

红树林土壤中脂肪酶产生菌的筛选及酶学性质

董磊^{1,2}, 李姜维¹, 杨彩云¹, 田蕴¹, 林光辉^{1,2}, 郑天凌^{1,2*}

(1. 厦门大学生命科学学院, 2. 近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学), 福建 厦门 361005)

摘要: 从福建龙海红树林区土壤中分离获得 9 株产脂肪酶的细菌, 经 16S rDNA 序列分析表明分别属于红球菌属(*Rhodococcus*)、库克菌属(*Kocuria*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和微小杆菌属(*Exiguobacterium*)。对 9 株细菌所产的脂肪酶进行酶学性质研究, 结果显示这些酶的最适作用温度在 25~35 °C、最适作用 pH 值在 8~10, 其中 L13 菌株所产脂肪酶(L13)具有适应温度和 pH 范围较广、对多种金属离子耐受性强、能有效降解不同底物等特点, 在环境保护和工业生产方面具有良好的应用前景。

关键词: 红树林; 脂肪酶; 酶学特性

中图分类号: Q 936

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2010)04-0570-04

红树林是热带、亚热带海洋潮间带的木本植物群落, 多分布于河口海岸和水陆交叠的地方。由于处于周期性遭受海水浸淹的潮间带环境, 红树林土壤兼有海洋和陆地的性质却又与二者不同, 具有沼泽化、盐渍化、偏碱性、有机质含量高为主要特征。红树林土壤生境的独特性决定了其中微生物的多样性及其资源的珍稀性, 因此对红树林土壤微生物的研究正成为热点^[1]。

脂肪酶(Lipase, EC 3.1.1.3)是一类在油-水界面上催化天然油脂(甘油三酯)降解为甘油和游离脂肪酸的酶, 广泛存在于植物、动物和微生物中^[2]。微生物脂肪酶(基本为胞外脂肪酶^[3])由于反应所需温度和 pH 范围较宽, 可在工业化生产中获得高纯度酶制剂^[4], 因此在食品、医药、化工、能源等领域发挥重要作用^[5-6]。

本研究从采集的红树林土壤中分离出多株产胞外脂肪酶的微生物, 经过多次筛选比较, 以 9 株产胞外脂肪酶菌株为研究对象, 应用分子生物学手段对其进行分类鉴定, 并对产生的脂肪酶的酶学性质进行初步研究, 以期为今后微生物脂肪酶的工业应用打下基础。

1 材料与方法

收稿日期: 2009-11-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2008AA09Z408); 国家自然科学基金(40930847, 30940002, 30930017); 福建省科技计划项目(2009Y0048); 深港创新圈项目(08Lh04)

* 通讯作者: microzh@xmu.edu.cn

1.1 样品

用于菌株筛选的红树林土壤采集自福建省九龙江口南岸的龙海市浮宫镇草埔头村九龙江口秋茄林。

1.2 培养基

富集培养基: 酵母膏 0.2 g, Na₂HPO₄ 3.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, NaCl 0.5 g, 橄榄油 10 g, pH 7.0, 纯水定容至 1 000 mL。

2216E 培养基(液体): 蛋白胨 5 g, 酵母粉 1 g, 磷酸高铁 0.01 g, pH 7.6~7.8, 陈海水定容至 1 000 mL。

2216E 培养基(固体): 蛋白胨 5 g, 酵母粉 1 g, 磷酸高铁 0.01 g, 琼脂 15 g, pH 7.6~7.8, 陈海水定容至 1 000 mL。

筛选培养基: 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 5 g, 琼脂 15 g, 罗丹明 B 0.5 g, 纯水定容至 1 000 mL。

1.3 产胞外脂肪酶菌株的筛选

采用罗丹明 B 指示剂染料法^[7-8]。选择菌株周围桔红色荧光圈大且清晰的菌株转移到 2216E 培养基上保藏以供进一步研究。

1.4 粗酶液的制备

将菌种接种于液体 2216E 培养基, 37 °C 恒温摇床震荡培养 48 h, 8 000 r/min, 10 min, 4 °C 离心收集上清液, 缓慢加入硫酸铵并轻柔搅拌, 至 65% 饱和度, 于 4 °C 放置过夜, 8 000 r/min, 4 °C 离心沉淀 20 min, 弃上清, 以 0.02 mol/L, pH 9.0 磷酸缓冲液溶解沉淀即为粗酶液。

1.5 脂肪酶酶活力测定

取 4 个 100 mL 锥形瓶, 每瓶加入 5 mL 0.025

mol/L 磷酸缓冲液和 4 mL 橄榄油乳化液, 摇匀, 40 °C 水浴 5 min, 然后在 4 个瓶中各加 1 mL 粗酶液. 从加入酶液开始精确记时, 继续保温 15 min, 取出立即加入 95% (体积分数) 的乙醇 15 mL 终止酶的作用, 再加入 3 滴酚酞指示剂, 用 0.05 mol/L NaOH 滴定溶液至呈粉红色. 以 1 min 从底物(橄榄油)中释放出 1 μ mol 脂肪酸的酶量定义为 1 国际单位(U)^[9].

1.6 菌种的分子生物学鉴定

细菌总 DNA 的提取参照文献[10]. 菌株 16S rDNA PCR 扩增体系参考文献[11].

PCR 产物(约 1.5 kb) 经 AT 克隆至载体 pMD18-T, 后转化大肠杆菌, 筛选并获得阳性克隆子. 测序由上海英骏生物技术有限公司测序. 将菌株 16S rDNA 基因序列提交 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), 进行序列比较分析.

1.7 胞外脂肪酶酶液酶学性质研究

1) 温度对酶液活性的影响: 分别测定不同温度(15, 25, 30, 35, 40, 50 °C)对酶液活性的影响.

2) pH 值对酶液活性的影响: 用 pH 分别为 6, 7, 8, 9, 10 的 PBS 缓冲液(0.025 mol/L) 配制底物溶液, 测定酶在最适温度不同 pH 值条件下的酶活力, 以确定其最适作用 pH 值.

3) 金属离子对酶液活性的影响: 将等体积的粗酶液与 0.002 g/mL 的金属氯化物(KCl, NaCl, CaCl₂, CuCl₂, FeCl₃ 和 MgCl₂) 溶液相混合, 置于 25 °C 中 30 min 后取出测其酶活(以未经处理的酶液酶活为 1).

4) SDS 对酶液活性的影响: 在酶活力测定体系中加入质量分数分别为 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5% 的 SDS, 混匀作用 1 h, 于各自的最适条件下测定酶活力.

5) 脂肪酶粗酶液催化几种植物油活性的比较: 分别测定了底物分别为橄榄油、花生油、玉米油和大豆油, 终浓度均为 4% (质量分数) 时的酶活力(25 °C, pH=9.0).

2 结果与分析

2.1 菌种分子生物学鉴定结果

将菌株的 16S rDNA 序列与 NCBI 数据库中的序列进行相似性比较(表 1), 序列相似性小于 98% 可以认为属于不同的种, 相似性小于 93%~95%, 可以认为属于不同属^[12]. 从 16S rDNA 序列相似性比较结果可以看出, 这 9 株产脂肪酶菌株可分为 5 个属: L1 属

于红球菌属(*Rhodococcus*), L3 属于库克菌属(*Kocuria*), L4 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*), L5B、L5H、L6、L12 和 L14 属于芽胞杆菌属(*Bacillus*), L13 属于微小杆菌属(*Exiguobacterium*). 将以上 9 株菌所产生的脂肪酶命名为 L'1、L'3、L'4、L'5B、L'5H、L'6、L'12、L'13 和 L'14.

表 1 菌株 16S rDNA 序列相似性比对结果

Tab.1 The comparison result of similarity of the 16S rDNA sequence

菌株	最高同源种/属	相似性/%
L1	<i>Rhodococcus</i> sp.	98
L3	<i>Kocuria</i> sp.	96
L4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97
L5B	<i>Bacillus cereus</i>	99
L5H	<i>Bacillus</i> sp.	100
L6	<i>Bacillus cereus</i>	100
L12	<i>Bacillus mycoides</i>	100
L13	<i>Exiguobacterium</i> sp.	100
L14	<i>Bacillus</i> sp.	100

2.2 温度对酶液活性的影响

各脂肪酶的最适作用温度集中在 25~35 °C 之间, 属于中低温脂肪酶, 由于其最适温度较低, 可在常温下发挥较高的活性, 因此适用范围较广. 其中 L'3 的最适作用温度最低(25 °C), 而 L'4、L'5B 和 L'12 的最适作用温度较高(35 °C), 尤其 L'4 在 50 °C 下仍有约 50% 的剩余活力. 总体而言, L'5H 酶促反应的热稳定性较差, 而 L'5B 和 L'13 在 25~35 °C 之间都有较高的稳定性(图 1).

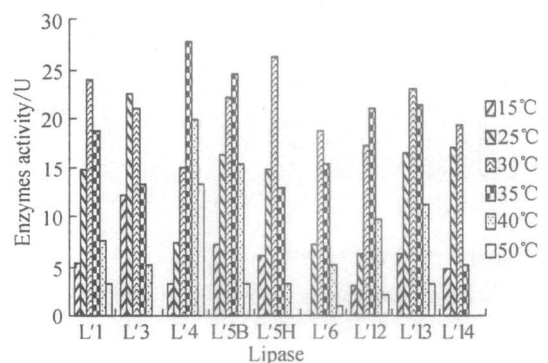


图 1 温度对脂肪酶活性的影响

Fig. 1 Effect of temperature on activity of enzymes

2.3 pH 值对酶液活性的影响

各脂肪酶的最适 pH 均集中在 8~9 之间,为碱性脂肪酶, L'6、L'12 和 L'13 酶促反应中 pH 的适应范围较广, L'6 在 pH=6 时仍有约 50% 的剩余活力(图 2)。碱性脂肪酶具有反应条件温和、反应效率高等优点,在工业上有着广阔的应用前景,本实验筛选的脂肪酶全部为碱性脂肪酶,可能与红树林土壤整体偏碱性有关。

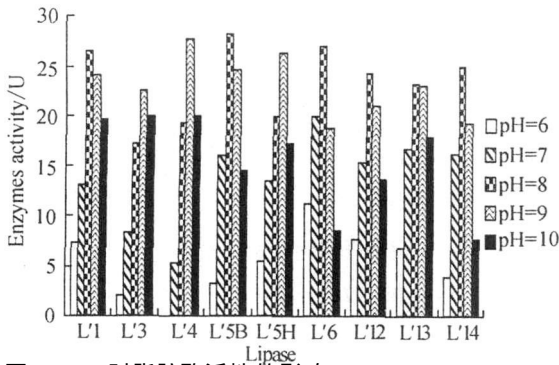


图 2 pH 对脂肪酶活性的影响

Fig. 2 Effect of pH on activity of enzymes

2.4 金属离子对酶液活性的影响

从金属离子对酶活力影响的研究中可以看出(图 3),除 Cu^{2+} 对各种酶都有较强的抑制作用外,其他离子对于不同酶激活或抑制的效果不同, Na^+ 对酶活力影响相对较小, Ca^{2+} 对 L'14, Mg^{2+} 对 L'6, K^+ 对 L'5B 和 L'13 激活作用明显. L'12 和 L'13 对多种金属离子抗性强,表明它们的活性中心对金属离子的依赖性较弱,可用于复杂的酶发酵环境,其它的脂肪酶也可通过添加或去除不同的金属离子,以得到较高的酶活力。

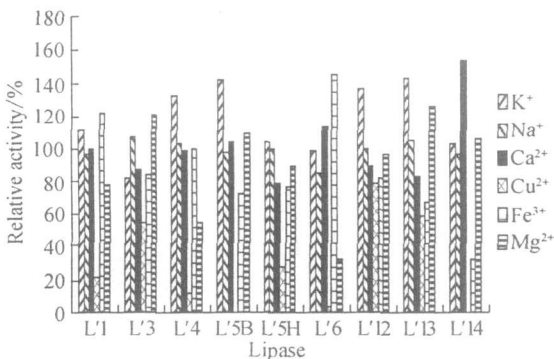


图 3 金属离子对酶活性的影响

Fig. 3 Effect of metal ions on activity of enzymes

2.5 SDS 对酶液活性的影响

SDS 作为非离子表面活性剂的代表对所有酶活性都有较强的抑制作用,大多数脂肪酶在 SDS 的质量

分数为 0.2% 时活性已丧失 50% 以上,但 L'1 和 L'6 在 SDS 的质量分数为 0.3% 时仍有 80% 左右的活性,当 SDS 的质量分数达到 0.5% 时仍有 30% 左右活性,表现出一定的耐受力(图 4)。

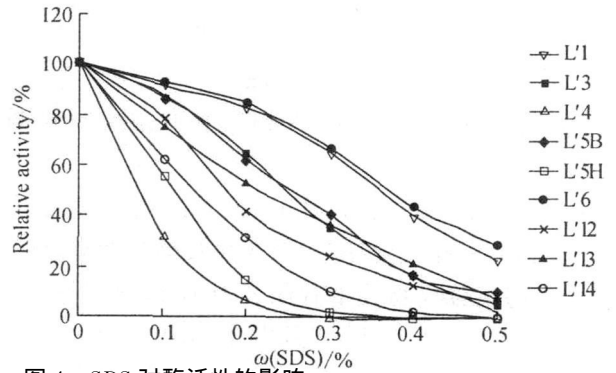


图 4 SDS 对酶活性的影响

Fig. 4 Effect of SDS on activity of the enzymes

2.6 脂肪酶粗酶液催化几种植物油活性的比较

考察脂肪酶粗酶液对橄榄油、花生油、玉米油和大豆油(质量分数均为 4%) 等几种植物油的催化活性时发现,当底物不同时, L3、L5B、L6、L12 和 L13 所产脂肪酶的催化效率变化不大, L4 所产脂肪酶催化花生油和大豆油的效率较高, L14 所产脂肪酶对橄榄油的专一性较强(图 5)。可在实际应用中针对具体底物选择合适的脂肪酶。

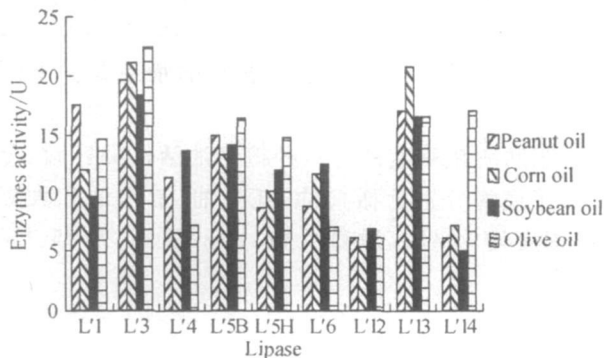


图 5 脂肪酶粗酶液催化几种植物油活性的比较

Fig. 5 Comparisons of lipases activity of plant oils

3 讨论

红树林生境的特殊性与高度复杂性造就了微生物的多样性,微生物的比表面积大,基质亲和能力强,能

分泌各种胞外酶分解颗粒有机物,而且能利用比其他生物种类更多的电子供体与电子受体,具有高度的代谢活性与丰富的代谢多样性^[13]。红树林土壤生境的独特性决定其中必然蕴藏独特酶资源和基因资源^[1],具有很高的科研和应用价值。

经酶学性质试验分析,本文所分离的菌株中L13所产脂肪酶(L'13)具有作用温度和pH范围广,对多种金属离子抗性强,能有效降解不同底物等特点,这些特点正是在工业应用中所需要的^[14],因此具有较好的应用开发前景;同时本研究中得到的相关数据对酶蛋白结构特点分析、酶相关基因的克隆等研究具有参考价值。为了有效与合理地利用这些菌株,尚需进一步优化该菌的产酶条件,分离纯化脂肪酶并深入研究其酶学特性。

参考文献:

- [1] 蒋云霞,郑天凌.红树林土壤微生物的研究:过去、现在、未来[J].微生物学报,2006,46(5):848-851.
- [2] Shimizu S, Nakano M. Structural characterization of triacylglycerol in several oils containing gamma-linolenic acid [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67(1): 60-67.
- [3] 董明奇,史岩,姜春雷,等.脂肪酶高产菌株的筛选及酶学特性研究[J].四川大学学报:自然科学版,2008,45(4):985-986.
- [4] 张树政.酶制剂工业(下册)[M].北京:科学出版社,1984:655-670.
- [5] Krishnakant S, Datta M. Ester synthesis by lipase immo-

- bilized on silica and microemulsion based organogels (MBGs) [J]. Process Biochemistry, 2001, 36(7): 607-611.
- [6] Hemachander C, Puvanakrishnan R. Lipase from *Ralstonia pickettii* as additive in laundry detergent formulations [J]. Process Biochemistry, 2000, 35(8): 809-814.
- [7] Ouke G, Jaeger K E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipase [J]. Appl Environ Microbiol, 1987, 53(1): 211-213.
- [8] Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger K L, et al. Novel division level bacterial diversity in a Yellow-stone hot spring [J]. J Bacteriol, 1998, 180(2): 366-376.
- [9] 施巧琴.碱性脂肪酶的研究[J].微生物学通报,1998,8(3):108-110.
- [10] Hai R C, Ning J. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts [J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(1): 55-59.
- [11] 杨小茹,苏建强,郑小伟,等.基于分子技术的1株产毒藻藻际细菌多样性分析[J].环境科学,2009,30(1):259-267.
- [12] Fry N K, Warwick S, Saunders N A. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae [J]. J Gen Microbiol, 1991, 137(5): 1215-1222.
- [13] 刘慧杰.红树林湿地微生物对典型有机物污染的响应及生物修复作用研究[D].厦门:厦门大学,2008.
- [14] Xu Y L, Qian H. Detergent development trend [J]. Detergent & Cosmetics, 2001, 24(2): 34-35.

Screening of Lipase-producing Bacteria from Mangrove Soil and Preliminary Studies on Properties of Enzyme

DONG Lei^{1,2}, LI Jiang-wei¹, YANG Cai-yun¹, TIAN Yun¹,
LIN Guang-hui^{1,2}, ZHENG Tian-ling^{1,2*}

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, 2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science(Xiamen University), Xiamen 361005, China)

Abstract: 9 strains lipase-producing bacteria from mangrove soil of Longhai, Fujian were isolated and characterized. The results of 16S rDNA sequence analysis showed that those bacteria belonged to *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Exiguobacterium*. Preliminary studies on properties of lipase products from those bacteria demonstrated that the optimal temperature was 25 °C to 35 °C, the optimal pH was 8 to 10. The lipases (L'13) produced by L13 had an effective role in a wide range of temperature and pH. They were also resisted to a variety of metal ions and could effectively degrade different substrates. Due to these properties, we suppose the lapses will have a broad application prospect in industrial production and environmental protection.

Key words: mangrove; lipase; enzyme properties