

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.05.010

一株脂肪酶产生菌的筛选鉴定 及其酶学性质研究^①

徐伟芳, 黄涛杨, 周敏, 方翔,
王飞, 刘凤丹, 谢洁

西南大学 生物技术学院/家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715

摘要: 分离筛选脂肪酶高产菌株, 为生物降解富含油脂的工业及生活污水提供菌种资源。从校园食堂附近土壤中分离微生物, 结合中性红油脂平板筛选法与三丁酸甘油酯平板透明圈法筛选脂肪酶高产菌株。根据菌株形态特征、生理生化特性以及分子生物学特征鉴定高产菌株, 进而利用酸碱滴定法定量测定脂肪酶酶活, 探究该菌株产生脂肪酶的最适酶促反应温度、pH 值等酶学性质。研究结果表明, 筛选获得的脂肪酶产生菌 SLB-1 为革兰氏阳性芽孢杆菌; 硝酸盐还原呈阳性, 能够水解淀粉和液化明胶; 基于 16S rDNA 的系统发育分析结果表明 SLB-1 菌株与登录号为 NR116240 甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)处于同一最小分支, 故将 SLB-1 菌株鉴定为甲基营养型芽孢杆菌, 命名为 *B. methylotrophicus* SLB-1, 该菌株产脂肪酶的最适培养时间是 24 h, 酶促反应的最适温度为 30 ℃, 最适 pH 值为 7.0。本研究分离鉴定了脂肪酶产生菌 *Bacillus methylotrophicus* SLB-1, 且由该菌所产生的脂肪酶为中性常温酶。

关键词: 脂肪酶产生菌; 筛选; 菌种鉴定; 酶学性质

中图分类号: Q936

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)05-0062-08

近年来, 随着食品加工业与餐饮业的迅速发展, 富含油脂的生活污水已成为水体的重要污染源。据不完全统计, 每年餐饮业排放的未经处理的废水达上亿吨, 且有不断上升的趋势^[1]。污染水体成分复杂, 主要以胶体形式存在, 化学需氧量(COD)与生化耗氧量(BOD)相对较高, 富含油脂、纤维素等有机物^[2-3]。不经处理直接排放的废水, 不仅会引起水体富营养化, 破坏水体自净能力, 给环境治理带来恶劣影响^[4-6], 而且废水中的有害微生物也会成为疾病的传播源, 严重威胁人们的身心健康^[1]。近年来, 国内外主要采用物理、化学、物化和生物技术等方法对含油污水进行处理^[2], 其中, 采用微生物降解含油废弃物的研究逐渐增多^[7-8]。微生物能够利用油脂作为生长所需营养, 并在脂肪酶等多种酶系的催化作用下, 将其水解为甘油、脂肪酸等代谢产物^[9]。在此过程中, 脂肪酶作为一种高效解脂酶, 具有重要的研究与开发应用价值。

脂肪酶(Lipase EC. 3.1.1.3), 即酰基甘油水解酶(Acylglycerol hydrolases)广泛存在于动植物及微生物

① 收稿日期: 2016-08-29

基金项目: 国家自然科学基金(31601678); 重庆市基础与前沿研究计划重点项目(cstc2015jcyjys80001); 教育部留学回国人员科研启动基金项目(外交司留 2015-311); 中央高校基本科研业务费专项(XDJK2017C039)。

作者简介: 徐伟芳(1991-), 女, 安徽安庆人, 硕士研究生, 主要从事微生物代谢产物研究。

通信作者: 谢洁, 博士, 副教授, 硕士研究生导师。

物^[10], 是一类具有多种催化能力(解脂、酯交换和酯合成等)的酶^[11-12]. 由于微生物产生的脂肪酶种类繁多、来源广泛(据不完全统计, 自然界中已有 65 个属的微生物能够产生脂肪酶^[13-14]), 且具有高效的底物专一性、便于工业大规模生产和较高纯度酶制剂的获取等优势^[15-16], 因此工业上普遍采用培养微生物生产脂肪酶. 尽管脂肪酶产生菌屡有报道, 如荧光假单胞菌、不动杆菌、黑曲霉、扩展青霉、假丝酵母和涅斯捷连科氏菌^[17-18], 且目前市场上已经存在利用微生物生产的酶制剂商品^[19], 但总体来说, 脂肪酶高产菌株的数量还是十分有限的^[7], 且适用于工业大规模生产的菌株甚少. 因此, 从环境中筛选出具有高活力、耐受性强和酶学性质稳定的脂肪酶生产菌株, 对实际生产中应用脂肪酶降解油脂的意义重大.

本研究从校园土壤中分离微生物, 并通过中性红油脂平板筛选法与三丁酸甘油酯平板透明圈法筛选脂肪酶高产菌株. 同时以脂肪乳化液为原料, 利用酸碱滴定法对高产菌株的酶学性质进行初探, 为后续进一步提高脂肪酶产量并进行工业化生产提供研究基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤采集

用于分离筛选脂肪酶产生菌的土壤采自西南大学楠园学生二食堂附近.

1.1.2 培养基

初筛培养基(中性红油脂培养基)^[20]: 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 20.0 g, 猪油 20.0 g, 中性红 16.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值为 7.0, 121 °C 灭菌 20 min; 复筛培养基^[11]: 100 g/L 的三丁酸甘油酯(用体积比为 3% 的聚乙二醇溶液配制)100 mL, Tris-HCl 缓冲液(pH=8.0)900 mL, 琼脂 20.0 g, 121 °C 灭菌 20 min; 产酶基础培养基: 蛋白胨 10.0 g, 蔗糖 5.0 g, 脂肪乳化液 10.0 g, 硫酸铵 1.0 g, 硫酸镁 0.5 g, 磷酸氢二钾 2.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min; 种子培养基: 马铃薯 200.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值自然, 121 °C 灭菌 20 min; 菌株活化培养基: 马铃薯 200.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值自然, 121 °C 灭菌 20 min.

1.1.3 主要试剂与仪器

基因组 DNA 提取试剂盒 PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent 购自美国 ABI 公司; DNA marker 2000、rTaq 酶、dNTP、PCR 引物、10×PCR Buffer 和 Mg²⁺ 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 细菌生理生化检测鉴定管购自广东环凯微生物科技有限公司; PCR 仪购自美国 ABI 公司; 恒温摇床、电泳仪购自北京六一仪器厂; 普通显微镜购自奥林巴斯公司; 三丁酸甘油酯、聚乙二醇 2000、(NH₄)₂SO₄、MgSO₄、K₂HPO₄ 和 NaCl 等均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 脂肪酶产生菌分离与筛选的方法

1.2.1.1 脂肪酶产生菌的分离

称取含菌土样 0.5 g 混悬于 49.5 mL 含有玻璃珠的生理盐水中, 作为 10⁻² g/mL 稀释度, 振荡混匀(约 30 min). 静置后, 将上清液作连续 10 倍梯度稀释, 取 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ g/mL 等 4 种不同质量浓度稀释液 200 μL 涂布于 PDA 培养基, 每个稀释度 2 次重复, 28 °C 倒置培养 48 h, 挑取生长较快的菌株划线接种至初筛培养基, 每隔 12 h 观察一次, 将菌落周围发生红色显色带的菌株进行纯化并保种.

1.2.1.2 脂肪酶产生菌的筛选

将初筛确定的脂肪酶生产菌株在 PDA 平板上划线活化后, 接种于产酶基础培养基中, 于 30 °C 条件下以 180 r/min 的转速振荡培养 72 h, 并以 10 000 r/min 的转速离心 10 min 后获取发酵上清液, 用三丁酸甘油酯平板透明圈法^[11]检测脂肪酶活, 即: 用直径为 5 mm 的打孔器在复筛培养基上打孔, 取 50 μL 目标菌株发酵上清液注入孔中, 28 °C 培养 5 d, 观察培养液周围是否有透明圈, 并根据透明圈的大小判

定酶活强弱.

1.2.2 脂肪酶产生菌菌种鉴定的方法

1.2.2.1 菌体培养特征、形态的观察

将筛选获得的脂肪酶产生菌 SLB-1 接种至 PDA 培养基, 28 °C 培养 18~24 h, 观察单菌落的大小、形状、颜色、透明度和色泽等特征. 同时, 将培养 24 h 和 96 h 的细菌分别进行革兰氏染色和芽孢染色, 具体操作方法参照文献[21].

1.2.2.2 生理生化反应特征的检测

参考文献[22-23]所述的方法进行硝酸盐还原、淀粉水解、明胶液化、葡萄糖产气和过氧化氢酶实验等生理生化特性的测试.

1.2.2.3 分子生物学特征检测

使用 PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, USA) 试剂盒提取目标菌株基因组, 并以其为模板, 采用细菌 16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGCTACCTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系为: dd H₂O 15.9 μL, 10× PCR Buffer 2.5 μL, Mg²⁺ (1.5 mmol/L) 1.5 μL, dNTP (10 mmol/L) 2.0 μL, Primer-F (10 μmol/L) 1.0 μL, Primer-R (10 μmol/L) 1.0 μL, 模板 1.0 μL, rTaq 酶 0.1 μL. PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min. 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序. 将获得的基因序列拼接后用 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比较分析, 下载同源性较高的序列, 用 Clustal 1.83 软件进行同源性分析, 并用 MEGA 4.0 软件邻接法 (Neighbor-joining method) 进行 1 000 次步长计算, 构建系统发育树^[24-25].

1.2.3 脂肪酶酶学性质的研究

1.2.3.1 脂肪酶酶活定量测定方法

参考文献[26]中所述的酸碱滴定法测定脂肪酶酶活, 具体操作方法为: 用体积比为 3% 的聚乙二醇溶液制备含 100 g/L 的三丁酸甘油酯乳化液. 取该底物乳化液 5 mL, 加入 4 mL 0.025 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH=7.0) 组成反应体系, 置于 40 °C 水浴中保温 5 min, 加入 1 mL 发酵上清粗酶液开始精确计时, 继续保温 15 min 后取出, 立即加入 95% 的乙醇 15 mL 终止酶反应, 以加入高温灭活酶液为对照. 将酶促反应后的底物与对照分别加入 15 mL 蒸馏水稀释, 并加入 3 滴酚酞指示剂, 用 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液滴定水解产生的游离脂肪酸. 根据两者耗碱量的差值计算酶活大小. 脂肪酶酶活单位定义为: 一定条件下, 每分钟产生 1 μmol 脂肪酸所需的酶量定义为 1 个酶活单位 (U). 酶活的计算公式为:

$$U = (V - V_0) \times M / (t \times n)$$

式中: U 为酶活, V 为滴定样所消耗的 NaOH 体积 (mL), V_0 为滴定空白样所消耗的 NaOH 体积 (mL), t 为反应时间 (min), n 为酶液体积 (mL), M 为滴定用的 NaOH 溶液的浓度 (mol/mL).

1.2.3.2 脂肪酶酶学性质研究

1) 产酶最适培养时间: 将脂肪酶产生菌 SLB-1 接种于产酶基础培养基, 分别振荡培养 12, 24, 48, 72, 96 h 后, 以 10 000 r/min 的转速离心 10 min, 取各上清液作为粗酶液测定酶活, 确定菌株产酶最适培养时间;

2) 酶促反应的最适温度与最适 pH 值: 将脂肪酶产生菌 SLB-1 接种于产酶基础培养基中振荡培养 24 h 后, 以 10 000 r/min 的转速离心 10 min, 上清液即为粗酶液. 分别设置酶促反应温度为 20, 25, 30, 35, 40, 45 °C, 酶促反应 pH 值为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 测定不同的温度及不同 pH 值条件下的酶活, 确定酶促反应的最适温度与最适 pH 值.

2 结果与分析

2.1 脂肪酶产生菌分离筛选的结果

从采集的含菌土壤样品中分离获得 11 个细菌分离株, 分别命名为 SLB-1—SLB-11. 其中 SLB-3 (图 1(a)), SLB-4, SLB-6, SLB-7, SLB-11 共 5 株细菌在初筛平板上能够生长, 但无显色反应; 其余 6 株细菌在初筛平板上生长良好, 且均能发生显色反应, 但各菌株所产脂肪酶酶活有所差异, SLB-2 菌株在初筛平板上显淡红色, 其脂肪酶酶活较弱(图 1(b)), SLB-1 菌株在初筛平板上颜色最红, 表明该菌株所产脂肪酶酶活最高(图 1(c)). 选择初筛获得的 6 株脂肪酶产生菌进行复筛, 结果显示 SLB-1 菌株上清液周围出现明显的透明圈, 培养 5 d 后透明圈直径可达 (29.8 ± 0.2) mm(图 2), 而其他菌株无透明圈产生或产生透明圈较小, 由此表明 SLB-1 菌株上清液中的脂肪酶具有较高酶活, 且由该菌株所产脂肪酶酶活较为稳定, 故选取 SLB-1 菌株进行后续研究.

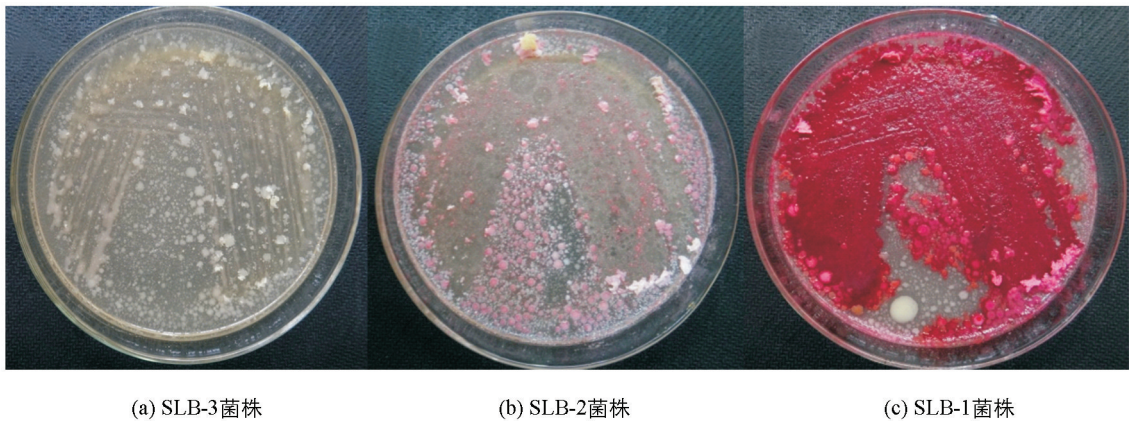


图 1 不同分离株在中性红油脂培养基上的菌落特征

2.2 脂肪酶产生菌菌种鉴定的结果

2.2.1 脂肪酶产生菌的形态及生理生化特征

将获得纯培养的 SLB-1 菌株接种于 PDA 培养基, 于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下倒置培养 24 h, 菌落呈乳白色, 较透明, 圆形, 边缘整齐, 蜡质, 表面光滑(图 3(a)). 菌株 SLB-1 革兰氏染色呈蓝紫色, 为革兰氏阳性菌(图 3(b)), 芽孢染色后, 菌体中央有椭圆形绿色芽孢(图 3(c)). 生理生化检测结果表明脂肪酶产生菌 SLB-1 菌株硝酸盐还原呈阳性, 能够水解淀粉和液化明胶(表 1). 结合对菌株 SLB-1 的形态及培养特征观察结果, 判断脂肪酶产生菌 SLB-1 为芽孢杆菌属菌株.

2.2.2 脂肪酶产生菌基于 16S rDNA 的系统发育分析

以脂肪酶产生菌 SLB-1 基因组 DNA 为模板, 使用 16S rDNA 通用引物 PCR 扩增, 获得一条长度为 1457 bp 的目的片段. 将测序后的 16S rDNA 序列提交 GenBank, 获得登录号为 KX421201. 使用 MEGA 4.0 软件, 根据 16S rDNA 序列采用邻接法构建 SLB-1 菌株的系统发育树, 结果显示菌株 SLB-1 与登录号为 NR116240 甲基营养型芽孢杆菌 *Bacillus methylotrophicus* (又名 *Bacillus velezensis*^[27]) 处于同一最小分支(图 4), 且序列同源性高于 99%. 结合形态学和生理生化特征及 16S rDNA 序列的系统发育分析结果, 鉴定该菌株为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*), 命名为 *B. methylotrophicus* SLB-1.

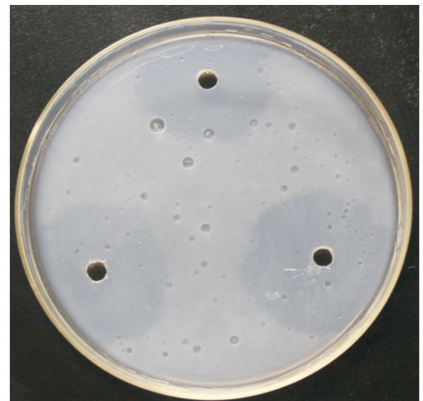
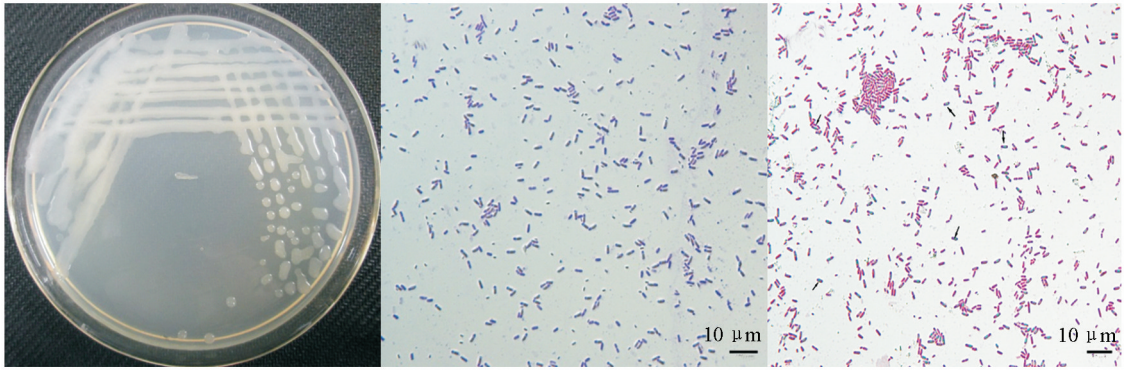


图 2 SLB-1 菌株发酵上清液在三丁酸甘油酯平板上的酶活检测



(a) 在PDA培养基上的菌落形态

(b) 革兰氏染色

(c) 芽孢染色

图 3 SLB-1 菌株的菌落及菌体形态特征

表 1 SLB-1 菌株主要生理生化特征

测试项目	结果	测试项目	结果	测试项目	结果
甘露糖	-	蛋白胨水水解	-	阿拉伯糖	-
西蒙氏	-	硝酸盐还原	+	木糖	-
半固体琼脂	+	淀粉水解	+	葡萄糖磷酸盐	-
葡萄糖产气	+	明胶液化	+	过氧化氢酶	+

注: + 为阳性; - 为阴性。

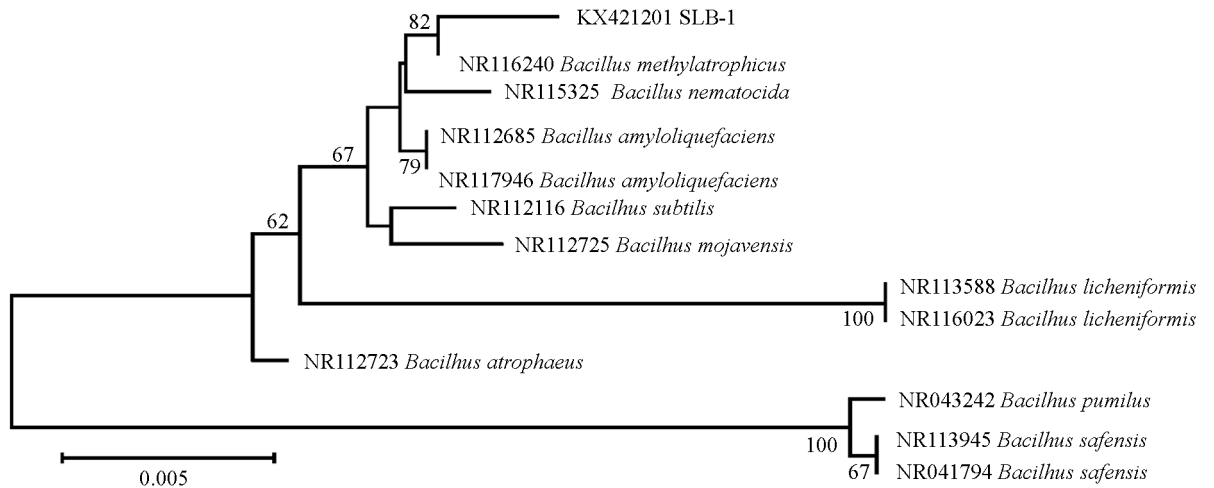


图 4 SLB-1 菌株基于 16S rDNA 序列的系统发育树

2.3 *B. methylatrophicus* SLB-1 产脂肪酶的酶学性质

2.3.1 SLB-1 菌株产酶的最适培养时间

SLB-1 菌株产脂肪酶酶活整体呈现先上升后下降的趋势, 在 0~24 h 期间, 发酵上清液中脂肪酶酶活逐渐升高, 培养 24 h 时脂肪酶酶活达到峰值 5.67 U/mL, 随后随着培养时间的延长, 脂肪酶酶活呈下降趋势(图 5), 故初步确定 24 h 为该菌株产脂肪酶的最

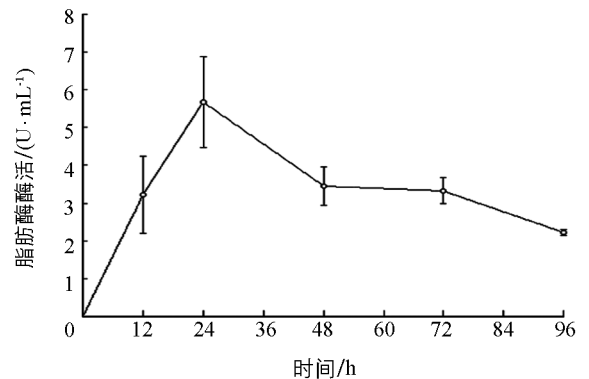


图 5 培养时间对 SLB-1 菌株产脂肪酶酶活的影响

适培养时间.

2.3.2 酶促反应的最适温度

SLB-1 菌株所产脂肪酶酶促反应的最适温度测定结果表明,该酶最适作用温度为 30 ℃,其酶活达到 13.22 U/mL. 超过 30 ℃后,脂肪酶酶活力急剧下降,直至 45 ℃时,脂肪酶完全失活(图 6),该实验结果表明该脂肪酶为常温酶,且其对酶促反应温度极为敏感. 由此结果可知,在研究 SLB-1 菌株产酶最佳时间时,由于选用酶促反应温度为 40 ℃,导致即使在最适培养时间 24 h,酶活亦仅为 5.67 U/mL.

2.3.3 酶促反应的最适 pH 值

SLB-1 菌株所产脂肪酶酶促反应的最适 pH 值研究结果表明,该酶酶促反应的最适 pH 值为 7.0,其酶活可达 21.22 U/mL,酶促反应 pH 值为 8.0 时,酶活仅为 5.22 U/mL(图 7),该结果表明 SLB-1 菌株产生的脂肪酶属于中性脂肪酶.

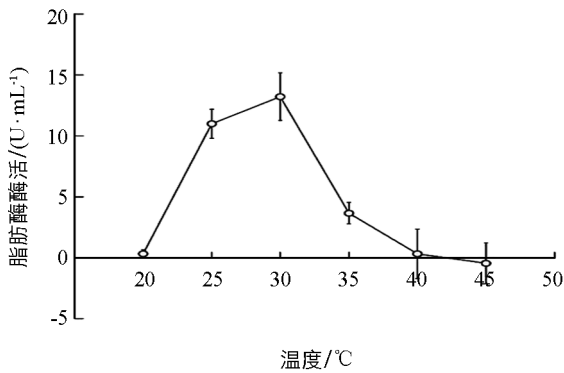


图 6 酶促反应温度对 SLB-1 菌株产脂肪酶酶活的影响

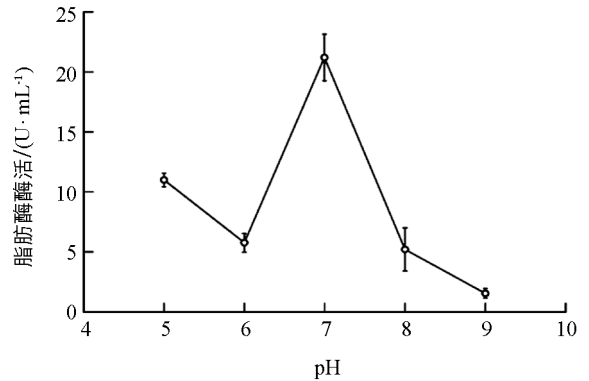


图 7 酶促反应 pH 值对 SLB-1 菌株产脂肪酶酶活的影响

3 讨论

含油污水是一种量大而面广的污染源,利用微生物对油脂降解进而治理含油污水是一种经济、高效且环保的可行办法^[28]. 本研究以猪油和三丁酸甘油酯为底物,从西南大学食堂附近富含油脂的土壤中筛选获得一株脂肪酶产生菌 SLB-1,根据其形态学特征、生理生化特性及基于 16S rDNA 的系统发育分析,将其鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*). 产生脂肪酶的微生物在自然界分布广泛,尤其是在种植大豆等农作物的富含植物油脂或食堂、厨房等附近排放废弃油脂的土壤或水体更容易筛选出脂肪酶活高产菌株^[29]. 近几十年来,随着脂肪酶在工业上的广泛运用,能够产生脂肪酶的微生物也不断被发现. 其中,有关枯草芽孢杆菌^[30-31]与假单胞菌属菌株^[32]生产脂肪酶的研究报道颇多,但有关甲基营养型芽孢杆菌产生脂肪酶却鲜见报道.

一般来说,细菌脂肪酶大多数为中性或碱性脂肪酶,且在 pH 值为 4~11、温度为 30 ℃~60 ℃的条件下具有良好的稳定性^[33-34]. 这与本研究的 SLB-1 菌株所产脂肪酶酶学性质实验结果一致,该菌株培养时间为 24 h 时上清液中脂肪酶酶活最高,其最适反应温度为 30 ℃,最适反应 pH 值为 7.0,属于常温中性脂肪酶. 该菌株在 30 ℃、pH=7.0 条件下的脂肪酶酶活为 21.22 U/mL,略高于伍康荣等筛选的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)在最佳培养基条件下的脂肪酶酶活(8.293 U/mL)^[32]以及张博等从土壤中筛选的假单胞菌属(*Pseudomonas sp.*)菌株在最适产酶条件下发酵脂肪酶所产生的酶活(15.5 U/mL)^[35]. 本研究以猪油与三丁酸甘油酯为油脂来源筛选得到脂肪酶生产菌 SLB-1 菌株,并对其脂肪酶的部分酶学性质进行探究,为后续优化 SLB-1 菌株产生脂肪酶的发酶条件奠定了前期研究基础,亦将有利于利用该菌株进行富含油脂工业废水及生活污水的环境治理.

参考文献:

- [1] 陈威,江小林,朱雷.我国餐饮废水处理方法及发展方向[J].工业安全与环保,2005,31(4):30-32.
- [2] 韩德军,潘丽梅.餐饮废水的微生物降解技术初步研究[J].东北师大学报(自然科学版),2009,41(2):182-185.
- [3] 于雅潇,薛伟,何南思.利用微生物发酵工业废水生产油脂的研究现状[J].品牌(下半月),2015(5):171.
- [4] 刘国防,梁志伟,杨尚源,等.油脂废水生物处理研究进展[J].应用生态学报,2011,22(8):2219-2226.
- [5] 童延斌,魏长庆.食品工业有机废水处理技术的研究进展[J].农产品加工,2009(5):34-36.
- [6] 王斐,罗登林,刘建学.微生物利用食品工业废水发酵产油脂的研究进展[J].中国粮油学报,2013,28(12):124-128.
- [7] 李振红,陆贻通.高效油脂分解菌的筛选[J].上海环境科学,2002,21(11):680-682.
- [8] 谢丹平,尹华,彭辉,等.混合菌对石油的降解[J].应用与环境生物学报,2004,10(2):210-214.
- [9] 赖万东,杨卓如,陈焕钦.油脂废水的生物降解研究[J].工业用水与废水,2000,31(4):21-23.
- [10] XIA J L, HUANG B, NIE Z Y, et al. Production and Characterization of Alkaline Extracellular Lipase from Newly Isolated Strain *Aspergillus Awamori* HB-03 [J]. Journal of Central South University of Technology, 2011, 18(5): 1425-1433.
- [11] 郭冉冉.高产脂肪酶菌株的筛选及酶学性质的研究[D].重庆:西南大学,2010:14-19.
- [12] 郭净,张根旺.脂肪酶的结构特征和化学修饰[J].中国油脂,2003,28(7):5-10.
- [13] 李雪玲,陈智明,周伟坚.脂肪酶产生菌的筛选及不同保藏方法对其产酶活性的影响[J].食品科技,2015,40(3):2-6.
- [14] 刘雅琴,任玉锋,周杰,等.脂肪酶产生菌的分离筛选及菌株鉴定[J].食品研究与开发,2014,35(17):103-106.
- [15] 董磊,李姜维,杨彩云,等.红树林土壤中脂肪酶产生菌的筛选及酶学性质[J].厦门大学学报(自然科学版),2010,49(4):570-573.
- [16] 徐新磊,秦雯娜,杨永帅,等.一株产脂肪酶海洋细菌的筛选、鉴定及其酶学性质[J].四川农业大学学报,2015,33(2):174-180.
- [17] 胡长浩,施文芳,沈麟,等.脂肪酶菌种的筛选、鉴定及酶学性质研究[J].生物技术,2009,19(2):53-57.
- [18] 赵喜云,张杰,熊文,等.产脂肪酶中度嗜盐菌 ZF-03 的分离鉴定与酶学性质研究[J].安徽农业科学,2014,42(4):1138-1140.
- [19] 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.
- [20] 王继华,李凤敏,彭丽杰,等.低温高效油脂降解菌的分离筛选驯化[J].微生物学通报,2009,36(12):1916-1920.
- [21] 沈萍,陈向东.微生物实验[M].4版.北京:高等教育出版社,2013:81-84.
- [22] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译.8版.北京:科学出版社,1984:729-758.
- [23] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:370-398.
- [24] 张飞官,高雅慧,任慧爽,等.桑疫病病原拮抗菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J].微生物学报,2013,53(12):1285-1294.
- [25] XIE J, STROBEL G A, FENG T, et al. An Endophytic Coniochaeta Velutina Producing Broad Spectrum Antimycotics [J]. J Microbiol, 2015, 53(6): 390-397.
- [26] 江慧芳,王雅琴,刘春国.三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进[J].化学与生物工程,2007,24(8):72-75.
- [27] DUNLAP C A, KIM S J, KWON S W, et al. *Bacillus velezensis* is Not a Later Heterotypic Synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* Subsp Plantarum and '*Bacillus oryzicola*' Are Later Heterotypic Synonyms of *Bacillus velezensis* Based on Phylogenomics [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66: 1212-1217.
- [28] 滕农,徐虹,欧阳平凯.油脂废水生物治理法[J].南京化工大学学报(自然科学版),1999,21(3):58-61.
- [29] 朱俊任,郑旭煦,李强,等.不同来源脂肪酶催化制备生物柴油的研究进展[J].中国农学通报,2010,26(4):318-322.
- [30] 李璟,兰贵红,张飞伟,等.产脂肪酶微生物的筛选鉴定及脂肪酶 lipA 基因克隆[J].广东农业科学,2012,(17):

138-142.

- [31] 赵 博, 陶 进, 马吉胜, 等. 定向进化提高枯草芽孢杆菌脂肪酶的活力 [J]. 催化学报, 2009, 30(4): 291-296.
- [32] 伍康荣, 邓璐璐, 杨锐旺, 等. 脂肪酶产生菌的分离、鉴定及其发酵条件优化 [J]. 广东农业科学, 2012, 39(17): 100-102.
- [33] 周 晶. 一株脂肪酶产生菌的筛选鉴定、发酵条件优化及其酶学性质研究 [D]. 杭州: 中国计量学院, 2012: 47-52.
- [34] 汪小锋, 王 俊, 杨江科, 等. 微生物发酵生产脂肪酶的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2008, (4): 47-53.
- [35] 张 搏, 杨江科, 苏华武, 等. 脂肪酶产生菌的筛选、鉴定及其产酶条件优化 [J]. 生物技术, 2007, 17(1): 23-26.

Research on Screening and Identification of a Lipase-Producing Bacterial Strain and Its Enzymatic Properties

XU Wei-fang, HUANG Tao-yang, ZHOU Min,
FANG Xiang, WANG Fei, LIU Feng-dan, XIE Jie

School of Biotechnology, Southwest University/State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Chongqing 400715, China

Abstract: In order to screen out efficient lipase-producing microorganisms, which can be used in the treatment of oily water generated from industry and oil-rich waste water discharge of daily life, microorganisms were isolated from the soil collected from the areas around a campus cafeteria, and high-yield lipase-producing strains were screened by the neutral red grease plate screening method and the tributyrin transparent circle method. Then, a high-yield lipase-producing strain was identified based on its morphological, physiological and biochemical characteristics and molecular analysis. Moreover, enzymatic properties of lipase, including enzymatic reaction temperature, pH and so on, were explored through the acid-base titration method for the quantitative determination of the lipase activity. The results indicated that the high-yield lipase-producing strain SLB-1 was screened out. SLB-1 was a strain of Gram-positive *Bacillus*, capable of hydrolyzing starch and liquefying gelatin. Phylogenetic analysis results based on the 16S rDNA sequences indicated that SLB-1 existed in the same minimum clade with *B. methylotrophicus* (accession Number: NR116240). Therefore, SLB-1 strain was identified to be *B. methylotrophicus*, which was named as *B. methylotrophicus* SLB-1. The optimal incubation time for *B. methylotrophicus* SLB-1 to produce lipase was 24 h, the optimal temperature of the enzymatic reaction was 30 °C, and the optimum enzymatic reaction pH value was 7.0. In the study, a high-yield lipase-producing strain *B. methylotrophicus* SLB-1 was isolated, and the lipase produced by this strain was a neutral-pH and room-temperature enzyme.

Key words: lipase-producing bacteria; screening; strain identification; enzymatic property

责任编辑 潘春燕

