

脂肪酶生产菌株的筛选及其发酵条件优化

王沙莉¹, 朱胜杰¹, 夏海锋^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为获得具有高产脂肪酶能力的菌株, 以橄榄油为唯一碳源进行富集, 再经过维多利亚蓝 B 平板初筛和两次摇瓶复筛, 从自然界中筛选得到一株具有较高酶活的革兰氏阴性短杆菌 G1。通过提取 16S rDNA 进行同源比对, 确定该菌属于伯克霍尔德氏菌属。该菌经紫外和 ARTP 复合诱变得诱变株 G1-7-4, 酶活较原始菌株提高了 51.87%。在单因素试验考察各因素对脂肪酶酶活的影响的基础上采用响应面法对影响酶活的重要因素进一步优化, 得到最佳发酵条件: 玉米油 33.09 mL/L, 酵母膏 31.90 g/L, 初始 pH 6.67。该条件下酶活最高达到 80.62 U/mL, 为初始条件下的 24.81 倍。该脂肪酶的最适 pH 为 8.0, 在 30~80 °C 范围内均具有较高酶活, 最适反应温度为 50 °C。

关键词: 脂肪酶; 筛选; 伯克霍尔德氏菌; 诱变; 响应面法

中图分类号: Q 93-335 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)06—0648—09

Strain Screening and Fermentation Optimization for the Production of Lipase

WANG Shali¹, ZHU Shengjie¹, XIA Haifeng^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A gram-negative short rhabdoid bacillus G1 with the high enzymatic activity to produce lipase was first obtained by the enrichment using olive oil as the sole carbon, Victoria blue B plate screening and shaking culture re-screening. Homology search by 16S rDNA showed that the strain belonged to Burkholderia. The enzymatic activity of the resulting mutant G1-7-4 through the composite mutation of UV and ARTP was increased by 51.87%. Base on the response surface methodology, the optimal fermentation conditions were determined as 33.09 mL/L of corn oil, 31.90 g/L of yeast extract and initial pH 6.67. With these parameters, the lipase activity reached 80.62 U/mL, which was 24.81 times compared to that in the initial condition. The resulting lipase had the optimal pH 8.0, the active temperature range of 30-80 °C and the optimal temperature of 50 °C.

Keywords: lipase, screening, *Burkholderia*, mutagenesis, response surface methodology

收稿日期: 2014-12-13

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(JUSRP51401A); 江苏省自然科学基金项目(BK20151123)。

* 通信作者: 夏海锋(1979—), 男, 浙江平湖人, 工学博士, 副教授, 主要从事发酵工程、生化工程、生物分离工程的研究。

E-mail: hfxia@jiangnan.edu.cn

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3)是一种广泛存在于动物、植物和微生物中的酶,该酶在油-水界面上能催化油脂(甘油三酯)水解为甘油、甘油二酯、甘油一酯和游离脂肪酸^[1],在无水有机溶剂中又能催化酯的合成^[2]。所以脂肪酶被广泛用于食品风味改造、手性药物合成、皮革加工、生物柴油的制备,以及作为饲料添加剂^[3]。脂肪酶被誉为生物产业中最有价值的工业酶之一^[4]。

由于微生物脂肪酶比动植物脂肪酶催化作用的pH值和温度范围更宽,且制备相对更易,所以目前国内外获得脂肪酶的方法主要是微生物发酵法^[5-6]。2011年,苑博华等人^[8]通过响应面法对*Burkholderia* sp. SY BC LIP-Y发酵产低温脂肪酶的条件进行优化,优化后脂肪酶的酶活达到61.52 U/mL,是优化前的2.62倍。2013年,沈晓莉等^[8]通过平板划线分离法,从15份土样中筛选到1株产耐热脂肪酶菌株,通过单因素试验进行发酵条件优化后脂肪酶酶活力从11 U/mL提高到15 U/mL。Christina Papagora等(2013)^[9]从腌制橄榄干中分离得到1株*Debaryomyces hansenii*,通过响应面法使酶活提高了2.28倍,最高达到7.44 U/mL。

作者为获得高产脂肪酶的菌株,从被油脂污染的环境中采集多份土样,经过多轮筛选得到一株高产脂肪酶的菌株。对该菌株进行复合诱变,使其脂肪酶产量进一步提高,再利用单因素试验、Plackett-Burman设计、最陡爬坡试验,以及响应曲面法对发酵条件进行优化,使该菌株产酶量最大化。

1 材料与方法

1.1 试剂

4-硝基苯基棕榈酸苯酯(C16),4-硝基苯基辛酸酯(C8),4-硝基苯基乙酸酯,购于百灵威科技公司;玉米油和大豆油,购于作者居住地超市(金龙鱼);其他试剂均为国药集团化学试剂有限公司分析纯产品。

1.2 实验仪器

双人净化工作台,苏州净化集团安泰公司制造;高压蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂制造;电子天平PB2002-N、EL204,320-S型台式pH计,Mettler Toledo公司制造;超声破碎仪,美国Sonic公司制造;DRP-9082型电热恒温培养

箱,上海森信实验仪器有限公司制造;回转式恒温调速摇瓶柜,太仓培英自动化控制设备厂制造;ST16R冷冻离心机,Thermo Scientific公司制造。

1.3 样品的采集

土样分别采集于食堂餐厅和小餐馆排污处、厨房、户外烧烤摊等长期被油脂污染的土壤、油垢和污水,共41份。

1.4 培养基和溶液

1.4.1 富集培养基 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 10 g/L, NaCl 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g/L, NH_4Cl 1 g/L, $NaNO_3$ 1 g/L, 胰蛋白胨 5 g/L, 橄榄油乳化液 50 mL, pH自然。

1.4.2 初筛培养基 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 10 g/L, NaCl 5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g/L, 酵母膏 5 g/L, 橄榄油乳化液 50 mL, 质量分数1%维多利亚蓝B溶液 10 mL, 琼脂 15 g/L, pH 7.2。

1.4.3 复筛/发酵培养基 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 10 g/L, NaCl 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, 葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 橄榄油 10 mL/L, 曲拉通 1 mL/L。

1.4.4 橄榄油乳化液 将橄榄油与质量分数2.5%的Triton X-100以1:4的体积比混合后,冰浴下用超声破碎仪进行超声乳化,制得牛奶状乳化液。超声条件为:功率50%(总功率750 W),工作1 s停止3 s,工作4 min。

1.5 菌株的筛选

1.5.1 富集 将采集到的样品各取10 g或10 mL浸于90 mL无菌水中,常温下100 r/min振荡2 h后静置1 h。再各取1 mL上清液接种于富集培养基中,在30 ℃、220 r/min的条件下培养3 d。

1.5.2 初筛 将富集后的培养液进行梯度稀释,各取0.1 mL稀释至 10^{-6} ~ 10^{-8} ,将培养液涂布于初筛培养板,倒置于30 ℃培养箱中培养2~3 d。观察菌落周围是否出现变色圈^[10],将变色圈与菌落直径比(D/d)大于1.2的菌落进一步划线分离,直至得到菌落纯后划线斜面保藏培养基,4 ℃冰箱保藏。

1.5.3 复筛 将初筛后保藏的菌株接入种子培养基(LB)活化,然后以体积分数3%的接种量接入复筛培养基(一株一瓶),在37 ℃、220 r/min条件下培养2 d。发酵液在4 ℃、8 000 r/min条件下离心20 min,取上清液测定脂肪酶酶活。选出脂肪酶生产能力较强的菌株再次进行上述复筛工作(一株3瓶),选出其中最佳的脂肪酶生产菌株。

1.6 脂肪酶活力的测定

脂肪酶水解活力的测定采用对硝基苯酚法,以4-硝基苯基棕榈酸苯酯为底物,方法参见文献[11]。脂肪酶活力单位定义为:在一定温度和pH条件下每分钟产生1 μmol 对硝基苯酚的酶量为一个脂肪酶水解酶活力单位(U)。

1.7 菌株的诱变

先后分别采用紫外线^[12]、常压室温等离子体(ARTP)^[13]对复筛得到的菌株进行复合诱变,筛选出脂肪酶活力提高最多的诱变株。根据致死率曲线选择诱变条件,其中紫外诱变条件为:紫外灯功率30 W、照射距离40 cm,浓度为 $10^6\sim 10^8$ 个/mL的菌悬液6 mL,照射时间3 min;ARTP诱变条件为:以纯度99.99%氦气作为工作气体,体积流量10 L/min,电源功率115 W,样品与等离子体发射源之间距离3 mm,浓度为 $10^6\sim 10^8$ 个/mL的菌悬液20 μL ,照射时间1 min。

1.8 发酵过程的优化

1.8.1 培养方法 挑取一环斜面保藏的诱变菌株置于10 mL种子培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min培养8 h,以体积分数3%接种量将种子液转接入100 mL种子培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min条件下培养约6 h (OD_{600} 值3.0~3.2),再以体积分数3%的接种量将该种子液转接入装有50 mL发酵培养基的250 mL的三角烧瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min条件下培养2 d。发酵液在4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min条件下离心20 min,取上清液测定脂肪酶酶活。

1.8.2 单因素试验 以复筛的培养条件为基础,对可能影响酶活的各因素进行单因素试验,为后续的优化提供依据和参考。分别考察了碳源、氮源、诱导物、表面活性剂、无机盐、维生素、装液量、接种量、初始pH、培养温度对脂肪酶酶活的影响。

1.8.3 Plackett-Burman 设计 Plackett-Burman设计是一种快速有效的筛选试验设计,可通过较少的实验从众多影响因子中筛选出最重要的几个因素^[13]。每个因素采用高低两个水平,根据单因素结果,对可溶性淀粉、酵母膏、玉米油、PVA、 K_2HPO_4 、烟酰胺、初始pH、接种量这8个因素进行12次实验,响应值为单位体积的脂肪酶酶活。自变量、编码和水平因素见表1。培养温度和装液量采用单因素实验得出的最佳水平。

表1 Plackett-Burman 设计因子水平及编码

Table 1 Codes and levels of variables in the Plackett-Burman design

因素编码	因素	单位	低水平	高水平
X_1	可溶性淀粉	g/L	15	20
X_2	酵母膏	g/L	15	20
X_3	玉米油	mL/L	15	25
X_4	PVA	g/L	1.5	2
X_5	K_2HPO_4	mmol/L	0.5	1
X_6	烟酰胺	mmol/L	1	2
X_7	初始pH		5	5.5
X_8	接种量	%	6	8
X_9, X_{10}, X_{11}	虚拟变量		-1	1

1.8.4 最陡爬坡试验 由PB设计的结果筛选出对产脂肪酶影响最大的3个因素,根据各因素的效应值大小和影响趋势,设计各因素在最陡爬坡实验中的步长以及方向,快速逼近最优区域。

1.8.5 中心复合试验设计 以最陡爬坡试验得出的结果作为中心点,各因素取5个水平,进行中心复合试验设计。

1.8.6 发酵时间的优化 以响应面优化后所得最适条件进行培养,考察培养时间对于脂肪酶酶活的影响。

1.9 脂肪酶酶学性质初步研究

以不同浓度的4-硝基苯基棕榈酸苯酯作为底物测定脂肪酶酶活,采用双倒数作图法计算脂肪酶反应动力学常数 K_m 和 V_{max} 。在不同pH、温度下测定脂肪酶酶活,确定该脂肪酶的最适反应pH和最适反应温度。以不同的酯为底物,研究该脂肪酶的底物特异性。将酶液与不同金属离子、EDTA、有机溶剂、表面活性剂混合,40 $^{\circ}\text{C}$ 下温浴1 h后测定脂肪酶酶活。

1.10 菌种鉴定

将保藏的脂肪酶高产菌株划线LB平板活化后,用TaKaRa菌落PCR裂解缓冲液将菌体裂解,80 $^{\circ}\text{C}$ 热变性15 min后3 000 r/min离心片刻,以上清液作为PCR反应的模板,用TaKaRa的PCR扩增细菌16S rDNA试剂盒进行16S rDNA扩增,扩增产物交由生工生物工程(上海)有限公司进行测序,序列测定结果通过NCBI中的BLAST进行比对。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

通过富集培养从 41 份样品中得到 32 株能产生变色圈的菌株,其中 $D/d > 1.2$ 的有 20 株,复筛后保留酶活较高的 5 株菌,进一步复筛得到最优菌株 G1。图 1 为 G1 在初筛平板上的生长情况。通过革兰氏染色与电镜扫描可知 G1 为革兰氏阴性短杆菌,电镜图见图 2。



图 1 菌株 G1 在初筛板上的生长情况

Fig. 1 Growth of G1 on the screening plate

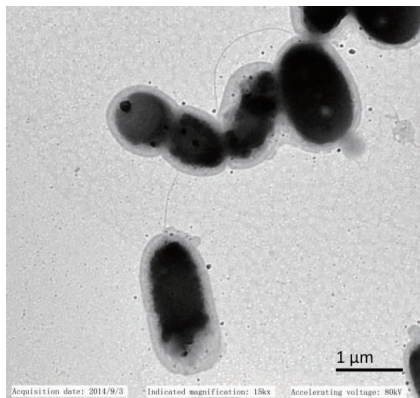


图 2 菌株 G1 的扫描电镜图

Fig. 2 Electron microscope picture of G1

2.2 菌株的诱变处理

以未进行紫外诱变的菌株 G1 作为对照,挑取紫外诱变后 D/d 大于 G1 的诱变株发酵测酶活,筛选得到酶活最高的诱变菌株 G1-7。再以未进行 ARTP 处理的诱变菌株 G1-7 作为对照,挑取 ARTP 诱变后 D/d 大于 G1-7 的诱变株发酵测酶活,筛选得到酶活进一步提高的诱变菌株 G1-7-4。经两次诱

变,单位酶活从 2.14 U/mL 提高到了 3.25 U/mL,是原始菌株的 151.87%,见图 3。

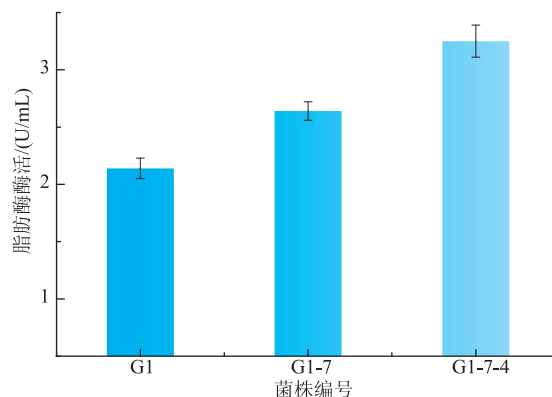


图 3 诱变株酶活变化

Fig. 3 Lipase activities of mutants

2.3 发酵过程优化

2.3.1 单因素试验结果 通过单因素试验分别考察了碳源、氮源、诱导物、表面活性剂、无机盐、微生物素、装液量、接种量、初始 pH、培养温度对脂肪酶酶活的影响,得到各因素的最佳水平分别为:可溶性淀粉 20 g/L,酵母膏 15 g/L,玉米油 20 mL/L,PVA 2 g/L, K_2HPO_4 0.5 mmol/L,烟酰胺 2 mmol/L,装液量 20 mL,接种量(体积分数)8%,初始 pH 5.5,培养温度 28 °C。

2.3.2 Plackett-Burman 设计 Plackett-Burman 设计与结果见表 2,利用 Design-Expert 软件对结果进行分析,结果见表 3。由分析结果可知,模型在 95% 的概率下是显著的,酵母膏(X_2)、玉米油(X_3)、初始 pH (X_7)对脂肪酶酶活影响最大,且均表现为差异显著,而其余因素均为不显著。根据回归系数,可得一元回归方程:

$$Y = 31.76 - 0.45X_1 + 2.48X_2 + 3.45X_3 + 0.38X_4 - 0.071X_5 - 0.48X_6 + 1.4X_7 - 0.35X_8 \quad (1)$$

2.3.3 最陡爬坡试验 根据 PB 设计结果分析,设计玉米油、酵母膏、初始 pH 这 3 个因素的步长和方向,见表 4。其余因素采用单因素试验得出的水平。由表 4 可知,脂肪酶酶活在爬坡过程中先逐渐增大,再逐渐减小,在第 3 步即玉米油为 35 mL/L、酵母膏 28.3 g/L、初始 pH 7.25 时达到最大。

2.3.4 中心复合试验 选取最陡爬坡试验第 3 步的条件作为各因素的中心点水平,每个因素选择 5 个水平(见表 5)。利用 Design-Expert 软件设计的 CCD 矩阵及结果(见表 6)。

表 2 PB 设计与结果

Table 2 Plackett-Burman design and results

序号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	酶活/(U/mL)
1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	28.41
2	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	25.62
3	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	28.31
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	33.90
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	24.99
6	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	28.63
7	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	32.89
8	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	39.57
9	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	30.92
10	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	38.55
11	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	36.51
12	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	32.85

表 3 PB 设计结果分析

Table 3 Results of the Plackett-Burman design

因素	平方和	F 值	P 值	相关系数	重要性
模型	248.937	18.376	0.018		
X_1	2.441	1.441	0.316	-0.451	5
X_2	74.038	43.721	0.007	2.484	2
X_3	143.078	84.491	0.003	3.453	1
X_4	1.762	1.040	0.383	0.383	6
X_5	0.061	0.036	0.861	-0.071	8
X_6	2.725	1.609	0.294	-0.476	4
X_7	23.360	13.795	0.034	1.395	3
X_8	1.473	0.870	0.420	-0.350	7

表 4 最陡爬坡实验设计与结果

Table 4 Steepest ascent design and result

序号	玉米油体积分数/(mL/L)	酵母膏质量浓度/(g/L)	初始 pH	酶活/(U/mL)
原点	20	17.5	5.25	30.4
Δ	5	3.6	0.5	
原点+1 Δ	25	21.1	5.75	34.2
原点+2 Δ	30	24.7	6.25	53.9
原点+3 Δ	35	28.3	6.75	61.7
原点+4 Δ	40	31.9	7.25	46.5
原点+5 Δ	45	35.5	7.75	47.5
原点+6 Δ	50	39.1	8.25	46.7

表 5 中心复合试验设计因素水平

Table 5 Levels of center composite design

变量	水平				
	-1.682	-1	0	1	1.682
A(玉米油体积分数 mL/L)	26.59	30	35	40	43.41
B(酵母膏质量浓度 g/L)	22.25	24.7	28.3	31.9	34.35
C(初始 pH)	5.91	6.25	6.75	7.25	7.59

表 6 CCD 矩阵及其结果

Table 6 Center composite design matrix and results

实验编号	A(玉米油)	B(酵母膏)	C(初始 pH)	酶活/(U/mL)
1	0	0	0	69.61
2	1	1	-1	64.49
3	0	0	1.682	64.17
4	-1	1	1	68.62
5	0	0	0	70.14
6	-1	-1	1	65.96
7	-1	-1	-1	66.68
8	0	0	-1.682	56.20
9	0	-1.682	0	68.25
10	1	-1	-1	46.74
11	0	1.682	0	72.44
12	0	0	0	69.50
13	0	0	0	67.62
14	0	0	0	75.22
15	1.682	0	0	53.87
16	1	1	1	66.69
17	1	-1	1	65.49
18	0	0	0	71.73
19	-1.682	0	0	66.37
20	-1	1	-1	70.89

由表 7 的响应面方差分析可知, 模型 F 值为 10.75, P 值 <0.001 , 表明该模型具有高度显著性。失拟项 F 值为 1.38, P 值为 0.365, 大于 0.05, 表明失拟不显著。拟合所得二次回归方程:

$$Y=71.59-3.64A+2.41B+2.30C+1.51AB+2.99AC-2.26BC-3.44A^2+0.18B^2-3.42C^2 \quad (2)$$

其中 A 、 B 和 C 分别代表玉米油体积分数、酵母膏质量浓度和初始 pH。

表 7 响应面方差分析

Table 7 ANOVA for Response Surface

来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值
模型	780.83	9	86.76	10.75	<0.001
A	181.39	1	181.39	22.47	0.001
B	79.14	1	79.14	9.80	0.011
C	72.06	1	72.06	8.92	0.014
AB	18.27	1	18.27	2.26	0.163
AC	71.70	1	71.70	8.88	0.014
BC	41.00	1	41.00	5.08	0.048
A^2	170.42	1	170.42	21.11	0.001
B^2	0.45	1	0.45	0.06	0.819
C^2	168.15	1	168.15	20.83	0.001
失拟项	46.88	5	8.07	1.38	0.365

对回归方程进行响应面分析得到玉米油、酵母膏和初始 pH 两两因素间对脂肪酶酶活的三维曲面图和等高线图, 见图 4、图 5、图 6。对回归方程的 3 个因素分别求导, 得到最佳发酵条件组合: 玉米油 33.09 mL/L, 酵母膏 31.90 g/L, 初始 pH 6.67, 预测脂肪酶酶活为 73.58 U/mL。

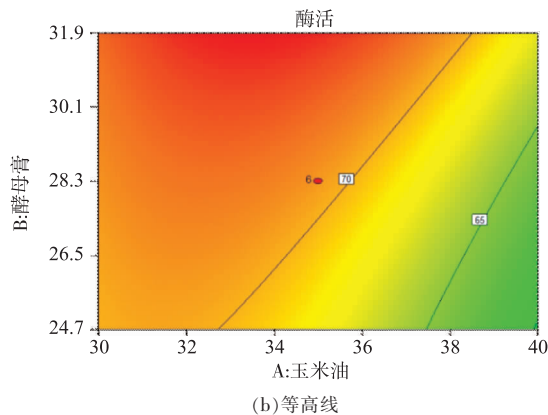
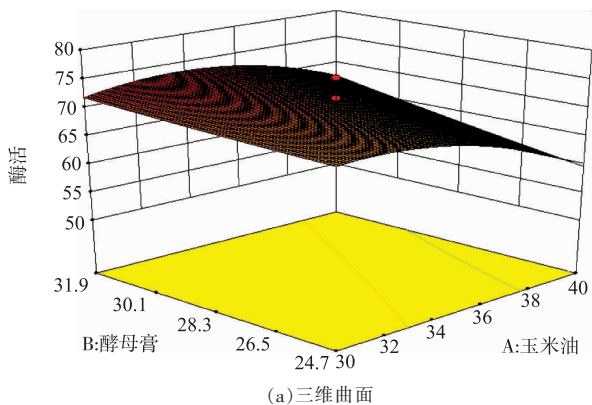


图 4 玉米油和酵母膏对脂肪酶酶活影响的三维曲面图和等高线图

Fig. 4 Response surface plot and contour plot of corn oil and yeast extract for the production of lipase

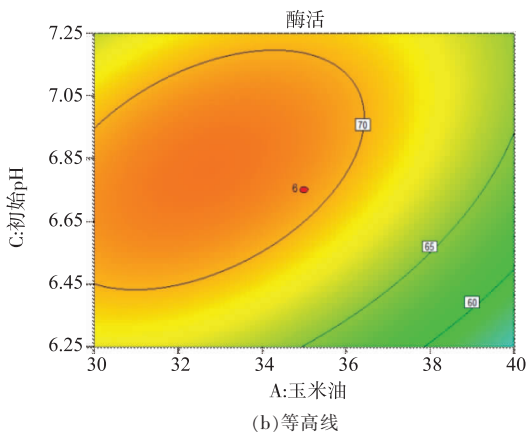
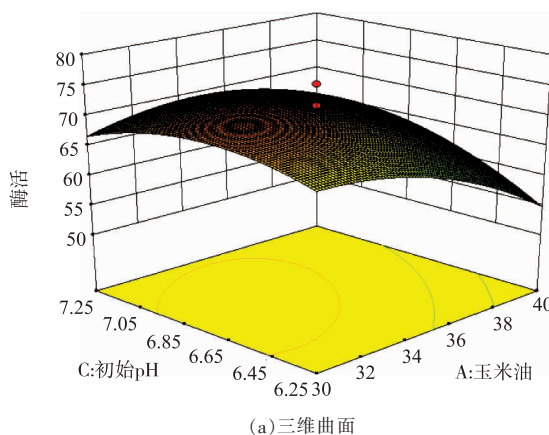


图 5 玉米油和初始 pH 对脂肪酶酶活影响的三维曲面图和等高线图

Fig. 5 Response surface plot and contour plot of corn oil and initial pH for the production of lipase

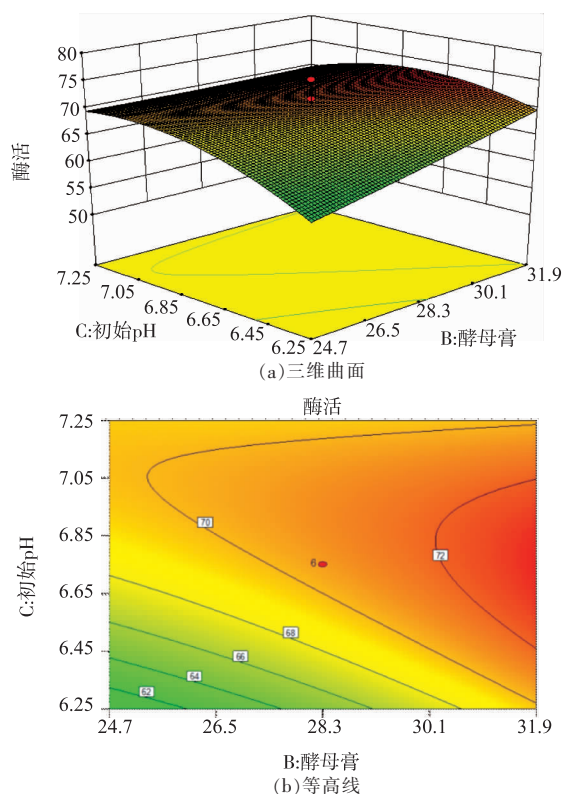


图6 酵母膏和初始 pH 对脂肪酶酶活影响的三维曲面图和等高线图

Fig. 6 Response surface plot and contour plot of yeast extract and corn oil for the production of lipase

2.3.5 优化结果验证 为检验模型的准确性,以预测的最佳发酵组合条件进行发酵培养,所得脂肪酶酶活平均为 74.74 U/mL,与预测值接近,说明该模型能较好地预测实际发酵情况。

2.3.6 发酵时间的优化 以优化后的发酵条件对 G1-7-4 进行培养,测定发酵液 OD_{600} 与脂肪酶酶活随着培养时间的变化情况。由于培养基中含有玉米油和表面活性剂 PVA,在菌体的代谢作用下发酵液很快呈现牛奶状,导致发酵液 OD_{600} 迅速增大。结果如图 7 所示,脂肪酶酶活随着菌浓度的变化而变化,在 52 h 时酶活达到最高 (80.62 U/mL),此时约为稳定后期,随后逐渐降低。

2.4 脂肪酶酶学性质

根据图 8 所示可以计算出脂肪酶的 K_m 值为 0.068 mmol/L,最大反应速度 V_{max} 为 19.05 U/mL。

由图 9 可知,脂肪酶的最适反应 pH 为 8。

从图 10 可以看出,该脂肪酶最适反应温度为 50 °C,且在 30~80 °C 范围内均有较高酶活。

分别以 4-硝基苯基棕榈酸苯酯 (C16)、4-硝基

苯基辛酸酯 (C8)、4-硝基苯基乙酸酯 (C2) 3 种酯为底物,作底物特异性研究,结果见图 11。可知,底物为 4-硝基苯基辛酸酯时酶活最高,4-硝基苯基棕榈酸苯酯次之,说明该脂肪酶对中长链脂肪的水解能力较强。

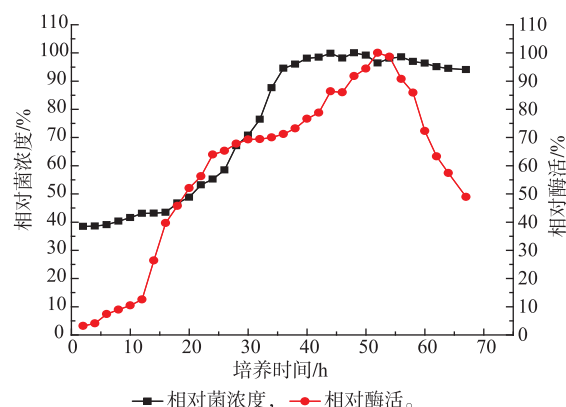


图7 生长曲线和酶活曲线

Fig. 7 Curves of growth and lipase production

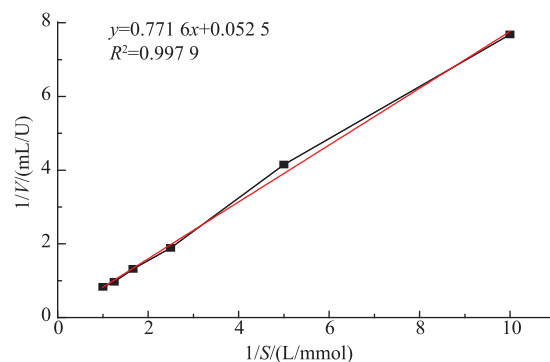


图8 脂肪酶的双倒数图

Fig. 8 Lineweaver-Burk plot of lipase

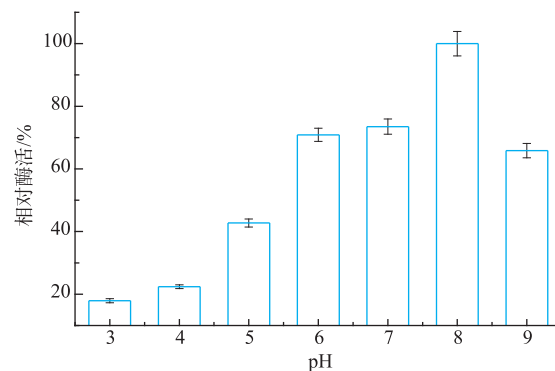


图9 最适反应 pH

Fig. 9 Optimal reaction pH of lipase

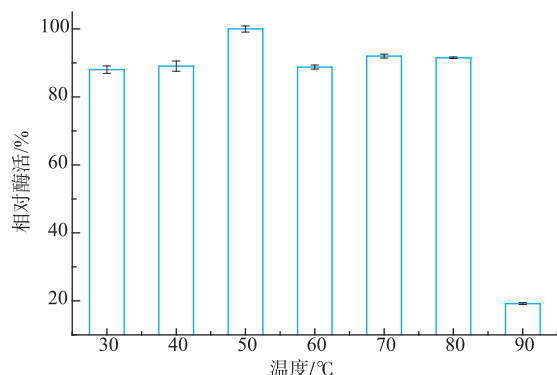


图 10 最适反应温度

Fig. 10 Optimal reaction temperature of lipase

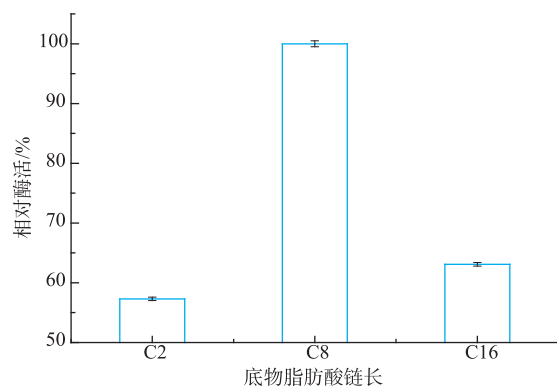


图 11 脂肪酶的底物特异性

Fig. 11 Substrate specificity of lipase

将未经处理过的脂肪酶酶活设为 100%，从图 12 可知，所有金属离子和 EDTA 对酶活均有抑制作用，以 Ni^{3+} 最为显著。

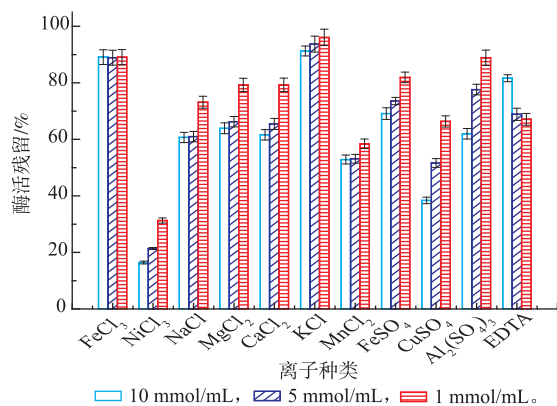


图 12 金属离子与 EDTA 对酶活的影响

Fig. 12 Effect of different metal ions and EDTA on lipase

从图 13 可以看出，低浓度的 Triton X-100 对酶活稍有促进作用，而高浓度的表现为抑制作用。其他表面活性剂对酶活均有抑制作用，其中 SDS 对酶

活抑制作用最大，当其质量分数达到 0.5% 时就会完全抑制脂肪酶酶活，故在实际应用中应避免 SDS 的存在。

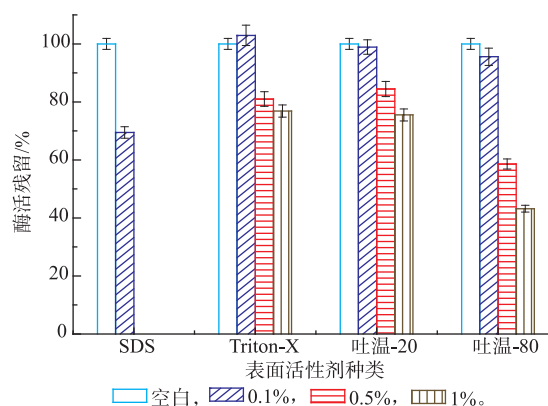


图 13 表面活性剂对酶活的影响

Fig. 13 Effect of different surfactants on lipase

2.5 菌种鉴定

所得 16S rDNA 基因序列长度为 1.5 kb 左右，通过 BLAST 比对，确定 G1 属于伯克霍尔德氏菌属 *Burkholderia*。

3 结 语

从长期被油污污染的环境中采集样品，以橄榄油为唯一碳源进行富集培养，使能够产脂肪酶的菌株成为优势菌；继而利用含橄榄油与维多利亚蓝 B 的平板筛选出产脂肪酶能力较强的菌株；最后通过两轮复筛最终得到高产脂肪酶菌株 G1。对菌株 G1 进行紫外线和常压室温等离子体 (ARTP) 复合诱变，得到诱变菌株 G1-7-4，单位酶活从 2.14 U/mL 提高到 3.25 U/mL。

分别先后采用单因素试验、PB 试验、最陡爬坡试验、响应面法 (CCD) 等对诱变菌株 G1-7-4 产脂肪酶的发酵条件进行优化，得出最佳摇瓶发酵条件：可溶性淀粉 20 g/L，玉米油 33.09 mL/L，酵母膏 31.90 g/L，PVA 2 g/L， K_2HPO_4 0.5 mmol/L，烟酰胺 2 mmol/L，装液量 20 mL，接种量为体积分数 8%，初始 pH 6.67，培养温度 28 °C，培养时间 52 h。在该条件下，脂肪酶酶活可达 80.62 U/mL，是原始培养条件下的 24.81 倍。与现有文献报道中未经分子改造的菌株产量相比较，该菌株脂肪酶产量处于较高水平。后续研究将采用分子生物学手段，使该脂肪酶基因实现高效外源表达，进一步提高脂肪酶酶活。

参考文献:

- [1] Abbas H, Hiol A, Deyris V, et al. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2002, 31(7): 968-975.
- [2] Kantak J, Bagade A, Mahajan S, et al. Isolation, identification and optimization of a new extracellular lipase producing strain of *Rhizopus* sp.[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2011, 164(7): 969-978.
- [3] 董明奇, 史岩, 姜春雷, 等. 脂肪酶高产菌株的筛选及酶学特性研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2008, 45(4): 985-990.
DONG Mingqi, SHI Yan, JIANG Chunlei, et al. Screening of lipase producing strains and studying on properties of lipase [J]. **Journal of Sichuan University(Natural Science Edition)**, 2008, 45(4): 985-990. (in Chinese)
- [4] Brígida A I S, Amaral P F F, Coelho M A Z, et al. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2014, 101: 148-158.
- [5] Sheikh Abdul Hamid N, ZEN H B, Tein O B, et al. Screening and identification of extracellular lipase-producing thermophilic bacteria from a Malaysian hot spring[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2003, 19(9): 961-968.
- [6] 夏宇, 周文化, 邓学良, 等. 脂肪酶高产菌株的筛选及产酶条件优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2013(9): 116-120.
XIA Yu, ZHOU Wenhua, DENG Xueliang, et al. Isolation of high lipase-producing strains and optimization of lipase producing conditions[J]. **Journal of Central South University of Forestry and Technology**, 2013(9): 116-120. (in Chinese)
- [7] 苑博华, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 响应面法优化 *Burkholderia* sp.SYBC LIP-Y 发酵产低温脂肪酶条件的研究[J]. 工业微生物, 2011, 41(4): 21-25.
YUAN Bohua, CAI Yujie, LIAO Xiangru, et al. Optimization of fermentation conditions for a cold-adapted lipase produced by *Burkholderia* sp.SYBC LIP-Y using response surface methodology[J]. **Industrial Microbiology**, 2011, 41(4): 21-25. (in Chinese)
- [8] 沈晓莉, 裴建云. 一株耐热脂肪酶产生菌的筛选、产酶及催化条件研究[J]. 广州化工, 2013, 41(7): 95-97.
SHEN Xiaoli, PEI Jianyun. Screening and enzyme production and catalytic conditions of a thermostable lipase producing bacteria [J]. **Guangzhou Chemical Industry**, 2013, 41(7): 95-97. (in Chinese)
- [9] Papagora C, Roukas T, Kotzekidou P. Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology[J]. **Food and Bioproducts Processing**, 2013, 91(4): 413-420.
- [10] 刘瑞娟, 王海宽, 路福平, 等. 低温碱性脂肪酶产生菌的筛选及产酶培养基的优化[J]. 天津科技大学学报, 2009(1): 6-10.
LIU Ruijuan, WANG Haikuan, LU Fuping, et al. Screening and optimization of fermentation medium of bacterium producing cold-adapted and alkaline lipase[J]. **Journal of Tianjing University of Science and Technology**, 2009(1): 6-10. (in Chinese)
- [11] Vorderwü lbecke T, Kieslich K, Erdmann H. Comparison of lipases by different assays[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1992, 14(8): 631-639.
- [12] 刘仁春, 吴晓英, 范一文, 等. 紫外诱变选育脂肪酶高产菌株及其酶学性质的研究[J]. 生物技术, 2008(1): 26-29.
LIU Renchun, WU Xiaoying, FAN Yiwen, et al. Mutation breeding of high-yield lipase strains and study of properties of lipase[J]. **Biotechnology**, 2008(1): 26-29. (in Chinese)
- [13] 蔡友华, 李文锋, 卢伟宁, 等. 新型常压室温等离子体(ARTP)快速诱变高产苏氨酸的突变株[J]. 现代食品科技, 2013(8): 1888-1892.
CAI Youhua, LI Wenfeng, LU Weining, et al. A mutant strain with high threonine yield obtained by rapid mutation using novel atmospheric and room temperature plasmas[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2013(8): 1888-1892. (in Chinese)
- [14] HOU Zhiguo, CHEN Bingmei, LAN Jing, et al. Optimization of fermentation medium for producing α -hydroxyphenylacetic acid by using plackett-burman design and response surface methodology[J]. **American Journal of Analytical Chemistry**, 2013(4): 594-599.