

# 低温脂肪酶产生菌的筛选及鉴定

林容霞<sup>1</sup> 马延和<sup>2\*</sup> 谭天伟<sup>1</sup>

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 中科院微生物研究所极端微生物实验室, 北京 100080)

**摘要:** 通过三丁酸甘油酯平板法从太平洋帕里西维拉海盆 5010 m 的底泥中共筛出八株可产脂肪酶的菌株, 其中的两株生理生化特征极其相近的菌脂肪酶活性最高, 并且对橄榄油平板产生荧光。对两株菌进行鉴定, 分析其生理生化特征和 16SrDNA 产物序列, 确定这两株菌均属于发光杆菌属, 但是和该属的各种还有一定差异, 对其分类地位的最后确定还需进一步的系统发育学分析。其中 D<sub>2</sub> 菌株所产脂肪酶的最适作用温度在 35 左右, 证明其脂肪酶为低温酶; 最适作用 pH 值在 7~9 之间, 最适 pH 值 8。

**关键词:** 低温脂肪酶; 深海; 菌株鉴定

**中图分类号:** Q559.1

极端微生物资源近年来正成为开发的热点, 除了其在适应极端环境的机理和生命的起源等理论领域具有重大意义外, 极端酶在工业应用中的优势和诱人前景也是重要原因。例如低温酶 (cold adapted enzymes), 它的主要特征是低温条件 (< 40 ) 下具有较高的酶活力, 活化能变小, 热稳定性下降<sup>[1]</sup>, 在工业上的应用优势在于酶的活化能和最适反应温度较低, 可以节约能源保护环境<sup>[2]</sup>。

脂肪酶是一类具有良好应用前景的酶类, 它在不同的反应体系下可催化多种反应, 如水解、酯化、转酯及酯类手性合成等<sup>[3]</sup>。低温脂肪酶可在较为低温的环境下催化这些反应, 因而在洗涤、食品、环保等方面的低温生物催化引起了广泛兴趣。另外, 低温脂肪酶的热不稳定性对某些工业性的生物催化来说是有益的, 比如在食品加工过程中, 可以在相对较低的温度下快速使酶失去活力, 从而避免了食品在酶的热处理失活过程中营养受到损失<sup>[4]</sup>。

近年来低温脂肪酶的研究广泛开展, 已有多种低温脂肪酶得到了纯化或克隆表达, 如菌株 *psychrobacter immobilis* B10, *Pseudomonas fragi* strain IFO 3458 (PFL), *Pseudomonas sp.* strain KB700A, *Acientobacter sp.* strain No. 6 分泌的脂肪酶。其中大部份低温酶是从南极和北极以及深海、高山冻土

中的低温微生物产生<sup>[5-7]</sup>。深海的大部分区域常年低温, 低温微生物资源丰富, 对它的研究和开发对于丰富我国的低温微生物资源和低温酶具有重要的意义。本文自深海泥样中分离出的 40 多株低温菌中共筛出 8 株可产脂肪酶或酯酶的菌株, 并对其中两株酶活力较高的菌进行了鉴定。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种来源

分离自太平洋帕里西维拉海盆 5010 m 的底泥, 由中国科学院海洋研究所科学一号考察船 2002 年 2 月提供, 使用箱式取样器取样。

### 1.2 培养基

采用 2216 海水培养基<sup>[8]</sup>。

### 1.3 低温脂肪酶菌株的初筛

由于不同脂肪酶的底物特异性不同, 本实验采用两种初筛方案: 三丁酸甘油酯主要用于筛选作用底物碳链较短的脂肪酶和酯酶; 橄榄油大部分为 16 个碳的酯, 可筛选出作用于较长碳链的脂肪酶。由三丁酸甘油酯筛出的菌株进一步用橄榄油平板检测, 以判断两种方案筛选的结果是否有异。

**1.3.1 三丁酸甘油酯琼脂平板透明圈法<sup>[9]</sup>** 用体积比为 3% 聚乙二醇 (PVA) 溶液制备含 100 g/L 三丁酸甘油酯的乳化液。在 225 mL Tris-HCl 缓冲液 (pH = 8) 中加入三丁酸甘油酯乳化液 25 mL 和 1.2% 琼脂, 灭菌。在无菌的平皿中倒入上面的热溶液, 凝固后, 打出直径 1 cm 小孔, 注入 50 μL 的酶液, 20 保温 24 h, 测定透明圈大小, 取圈大清晰者进行

收稿日期: 2005-03-31

第一作者: 女, 1980 年生, 硕士生

\*通讯联系人

E-mail: linrongxia0681@sina.com

复筛。

**1.3.2 罗丹明 B-橄榄油平板法** 将上述三丁酸甘油酯平板中的三丁酸甘油酯换成橄榄油,灭菌后加入 25  $\mu\text{L}$  过滤灭菌的罗丹明 B,操作基本同 1.3.1,反应结束后在紫外灯下观察,如果孔周围出现荧光为阳性,反之为阴性。

#### 1.4 产低温脂肪酶菌株的复筛

将待测菌株接种于 50 mL 2216 培养基中,180 r/min,培养 2 d 后,测定 0, 10, 20, 30, 40, 50 条件下发酵液的酶活。以酶活性为纵坐标反应温度为横坐标,作酶反应温度曲线。曲线顶点落在直线  $t = 40$  左侧区域作为低温酶的依据。

#### 1.5 脂肪酶活力测定方法

脂肪酶活力测定参照文献[5]的比色法进行。

#### 1.6 产酶菌株的鉴定

**1.6.1 形态学、生理生化特征** 产酶菌株的形态学观察、生理生化实验参照文献[10]和[11],参照菌株性质参考文献[12]。

**1.6.2 16S rDNA 序列测定和分析** 用接种环在斜面上刮少量菌体悬浮于 200  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液,在沸水中煮 10 min 后立即放入冰浴冷却。将所得产物用作模板,按照文献[12]进行 16S rDNA 序列 PCR 扩增,引物为 27f 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG-3' 和 1541r 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3', PCR 产物用质量分数 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,上样量 5  $\mu\text{L}$ ,然后交由博亚生物技术公司进行纯化及测序。序列通过 GenBank 中的 BLAST 检索进行系统发育分析,采用 Clustal X version 1.8 进行多序列匹配排列,通过 Treecon W (1.3b) 程序中的 Neighbor-Joining 方法,采用 Kimura 双参数计算模型,构建系统发育树。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株筛选

自底泥样中分离出的 40 株可培养低温菌中,共筛出 8 株可产低温脂肪酶的菌株,进一步用罗丹明橄榄油平板检测,只有两株形态及生理生化特性极其相近的菌株  $D_1$  和  $D_2$  可产生明显的荧光圈,复筛结果表明菌株  $D_2$  发酵液酶活性最高。作用结果如图 1,2 所示。

### 2.2 菌种 $D_1, D_2$ 的鉴定

**2.2.1 形态及生长特性** 菌株  $D_1, D_2$  菌落圆形,淡黄色,突起,不透明。细菌革兰氏阴性,常压下个

体形状不规则,细胞大小为  $0.5 - 1.0 \times 2 - 10 \mu\text{m}$ ,无鞭毛,不运动,兼性厌氧, $D_1, D_2$  最适生长温度为  $14 \sim 15$ ,高于 25 不生长,参考文献[13]两株菌可划归为嗜冷菌。 $D_1$  和  $D_2$  的温度生长曲线如图 3,4 所示。

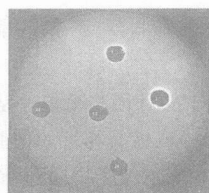


图 1 罗丹明-橄榄油平板

Fig. 1 Lipase production on medium olive oil plates

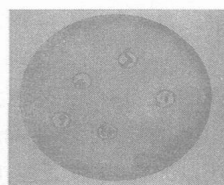


图 2 三丁酸甘油酯平板

Fig. 2 Lipase production on medium tributyrin plates

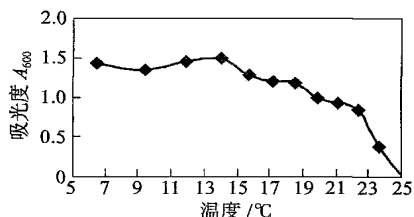


图 3  $D_1$  的温度生长曲线

Fig. 3 Effect of temperature on the growth of strain  $D_1$

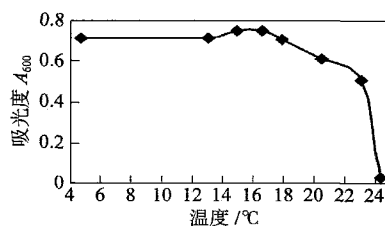


图 4  $D_2$  的温度生长曲线

Fig. 4 Effect of temperature on the growth of strain  $D_2$

**2.2.2 16S rDNA 测序结果** 所得 16S rDNA 基因序列长度大约为 1.5 kb, $D_1, D_2$  的 16SrRNA 基因序列在 GenBank 核苷酸数据库中的存取号分别为 A Y582933 和 A Y582934。将得到的 16S rDNA 序列进行比对, $D_1$  和  $D_2$  归为发光杆菌属 *Photobacterium*,它们与该属的种 *P. profundum*, *P. an-*

*gustum*, *P. phosphoreum* 和 *P. leiognathi* 的 16S rDNA 序列同源性都是 96%, 与 *P. damsela* 的 16S rDNA 序列同源性都是 94%。系统发育树见图 4。

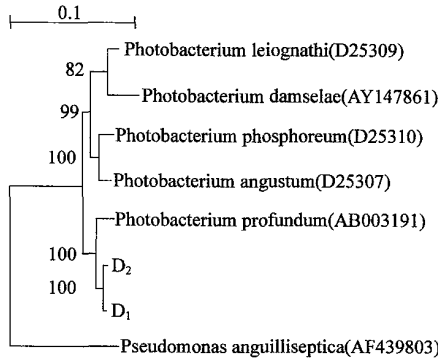


图 4 *Photobacterium* 属的系统发育树, *Pseudomonas anguilliseptica* 为外群, 括号中为各菌株 16SrRNA 基因序列在 GenBank 核苷酸数据库中的存取号

Fig. 4 Phylogenetic tree showing the relationship of amplified D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> 16SrDNA with *photobacterium* reference strains. *Pseudomonas anguilliseptica* is the external group

菌株 D<sub>2</sub> 和 D<sub>1</sub> 之间的 16S rDNA 序列同源性为 99%。

**2.2.3 生理生化特性** *Photobacterium* 属目前共有 5 个种, D<sub>1</sub> 和 D<sub>2</sub> 的生理生化特点与该属中其它种的比较见表 1 和表 2。主要的特征有触酶和氧化酶阳性, 对 O/129 (10 和 150 μg) 敏感。产氨实验、产 H<sub>2</sub>S 实验、吲哚实验、硝酸盐还原实验、葡萄糖发酵产酸阳性。M. R. V. P 实验、脲酶实验和亚硝酸盐还原实验阴性。鸟氨酸脱羧酶阴性, 赖氨酸脱羧酶、精氨酸脱羧酶阳性, 精氨酸双水解酶阴性。利用乳酸钠、丁二酸钠、水苏四糖、来苏糖、蜜二糖、松三糖、阿拉伯糖、肌醇、果糖、纤维二糖、甘油、鼠李糖、卫矛醇、木糖、丙酮酸钠、脯氨酸、乳糖作为唯一碳源。利用以下糖醇产酸: 甘露醇、糖、葡萄糖、山梨醇、蜜二糖、棉子糖、水扬素、赤藓糖醇、麦芽糖、果糖、半乳糖、菊糖、蔗糖和甘露糖。

**2.2.4 菌株 D<sub>2</sub> 所产脂肪酶粗酶的基本性质** 将菌株 D<sub>2</sub> 在 15 °C, 180 r/min 摇床转速条件下培养两天, 5000 r/min 离心菌液取上清, 利用 p-NP acetate

表 1 D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 和参照菌株主要特征对比

Table 1 Characteristics of the strains D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> and *photobacterium* reference strains

菌株名称	特征											
	最适生长温度	最适生长压力	过氧化氢酶	氧化酶	产 H <sub>2</sub> S 实验	吲哚实验	硝酸盐还原实验	O/129 敏感性		精氨酸双水解酶	赖氨酸脱羧酶	鸟氨酸脱羧酶
	/	/ MPa						10 μg	150 μg			
<i>P. angustum</i>	25	0.1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>P. damsela</i>	26	0.1	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>P. leiognathi</i>	26	0.1	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>P. phosphoreum</i>	18	0.1	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>P. profundum</i>	8~12	20	+	+	-	+	+	+/-	+/-	+/-	-	-
D <sub>1</sub>	14	ND	+	+	+	+	+	-	+/-	-	+	-
D <sub>2</sub>	15	ND	w	+	+	+	+	+	+	-	+	-

注: ND: 未测; +: 阳性; -: 阴性; +/-: 可变; O/129: 2, 4-diamino-6, 7-diisopropyl pteridine。

表 2 D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 和参照菌株对碳源的利用对比

Table 2 Carbon utilization by strains D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> and *photobacterium* reference strain

菌株名称	碳源名称															
	D-甘露醇	D-海藻糖	D-葡萄糖	D-山梨醇	核糖醇	D-棉子糖	L-阿拉伯糖	肌醇	麦芽糖	D-果糖	D-半乳糖	纤维二糖	甘油	蔗糖	L-鼠李糖	D-甘露糖
<i>P. angustum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>P. damsela</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+/-	+	-	-	+
<i>P. leiognathi</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>P. phosphoreum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>P. profundum</i>	+	+	+	-	-	-	-	+/-	+	+/-	+	+/-	+	-	-	+
D <sub>1</sub>	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-

注: +: 阳性; -: 阴性; +/-: 可变。

做底物,分光光度法测酶活,分别在40不同pH值下测其酶活性,得到酶活性随pH值的变化情况;在pH=8不同温度的情况下测酶活性随温度的变化情况。

其最适反应温度在35(见图5),在10仍有大约20%的酶活性。在10~35之间,随着温度的升高,酶活性平稳上升;超过40,酶活性会迅速下降,到65时完全失去活性。

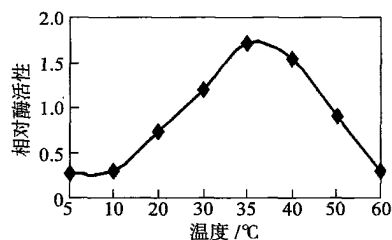


图5 D<sub>2</sub>脂肪酶活性随温度的变化曲线

Fig. 5 Effect of temperature on the activity of Lip. D<sub>2</sub>

其最适反应pH值8.0(见图6),总的趋势,从pH值4.0~8.0随着pH值的升高,酶的活性上升,7和8之间上升较迅速;超过pH值8.0,酶活性会迅速下降,到pH值10.0时完全失去活性。

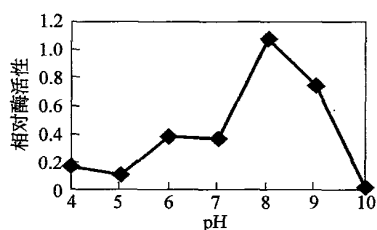


图6 D<sub>2</sub>脂肪酶活性随pH值的变化曲线

Fig. 6 Effect of pH on the activity of Lip. D<sub>2</sub>

### 3 结论

经过16S rDNA序列比对,新发现的发光杆菌属(*Photobacterium*)D<sub>1</sub>和D<sub>2</sub>,和发光杆菌属的其它种比较,发现这两株菌具有该属的一些共同特点,如革兰氏阴性,兼性厌氧,生长依赖Na<sup>+</sup>,利用葡萄糖和甘露糖产酸,鸟氨酸脱羧酶阴性,可利用果糖作为唯一碳源等。但也有一些不同于该属其它种的特点,如精氨酸双水解酶阴性,赖氨酸脱羧酶阳性,产H<sub>2</sub>S实验阳性等,表明这两个种有可能是该属的新种,还需要进一步的基因水平的研究确定最后的发育学地位。*Photobacterium*是深海环境中常见的微生物物种(Ruby and Nealson, 1978),由于*photobac-*

*terium*有可能是最重要的深海可培养微生物种群之一,对它们分类特征的研究对整个深海微生物类群的研究具有重要的意义<sup>[14]</sup>。

对D<sub>2</sub>所产的胞外脂肪酶粗酶进行初步性质研究表明,该酶的最适作用温度在35左右,最适作用pH值在7~9之间,相对于中温脂肪酶最适作用温度偏低,最适作用pH偏碱性,有望应用于低温环境下的生物催化。

### 参 考 文 献

- [1] Georges Feller, Michel Thiry, Jean-Louis Arpigny. Lipase from psychrotropic antarctic bacteria [J]. FEMS Microbiology Letters, 1990(66): 239 - 244.
- [2] 朱非,王珊,周培瑾. 低温酶冷适应的分子机制及其在生物技术中的应用[J]. 微生物学报, 2002, 42(5): 640 - 644.
- [3] 孙宏丹,孟秀香,贾莉,等. 微生物脂肪酶及其相关研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2001, 23(4): 293 - 295.
- [4] Choo D W, Kurihara T, Suzuki T, et al. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, pseudomonas sp. strain B11-1: Gene cloning and enzyme purification and characterization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 486 - 491.
- [5] Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, et al. Low-temperature lipase from psychrotrophic pseudomonas sp strain KB700A[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 4064 - 4069.
- [6] Takeshi Suzuki, Toru Nakayama, Tatsuo Kurihara, et al. A cold-active esterase with a substrate preference for vinyl esters from a psychrotroph *Acinetobacter* sp strain no 6: gene cloning purification and characterization [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 16: 255 - 263.
- [7] Claudia Alquati, Luca De Gioia, et al. The cold-adapted lipase of pseudomonas fragi heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling[J]. Eur J Biochem, 2002, 269: 3321 - 3328.
- [8] Daniel, Prieur. Microbiology of deep-sea hydrothermal vents[J]. Marine Biotechnology, 1997, 15: 242 - 244.
- [9] 卢世珩,刘光焯,江跃林,等. 合成己酸乙酯脂肪酶产生菌的筛选及产酶条件[J]. 微生物学通报, 1994, 21(1): 23 - 26.
- [10] 东秀珠,蔡妙英,等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:北京科学出版社, 2001, 128.
- [11] Barrow GL, Feltham R K, et al. Manual for the ident

- tification of medical bacteria [M]. 3rd ed. London: Cambridge University Press, 1993, 92.
- [12] 辛明秀, 周培谨. 低温微生物研究进展[J]. 微生物学报, 1998, 38(5): 400 - 403.
- [13] Yuichi Nogi, Noriaki Masui, Chiaki Kato. *Photobacterium protundum* sp nov, a new, moderately barophilic bacterial species isolated from a deep-sea sediment[J]. Extremophiles, 1998, 2(1): 1 - 8.

## Screening and classification of cold-adapted lipase-producing bacterium and part characterization of the lipase

L IN Rong-xia<sup>1</sup> MA Yan-he<sup>2</sup> TAN Tian-wei<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. Laboratory of Extremophiles, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

**Abstract:** Eight lipase-producing bacterium strains were screened from 40 cold-adapted strains, these strains isolated from the mud of Parece Vela sea basin in the Pacific Ocean of 5 010 m deep, of which two similar strains have the highest lipolytic activity and are positive to olive oil. Through the traditional physiological and biochemical method, together with the 16SrDNA sequence homology and phylogenetic analysis, the strains were identified. The result shows they belong to the genus *photobacterium*, but they differ from any species of this genus in some characteristic which suggests they might be new species, and their taxonomic placement needs more information on genes level. The optimal temperature of the action of D<sub>2</sub> crude lipases is about 35 which supports that the lipase is a cold-adapted one, and its optimal pH for activity is 8.

**Key words:** cold-adapted lipase; deep sea; classification of strains

## 下期预告

WCDMA 系统数字中频解调器的设计

基于 Web Services 的网络时间同步

一类图构形的模元素

碳分纳米氢氧化铝悬浮液的流变行为与纳米粒子团聚

高固相浓度下多孔板分布器对淤浆床内流动特性的影响

2,2-二羟甲基辛酸的合成与表征

PMMA/ TiO<sub>2</sub> 纳米复合粒子的制备及初步应用研究

新型 1,5-二芳基咪唑类选择性 COX-2 抑制剂的抗炎构效关系

黄芩苷-Fe( ) 配合物的合成与表征

双吡啶咪唑螺吡喃的合成与表征

由预聚 PS 制备 PMMA/ PS 复合光散射材料的研究

二次锂电池用 PVDF-HFP/ SiO<sub>2</sub> 复合聚合物隔膜的研究

并联多筒体摇滚式混合机摆动机构节能设计

植物纤维素水解液脱除酚类化合物研究

用 CTAB 从发酵液中提取透明质酸

响应面试验设计优化脂肪酶发酵培养基

聂伟等

赵英等

郭玲等

梁磊等

王国峰等

胡雪丰等

王璧等

汪凤颖等

李思睿等

焦海冰等

邢华等

李立等

吴冬梅等

王艳辉等

盛瑞堂等

张大皓等