

基于高含油废水降解的产脂肪酶菌株的 筛选及发酵工艺优化

张羽^{1,2}, 王群^{1,2}, 杨雪花^{1,2}, 刘焯焯^{1,2}, 曾祥勇^{1,2}

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵阳 550025)

摘要:为了筛选高产脂肪酶菌株并探究其对高含油废水的降解能力,采用传统的微生物筛选法从餐厨废水中分离筛选菌株,考察菌株对高含油废水(油脂含量 20 g/L)的油脂降解率和产脂肪酶酶活,并对产脂肪酶酶活较高的菌株进行鉴定。采用单因素实验和响应面实验对鉴定菌株发酵产脂肪酶的工艺条件进行优化。结果表明:从餐厨废水中筛选出 3 株细菌、2 株酵母菌,其中 2 株细菌可在高含油废水中快速生长代谢,油脂降解率和产脂肪酶酶活均较高,经鉴定 1 株为解淀粉芽孢杆菌(Bi),1 株为鲁氏不动杆菌(Bu);Bi 产脂肪酶最优发酵工艺条件为 pH 6.69、氯化钠含量 3.01 g/L、蛋白胨含量 6.01 g/L;Bu 产脂肪酶最优发酵工艺条件为 pH 5.07、氯化钠含量 6.10 g/L、蛋白胨含量 9.38 g/L;在最优发酵工艺条件下,Bi 和 Bu 产脂肪酶酶活分别为(222.83 ± 0.91)U/mL 和(231.50 ± 2.28)U/mL,优化后的 Bu 产脂肪酶酶活甚至高于初始脂肪酶酶活更高的 Bi。综上,2 株细菌具有高含油废水降解能力,具备广阔的应用前景。

关键词:高含油废水;脂肪酶;解淀粉芽孢杆菌;鲁氏不动杆菌;油脂降解菌;酶学性质;响应面法

中图分类号:Q55; TQ426 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)07-0075-08

Screening of lipase – producing strains based on the degradation of highly oily wastewater and optimization of fermentation process

ZHANG Yu^{1,2}, WANG Qun^{1,2}, YANG Xuehua^{1,2},
LIU Yelan^{1,2}, ZENG Xiangyong^{1,2}

(1. College of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China;
2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Fermentation and Biopharmacy, Guizhou University,
Guiyang 550025, China)

Abstract: In order to screen high lipase – producing strains and explore the ability to degrade highly oily wastewater, the traditional microbial screening method was used to select the strains from the kitchen wastewater, and the oil degradation rate of highly oily wastewater (oil content 20 g/L) and the lipase activity of the selected strains were studied. Strains with higher lipase production activity were identified. Furthermore, single factor experiment and response surface methodology were employed to optimize the

收稿日期:2023-04-07;修回日期:2024-04-01

基金项目:贵州大学国家级大学生创新创业训练计划项目(202110657022);国家自然科学基金地区项目(32260580);贵州省科技厅基础研究一般项目(黔科合基础-ZK[2021]一般180);中国轻工业浓香型白酒固态发酵重点实验室开放基金项目(2019JJ015)

作者简介:张羽(2001),女,在读本科,酿酒工程专业(E-mail)yuz2023@163.com。

通信作者:曾祥勇,副教授,博士(E-mail)xyzeng1@gzu.edu.cn。

fermentation conditions for lipase production of the identified strains. The results indicated that three bacterial strains and two yeast strains were screened from kitchen wastewater, two bacteria grew and metabolized rapidly in highly oily wastewater, and the oil degradation rate and lipase activity were higher, which were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* (Bi) and *Acinetobacter lwoffii* (Bu), respectively. The optimal fermentation conditions for lipase

production by Bi were pH 6.69, NaCl content 3.01 g/L, peptone content 6.01 g/L, and lipase activity was (222.83 ± 0.91) U/mL, while that of Bu were pH 5.07, NaCl content 6.10 g/L, peptone content 9.38 g/L, and the lipase activity was (231.50 ± 2.28) U/mL. The lipase activity of Bu after optimization even higher than that of Bi, which had a greater initial lipase activity. In conclusion, these two bacterial strains show a high biodegradation performance for highly oily wastewater, and they have a wide application prospect.

Key words: highly oily wastewater; lipase; *Bacillus amyloliquefaciens*; *Acinetobacter lwoffii*; oil-degrading bacteria; enzymatic property; response surface methodology

随着我国经济水平的不断提高,餐饮业逐步扩大,排放的餐饮废水也随之增多。餐饮废水是一种量大而面广的污染源,若不经处理直接排放到环境中不仅会污染水体,还易造成输送管道堵塞^[1]。目前用于含油废水处理的方法有物理法、化学法和生物法,其中:物理法包括重力分离、膜过滤、树脂吸附等方法,需要借助特殊设备分离油脂,存在油脂分离效率低的问题;化学法包括过氧化氢氧化、溶剂萃取等方法,需要化学试剂与污水中物质发生化学反应,存在成本高、易对环境造成二次污染且反应产物难以降解的问题^[2-3];而生物法处理含油废水具有操作简便、成本低和不产生二次污染等优点。生物法主要是通过微生物产生脂肪酶从而对油脂进行降解,脂肪酶是一种特殊的甘油三酯水解酶,可使甘油三酯水解为甘油二酯、单甘油酯、甘油和脂肪酸,并且能催化水解、酯化和醇解反应。脂肪酶主要来源于动物、植物和微生物等。其中,微生物来源的脂肪酶具有能催化更多反应,产量高,遗传操作简便,更稳定、安全、方便等优点;另外,原料微生物存在生长速率快、不受季节影响、可全年供应等优点^[4]。因此,分离筛选出高脂肪酶酶活且性能稳定的微生物对环境和食品工业等领域有重要应用意义。

产脂肪酶微生物包括细菌、酵母菌和霉菌^[5],其中细菌有不动杆菌、芽孢杆菌、假单胞菌、微杆菌等,酵母菌有解脂耶氏酵母、皱褶假丝酵母、毕赤酵母、红酵母等,霉菌有根霉、曲霉、青霉等^[6-10]。然而,微生物天然菌株往往降解油脂和产酶能力不强,需通过进一步的手段对产脂肪酶菌株酶活进行优化。响应面优化作为一种传统方法,在有效减少实验次数的基础上,仍能对实验相关参数进行合理优化并得到较好的优化结果^[11-14]。景智波等^[11]采用响应面法优化乳酸菌产脂肪酶酶活,在最佳发酵条件下乳酸菌 TR1-1-3 的酶活为 10.92 U/mL,较优化前有所提高;Amin 等^[12]利用响应面法提高青霉产脂肪酶酶活,在优化的工艺条件下菌株产脂肪酶酶活

可达 1 038.86 U/g,较优化前提高了 2.05 倍。可见,在传统优化方法下脂肪酶酶活有较大的提高。

虽然之前的研究中获得了产脂肪酶能力高的菌株,且有微生物实现了工业化生产^[5],然而,之前的研究主要是以低含油废水为底物,分离筛选出的油脂降解菌也主要是针对低含油废水发挥效果,针对高含油废水的高效降解菌种类较少,且适用性较差,应用受限。另外,脂肪酶高产菌在实际环境中常常因为适应性差、分散不足或存在抑制剂等情况导致其效果大大减弱^[15]。因此,本研究将从自然环境中分离筛选脂肪酶高产菌,综合考察菌株的油脂降解率和脂肪酶活力,并利用单因素实验和响应面实验对菌株的发酵产脂肪酶工艺条件进行优化,以期开发出能有效降解高浓度油脂的产脂肪酶菌株,为高含油废水的微生物降解提供潜力菌株。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品

质量分数 10% 的污泥样品,由从贵州大学周边餐馆厨房污水排放沟多个位置取的含油污水和污泥混合制成。

1.1.2 主要试剂

牛肉膏、琼脂粉、酵母浸出粉,北京索莱宝科技有限公司;蛋白胨、氯化钠、无水乙醇,成都科龙化工试剂厂;对硝基苯酚、棕榈酸对硝基苯酯,上海易恩化学技术有限公司。

1.1.3 培养基

改良 R2A 培养基^[16]:氯化铵 0.8 g、硝酸钾 0.505 g、酪蛋白水解物 0.5 g、葡萄糖 0.5 g、蛋白胨 0.5 g、丙酮酸钠 0.5 g、可溶性蛋白 0.5 g、酵母浸出粉 0.5 g、K₂HPO₄ 0.4 g、KH₂PO₄ 0.25 g、MgCl₂·6H₂O 20.0 mg、CaCl₂·2H₂O 15.0 mg、FeSO₄·7H₂O 7.0 mg、MnCl₂·4H₂O 5.0 mg、Na₂SO₄ 5.0 mg、CoCl₂·6H₂O 0.5 mg、H₃BO₃ 0.5 mg、NiSO₄·6H₂O

0.5 mg、ZnCl₂ 0.5 mg、CuCl₂ · 2H₂O 0.3 mg、Na₂MoO₄ · 2H₂O 10.0 μg、琼脂 15 ~ 20 g、蒸馏水 1.0 L, 121℃ 高压灭菌 15 min, pH 7.0 ± 0.2; 加入 10% 污泥样品浸出液(1 g 污泥样品于 100 mL 带有玻璃珠的无菌水中, 摇床振荡 4 ~ 5 h 后用 0.2 μm 膜过滤除菌得到), 混匀。

NA 培养基: 牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 15 ~ 20 g、蒸馏水 1.0 L, pH 7.0 ± 0.2, 121℃ 高压灭菌 15 min。

YPD 培养基: 葡萄糖 20 g、蛋白胨 10 g、酵母浸粉 5 g、琼脂 14 g、蒸馏水 1.0 L, pH 6.0 ~ 6.6, 121℃ 高压灭菌 15 min。

NA/YPD 中性红培养基: 于 NA/YPD 培养基中加入 1.6% 中性红水溶液 1 mL、菜籽油 10 mL。

三丁酸甘油酯培养基^[17]: 于 NA/YPD 培养基中加入 40 mL 三丁酸甘油酯乳化液(三丁酸甘油酯与 20 g/L 的聚丙烯醇溶液体积比 1:3)、14 g 琼脂, 121℃ 灭菌 20 min。

细菌产酶培养基^[17]: 蛋白胨 10 g、酵母浸粉 5 g、氯化钠 5 g、菜籽油乳化液(菜籽油与 20 g/L 的聚丙烯醇溶液体积比 1:3) 40 mL、蒸馏水 1.0 L, 121℃ 灭菌 20 min。

真菌产酶培养基^[17]: 蛋白胨 10 g、酵母浸粉 5 g、葡萄糖 5 g、菜籽油乳化液 40 mL、蒸馏水 1.0 L, 121℃ 灭菌 20 min。

降解培养基: (NH₄)₂SO₄ 2.0 g、K₂HPO₄ 2.0 g、NAH₂PO₄ 2.0 g、NaCl 5.0 g、菜籽油 20 g、蒸馏水 1.0 L, pH 自然, 121℃ 灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的初筛

无菌条件下称取一定量污泥样品分别用无菌水稀释至梯度 10⁻²、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 的稀释液。分别吸取 100 μL 不同梯度的稀释液至改良 R2A 培养基(加入中性红、菜籽油, 添加量同中性红培养基, 培养细菌)、NA 中性红培养基(培养细菌)、YPD 中性红培养基(培养酵母菌)平板中进行涂布, 将涂布后的平板分别于恒温培养箱(细菌 37℃, 酵母菌 30℃)中培养一定时间(细菌 12 h, 酵母菌 48 h)。观察平板上菌落周围是否变红, 以定性判断菌株是否有产脂肪酶的能力, 挑取不同形态的变红菌株于对应平板划线纯化 2 ~ 3 次, 纯化条件同前。

1.2.2 菌株的复筛

将纯化后的菌株接种于细菌或真菌产酶培养基中, 30℃、180 r/min 振荡培养 72 h 获取上清液, 用打孔器在三丁酸甘油酯平板打 3 个大小均匀的孔,

注入 50 μL 上清液^[17], 于恒温培养箱中培养 72 h, 观察并用游标卡尺测量透明圈直径(菌落周围出现透明圈表明具有胞外脂肪酶活性)及菌落直径, 取透明圈与菌落直径比值较大的菌株进行油脂降解率和酶活测定。

1.2.3 菌株产脂肪酶发酵工艺

将复筛后的菌株活化后, 按体积比的 10% 接入细菌/真菌产酶培养基中, 30℃、180 r/min 振荡培养 48 h, 在 3 330 × g 下离心 5 min, 获得的发酵上清液即为粗酶液。

1.2.4 油脂降解率测定

标准曲线的绘制: 参照文献[18]的方法, 以稻米油为溶质, 将其用石油醚配制质量浓度分别为 0.2、0.6、1.0、1.4、1.6 mg/mL 的溶液, 在 230 nm 波长下测定不同质量浓度稻米油溶液的吸光度, 绘制稻米油溶液质量浓度(x)与吸光度(y)的关系曲线, 拟合得到的标准曲线方程为 $y = 1.111x + 0.005744$, $R^2 = 0.9964$ 。

将复筛后的菌株经培养接种于液体培养基(细菌, 营养肉汤; 酵母菌, YPD)中摇床培养 24 h, 得到种子液, 按接种量 10% (以培养基的体积计) 接入降解培养基中, 在 30℃、180 r/min 条件下分别摇床培养 24、48、72 h 后, 取上清液, 分别加入石油醚萃取 2 次, 合并萃取液, 用石油醚定容至 25 mL, 在 230 nm 波长下测定不同培养时间下的吸光度, 代入标准曲线方程中计算油脂质量浓度。根据式(1)计算油脂降解率(P)。

$$P = \frac{c - c_{\text{test}}}{c} \times 100\% \quad (1)$$

式中: c 为培养基中初始油脂质量浓度, mg/mL; c_{test} 为培养后培养基中剩余油脂质量浓度, mg/mL。

1.2.5 酶活测定

脂肪酶酶活定义: 在一定条件下, 将每分钟产生 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。采用对硝基苯酚(p-NP)法进行酶活测定。取 2 根试管, 分别为对照管和样品管, 加入 20 μL 3 mg/mL 的棕榈酸对硝基苯酯(p-NPP)异丙醇溶液和 780 μL Tris-HCl 缓冲液, 于 37℃ 水浴锅中预热 5 min, 然后在对照管中加入 200 μL 已灭酶的粗酶液, 样品管中加入 200 μL 粗酶液, 准确反应 10 min, 立即加入 1 mL 三氯乙酸终止反应, 5 min 后加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 至 8.0, 于 410 nm 处测定吸光度, 代入 p-NP 标准曲线方程(参照文献[19]绘制)中计算 p-NP 浓度, 根据式(2)计算

酶活。

$$X = \frac{cV}{tV' \times 1000} \quad (2)$$

式中: X 为脂肪酶酶活, U/mL; c 为 p -NP 浓度, $\mu\text{mol/L}$; V 为反应液终体积, mL; t 为反应时间, min; V' 为粗酶液用量, mL。

1.2.6 脂肪酶高产菌株的鉴定

肉眼观测产脂肪酶酶活较高菌株的形态学特征。

分子生物学鉴定: 采用冻融法提取目的菌株的基因组, 以总 DNA 为模板, 以细菌通用引物 27F(5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3') 和 1492R(5' - TACGGYTACCTTGTTACGACTT - 3') 为引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系: 基因组 DNA 2 μL , 2 \times Taq PCR MasterMix II 25 μL , 上游引物 27F 1 μL , 下游引物 1492R 1 μL , ddH₂O 21 μL 。反应参数: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 维持。参照文献[20]采用琼脂糖凝胶电泳验证目的片段。外送测序, 所得序列通过 BLAST 比对进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

经过初筛, 共分离筛选出了 8 株细菌和 6 株酵母菌。进一步复筛得到 3 株细菌(Bu、Bi 和 Bh)、2 株酵母菌(Yl、Yk), Bu、Bi、Bh、Yl、Yk 的透明圈直径与菌落直径比值分别为 3.56 ± 0.04 、 1.95 ± 0.35 、 2.32 ± 0.09 、 2.39 ± 0.03 、 2.10 ± 0.05 。

2.2 油脂降解率

筛选的 5 株菌株在 24、48、72 h 的油脂降解率如图 1 所示。

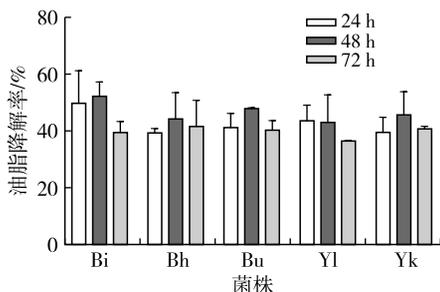


图 1 产脂肪酶菌株在 24、48、72 h 的油脂降解率

由图 1 可看出: 3 株细菌的油脂降解率均在培养 48 h 时达到最大, 其中菌株 Bi 的最高, 达到 52.22%, 其次是 Bu, 油脂降解率达 48.95%, Bh 的最低; 酵母菌 Yl 的油脂降解率在培养 24 h 时达到最大, 为 43.58%, 之后随培养时间延长呈下降趋势, Yk 的

油脂降解率在培养 48 h 时最高, 达到 45.66%。

总的来说, 3 株细菌的最高油脂降解率均高于 2 株酵母菌, 说明本研究分离筛选的细菌具有更强的油脂降解能力, 且适合 3 株细菌作用的时间为 48 h, 可在较短时间内达到最大降解效果。孟卓妮^[18]在初始油脂质量浓度为 20 g/L 下, 得到菌株的油脂降解率为 39.5%。通过对比发现, 本研究筛选的菌株 Bi 和 Bu 针对高含油废水(20 g/L)仍具有更高的油脂降解率, 且 2 株菌株具有很好的生存能力和稳定性, 具有实际应用潜力。

2.3 脂肪酶酶活

5 株菌株产脂肪酶酶活测定结果如图 2 所示。

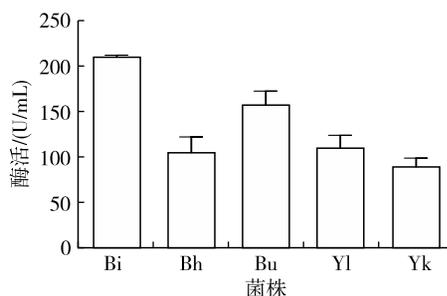


图 2 3 株细菌和 2 株酵母菌的脂肪酶酶活

由图 2 可看出, 5 株菌株产脂肪酶酶活分别为 Bi (209.88 ± 0.88) U/mL、Bu (157.09 ± 10.96) U/mL、Bh (104.59 ± 12.34) U/mL、Yl (109.61 ± 10.04) U/mL、Yk (89.08 ± 6.85) U/mL。可以看出, 菌株 Bi 的脂肪酶酶活最高, 且细菌的酶活总体高于酵母菌的, 与刘国防等^[21]报道的细菌脂肪酶酶活低于酵母菌的结论并不一致, 这可能是因为在不同环境中筛选得到的油脂降解菌菌株不同, 其产脂肪酶酶活也有所差异。根据酶活力大小选取 Bu 和 Bi 进行菌株鉴定和脂肪酶酶活优化。

2.4 脂肪酶菌株的鉴定

菌株 Bi、Bu 菌落形态如图 3 所示。

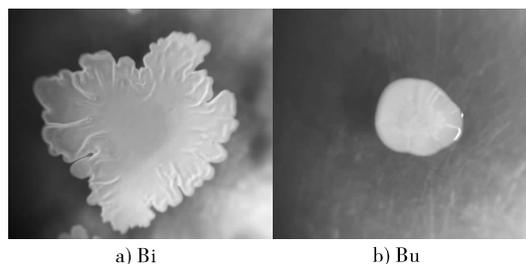


图 3 菌株 Bi、Bu 菌落形态

由图 3 可以看出: 菌株 Bi 形状似花瓣不规则、表面干燥无光泽、扁平呈不透明状态; 菌株 Bu 形状为卵圆形、表面光滑有光泽、凸起呈不透明状态。

分子生物学鉴定结果表明: 菌株 Bi 与解淀粉芽

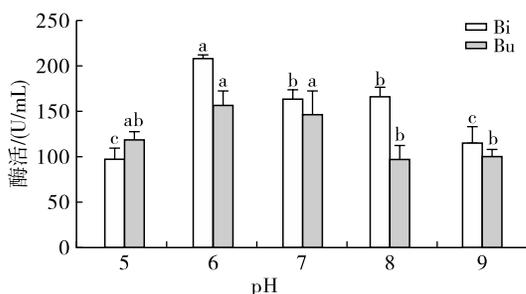
孢杆菌同源性最高,为99.86%;菌株Bu与鲁氏不动杆菌同源性达99.79%。因此,确定菌株Bi为解淀粉芽孢杆菌,菌株Bu为鲁氏不动杆菌。已有研究报道了部分不动杆菌和芽孢杆菌具有油脂降解能力^[6],如:詹亚斌等^[22]从餐厨垃圾高温期堆肥中分离出2株耐高温油脂降解菌,分别归属于枝芽孢杆菌属和芽孢杆菌属,油脂降解率分别为30.40%和27.45%;贾群超等^[23]从受原油污染的土壤中筛选到2株对稠油有降解作用的不动杆菌GS02和GS07,二者对1 g/L稠油5 d的降解率分别可达到45.3%和46.1%。但关于解淀粉芽孢杆菌和鲁氏不动杆菌产脂肪酶的研究不多见,在少有几篇报道中,Kanmani等^[24]获得的解淀粉芽孢杆菌产脂肪酶酶活最大为28.81 U/mL,鲁氏不动杆菌产脂肪酶未见报道。总体而言,芽孢杆菌和不动杆菌都是产脂肪酶的潜力菌株,还需从自然界中分离筛选出尽可能多的种类,从而为开发产脂肪酶菌株提供更多可能性。

含油废水成分复杂,常含抗生素和清洁剂等物质,且易受外界环境影响,往往导致高产菌株在实际生产应用中效果大打折扣,制约了其应用。生物膜具有抵御强酸、抗生素、清洁剂和渗透压等不良环境的优良特性^[25],同时,相比于浮游态或非产膜微生物,生物膜中的胞外聚合物兼具固定化载体和为膜内微生物提供营养物质的特性^[26],而许多芽孢杆菌如枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌等均能够产生生物膜。生物膜将有助于提高解淀粉芽孢杆菌在实际含油废水处理中的适应性和稳定性^[27-28]。

2.5 菌株产脂肪酶发酵工艺单因素实验

2.5.1 pH对菌株的脂肪酶酶活的影响

按照1.2.3粗酶液的制备方法,固定其他培养条件不变,将细菌产酶培养基初始pH控制为5、6、7、8、9,振荡培养48 h测定酶活,考察pH对菌株Bi、Bu产脂肪酶酶活的影响,结果见图4。



注:不同字母表示同一菌株具有显著差异($p < 0.05$)。下同

图4 pH对菌株Bi、Bu产脂肪酶酶活的影响

由图4可以看出,当产酶培养基的初始pH在

6~8之间时,Bi产脂肪酶酶活较高,酶活均大于150 U/mL,且当培养基初始pH为6时,Bi产脂肪酶酶活最高,达209.88 U/mL,当pH小于6和pH大于8时,该菌株产脂肪酶酶活较低,说明该菌株在酸性和碱性条件下所产脂肪酶酶活有所降低。当培养基的初始pH为6时,Bu产脂肪酶酶活最高,达177.6 U/mL,且该菌株在pH为7时所产脂肪酶酶活也较高,说明该菌株在中性、中性偏酸环境下具有良好的适应能力。结果表明,本研究筛选到的2株细菌都在中性偏酸的环境下所产脂肪酶酶活更高,目前大多数油脂降解菌包括细菌、酵母菌等的培养条件pH为中性偏酸,与本研究结果一致,并且餐饮废水pH一般为6~7^[29],属于中性偏酸环境,因此推测本研究分离的菌株在餐饮废水中的生存能力和适应性相对会更强。

2.5.2 氯化钠含量对菌株的脂肪酶酶活的影响

按照1.2.3粗酶液的制备方法,固定其他培养条件不变,将细菌产酶培养基中氯化钠含量控制在3、4、5、6、7 g/L,振荡培养48 h测定酶活,考察氯化钠含量对菌株Bi、Bu产脂肪酶酶活的影响,结果见图5。

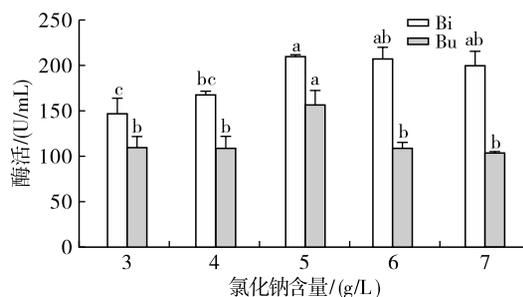


图5 氯化钠含量对菌株Bi、Bu产脂肪酶酶活的影响

由图5可以看出,随产酶培养基中初始氯化钠含量增大,Bi产脂肪酶酶活先增大,在氯化钠含量为5 g/L时,脂肪酶酶活达到最大,为209.88 U/mL,之后随着氯化钠含量继续增大,Bi产脂肪酶酶活略有降低,但与氯化钠含量为5 g/L时无显著差异。氯化钠含量为5 g/L时,Bu产脂肪酶酶活最大,达到177.1 U/mL,而氯化钠含量小于或大于5 g/L时,该菌株产脂肪酶酶活显著下降。

2.5.3 蛋白胨含量对菌株的脂肪酶酶活的影响

按照1.2.3粗酶液的制备方法,固定其他培养条件不变,将细菌产酶培养基氮源(蛋白胨)含量控制在6、8、10、12、14 g/L,振荡培养48 h测定酶活,考察蛋白胨含量对菌株Bi、Bu产脂肪酶酶活的影响,结果见图6。

由图6可以看出,随着蛋白胨含量增加,Bi产脂肪酶酶活先有微弱上升,而后呈下降趋势,在蛋白

胨含量为 8 g/L 时, Bi 产脂肪酶酶活最大, 达 209.88 U/mL。随着蛋白胨含量增加, Bu 产脂肪酶酶活呈先升高后降低再升高趋势, 在蛋白胨含量为 10 g/L 时, Bu 产脂肪酶酶活最大, 达 157.1 U/mL, 而在蛋白胨含量为 12 g/L 时, 该菌株产脂肪酶酶活最低。

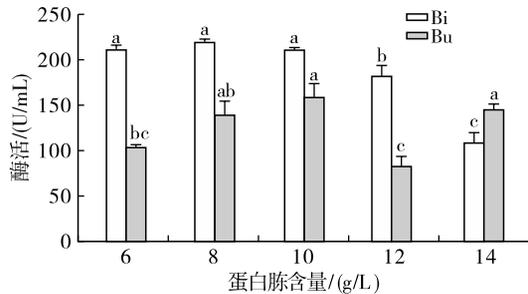


图6 蛋白胨含量对菌株 Bi、Bu 产脂肪酶酶活的影响

2.5.4 接种量对菌株的脂肪酶酶活的影响

按照 1.2.3 粗酶液的制备方法, 固定其他培养条件不变, 将接种量控制在 1%、3%、5%、7%、10%, 振荡培养 48 h 测定酶活, 考察接种量对菌株 Bi、Bu 产脂肪酶酶活的影响, 结果见图 7。

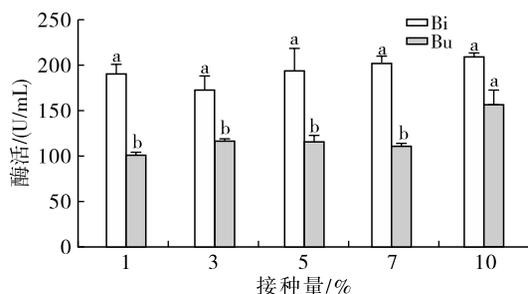


图7 接种量对菌株 Bi、Bu 产脂肪酶酶活的影响

由图 7 可以看出: 接种量在 1% ~ 10% 之间时, Bi 产脂肪酶酶活无显著变化, 且始终保持在较高水平, 接种量为 3% 时该菌株产脂肪酶酶活最低; 在接种量 1% ~ 7% 范围内 Bu 产脂肪酶酶活无显著变化, 接种量在 10% 时其产脂肪酶酶活显著增大, 达 157.1 U/mL。

2.6 菌株产脂肪酶发酵工艺响应面实验优化

2.6.1 模型方程的建立与显著性检验

根据单因素实验结果, 固定接种量为 10%, 选取 pH(A)、氯化钠含量(B)、蛋白胨含量(C)为自变量, 菌株产脂肪酶酶活为考察指标, 使用 Design - Expert 8.0.6 软件设计三因素三水平实验共 17 个实验点的 Box - Behnken 中心组合实验, 对菌株 Bi、Bu 产脂肪酶发酵条件进行优化。响应面实验因素和水平见表 1, Bi 及 Bu 产脂肪酶酶活响应面实验设计及结果见表 2。

表1 响应面实验因素和水平

| 水平 | A pH | B 氯化钠含量/(g/L) | C 蛋白胨含量/(g/L) |
|----|------|---------------|---------------|
| -1 | 5 | 3 | 6 |
| 0 | 7 | 5 | 10 |
| 1 | 9 | 7 | 14 |

表2 Bi 及 Bu 产脂肪酶酶活响应面实验设计及结果

| 实验号 | A | B | C | 酶活/(U/mL) | |
|-----|----|----|----|--------------|----------------|
| | | | | Bi 产脂肪酶 | Bu 产脂肪酶 |
| 1 | 0 | -1 | 1 | 139.7 ± 3.4 | 96.83 ± 3.43 |
| 2 | 0 | -1 | -1 | 230.1 ± 2.3 | 55.28 ± 1.37 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 198.0 ± 1.4 | 143.85 ± 3.20 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 192.7 ± 3.0 | 138.37 ± 13.24 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 199.1 ± 5.6 | 140.65 ± 4.64 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 190.9 ± 6.4 | 151.61 ± 10.24 |
| 7 | 0 | 1 | 1 | 182.7 ± 1.8 | 63.05 ± 6.72 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 200.3 ± 13.4 | 182.44 ± 3.89 |
| 9 | 0 | 1 | -1 | 170.6 ± 2.0 | 120.57 ± 8.67 |
| 10 | -1 | -1 | 0 | 175.4 ± 14.2 | 168.50 ± 5.93 |
| 11 | -1 | 0 | -1 | 188.1 ± 2.7 | 208.68 ± 9.59 |
| 12 | -1 | 1 | 0 | 166.7 ± 9.6 | 230.43 ± 5.48 |
| 13 | -1 | 0 | 1 | 161.7 ± 8.2 | 218.26 ± 3.65 |
| 14 | 1 | -1 | 0 | 151.6 ± 3.7 | 171.70 ± 8.67 |
| 15 | 1 | 0 | 1 | 116.9 ± 4.3 | 104.13 ± 0.91 |
| 16 | 1 | 1 | 0 | 125.1 ± 9.2 | 50.26 ± 1.83 |
| 17 | 1 | 0 | -1 | 144.2 ± 22.7 | 129.24 ± 8.67 |

采用响应面分析法分析实验结果, 对各因素进行回归拟合后, 得到以 Bi 产脂肪酶酶活(Y_1)为响应值的回归方程为 $Y_1 = 196.20 - 19.25A - 6.46B - 16.52C - 4.46AB - 0.21AC + 25.61BC - 34.78A^2 - 6.72B^2 - 8.69C^2$, 以 Bu 产脂肪酶酶活(Y_2)为响应值的回归方程为 $Y_2 = 151.38 - 46.32A - 3.50B - 3.94C - 45.84AB - 8.67AC - 24.77BC + 42.49A^2 - 38.65B^2 - 28.80C^2$ 。

Bi 和 Bu 产脂肪酶酶活模型的方差分析结果分别见表 3 和表 4。

由表 3 可知: 该模型极显著 ($p < 0.01$), 模型失拟项 p 值为 0.1249, 大于 0.05, 表示数学模型拟合良好; 同时, 模型校正决定系数 (R_{Adj}^2) 为 0.9593, 表明有约 95.93% 的酶活变化能由此模型进行解释; 模型相关系数 (R^2) 为 0.9822, 表明酶活的实测值与预测值之间具有较好的拟合优度, 实验误差小, 证明该数学模型可靠。综合上述分析可知, 本实验模型可靠有效, 具有实践意义。各因素中一次项 A、C, 交互项 BC, 二次项 A^2 影响极显著, 一次项 B、二次项 C^2 影响显著。

表3 Bi产脂肪酶活模型的方差分析

| 项目 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F | p |
|----------------|-----------|-----|----------|-----------|-------------|
| 模型 | 14 096.74 | 9 | 1 566.30 | 42.93 | <0.000 1 ** |
| A | 2 963.77 | 1 | 2 963.77 | 81.23 | <0.000 1 ** |
| B | 334.11 | 1 | 334.11 | 9.16 | 0.019 2 * |
| C | 2 183.03 | 1 | 2 183.03 | 59.83 | 0.000 1 ** |
| AB | 79.73 | 1 | 79.73 | 2.19 | 0.182 9 |
| AC | 0.17 | 1 | 0.17 | 4.79E-003 | 0.946 7 |
| BC | 2 622.89 | 1 | 2 622.89 | 71.89 | <0.000 1 ** |
| A ² | 5 091.91 | 1 | 5 091.91 | 139.55 | <0.000 1 ** |
| B ² | 190.19 | 1 | 190.19 | 5.21 | 0.056 4 |
| C ² | 318.23 | 1 | 318.23 | 8.72 | 0.021 3 * |
| 残差 | 255.41 | 7 | 36.49 | | |
| 失拟项 | 186.10 | 3 | 62.03 | 3.58 | 0.124 9 |
| 纯误差 | 69.31 | 4 | 17.33 | | |
| 总和 | 14 352.15 | 16 | | | |

注: * 差异显著, $p < 0.05$; ** 差异极显著, $p < 0.01$ 。下同

表4 Bu产脂肪酶活模型的方差分析

| 项目 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F | p |
|----------------|-----------|-----|-----------|-------|------------|
| 模型 | 45 208.51 | 9 | 5 023.17 | 14.80 | 0.000 9 ** |
| A | 17 163.14 | 1 | 17 163.14 | 50.58 | 0.000 2 ** |
| B | 98.01 | 1 | 98.01 | 0.29 | 0.607 6 |
| C | 124.01 | 1 | 124.01 | 0.37 | 0.564 6 |
| AB | 8 405.83 | 1 | 8 405.83 | 24.77 | 0.001 6 ** |
| AC | 300.92 | 1 | 300.92 | 0.89 | 0.377 7 |
| BC | 2 453.28 | 1 | 2 453.28 | 7.23 | 0.031 1 * |
| A ² | 7 602.89 | 1 | 7 602.89 | 22.41 | 0.002 1 ** |
| B ² | 6 291.15 | 1 | 6 291.15 | 18.54 | 0.003 5 ** |
| C ² | 3 491.99 | 1 | 3 491.99 | 10.29 | 0.014 9 * |
| 残差 | 2 375.34 | 7 | 339.33 | | |
| 失拟项 | 1 069.92 | 3 | 356.64 | 1.09 | 0.448 5 |
| 纯误差 | 1 305.43 | 4 | 326.36 | | |
| 总和 | 47 583.85 | 16 | | | |

由表4可看出:该模型极显著($p < 0.01$),失拟项 p 值为0.448 5,大于0.05,说明数学模型拟合良好;同时 R_{Adj}^2 为0.885 9,表明有约88.59%的酶活变化能由此模型进行解释; R^2 为0.950 1,表明酶活的实测值与预测值之间具有较好的拟合优度,实验误差小,证明该数学模型可靠。综合上述分析可知,本实验模型可靠有效,具有实践意义。一次项 A,交互项 AB,二次项 A²、B² 影响极显著,交互项 BC、二次项 C² 影响显著。

2.6.2 响应面优化

利用 Design - Expert 8.0.6 软件进行产酶培养基各因素的优化组合,得到 Bi 产脂肪酶最优发酵条件为 pH 6.69、氯化钠含量 3.01 g/L、蛋白胨含量

6.01 g/L,Bu 产脂肪酶最优发酵条件为 pH 5.07、氯化钠含量 6.10 g/L、蛋白胨含量 9.38 g/L。在优化条件下,预测的 Bi、Bu 产脂肪酶酶活分别为 230.01、247.35 U/mL。在优化条件下进行3次平行验证实验,得到 Bi 和 Bu 产脂肪酶酶活平均值分别为 (222.83 ± 0.91) U/mL 和 (231.50 ± 2.28) U/mL。Bi 和 Bu 产脂肪酶酶活实际值与理论值之间相对误差分别为 3.22%、6.84%,可证明该优化工艺可靠。综上,在各自最优条件下,Bu 产脂肪酶酶活超过了初始酶活更高的 Bi,说明鲁氏不动杆菌 Bu 优化后的应用潜力非常大。

3 结论

采用传统的微生物筛选法从餐厨废水中分离出5株菌株(3株细菌和2株酵母菌),通过考察其对高含油废水(油脂含量 20 g/L)的油脂降解率和产脂肪酶的酶活优选出2株细菌 Bi 和 Bu 作为研究菌种。经鉴定,Bi 为解淀粉芽孢杆菌,Bu 为鲁氏不动杆菌。通过单因素实验和响应面实验对2株细菌产脂肪酶发酵条件进行优化,得到 Bi 产脂肪酶最优发酵条件为 pH 6.69、氯化钠含量 3.01 g/L、蛋白胨含量 6.01 g/L,Bu 产脂肪酶最优发酵条件为 pH 5.07、氯化钠含量 6.10 g/L、蛋白胨含量 9.38 g/L。在优化条件下,Bi 产脂肪酶酶活为 (222.83 ± 0.91) U/mL,Bu 产脂肪酶酶活为 (231.50 ± 2.28) U/mL。Bi 和 Bu 可在高含油废水中快速生长代谢,所产脂肪酶具有较高酶活。后续课题组将通过诱变育种、固定化等方法进一步提高上述2株脂肪酶高产菌株的产酶活力,充分优化其油脂降解性能。另外,将采用原位培养法从油脂污染、餐馆下水道等环境中分离筛选更多难培养的、油脂降解能力强的微生物,包括细菌、酵母菌和霉菌等,开发出高效、稳定性高、适应能力强的微生物菌剂用于高含油废水绿色降解转化。

参考文献:

- [1] NIMKANDE V D, BAFANA A. A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment[J/OL]. J Water Process Eng, 2022, 46: 102591 [2023 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102591>.
- [2] 张凯. 油脂降解菌的筛选与发酵条件优化及其降解途径的探讨[D]. 辽宁大连: 辽宁师范大学, 2022.
- [3] 王长青, 张西华, 宁朋歌, 等. 含油废水处理工艺研究进展及展望[J]. 化工进展, 2021, 40(1): 451 - 462.
- [4] KANDASAMY S, VIJAYALAKSHMI V S, SALMEN S H, et al. Screening, characterization, and optimization of lipase enzyme producing bacteria isolated from dairy effluents contaminated muddy soil [J]. Appl Nanosci, 2023, 13(2): 1443 - 1451.

- [5] 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.
- [6] HASSANSHAHIAN M, EMTIAZI G, CAPPELLO S. Isolation and characterization of crude - oil - degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea[J]. Mar Pollut Bull, 2012, 64(1): 7 - 12.
- [7] 程爽, 包朋鑫, 徐玉晨, 等. 一株脂肪酶产生菌的筛选鉴定及其发酵条件优化[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(11): 73 - 80.
- [8] 朱超, 张文婷, 段翠花, 等. 低温油脂降解菌的分离和菌剂构建及中试验证[J]. 皮革科学与工程, 2020, 30(6): 21 - 27.
- [9] PHAM V H T, KIM J, CHANG S, et al. Investigation of lipolytic - secreting bacteria from an artificially polluted soil using a modified culture method and optimization of their lipase production[J/OL]. Microorganisms, 2021, 9(12): 2590 [2023 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122590>.
- [10] 秦昊, 刘凯, 邓文玺, 等. 产脂肪酶菌株的筛选鉴定及响应面法优化发酵工艺[J]. 现代农业科技, 2022(12): 165 - 170.
- [11] 景智波, 田建军, 赵丽华, 等. Box - Behnken 优化培养条件提高乳酸菌产脂肪酶活性[J]. 中国食品学报, 2020, 20(10): 124 - 133.
- [12] AMIN M, BHATTI H N, SADAF S, et al. Optimization of lipase production by response surface methodology and its application for efficient biodegradation of polyester nylon - 200 [J]. Catal Lett, 2021, 151(12): 3603 - 3616.
- [13] ABU M L, NOOH H M, OSLAN S N, et al. Optimization of physical conditions for the production of thermostable T1 lipase in *Pichia guilliermondii* strain SO using response surface methodology[J/OL]. BMC Biotechnol, 2017, 17(1): 78 [2023 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0397-7>.
- [14] 刘延波, 邢星月, 赵志军, 等. 高产脂肪酶菌株的筛选鉴定及产酶条件优化[J]. 中国酿造, 2019, 38(7): 54 - 59.
- [15] GURD C, VILLA R, JEFFERSON B. Understanding why fat, oil and grease (FOG) bioremediation can be unsuccessful[J/OL]. J Environ Manage, 2020, 267: 110647 [2023 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110647>.
- [16] 熊盈盈. 第三代测序技术和培养法联合使用对酱香大曲细菌多样性及其功能的研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2021.
- [17] 蒋翠翠, 尚昊, 张素芳, 等. 产脂肪酶菌株的筛选、酶学特性及其接种对酸肉风味物质的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(10): 106 - 113.
- [18] 孟卓妮. 油脂降解菌的筛选及生物法降解油脂的初步研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
- [19] 李成龙, 董倩, 李乔惠, 等. 脂肪酶活力的测定方法及比较分析[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(S1): 323 - 328.
- [20] 单张凡. 琼脂糖凝胶电泳法测定小麦中中穗偃麦草的基因[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(21): 14 - 15, 39.
- [21] 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.
- [22] 詹亚斌, 魏雨泉, 陶兴玲, 等. 耐高温油脂降解菌株的筛选、鉴定及其在好氧堆肥中的应用[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(7): 812 - 818.
- [23] 贾群超, 郭楚玲, 卢桂宁, 等. 两株稠油高效降解菌的筛选鉴定及其降解性能研究[J]. 环境工程学报, 2011, 5(5): 1181 - 1186.
- [24] KANMANI P, KUMARESAN K, ARAVIND J. Gene cloning, expression, and characterization of the *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 lipase [J]. Publ Braz Soc Microbiol, 2015, 46(4): 1235 - 1243.
- [25] FLEMMING H C, WUERTZ S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17(4): 247 - 260.
- [26] CAVERO - OLGUIN V H, HATTI - KAUL R, CARDENAS - ALEGRIA O V, et al. Stress induced biofilm formation in *Propionibacterium acidipropionici* and use in propionic acid production [J/OL]. World J Microbiol Biotechnol, 2019, 35(7): 101 [2023 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2679-9>.
- [27] ZHANG Y, QI J, WANG Y, et al. Comparative study of the role of surfactin - triggered signalling in biofilm formation among different *Bacillus* species [J/OL]. Microbiol Res, 2022, 254: 126920 [2023 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126920>.
- [28] 王世伟, 王卿惠. 解淀粉芽孢杆菌相关功能机制研究进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(1): 150 - 159.
- [29] 易蒲红, 李琴萍, 赵彩虹, 等. 餐厨垃圾中油脂高效降解菌酯香微杆菌(*Microbacterium esteraromaticum*)的分离及其应用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(17): 143 - 149.