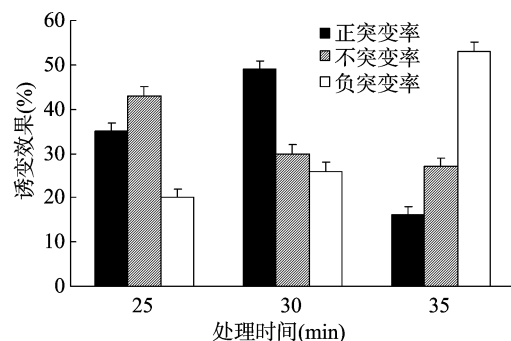


图6 菌株 FS119 硫酸二乙酯处理不同剂量下的诱变效果

照射时间为 30 s 筛选得到的高产菌株作为二次出发菌株, 制成菌悬液, 选择致死率为 92% 的处理剂量继续进行诱变, 即用体积分数 2% 的 DES 处理 30 min, 经油脂同化培养基培养, 筛选出透明圈直径与菌落直径比值大的菌株复筛, 经反复筛选, 最终获得 1 株高产诱变菌株 FS119-1 (图 7), 其透明圈直径与菌落直径比为 5.21, 其酶活达到 24.9 U/mL, 将其与原始菌株对照, 其直径比和酶活均约为原始菌株的 1.4 倍。

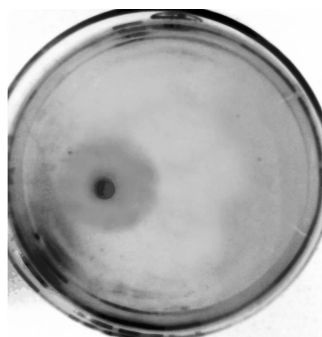


图7 菌株 FS119-1 菌落形态

2.3.4 菌株 FS119-1 遗传稳定性 高产诱变菌株 FS119-1 在斜面上分别传代 10 次后分别发酵培养, 测定摇瓶培养基中摇瓶发酵测酶活。由图 8 可知, 菌株 FS119-1 在传代至第 10 代时, 仍能保持一个稳定的脂肪酶产量, 说明此菌株遗传性能稳定。

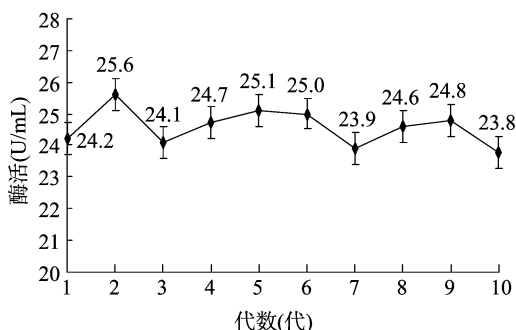


图8 菌株 FS119-1 传代稳定性检测

2.4 酶学性质研究

2.4.1 酶最适作用温度 由图 9 可知, 酶的最适反应温度为 30 ℃, 30 ℃ 后酶活力逐渐下降, 0 ~ 40 ℃ 酶活力保持在 50% 以上, 0 ℃ 有 51% 的相对酶活, 符合低温酶特性, 在较短的时间产生大量脂肪酶。

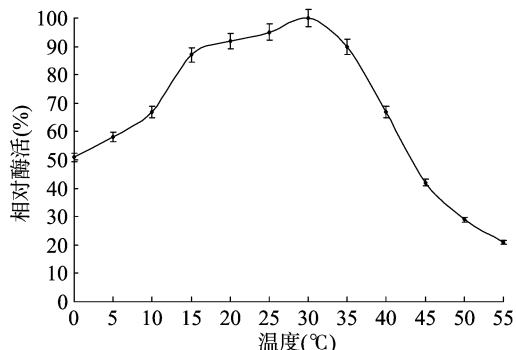


图9 反应温度对酶活的影响

2.4.2 酶的热稳定性 由图 10 可知, 脂肪酶在较低的温度 (0 ~ 40 ℃) 下能保持良好的稳定性, 超过 40 ℃ 后酶活力迅速

下降。40 ℃ 以上的温度使酶变性失活,55 ℃ 处理 1 h 可使酶活力完全丧失,表明该酶具有热不稳定性。

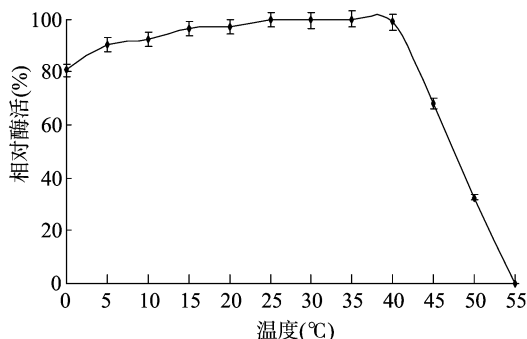


图10 低温脂肪酶的热稳定性

2.4.3 酶最适作用 pH 值 由图 11 可知,酶的最适反应 pH 值为 9,在 pH 值为 7~9 时,有 50% 以上的活性,表明该酶属于碱性脂肪酶。

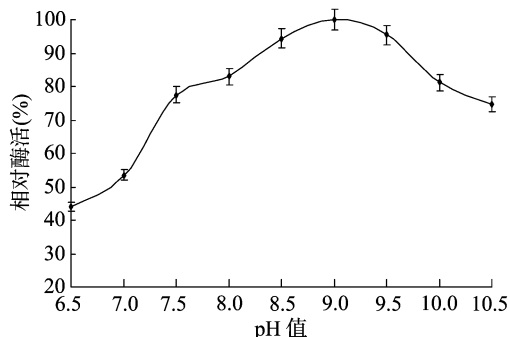


图11 低温脂肪酶最适作用 pH 值

2.4.4 酶的 pH 值稳定性 由图 12 可知,低温脂肪酶在 pH 值为 4.0~9.5 下能保持良好的稳定性,这符合碱性脂肪酶的特性。

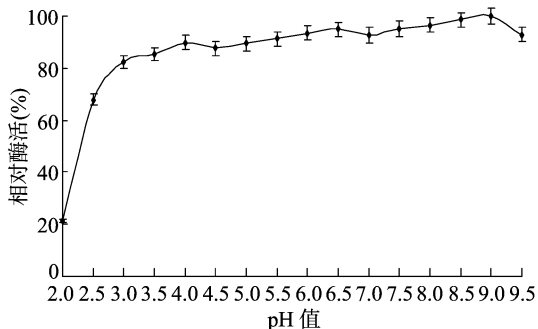


图12 低温脂肪酶的酸碱稳定性

2.4.5 金属离子及螯合剂对酶活的影响 由表 4 可知, K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 对脂肪酶的活性有明显促进作用; Ca^{2+} 是酶活性发挥所必需的^[25],沈永强等研究表明 Ca^{2+} 和脂肪酸生成的皂钙促进了酶反应进行^[26],也有人推测 Ca^{2+} 是脂肪酶的组成成分^[27]; Na^+ 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 对脂肪酶活性有微弱抑制作用,残留酶活保持在 80% 以上; Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、EDTA 对脂肪酶活性有严重抑制作用,残留酶活在 30% 以下,可能是由于这些离子与酶中心的巯基基团结合,进而引起酶失活。

3 结论

本试验从黄海大连长海县海域的海泥和海水样品中初筛

表 4 金属离子及螯合剂对酶活力的影响

金属离子	相对酶活(%)
对照	100.0
Na^+	90.7
K^+	125.8
Ca^{2+}	115.6
Mg^{2+}	120.9
Fe^{2+}	86.3
Cu^{2+}	8.1
Mn^{2+}	28.9
Fe^{3+}	87.5
Zn^{2+}	92.6
Ba^{2+}	109.4
EDTA	0.0

到 7 株产低温脂肪酶菌株,对其进行酶活测定复筛,得到 1 株酶活较高菌株 FS119,20 ℃ 为其最佳培养温度,属于低温酶类。并对其进行形态学、生理生化特征、16S rDNA 序列分析,鉴定菌株 FS119 为液化沙雷氏菌,大连海域未见有关此属菌株海洋产低温脂肪酶的报道。通过对液化沙雷氏菌 FS119 的物理化学合成诱变,即紫外(UV)诱变与硫酸二乙酯(DES)诱变,筛选出 1 株高产诱变菌株 FS119-1,该菌株遗传性能稳定,酶活达到 24.9 U/mL,为原始菌株的 1.4 倍。对高产诱变菌株 FS119-1 的酶学性质初步研究表明,该低温脂肪酶的最适反应温度为 30 ℃,0 ℃ 时仍有酶活,热稳定性比较差;最适 pH 值为 9,酸碱稳定性良好; K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 对脂肪酶的活性有明显促进作用, Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、EDTA 对脂肪酶活性有严重抑制作用,该酶在碱性条件下较为稳定,初步判断为碱性脂肪酶。

参考文献:

- [1] 兰立新,肖怀秋. 微生物脂肪酶应用研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(14):7547-7548,7561.
- [2] 陆小波,魏云林. 低温酶及其冷适应性机制研究进展[J]. 生物技术通报,2006(4):51-53,58.
- [3] 孙 谧,洪义国,李勃生,等. 海洋微生物低温酶特性及其在工业中的潜在用途[J]. 海洋水产研究,2002,23(3):44-49.
- [4] 达文燕,杨霞霞,张爱梅. 低温酶及产低温脂肪酶微生物研究概述[J]. 甘肃农业,2013(13):14-16.
- [5] 唐琦勇,张志东,朱 静,等. 一株低温脂肪酶产生菌的筛选鉴定及酶学特性[J]. 新疆农业科学,2013(1):117-123.
- [6] 李兴军. 谷物及其加工品脂肪酶解的生化机制[J]. 粮食科技与经济,2012(6):55-58.
- [7] 刘虹蕾,缪 铭,江 波,等. 微生物脂肪酶的研究与应用[J]. 食品工业科技,2012,33(12):376-381.
- [8] 苏二正,尤鹏伟,魏东芝. 非水相体系中木瓜脂肪酶催化合成蒎烯醇芳香酯的研究[J]. 林产化学与工业,2015,35(1):45-50.
- [9] 李 林. 用碱性蛋白酶和脂肪酶优化洗衣粉配方的研究[J]. 日用化学品科学,2015,38(8):45-48,56.
- [10] 田雪梅. 脂肪酶催化有机合成反应的合理调控[D]. 长春:吉林大学,2016.
- [11] 周力超. 应用于油脂废水处理的全细胞脂肪酶的构建及其应用[D]. 武汉:湖北大学,2012.
- [12] 张之建,李鸣海,张耀华,等. 脂肪酶 Novozyme435 手性拆分(*R*, *S*)-扁桃酸[J]. 国外医药:抗生素分册,2016,37(2):81-83.

杨浩,孟娜,张辉.热环境视角下的城市间最小生态安全距离研究[J].江苏农业科学,2018,46(15):200-204.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.15.053

热环境视角下的城市间最小生态安全距离研究

杨浩^{1,2},孟娜³,张辉²

(1.北京市社会科学院,北京 100101; 2.北京大学经济学院,北京 100871; 3.北京师范大学政府管理学院,北京 100875)

摘要:划定城市间“最小生态安全距离”作为研究城镇化进程中治理城市间复合污染问题的全新思路,对实施城市可持续发展战略具有重要意义。基于热环境视角通过解析 3 种假设情景来揭示城市间“最小生态安全距离”的表现形式与实质内涵,并据此构建测量方法及理论模型对北京与天津 2 个典型城市进行模拟检验。研究结果显示:2003—2013 年北京市和天津市城市热岛区域呈现出逐年接近、连片发展的空间分布格局。10 年间,北京市和天津市的城市热岛面积迅速扩大,由 2003 年的 1 096.98、370.32 km²,增加到 2013 年的 8 188.06、4 567.54 km²;京津 2 地城市间的热环境“最小生态安全距离”衰减明显,由 2003 年的 80.76 km 锐减到 2013 年的 1.44 km。最后提出了建设城市通风走廊、科学规划城市绿地系统、利用科技手段减少热污染排放的对策建议。

关键词:城市热环境;密度分割;最小生态安全距离;京津地区

中图分类号: TU984.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)15-0200-05

在 2014 年 3 月的全国环境保护工作会议中国家环保部首次提出了“最小生态安全距离(the minimum distance forecological security, MDSE)”的概念。这是我国城镇化进程中治理城市间复合污染问题的全新思路,包含了生态保护、安全底线、资源承载力和环境容量的综合性概念。但迄今为止,学术界对于“最小生态安全距离”的实质内涵还缺乏较为明

晰的界定。城市热环境作为城市生态系统的重要组成部分,随着城市化进程的加快,城市人口的快速增加,城市建筑密度的大幅提升,以城市热岛效应为代表所引发的一系列热环境负面效用逐渐成为人们关注的焦点。现阶段城市热环境问题已经不是单纯的气候环境问题,而是影响城市化进程和城市生态环境良性发展的重大阻碍^[1-6]。因此,测量基于热环境视角的城市间最小生态安全距离,不仅能够设置为城市发展的“刚性界限”和“生态安全底线”提供理论依据,还能够为解决城市集中发展所显现出来的城市群热环境冲突和叠加等新型环境问题提供科学参考。

收稿日期:2018-03-09

基金项目:中国博士后科学基金面上项目(编号:2018M631383);北京市社会科学院青年项目(编号:2017B4758)。

作者简介:杨浩(1983—),男,吉林长春人,北京大学在站博士后,北京市社会科学院助理研究员,研究方向为土地行政、政府绩效评估、政府经济管理。E-mail: yanghaojldx@163.com。

通信作者:张辉,教授,博士生导师,研究方向为区域经济学、产业经济学、土地经济学。E-mail: nk94zhang@126.com。

1 相关研究综述

划定城市增长边界是解决城市空间蔓延带来热岛效应的有效手段。自 20 世纪 70 年代美国俄勒冈州划定第一条城市

[13] 叶慧,雷建平,左建军,等.微生物脂肪酶概况及其动物营养效应的研究进展[J].饲料工业,2012,33(12):37-40.
[14] 兰立新,肖怀秋.微生物脂肪酶生物学特性及分离纯化研究进展[J].江苏调味副食品,2009,26(5):1-5.
[15] 徐启峻,滕宏飞,黄程,等.一株柱状假丝酵母产脂肪酶条件的优化研究[J].中国油脂,2015,40(5):70-75.
[16] 顾美英,张志东,茆军,等.低温脂肪酶产生菌的筛选及发酵条件研究[J].农产品加工.学刊,2006(11):4-6,72.
[17] 东秀珠,蔡妙英.常用细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
[18] Bergey D H, Holt J G, Krieg N R. Bergey's manual of systematic bacteriology[J]. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1989, 38(4):443-491.
[19] 雷启义,邹凯,周江菊,等.脂肪酶活力测定方法及其比较[J].凯里学院学报,2011(6):43-45.
[20] Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, et al. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9):4064-4069.

[21] Mahadik N D, Puntambekar U S, Bastawde K B, et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger*, in solid state fermentation[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(5):715-721.
[22] 王艳,李大平,刘世贵.紫外线和硫酸二酯诱变五株亚硝化单胞菌的硝化活力比较[J].四川大学学报(自然科学版),2003(1):181-183.
[23] 刘海洲,刘均洪,张媛媛,等.南极假丝酵母诱变育种及产脂肪酶条件优化[J].青岛科技大学学报(自然科学版),2009(3):226-229,237.
[24] 武晓炜,吴志国,王艳敏,等.甲胺磷降解菌的紫外诱变及高产菌株的筛选[J].河北省科学院学报,2005(3):71-73.
[25] 刘光.黑曲霉脂肪酶的分离纯化及其性质研究[D].广州:华南理工大学,2013.
[26] 沈永强,刘慈俊,张景六,等.阿氏假囊酵母(*Eremothecium ashbyii*) Du-32 脂肪酶的研究[J].微生物学报,1974(1):95-102.
[27] Verger R. Lipases: structure, mechanism and genetic engineering[J]. Biochimie, 1992, 74(2):209-214.