

doi: 10.16104/j.issn.1673-1891.2024.03.010

产脂肪酶菌株筛选及发酵条件与酶学性质研究

陈梦越^a, 孙 劲^{a*}, 张文丽^b, 王 洁^a, 周星朴^a, 黄诗维^a, 楚菲菲^a

(西昌学院 a. 资源与环境学院; b. 动物科学学院, 四川 西昌 615013)

摘要: [目的] 获得产酶能力强、环境安全友好的产脂肪酶菌株。[方法] 采用罗丹明 B 平板法, 从受油污污染土壤和水体中筛选高产脂肪酶菌株; 利用血平板接种及抗生素药敏试验确定菌株安全性; 通过氮源、碳源及诱导剂单因素实验结合响应曲面法优化菌株的发酵产酶条件; 对菌株所产的脂肪酶进行酶学特性分析。[结果] 从受油污污染土壤中分离筛选出一株具有高产脂肪酶能力的菌株 JC-7, 经鉴定为沙雷氏菌 (*Serratia* sp.)。菌株于血琼脂平板上呈 γ -溶血, 对多数抗生素敏感。响应曲面法优化后酶活力最高达 38.6 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。菌株 JC-7 所产脂肪酶属于中温碱性脂肪酶。Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 能提高该酶的酶活力。该酶在丙三醇、二甲基亚砷以及甲醇中能维持较高的酶活力。十二烷基硫酸钠 (SDS)、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 和 Triton X-100 都对该酶有激活作用, 二硫苏糖醇 (DTT) 对该酶的酶活力几乎无影响, 乙二胺四乙酸 (EDTA) 则抑制了该酶的酶活力。[结论] 分离所获沙雷氏菌 JC-7 产脂肪酶能力强, 对环境安全友好, 优化培养条件后产酶能力明显提高, 且该酶能适应较为广泛的作用条件, 可为脂肪酶制剂的开发和环境污染生物降解菌剂的研究提供支持。

关键词: 脂肪酶; 响应曲面; 酶学性质

中图分类号: TQ925.6 文献标志码: A 文章编号: 1673-1891(2024)03-0078-12

Screening of Lipase-Producing Strains, Fermentation Conditions, and Enzymatic Properties Study

CHEN Mengyue^a, SUN Jin^{a*}, ZHANG Wenli^b, WANG Jie^a, ZHOU Xingpu^a, HUANG Shiwei¹, CHU Feifei^a

(a. School of Resources and Environment; b. School of Animal Science, Xichang University, Xichang 615013, Sichuan, China)

Abstract: [Objective] Obtain a lipase-producing strain with strong enzyme production ability and environmental safety. [Method] The rhodamine B plate method was used to screen high-lipase-producing strains from oil-contaminated soil and water. The safety of the strains was determined by blood plate inoculation and antibiotic sensitivity test. The fermentation enzyme production conditions of the strains were optimized by nitrogen source, carbon source and inducer single factor experiment combined with response surface methodology. The enzymatic characteristics of the lipase produced by the strains were analyzed. [Result] A strain JC-7 with high lipase production ability was isolated and screened from oil-contaminated soil. It was identified as *Serratia* sp. The strain was γ -hemolytic on blood agar plate and sensitive to most antibiotics. After optimization by response surface methodology, the enzyme activity reached up to 38.6 $\mu\text{mol}/\text{min}$. The li-

收稿日期: 2024-02-05

基金项目: 凉山州科技计划项目 (21ZDF0181); 西昌学院“两高”人才科研支持计划项目 (LGZ202001); 国家大学生创新计划项目 (202210628023); 四川省大学生创新训练项目 (S202310628086)。

作者简介: 陈梦越 (2001—), 男, 四川甘孜人, 本科生, 研究方向: 环境科学, e-mail: 1967609164@qq.com。

*通信作者: 孙劲 (1975—), 男, 四川邛崃人, 副教授, 硕士, 研究方向: 环境微生物及基于微生物发酵的固废资源化利用, e-mail: sunjin_xcc@xcc.edu.cn。

pase produced by strain JC-7 is a mesophilic alkaline lipase. Ca^{2+} and Mg^{2+} can improve the enzyme activity. The enzyme can maintain high activity in glycerol, dimethyl sulfoxide and methanol. Sodium dodecyl sulfate (SDS), hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) and TritonX-100 all activated the enzyme, dithiothreitol (DTT) had almost no effect on the enzyme activity, and ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) inhibited the enzyme activity. [Conclusion] The isolated *Serratia* JC-7 has a strong ability to produce lipase, is safe and friendly to the environment, and the enzyme production capacity is significantly improved after optimizing the culture conditions. The enzyme can adapt to a wider range of action conditions, which can provide support for the development of lipase preparations and the research on environmental pollution biodegradation agents.

Keywords: lipase; response surface; enzyme properties

0 引言

脂肪酶(lipase, EC3.1.1.3)又称甘油三酯酯水解酶,能够催化甘油三酯水解产生游离的脂肪酸、甘油二酯、甘油单酯和甘油,是最常用的工业化酶制剂之一^[1]。微生物是脂肪酶制剂的主要来源,我国于20世纪60年代开始开展脂肪酶的研究开发,但到目前为止,只有解脂假丝酵母(*Candida lipolytica*)和扩展青霉(*Penicillium expansum*)2种菌所产的脂肪酶实现了工业化生产,与国外相比尚有一定差距^[2]。因此,分离筛选更多的产脂肪酶能力强和适应性好的菌株,对拓展其应用场景和范围具有重要意义。

同时,发酵培养条件在很大程度上影响着菌株产酶能力。如张传丽等^[3]从油污污染土壤中分离得到一株具有较高产脂肪酶能力的约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*),通过优化培养温度、pH值和时间,酶活力最高达22.7 $\mu\text{mol}/\text{min}$,较优化前提高了12.9%。王冬梅等^[4]从含油废水中筛选的铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*),利用正交试验优化发酵培养条件后酶活力最高达42 $\mu\text{mol}/\text{min}$,较优化前提高了16.2%。贺秋红等^[5]筛选的枯草芽孢杆菌,基于响应曲面法优化发酵培养条件后最高酶活力达43 $\mu\text{mol}/\text{min}$,较优化前提高了17.6%。但目前大多数研究都集中于对工艺参数的优化,而对碳氮源和诱导剂适宜添加量的研究较少。本研究从油污污染土壤中分离筛选得到一株具有高产脂肪酶能力的

沙雷氏菌(*Serratia* sp.),利用血平板接种及抗生素药敏试验明确菌株安全性,基于响应曲面法优化了菌株发酵产酶条件,并探究了该菌所产脂肪酶的酶学性质,为脂肪酶的工业应用提供了菌株储备和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

供试样品采集于西昌学院安宁校区学生食堂及小吃街周边受油污污染的土壤和积水。

富集培养基:蛋白胨 5 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L、 K_2HPO_4 1 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L、NaCl 2 g/L、橄榄油乳化液 20 mL, pH 7.2。

初筛培养基:蛋白胨 10 g/L、牛肉膏 2 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L、NaCl 5 g/L、琼脂 15 g/L、橄榄油乳化液 12 mL、10 mL 罗丹明 B 1 mg/mL。

发酵产酶培养基:大豆蛋白胨 5 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L、NaCl 3 g/L、橄榄油乳化液 10 mL, pH 7.2。

改良发酵培养基:葡萄糖 5 g/L、牛肉膏 5 g/L、 K_2HPO_4 1 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L、NaCl 2 g/L、橄榄油乳化液 10 mL, pH 7.2。

种子培养基:牛肉膏 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 5 g/L、橄榄油乳化液 10 mL。

橄榄油乳化液:参考张传丽等^[3]使用的方法配置橄榄油等的聚乙烯醇(PVA)乳化液。

主要药品:细菌基因组 DNA 提取试剂盒、 $2\times$ Taq PCR 预混试剂 II (北京天根生化科技有限公司)、细菌 16SrDNA 通用引物 27F, 1492R(1 \times TSE101 金牌 mix)、TSINGKE 高纯度低电渗琼脂糖, DNA 凝胶回收试剂盒, DL5000 Marker, Tsingke, 对硝基苯酚棕榈酸酯($\geq 98\%$, 安徽酷尔生物工程有限公司)、罗丹明 B(分析纯、成都市科隆化学品有限公司)、抗生素药敏片(常德比克曼生物科技有限公司)、血琼脂平板(广东环凯微生物科技有限公司)。

主要仪器:L8 型紫外可见双光束分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司); 3730XL 型测序仪(Applied Biosystems); 2720 thermal cycler 型 PCR 仪(Applied Biosystems); JY04S-3C 型凝胶成像(北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 产脂肪酶菌株分离筛选

菌株初筛:称取 10 g 土样,加入 100 mL 无菌水中,混匀后静置,取 5 mL 上清液加入 95 mL 富集培养基中,水样则混匀取 5 mL 直接加入富集培养基中,33 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 48 h 后将培养的菌液做梯度稀释,取稀释至 10^{-5} ~ 10^{-7} 的菌液各 200 μL 涂布于初筛培养基上,33 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。在 360 nm 紫外灯下观察,挑取有明显荧光圈的菌落继续划线至初筛培养基分离纯化。

菌株复筛:将初筛得到的菌株接种至种子培养基,33 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 16 h 后以体积分数为 3% 的接种量接种至 50 mL/250 mL 的发酵产酶培养基中,相同条件下培养 24 h 后测定酶活力,选取其中产酶能力强的菌株进行后续试验。

1.3 酶活力测定方法

采用对硝基苯酚比色法测定酶活力,参考曹茜^[2]所使用的方法并结合试验条件略作修改,具体方法如下。

1)粗酶液制备。取发酵完成的菌液于离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min,所得上清液即为粗酶液。

2)对硝基苯酚标准曲线制作。使用 Tris-HCL (0.05 mol/L, pH 8.0) 缓冲溶液配制 1、2、4、6、8 μg /mL 的对硝基苯酚溶液,在 405 nm 处测定其吸光度值。本试验所得对硝基苯酚标准曲线回归方程及相关系数为: $y=5.253 8x-0.016 1$, $r^2=0.999 8$ (y 为对硝基苯酚浓度; x 为吸光度值)。

3)酶活力测定反应体系的制备。称取 0.03 g 对硝基苯酚棕榈酸酯(p-NPP)溶于 10 mL 甲醇中,得到 p-NPP 底物溶液。于 10 mL Ep 管中加入 4.1 mL 上述 Tris-HCL 缓冲溶液,再加入 400 μL p-NPP 底物溶液,最后加入 200 μL 粗酶液。在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中搅拌反应 10 min。反应完成后加入 300 μL 无水乙醇并置于冰水浴中 5 min。0.45 μm 水系滤膜过滤,405 nm 处测定吸光度值。酶活力计算公式如式(1)所示:

$$U = C_B V N \div T V_i$$

式中: U 为酶活力, $\mu\text{mol}/\text{min}$; C_B 为通过标准曲线计算出的对硝基苯酚浓度, $\mu\text{mol}/\text{L}$; V 为反应体系终体积, mL; N 为酶液稀释倍数; T 为反应时间, min; V_i 为酶液用量, mL。

1.4 产脂肪酶菌株的鉴定

形态及生理生化测定:参照《常见细菌系统鉴定手册》^[6],通过对菌株菌落形态、菌体形态、运动性及生理生化特性的观察,初步鉴定菌株种属。

16SrDNA 分析:按照 TSINGKE DNA 提取试剂盒(通用型)使用说明,提取菌株总 DNA,以其为模板,使用细菌通用引物 27F 和 1492R 对菌株 16SrDNA 进行 PCR 扩增,扩增体系为:1 \times TSE101 金牌 mix:45 μL ; 27F(10 pmol):2 μL ; 1492R(10 pmol):2 μL ; DNA 模板:1 μL 。PCR 扩增程序为:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min, 39 个循环;扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,获取鉴定胶图,并送至成都里来医学实验中心测序,所获测序结果用 ContigExpress 拼接测序结果,将拼接好的序列上传 GenBank 获取登录号,并在 NCBI 数据库(blast.ncbi.nlm.nih.

gov) 中进行同源性分析。使用 MEGA11 软件包 Kimura2-parameter 计算遗传距离, 使用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

1.5 生物安全性试验

1.5.1 血平板溶血试验

参照张小波等^[7]的方法对菌株进行溶血试验。将适当稀释的菌液接种到 5% 的血琼脂平板上, 33 °C 培养 24 h 后观察溶血结果。

1.5.2 抗生素敏感试验

参照刘玉华等^[8]的方法对菌株 JC-7 进行包括头孢他啶、米诺环素、链霉素、青霉素、阿米卡星、氨苄西林、万古霉素、氯霉素、多尼培南、四环素和庆大霉素等 20 种抗菌药物的药敏试验。参照《抗菌药物敏感性试验的技术要求》(WS/T 639-2018)^[9]进行细菌抗生素敏感评价。

1.6 发酵培养基组分优化

1.6.1 单因素试验

以菌株在改良发酵培养基中在 3% 接种量, 150 r/min 摇床转速, 50 mL/250 mL 装液量及 33 °C 下发酵培养 24 h 为初始默认条件。分别设置改良发酵培养基中的氮源为: 牛肉膏、蛋白胨、酵母粉、尿素、硫酸铵、硝酸铵; 碳源为: 麦芽糖、乳糖、蔗糖、可溶性淀粉、果糖; 诱导剂为: 橄榄油、菜籽油、芝麻油、大豆油和玉米油的 PVA 乳化液, 做单一组分替换, 其他条件不改变, 发酵培养后测定酶活力, 以酶活力高的作为优势氮源, 碳源和诱导剂。筛选出优势氮源后设置其在改良发酵培养基中的配置添加量分别为: 5、10、15、20、25、30 g/L; 碳源分别为: 5、10、15、20、25 g/L; 诱导剂体积分数分别为: 1%、2%、4%、6%、8%、10%、12% (V/V), 其他条件不改变, 发酵培养后测定酶活力。

1.6.2 Box-Behnken 试验

根据响应曲面分析法中 Box-Behnken 试验设计原理, 以酶活力为响应值。根据单因素试验结果, 确定对应因素的低水平、中心值和高水平(分别以

-1、0、1 表示)。使用 Design Expert 13 软件进行三因素三水平的 Box-Behnken 试验设计, 对改良发酵培养基中氮源、碳源及诱导剂的添加量进行优化, 得到最佳发酵条件组合, 并进行验证试验。试验因素及水平如表 1 所示。

表 1 Box-Behnken 试验因素与水平

水平	蛋白胨(A)/ (g·L ⁻¹)	麦芽糖(B)/ (g·L ⁻¹)	诱导剂(C)/%
-1	20	15	6
0	25	20	8
1	30	2	10

1.7 酶学性质探究

在 1.6 所得最佳发酵培养条件下制备粗酶液, 在 1.3 所述初始条件下测定其酶活力, 并以此为基础酶活力(basic enzyme activity, BEA)。以下述不同条件下测定所得酶活力与基础酶活(BEA)的比值为相对酶活(%). 分别探究不同温度、pH 值、金属离子、有机溶剂、表面活性剂以及 EDTA 和 DTT 对该酶催化反应的影响。

1.7.1 温度对酶活的影响

最适反应温度的确定: 取粗酶液分别在 25、30、35、45、50、55、60 °C 下反应来测定酶活力, 除反应温度外其他参数和方法同 1.3。

温度耐受性试验: 将粗酶液分别在 25、30、35、40、45、50、55、60 °C 条件下保温孵育 1 h, 再加入酶活力测定反应体系中, 测定残余酶活力, 除将粗酶液保温孵育外其他参数和方法同 1.3。

1.7.2 pH 值对酶活的影响

配置 pH 值 4~11 的 0.05 mol/L 的缓冲溶液, pH 值 4.0、5.0、6.0 为柠檬酸-磷酸氢钠缓冲溶液; pH 值 7.0、8.0、9.0 的为 Tris-HCL 缓冲溶液; pH 值 10.0、11.0 的为甘氨酸-NaOH 缓冲溶液。

最适反应 pH: 将酶活力测定反应体中的缓冲溶液替换为不同 pH 值的对应缓冲溶液, 测定酶活, 除缓冲溶液不同外其他参数和方法同 1.3。

pH 耐受性:将粗酶液加入不同 pH 值的缓冲溶液中,4 °C 保温孵育 1 h,再加入底物溶液,测定残余酶活,除将粗酶液保温孵育外其他参数和方法同 1.3。

1.7.3 金属离子和 EDTA 对酶活力的影响

向酶活测定反应体系中加入 EDTA 和含金属离子的盐类,包括 FeCl₃、FeSO₄、CuSO₄、ZnSO₄、MnSO₄、NaCl、KCl、CaCl₂、MgCl₂、BaCl₂,使 EDTA 以及金属离子的终浓度为 5 mmol/L,加入粗酶液,30 °C 保温孵育 1 h,再加入底物溶液,测定酶活力,其他参数和方法同 1.3。

1.7.4 有机溶剂、表面活性剂及 DTT 对酶活力的影响

向粗酶液中加入包括丙三醇、二甲基亚砷、甲醇、乙醇、丙酮、甲苯和环己烷,使其体积分数为 25%,30 °C、200 r/min 振荡孵育 1 h,再加入酶活力测定反应体系中,测定残余酶活力,其他参数和方法同 1.3。

向酶活力测定反应体系中分别加入聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)使其体积分数为 0.05%、十二烷基硫酸钠(SDS)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)和二硫苏糖醇(DTT)使其终浓度为 1 mmol/L,30 °C 保温孵育 1 h,再加入底物溶液,测定酶活力,其他参数和方法同 1.3。

1.8 数据处理

本研究中每个测定样本均设置 3 组平行,使用 Microsoft Excel 2019 软件进行数据统计,使用 IBM SPSS Statistics 22 软件进行统计分析,使用 Design Expert 13 软件进行 Box-Behnken 响应面设计试验设计和分析验证,使用 Origin 2021 软件作图。

2 结果与分析

2.1 产脂肪酶菌株的初筛与复筛

从受油污污染土壤中分离筛选得到菌株 JC-7,在初筛培养基上能产生较明显荧光圈,对其进行摇

瓶发酵复筛,测定酶活力为 4.33±0.08 μmol/min。选定菌株 JC-7 为目的菌株。

2.2 菌株鉴定结果

2.2.1 菌株形态特征观察

菌株 JC-7 菌落呈红色,表面有光泽,不透明,微隆起,边缘光滑齐整;半固体穿刺培养表明该菌株无运动性;革兰氏染色观察该菌株为革兰氏阴性菌,短杆状,大小为(1~1.3)×(0.7~1.0) μm,单个或成对排列(图 1)。

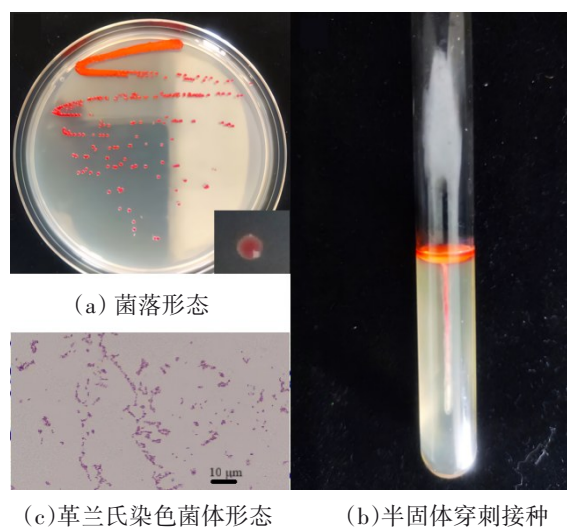


图 1 菌株 JC-7 形态学特征

2.2.2 菌株生理生化鉴定

菌株 JC-7 部分生理生化鉴定结果显示,该菌株产橙红色色素,V-P 试验阳性,能够发酵蔗糖、山梨醇,液化明胶,但不能发酵乳糖、密二糖及木糖(表 2)。

2.2.3 16SrDNA 序列及系统发育分析

如图 2 所示,PCR 扩增 JC-7 菌株 16SrDNA 核酸序列长度为 1 413 bp。其测序结果提交至 GenBank,登录号为:OR825721。下载同源性高的序列,利用 MEGA11 构建系统进化树(图 3),表明 JC-7 为沙雷氏菌(*Serratia* sp.)。

2.3 生物安全性评价

2.3.1 溶血试验

菌株 JC-7 在血平板上未产生溶血圈(图 4),由此可以判定菌株 JC-7 为 γ-溶血,对绵羊红细胞无

表2 菌株JC-7生理生化试验结果

试验名称	结果
乳糖(Lactose)	-
蜜二糖(Melibiose)	-
蔗糖(Sucrose)	+
山梨醇(Sorbitol)	+
木糖(Xylose)	-
V-P 试验(V-P test)	+
产橙红色色素(Produces orange-red pigment)	+
赖氨酸脱羧酶(Lysine decarboxylase)	+
硝酸盐还原(Nitrate Reduction)	+
鸟氨酸脱羧酶(Ornithine decarboxylase)	-
明胶水解(Gelatin hydrolysis)	+
硫化氢(Hydrogen sulfide)	-

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性。

裂解能力^[7]。

2.3.2 抗生素敏感试验

菌株JC-7对作用于革兰氏阳性菌的头孢呋辛、青霉素、氨苄西林、头孢唑林、头孢氨苄、万古霉素

等抗生素不敏感,对林可霉素、氯霉素、链霉素有一定的耐药性,对头孢他啶、米诺环素、头孢曲松、阿米卡星、头孢哌酮、哌拉西林、多尼培南、四环素、卡那霉素、红霉素、庆大霉素等参试抗生素敏感(图4),说明该菌株对环境友好,不存在种属特异性以外的抗生素耐受性,没有抗生素耐药性及抗性转移的风险。

2.4 发酵培养基组分优化

2.4.1 碳源、氮源、诱导剂筛选及单因素试验

碳源、氮源、诱导剂筛选结果如图5所示,单因素试验结果如图6所示。麦芽糖有利于JC-7产脂肪酶,在20 g/L麦芽糖添加量时酶活力达最大值,为20.4 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (图6(a))。这与刘思远等^[10]筛选的普城沙雷氏菌(*Serratia plymuthica*)优势碳源一致,均为麦芽糖。以20 g/L麦芽糖添加量作为响应曲面试验设计的中心值,15 g/L为低水平,25 g/L为高水平。

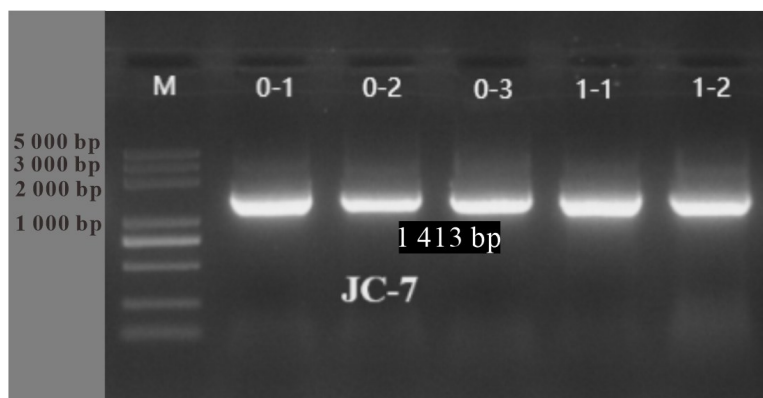


图2 菌株JC-7 PCR扩增产物凝胶电泳结果

如图5(b)所示,蛋白胨是JC-7菌株产脂肪酶的优势氮源,这与吴子君等^[11]的试验结果类似。添加25 g/L蛋白胨时,酶活力达最大值,为24.5 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (图6(b))。故以25 g/L蛋白胨添加量作为响应曲面试验设计的中心值,20 g/L为低水平,30 g/L为高水平。

图5(c)结果表明,添加橄榄油为诱导剂有利于JC-7产脂肪酶,且当橄榄油乳化液添加量为8%时,

酶活力达到最大值,为6.4 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (图6(c))。故以橄榄油乳化液添加量8%作为响应曲面试验设计的中心值,6%为低水平,10%为高水平。

2.4.2 Box-Behnken 试验结果及分析

根据单因素试验确定的因素和水平,以酶活力为响应值,通过三因素三水平的Box-Behnken试验设计和响应曲面分析方法,探究菌株最佳发酵培养条件。响应曲面试验设计和结果如表4所示,回归

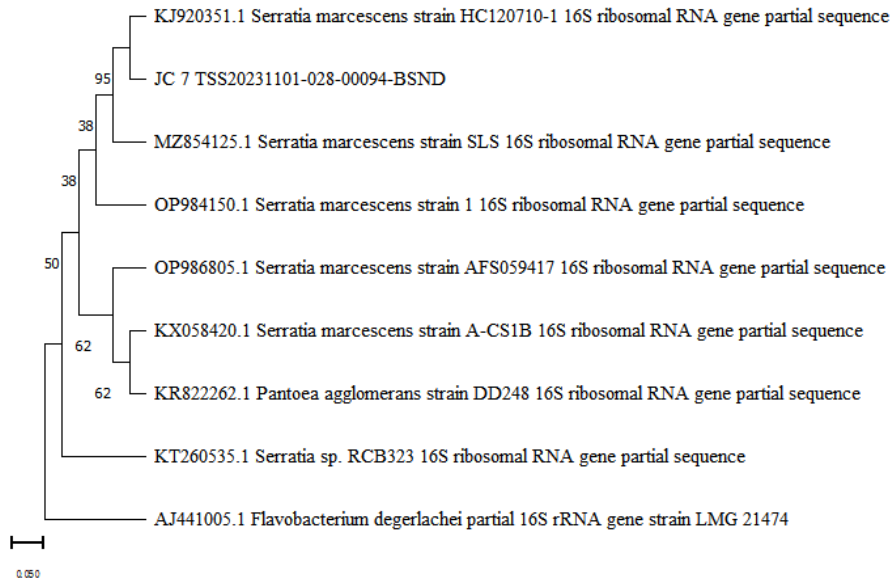


图3 基于细菌 16S rDNA 序列邻接法构建的系统发育树

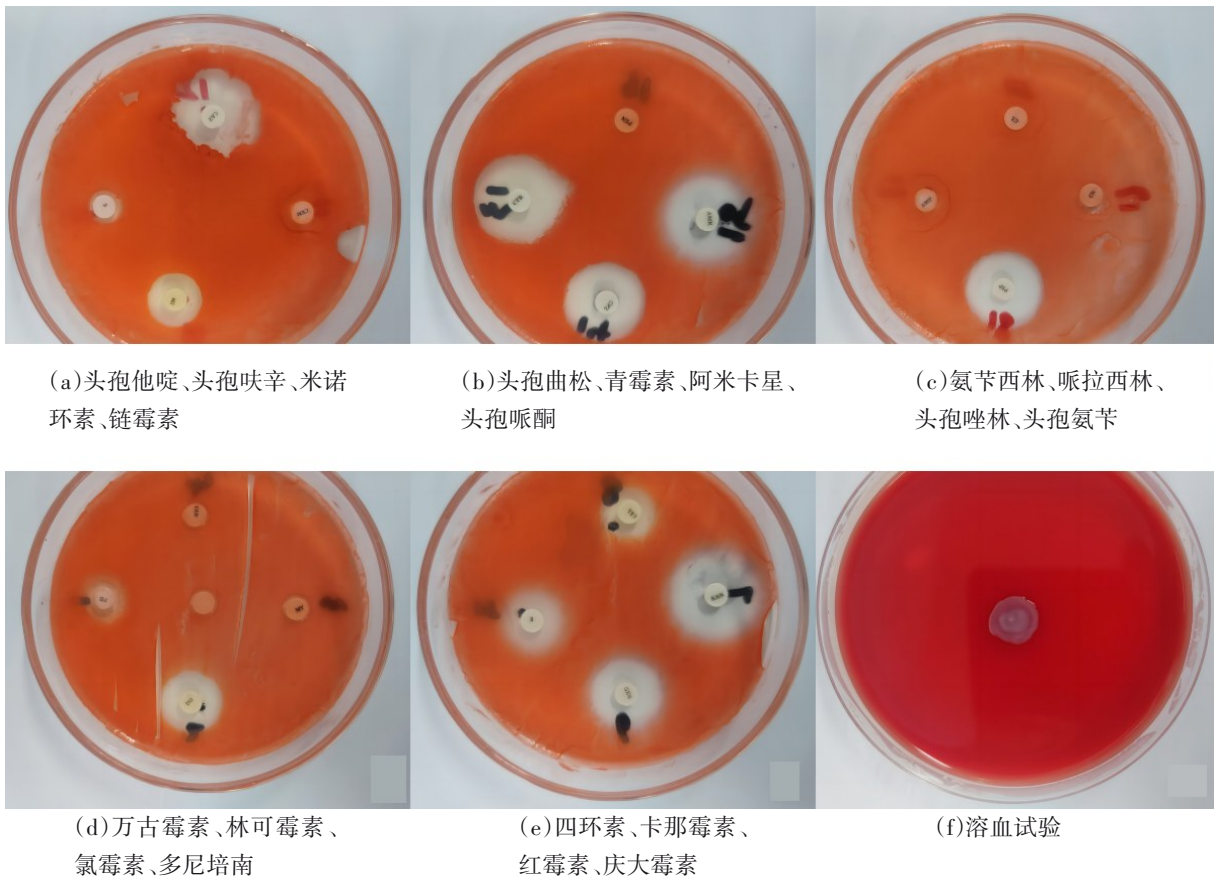


图4 菌株JC-7生物安全检测

模型方差分析及结果如表5所示。

使用 Design Expert 13 软件对表4的结果进行多元线性回归拟合,得到多元二次回归方程: $Y=42.14+$

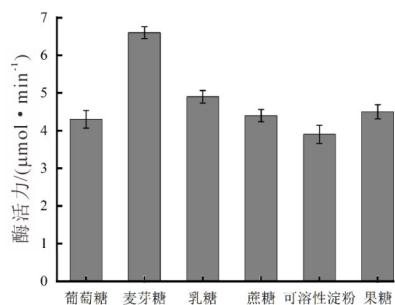
$1.24A+2.23B+0.2475C-2.55AB+1.71AC+0.6225BC-$

$2.85A^2-3.58B^2-7.52C^2$ 。对回归模型进行方差分析结果如表5所示。模型的P值为 $0.005<0.01$ 表明本试

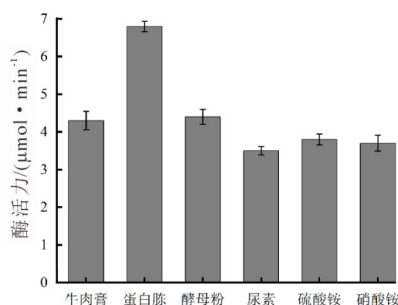
表3 菌株JC-7抗生素敏感评价结果

抗生素名称	敏感度
头孢他啶	S
头孢呋辛	R
米诺环素	S
链霉素	I
头孢曲松	S
青霉素	R
阿米卡星	S
头孢哌酮	S
氨苄西林	R
哌拉西林	S
头孢唑林	R
头孢氨苄	R
万古霉素	R
林可霉素	R
氯霉素	R
多尼培南	S
四环素	S
卡那霉素	S
红霉素	S
庆大霉素	S

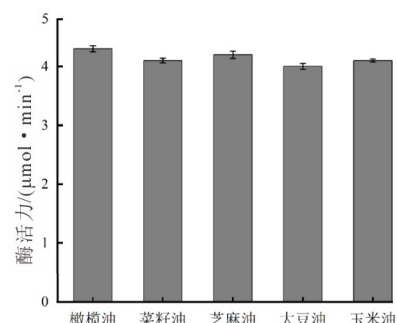
注:S为敏感;I为中介;R为耐药。



(a) 碳源筛选



(b) 氮源筛选



(c) 诱导剂筛选

图5 碳源、氮源及诱导剂筛选

2.5 酶学性质测定

2.5.1 温度对酶活力的影响

菌株JC-7的酶学性质测定结果如图8所示。如图8(a)所示,酶活力随温度升高先增大后减小,在45℃时达到最大值,表明该酶的最适反应温度为45℃。在不同温度下孵育1h后,该酶在25~45℃时

使用的多元二次回归模型极显著,失拟项 P 值为0.2061>0.05,不显著。表明该模型与试验结果拟合度好,误差较小。相关系数 $r^2=0.9586$ 表明试验值与预测值拟合性较好,可以较为真实地模拟曲面。模型修正相关系数 $r_{adj}^2=0.9053$,表明该模型能够较为真实地解释90.53%的响应值变化。由显著性检验结果可知因素一次项 B ;交互项 AB ;二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对酶活影响显著,说明试验因素与响应值之间不是简单的线性关系。由方差分析结果可知各因素对酶活力影响程度依次为麦芽糖>蛋白胨>橄榄油乳化液。

由Box-Behnken试验结果(图7)及二次多项回归方程得到菌株JC-7最优发酵产酶培养条件为蛋白胨25.504 g/L、麦芽糖21.452 g/L、橄榄油乳化液8.081%,由此预测最高酶活为42.546 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。为方便操作,设置蛋白胨添加量为25.5 g/L,麦芽糖添加量21.5 g/L,橄榄油乳化液添加量8.1%,进行验证试验,在此条件下测得酶活为(38.6±0.76) $\mu\text{mol}/\text{min}$,较模型预测值42.546 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 减少了9.27%,证明该模型可靠。

表现出较高的稳定性,保留了其初始活性的80%以上。但当温度高于45℃时,稳定性开始显著降低,这种下降的原因可能是由于高温使得脂肪酶三级结构改变,进而减少了酶与底物的相互作用^[12]。微生物来源的脂肪酶可分为低温、中温和高温3类,本试验筛选得到的菌株JC-7所产脂肪酶属于中温脂

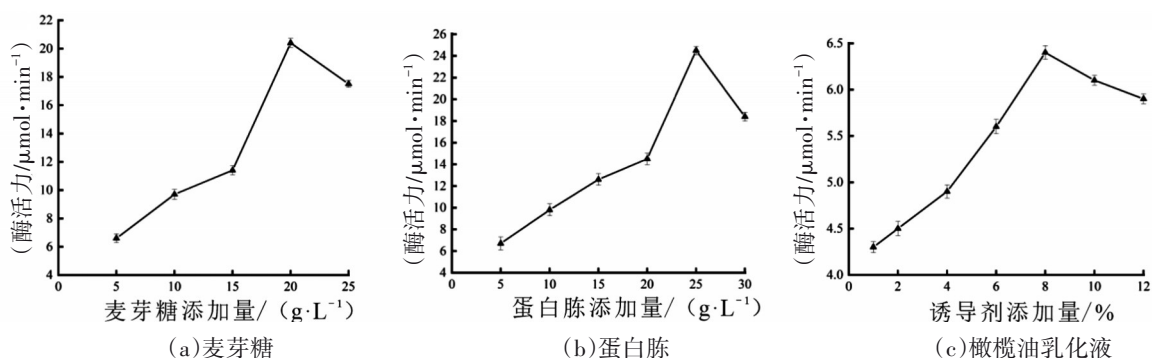


图6 麦芽糖、蛋白胨、橄榄油乳化液添加量对酶活的影响

表4 Box-Behnken 试验设计及结果

试验号	A(蛋白胨)	B(麦芽糖)	C(橄榄油乳化液)	酶活力/($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)
1	30	25	8	37.77
2	30	20	10	33.61
3	25	20	8	43.41
4	20	20	6	33.35
5	25	25	10	34.54
6	25	20	8	41.78
7	30	20	6	29.96
8	30	15	8	38.61
9	25	15	6	28.78
10	20	25	8	37.91
11	25	20	8	42.25
12	25	25	6	32.54
13	20	15	8	28.56
14	25	15	10	28.29
15	25	20	8	43.16
16	25	20	8	40.11
17	20	20	10	30.17

肪酶^[13]。

2.5.2 pH对酶活力的影响

如图8(b)所示,该酶的最适反应pH值为8.0,当pH值为7.0~9.0时能维持80%以上的酶活,当pH值为5.0~6.0时保持了60%以上的酶活力,当pH值高于9.0时酶活力开始快速降低,当pH值为11.0时基本失活。但当pH值为7.0~9.0时酶活力基本未受到影响,结合最适反应的pH值和pH耐受性试验分

表5 响应曲面试验回归模型方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	450.83	9	50.09	18.00	0.000 5	**
A	12.40	1	12.40	4.45	0.072 7	
B	42.87	1	42.87	15.40	0.005 7	**
C	0.49	1	0.49	0.18	0.687 4	
AB	25.96	1	25.96	9.33	0.018 5	*
AC	11.66	1	11.66	4.19	0.079 9	
BC	1.55	1	1.55	0.56	0.479 8	
A ²	34.13	1	34.13	12.26	0.010 0	*
B ²	54.03	1	54.03	19.41	0.003 1	**
C ²	238.25	1	238.25	85.59	<0.000 1	**
残差	19.48	7	2.78			
失拟项	12.57	3	4.19	2.42	0.206 1	
纯误差	6.92	4	1.73			
总和	470.31	16				

注:*表示差异有统计学意义($P<0.05$);**表示差异有高度统计学意义($P<0.01$)。

析,该酶属于碱性脂肪酶,或可用于洗涤剂等行业。很多相关研究都表明微生物所产脂肪酶属于碱性脂肪酶。如*Papiliotrema fonsecae*.NYNU19160所产脂肪酶最适反应pH值为7.5,在pH值为6.5~8.5时能保持良好的酶活性^[14]。*Thermosyntropha lipolytica* DSM 11003所产脂肪酶最适反应pH值为8.0,在pH值为6.0~11.0时有很好的稳定性^[15]。

2.5.3 金属离子和EDTA的影响

如图8(c)所示, Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Na^{+} 对该酶活力有促进作用,其中 Ca^{2+} 对该酶的促进作用最明

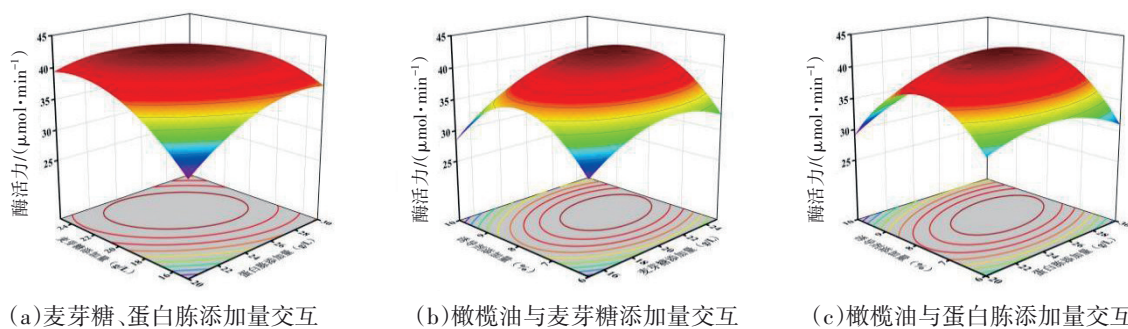
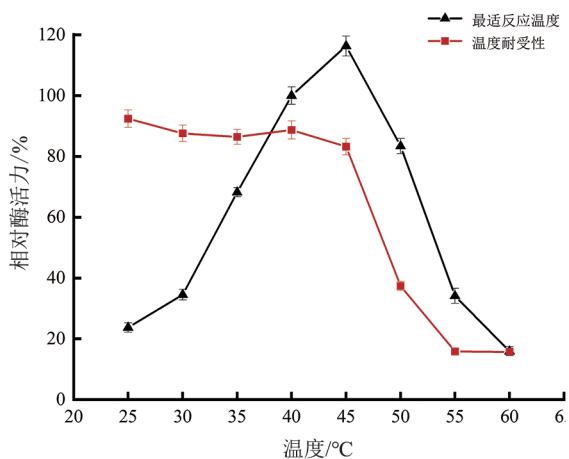
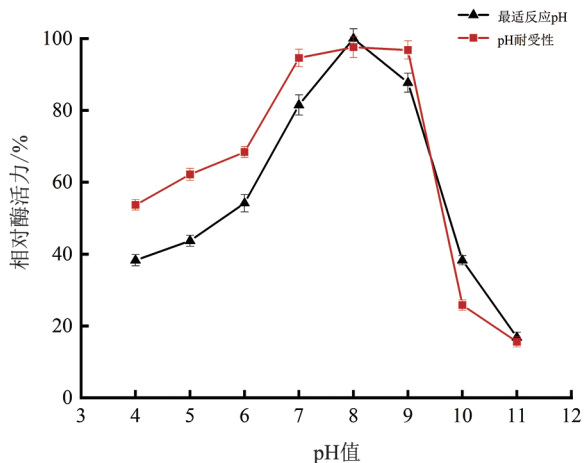


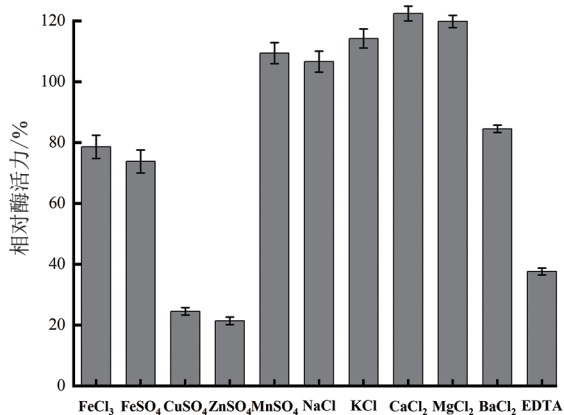
图7 各因素交互作用对酶活力影响的响应面图



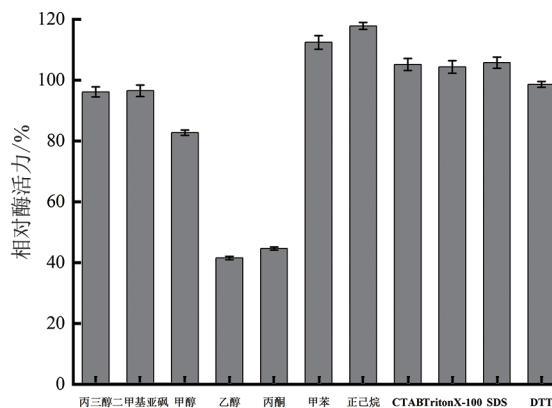
(a) 温度对酶活力的影响



(b) pH对酶活力的影响



(c) 金属离子及EDTA对酶活力的影响



(d) 有机溶剂、表面活性剂及DTT对酶活力的影响

图8 酶学性质测定

显,这与李晓雪^[16]的研究结果一致。而Fe²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺则对该酶活力有明显的抑制作用。金属离子对脂肪酶的促进或抑制作用可能是由于其与酶的结合使得酶的构象改变进而增强或减弱了其结构活性^[17]。EDTA对酶活力有明显的抑制作用,说明该酶可能是金属酶。

2.5.4 有机溶剂、洗涤剂及DTT的影响

在有机溶剂中的稳定性是脂肪酶的重要特征之一^[18],特别是对于极性有机溶剂的耐受性对脂肪酶工业应用至关重要^[19]。在图8(d)中有机溶剂的排列顺序从左到右,其log P值逐渐增大。在疏水性有机溶剂甲苯和正己烷中其酶活力得到了一定的提升,这与刘捷婧等^[20]的研究结果类似。通常认为

脂肪酶在亲水性有机溶剂中是不稳定的,因为亲水性有机溶剂倾向于从酶表面剥离水分子,从而导致酶失活^[21]。但在本试验中该酶在丙三醇(103.1%)、二甲基亚砷(96.5%)和甲醇(82.7%)中仍保持着较高的稳定性。

如图 8(d) 所示,无论是阳离子型表面活性剂 CTAB、非离子型表面活性剂 TritonX-100,还是阴离子型表面活性剂 SDS,都能提高酶活力。表面活性剂使得油水界面张力减小,从而使得脂肪酶更容易与底物结合^[22]。非离子型表面活性剂对脂肪酶活性的促进还可能是其削弱了蛋白质内部的疏水相互作用导致解聚,从而稳定了其活性^[23]。DTT 作为一种硫醇还原剂,可以降低蛋白质中的二硫键,改变蛋白质的结构。本试验中,DTT 对酶活力的影响不明显,意味着酶活力性位点不存在二硫键^[24]。

3 结论

本研究从油污污染土壤中分离得到一株具有较高产脂肪酶能力的菌株 JC-7。鉴定菌株 JC-7 为

沙雷氏菌(*Serratia* sp.)。血琼脂溶血试验、抗生素敏感试验表明该菌株不裂解绵羊红细胞,对常用抗生素无耐药性,环境友好。菌株最佳发酵条件为蛋白胨 25.5 g/L、麦芽糖 21.5 g/L、橄榄油乳化液 8.1%,在此条件下发酵液酶活力为(38.6±0.76) μmol/min,较模型预测值 42.546 μmol/min 减少了 9.27%,证明模型可靠。菌株 JC-7 所产脂肪酶最适反应 pH 值和温度分别为 8.0 和 45 °C, pH 适应范围较广,属中温碱性脂肪酶。金属离子 Ca²⁺、K⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Na⁺ 以及疏水性有机溶剂甲苯和正己烷均在一定程度上促进了该酶活力,3 种表面活性剂(CTAB、TritonX-100、SDS)对该酶均具有激活效应,其激活机理还有待进一步研究。但金属离子 Zn²⁺、Cu²⁺ 和亲水性有机溶剂乙醇、丙酮以及 EDTA 都显著抑制了该酶活力。后续研究可向菌株 JC-7 的诱变育种、功能基因分析、酰基迁移和底物链长选择以及酶蛋白纯化等方向进一步发展,以期获得产量和活性更高的脂肪酶。

参考文献:

- [1] 肖鹭,周锦涛,刘振,等.固定化纳米酶的研究进展[J],食品科学,2023,44(11):205-213.
- [2] 曹茜.脂肪酶高产菌的选育、酶的纯化和表征以及两种诱导方式产酶的机理研究[D].杭州:浙江大学,2016.
- [3] 张传丽,孙会刚,崔珏,等.高产脂肪酶菌株的筛选及其酶学性质分析[J].食品科技,2019,44(11):30-35.
- [4] 王冬梅,雒晓芳,程燕,等.脂肪酶产生菌的筛选及产酶条件的优化[J].西北师范大学学报(自然科学版),2013,49(3):87-91.
- [5] 贺秋红,巩志金,颜梅.产脂肪酶菌株的筛选、鉴定及发酵培养基优化[J].中国酿造,2019,38(10):84-88.
- [6] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:253-298.
- [7] 张小波,温贵兰,张喜懿等.一株鸭源贝莱斯芽孢杆菌的分离鉴定及药敏试验[J].贵州畜牧兽医,2020,44(6):48-50.
- [8] 刘玉华,陈光明,郭广富.犊牛腹泻大肠杆菌分离鉴定与药敏试验[J].现代畜牧科技,2023(2):81-83.
- [9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.抗菌药物敏感性试验的技术要求:WS/T 639—2018[S/OL].(2019-06-01)[2023-12-12].http://www.nhc.gov.cn/old_file/uploadfile/20190107102217856.pdf
- [10] 刘思远,申东晨,刘峥,等.产低温脂肪酶菌株鉴定、发酵条件优化及酶学性质分析[J].食品工业科技,2023,44(20):116-125.
- [11] 吴子君,陈思沅,杜昭君,等.产脂肪酶菌株的筛选、鉴定及产酶条件优化[J].河南工业大学学报(自然科学版),2021,42(6):10-16.
- [12] DAS A, SHIVAKUMAR S, BHATTACHARYA S, et al. Purification and characterization of a surfactant-compatible lipase from

- Aspergillus tamarii* JGIF06 exhibiting energy-efficient removal of oil stains from polycotton fabric [J]. *3 Biotech*, 2016, 6(2):131.
- [13] 马抒晗,张玮佳,吴茜,等.高产脂肪酶菌株的筛选鉴定及酶学、转酯特性[J].应用与环境生物学报,2014,20(4):602-608.
- [14] 史程风.产低温脂肪酶酵母菌的筛选、产酶条件优化及酶学性质研究[D].南阳:南阳师范学院,2022.
- [15] 许蕊,张昕怡,潘悦,等.来源于解酯菌的嗜热耐碱脂肪酶的表达纯化及其酶学性质研究[J].林业工程学报,2020,5(3):108-114.
- [16] 李晓雪.产脂肪酶耐冷菌的分离及其对油脂降解吸附的条件优化[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2020.
- [17] RMILI F, ACHOURI N, SMICHI N, et al. Purification and biochemical characterization of an organic solvent-tolerant and detergent-stable lipase from *Staphylococcus capitis* [J]. *Biotechnology Progress*, 2019, 35(4):2833-2842.
- [18] 纪晨雪,牛永武,杨岩晓,等.蚜虫莫氏黑粉菌脂肪酶的酶学性质研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2023,44(2):8-15.
- [19] 柏晓辉,樊燕,周娟,等.一株产耐有机溶剂脂肪酶伯克霍尔德氏菌的分子鉴定及酶学性质分析[J].中国油脂,2023,48(8):90-95.
- [20] 刘捷婧,王敏婷,周于婷,等.*Caldisericum exile* 来源新嗜热脂肪酶的发现及酶学特征的研究[J].食品与发酵工业,2023,49(2):41-46.
- [21] YANG L, DORDICK J S, GARD S. Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. *Biophysical Journal*, 2004, 87(2):812-821.
- [22] 周艳杰,耿鹏,时祎,等.嗜热玫瑰红球菌嗜热脂肪酶的重组表达与酶学性质研究[J].食品与发酵工业,2021,47(13):16-22.
- [23] RONG Z, HUO Y Y, JIAN S L, et al. Characterization of a novel alkaline esterase from *Altererythrobacter epoxidivorans* CGMCC 1.7731T [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2017, 48(7):113-120.
- [24] PENG Q, WANG X, SHANG M, et al. Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production [J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1):1-1.