

文章编号: 1000-5862(2014)01-0014-05

# 产脂肪酶菌株的筛选、鉴定与产酶条件优化

黎小军, 谢莲萍, 刘建宏, 朱婷婷, 刘 蓉

(新余学院医学与生命科学学院 江西 新余 338000)

**摘要:** 以橄榄油为唯一碳源, 采用平板变色圈法, 从土壤中筛选到1株脂肪酶高产菌XYU-6, 经生理生化试验鉴定及16S rDNA序列分析, XYU-6被鉴定为洋葱假单胞菌(*Burkholderia cepacia*)。设计单因素试验, 对其产酶条件进行优化, 优化后的培养条件为: 葡萄糖1.00%, 蛋白胨2.00%, 豆油1.00%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.35%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.15%,  $\text{MgSO}_4$  0.05%, 初始pH值为7.0, 培养温度30℃, 培养48h, 酶活可达 $24.1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 是优化前的1.65倍。

**关键词:** 脂肪酶; 洋葱假单胞菌; 筛选; 鉴定; 优化

中图分类号: Q 939; TQ 925

文献标志码: A

## 0 引言

脂肪酶全称为三酰基甘油酰基水解酶, 是一种重要工业酶类, 除了能水解甘油与脂肪酸形成的酯键外, 还能催化一系列的反应, 如酯水解、酯合成、酯交换、氨解等, 在食品、洗涤、制革、饲料、油脂加工、有机合成、生物能源、对映体拆分和工具酶等领域应用十分广泛<sup>[1-4]</sup>。脂肪酶催化反应具有选择性高、产物光学纯度高、副反应少、反应条件温和、绿色环保等特点<sup>[4-5]</sup>, 这使得脂肪酶在手性化合物的合成特别是手性药物的制备中具有独特的优势, 并已成为制备光学纯手性药物的重要技术手段。脂肪酶广泛存在于自然界中的各种生物体内<sup>[6]</sup>, 其中来源于微生物的脂肪酶种类最多, 且与动植物来源的脂肪酶相比, 具有更广的温度和pH值适应范围, 是目前工业用脂肪酶最重要来源<sup>[1, 6-7]</sup>, 其中假单胞菌脂肪酶因其对手性醇及其酯具有较高的立体选择性和天然耐受有机溶剂等性能被广泛用于有机合成<sup>[8-9]</sup>。

本文以橄榄油为唯一碳源, 采用平板变色圈法, 从土壤中筛选到1株脂肪酶高产菌XYU-6, 经鉴定为洋葱假单胞菌, 并通过单因素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应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂和药品 橄榄油为国药集团化学试剂有限公司产品, 对硝基苯酯(C2, C4, C6, C8, C10, C12, C16)购于上海百灵威公司; 基因组提取试剂盒、PCR扩增试剂盒和PCR产物纯化试剂盒均为Axygen公司产品; 其它均为市售分析纯试剂。

1.1.2 培养基 (i) 富集培养基/( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 橄榄油10 mL,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5.0 g, NaCl 0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g, 调pH值为7.0。

(ii) 平板筛选培养基/( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 橄榄油20 mL, 蛋白胨10 g, 牛肉膏5 g, 葡萄糖3 g, PVA 10 g, NaCl 5 g, 吐温-80 5 mL, 琼脂15 g, 溴百里香酚蓝质量分数为0.01%, 调pH值为7.0。

(iii) 种子培养基: LB培养基。

(iv) 发酵培养基/( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 葡萄糖10.0 g, 酵母膏20.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, 橄榄油质量分数为1%, pH值为7.0。

### 1.2 方法

1.2.1 土壤采集 采自新余市各地富含油脂的土壤64份。

收稿日期: 2013-09-20

基金项目: 江西省青年科学基金(20122BAB214011)资助项目。

作者简介: 黎小军(1979-), 男, 江西南康人, 讲师, 主要从事应用微生物与基因工程技术方面的研究。

1.2.2 产脂肪酶微生物的筛选 富集培养: 取 1 g 土样溶解于 25 mL 无菌水中, 于  $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下振荡 30 min; 取 2 mL 上清液加到 50 mL 富集培养基中, 于  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下振荡培养 48 h; 取 2 mL 转入 50 mL 新鲜富集培养基中进行第 2 次富集, 在同样条件下富集 48 h, 然后进行第 3 次富集。

脂肪酶产生菌的分离: 将富集培养的菌液适当稀释后涂布于平板筛选培养基上,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  静置培养 48 h. 然后测定平板上菌落的直径和菌落周围黄色变色圈的直径, 根据两者比值的大小进行菌株活力初筛, 选择比值大的菌株进行发酵培养, 并用碱式滴定法测定其脂肪酶活力。

复筛: 选择初筛得到的脂肪酶活力相对较高的菌株, 接种于发酵培养基中, 于  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  摇床上振荡培养 48 h,  $8\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液和细胞分别测定其脂肪酶酶活力, 选择酶活最高的菌株进行生理生化 and 分子鉴定及后续的产酶条件优化。

1.2.3 菌株的鉴定 菌株的形态观察和革兰氏染色参照文献[10]进行, 生理生化试验参照文献[11]进行。

菌株的分子鉴定采用 16S rDNA 序列分析, 菌株 XYU-6 基因组的提取、16S rDNA 序列的 PCR 扩增以及核苷酸测定参照文献[12]进行。选择 16S-8 (序列为 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 16S-1510 (序列为 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') 作为 PCR 的上下游引物, 以基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 16S rDNA 序列, PCR 产物经 PCR 纯化试剂盒纯化后送上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.4 底物特异性研究 以不同碳链长度的对硝基苯酚酯(C2、C4、C6、C8、C12、C16)为底物, 对所筛选到的菌株 XYU-6 进行了底物谱分析。反应体系为: 对硝基苯酚酯(终浓度为  $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 与乙醇的混合溶液  $100\text{ }\mu\text{L}$ , pH 值为 8.0,  $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Tris-HCl 缓冲液  $800\text{ }\mu\text{L}$ , 稀释一定倍数的菌悬液  $100\text{ }\mu\text{L}$ , 于  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下反应 5 min, 在  $405\text{ nm}$  下测定反应液的吸光值变化<sup>[13]</sup>。对照反应中 Tris-HCl 缓冲液代替菌悬液。

1.2.5 发酵条件优化 设计单因素试验, 对发酵培养基中 C 源、N 源、诱导剂种类、培养基初始 pH 值和培养温度等因素进行优化。

1.2.6 酶活的测定 发酵液中脂肪酶酶活的测定

参考碱式滴定法, 以聚乙烯醇(PVA) 橄榄油乳化液(橄榄油与 PVA 体积比为 1: 3) 为底物, 参照国家标准 GB/T 23535—2009 进行。酶活力单位的定义为:  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 8.0 条件下, 以每分钟产生  $1\text{ }\mu\text{mol}$  脂肪酸所需的酶量为 1 个活力单位(U)。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的筛选

通过富集培养、初筛、复筛, 以溴百里香酚蓝为指示剂, 从土壤筛选出了 6 株酯水解酶活力较高 ( $>5\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的菌株, 结果见表 1, 其中的菌株 XYU-6 活力最高, 达到  $14.6\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 1 产脂肪酶微生物筛选结果

菌株编号	酶活/( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	微生物分类
XYU-2	7.9	细菌
XYU-6	14.6	细菌
XYU-43	8.6	霉菌
XYU-47	10.2	细菌
XYU-25	5.3	霉菌
XYU-39	8.4	细菌

### 2.2 菌株 XYU-6 的鉴定

2.2.1 菌落形态与生理生化特征 对活力最高的菌株 XYU-6 进行了形态与生理生化鉴定。菌株呈短杆状, 大小为  $0.8\sim1.0\text{ }\mu\text{m}\times1.5\sim3.0\text{ }\mu\text{m}$ ; 菌落呈白色, 略带黄色, 不透明, 圆形, 菌落表面湿润光滑, 边缘整齐。菌株 XYU-6 的生理生化特征如表 2。根据形态和生理生化特征, 可初步确定菌株 XYU-6 属于伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)。

表 2 菌株 XYU-6 的生理生化特征检测结果

试验名称	结果	试验名称	结果
革兰氏染色	-	过氧化氢酶	+
反硝化	-	氧化酶	+
淀粉水解	+	明胶水解	-
精氨酸双水解酶	-	脲酶	+
葡萄糖	+	阿拉伯糖苷酶	+
甘露糖	+	麦芽糖	-
N-乙酰氨基葡萄糖	+	葡萄糖酸钾	+
甘露醇	+	蔗糖	+

注 “+”为阳性, “-”为阴性。

2.2.2 基于 16S rDNA 序列的系统发育分析 从菌株 XYU-6 基因组 DNA 中扩增获得一段大小为  $1\ 496\text{ bp}$  的 16S rDNA 序列, 并提交到 GenBank, 登录号为 KF408387。经 Blast 分析, 与 GenBank 中 *Burk-*

*holderia cepacia* 16S rDNA 的相似率最高, 达 99%。将菌株的 16S rDNA 序列 Clustal W 软件进行比对, 然后利用 MEGA 5 软件中的 Kimura 2-Parameter 模型计算遗传距离, 再用 Neighbour-Joining 法构建系统发

育树<sup>[14-15]</sup> 结果见图 1。结合菌株形态学特性, 可基本确定 XYU-6 菌株为洋葱假单胞菌 (*Burkholderia cepacia*) , 命名为 *Burkholderia cepacia* XYU-6。

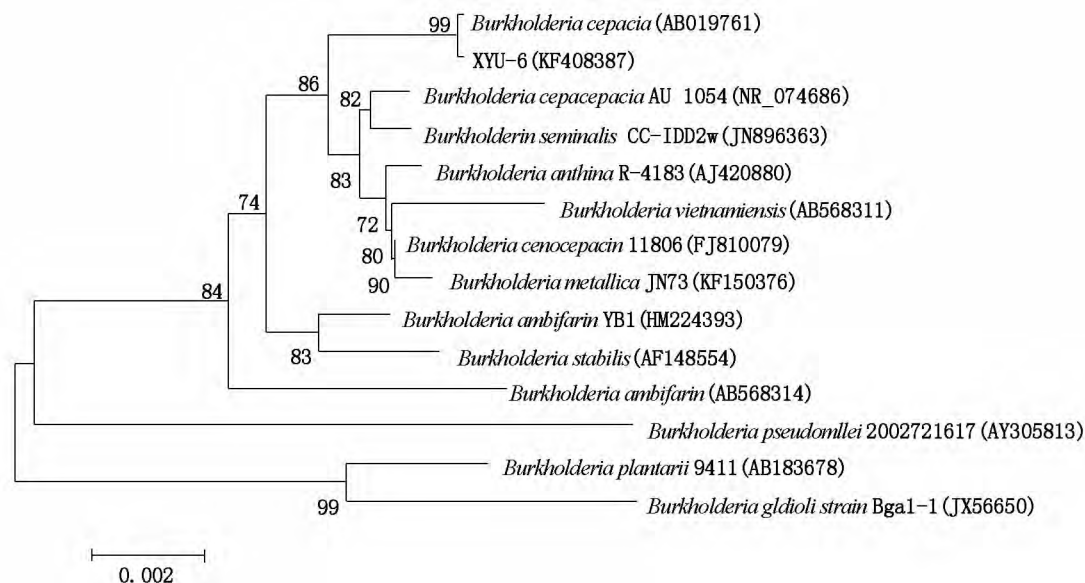


图 1 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

## 2.3 产酶类型的确定

由于水解酯键的可能是脂肪酶也可能是酯酶, 而酯酶和脂肪酶最大的区别在于偏好底物的链长不同, 脂肪酶比较偏向于水解碳链较长的酯类 (>10 个碳原子), 而酯酶偏向于水解碳链较短的酯类 (<10 个碳原子)<sup>[16]</sup>。为了确定 XYU-6 产的酯键水解酶为脂肪酶还是酯酶, 对不同碳链长度的对硝基苯酚酯 (C2, C4, C6, C8, C12, C16) 进行了底物谱实验。结果表明, 该酶对 C16 的酶活达到最高, 且随着底物碳链长度的延长其活性越高 (见图 2), 据此可初步判断此酶为脂肪酶。

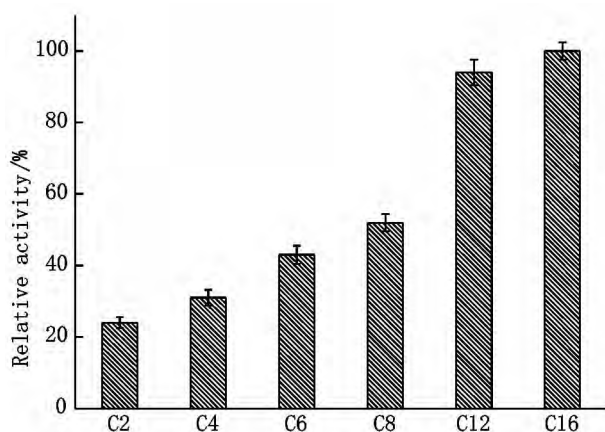


图 2 XYU-6 对不同碳链长度对硝基苯酯的相对活力

## 2.4 产酶条件优化

2.4.1 培养基碳源的优化 以 1% 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、可溶性淀粉和糊精作为碳源进行最适碳源的筛选, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 以葡萄糖为碳源酶活最高, 而以麦芽糖为碳源酶活最低。这与文献报道的洋葱假单胞菌不利用麦芽糖的特性相符。

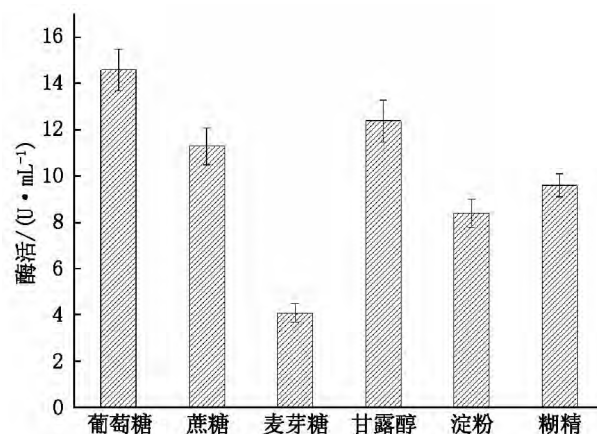


图 3 不同碳源对菌株 XYU-6 产酶的影响

2.4.2 培养基氮源的优化 在获得最佳碳源的基础上 (1% 的葡萄糖), 分别以 2% 的氯化铵、硫酸铵、硝酸钠、尿素、蛋白胨、酵母膏和玉米浆为氮源进行最适氮源的筛选 (见图 4)。结果表明该菌以蛋白胨为氮源时酶活最高, 以硝酸钠为氮源时酶活最低; 该菌比较容易利用有机氮源, 且氨态氮易于被该菌株利用。

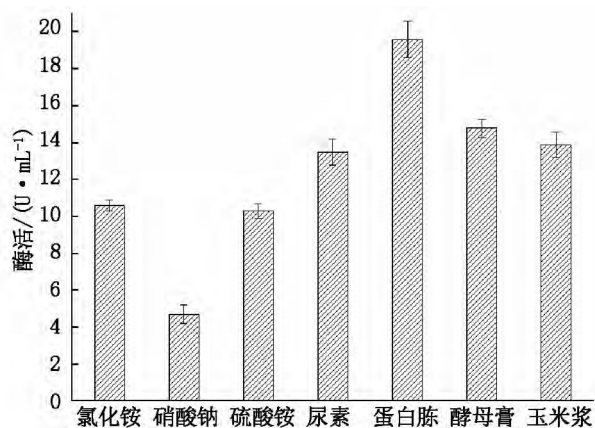


图 4 不同氮源对菌株产酶的影响

2.4.3 诱导剂的选择 添加 1% 的不同油脂(橄榄油、茶油、菜籽油、豆油和桐油)作诱导剂,考察不同诱导剂对产酶的影响,结果见图 5。由图 5 可知,添加油脂作为诱导剂能有效提高产酶水平,说明该脂肪酶为诱导酶,且使用豆油做诱导物与用橄榄油效果相当。考虑到成本,使用价格较便宜的豆油作为诱导剂比较合适。

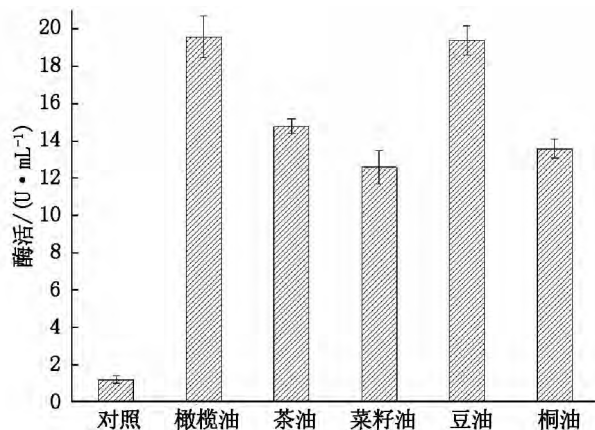


图 5 不同诱导剂对菌株产酶的影响

2.4.4 培养基初始 pH 值的优化 在优化的培养基基础上,调节发酵培养基的初始 pH 值,考察了不同 pH 值对菌株产酶的影响,结果见图 6。该菌株在

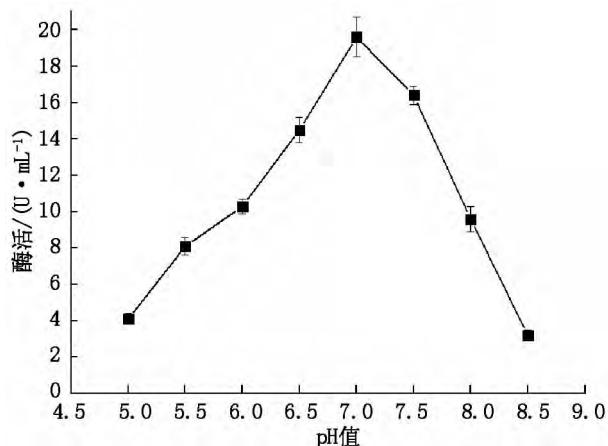


图 6 培养基初始 pH 值对菌株产酶的影响

pH 值为 6.5 ~ 7.5 时产酶状况较为良好, pH 值 7.0 为培养基最优初始 pH 值。

2.4.5 培养温度的优化 考察了培养温度对菌株产酶的影响,结果见图 7。该菌株的最适产酶温度为 30 °C,且该菌株在 28 ~ 37 °C 时脂肪酶活力都比较高;低于 30 °C 时,随着温度的升高酶活越高,高于 30 °C 时,酶活开始下降。

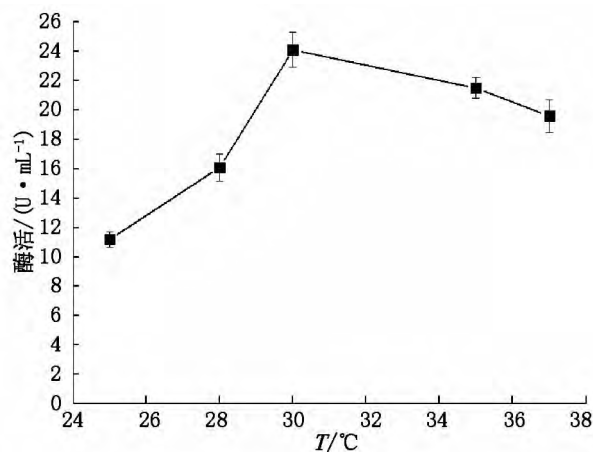


图 7 不同培养温度对产酶的影响

### 3 结论

从新余等地采集含油污土样 64 份,通过富集培养、初筛、复筛,以溴百里香酚蓝作为指示剂,筛选出了酶活力大于  $5.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  的菌株 6 株,其中 XYU-6 酶活最高,达到  $14.6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结合菌株形态学特性、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析,菌株 XYU-6 确定为洋葱假单胞菌(*Burkholderia cepacia*)。对 *Burkholderia cepacia* XYU-6 产脂肪酶条件进行了优化,优化培养条件为:葡萄糖 1.00%,蛋白胨 2.00%,豆油 1.00%, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.35%, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.15%, $\text{MgSO}_4$  0.05%,初始 pH 值为 7.0,培养温度 30 °C,培养 48 h,酶活可达  $24.1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,是优化前的 1.65 倍。

### 4 参考文献

- [1] Hasan F, Shah A A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(2): 235-251.
- [2] Jaeger K E, Eggert T. Lipases for biotechnology [J]. *Current Opinion in Biotechnology* 2002, 13(4): 390-397.
- [3] Ghanem A, Aboul-Enein H Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents [J]. *Tetrahedron: Asymmetry* 2004, 15(21): 3331-3351.
- [4] Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and their indus-

- trial applications [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology 2004 ,118( 1) : 155-170.
- [5] 熊小龙,杜鹏飞,金鹏,等. 脂肪酶催化药物合成的研究进展 [J]. 化学与生物工程 2010 ,27( 8) : 1-6.
- [6] Treichel H ,de Oliveira D ,Mazutti M A ,et al. A review on microbial lipases production [J]. Food and Bioprocess Technology 2010 ,3( 2) : 182-196.
- [7] Hasan F ,Shah A A ,Hameed A. Industrial applications of microbial lipases [J]. Enzyme and Microbial Technology , 2006 ,39( 2) : 235-251.
- [8] Jaeger K E ,Liebeton K ,Zonta A ,et al. Biotechnological application of *Pseudomonas aeruginosa* lipase: efficient kinetic resolution of amines and alcohols [J]. Applied Microbiology and Biotechnology ,1996 ,46: 99-105.
- [9] 彭仁,林金萍,魏东芝. 耐有机溶剂脂肪酶产生菌的筛选和鉴定 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2011 , 35( 2) : 197-200.
- [10] 沈萍,范秀荣,李广武. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社 2002: 26-46.
- [11] 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: 128-191 ,349-398.
- [12] 陈源源,牛丹丹,王正祥. 一种快速鉴定细菌的方法 [J]. 食品与发酵工业 2007 ,35( 5) : 29-31.
- [13] Zhao Lili ,Xu Jianhe ,Zhao Jian ,et al. Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010 [J]. Process Biochemistry 2008 ,43: 626-633.
- [14] Thompson J D ,Higgins D G ,Gibson T J ,et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting ,position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Research , 1994 ,22: 4673-4680.
- [15] Saitou N ,Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology and Evolution ,1987 ,4( 4) : 406-25.
- [16] Zheng Renchao ,Wang Tianzhen ,Fu Dejing ,et al. Biocatalytic synthesis of chiral intermediate of pregabalin with high substrate loading by a newly isolated *Morgarella morgani* ZJB-09203 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology 2013 ,97: 4839-4847.

## The Screening and Identification of a Lipase-Producing Strain and Its Culture Condition Optimization

LI Xiao-jun ,XIE Lian-ping ,LIU Jian-hong ,ZHU Ting-ting ,LIU Rong  
( School of Medicine and Life Sciences ,Xinyu University ,Xinyu Jiangxi 338004 ,China)

**Abstract:** A lipase producing strain XYU-6 was isolated from the soil by the method of flat discolor circle with olive oil as sole carbon source. XYU-6 was identified as *Burkholderia cepacia* by 16S rDNA sequencing and its biochemical and physiological characteristics. The optimal conditions ,glucose 1. 00% ,peptone 2. 00% ,soya-bean oil 1. 00% ,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0. 35% ,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0. 15% and MgSO<sub>4</sub> 0. 05% were obtained through one-factor experimental design. Furthermore ,the highest lipase activity 24. 1 U · mL<sup>-1</sup> was achieved under the optimum conditions with initial pH 7. 0 ,culture temperature 30 °C and culture time 48 h. These results indicated that the lipase activity was improved 1. 65 fold compared to the original conditions.

**Key words:** lipase; *Burkholderia cepacia*; screening; identification; optimization

( 责任编辑: 刘显亮)