

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 21720081152598

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

深海细菌 *Pseudomonas* sp. Dspro004 产低温
复合酶的性质分析和酶基因的克隆表达

Characterization of cold-active complex enzyme-producing
strain *Pseudomonas* sp. Dspro004 from deepsea and
cloning ,expression of the enzymes

杨 帆

指导教师姓名: 徐 洵 院 士

曾润颖 研究员

专 业 名 称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2011 年 月

论文答辩时间: 2011 年 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
第一章 深海细菌 <i>Pseudomonas</i> sp. Dspro004 产低温复合酶的性质分析及酶基因克隆表达	1
1 前言	1
1.1 深海环境简介	1
1.2 深海微生物与低温酶.....	2
1.2.1 深海微生物研究概况	2
1.2.2 极端微生物	2
1.2.3 低温微生物与低温酶	2
1.3 微生物脂肪酶研究进展.....	3
1.3.1 微生物脂肪酶的来源及其筛选方法	4
1.3.2 微生物脂肪酶的催化特性	4
1.3.3 微生物脂肪酶的发酵	5
1.3.4 微生物脂肪酶的诱变育种	5
1.3.5 微生物脂肪酶的应用及其前景	6
1.3.6 低温脂肪酶研究及应用前景	8
1.4 微生物基因组学研究.....	9
1.4.1 微生物基因组测序进展	9
1.4.2 基因组测序策略	9
1.4.3 基因组学研究与生物信息学	11
1.5 本文的研究目的及意义.....	11
2 材料与方法	12
2.1 材料.....	12
2.2 基本方法	20
2.3 深海沉积物产脂肪酶低温菌的筛选鉴定、产酶、酶学性质研究.....	27
2.4 Dspro004 菌株脂肪酶蛋白酶的克隆和表达纯化	30
2.5 Dspro004 野生菌高产脂肪酶菌株的诱变育种	34

2.6	Dspro004 菌全基因组测序及序列分析	35
3	结果与分析	37
3.1	深海产低温脂肪酶菌的筛选鉴定、产酶、酶学性质研究.....	37
3.1.1	菌种的筛选分离和鉴定.....	37
3.1.2	细菌 16S rDNA 的鉴定与系统发育树的构建	37
3.1.3	菌株 Dspro004 的生长和产脂肪酶特性.....	39
3.1.4	Dspro004 脂肪酶的基本特征.....	42
3.1.5	Dspro004 蛋白酶的基本特征.....	44
3.2	Dspro004 菌株脂肪酶蛋白酶的克隆和表达纯化	47
3.2.1	脂肪酶基因 <i>lipA</i> 的克隆和表达.....	47
3.2.2	蛋白酶基因 <i>aprA</i> 的克隆和表达.....	51
3.3	Dspro004 野生菌高产脂肪酶菌株的诱变育种	54
3.3.1	Dspro004 野生菌的紫外诱变初筛.....	54
3.3.2	Dspro004 高产脂肪酶突变菌株复筛与遗传稳定性测试.....	55
3.4	Dspro004 菌株全基因组测序及初步分析	56
3.4.1	Dspro004 基因组测序拼接及基因组概况.....	56
3.4.2	Dspro004 基因组编码 COGs 聚类分析.....	57
3.4.3	Dspro004 中 <i>lipA</i> 基因 ABC transporter 操纵子分析.....	59
3.4.4	Dspro004 中其它潜在水解酶基因研究.....	60
4	讨论与总结	63
第二章 南极产碱性淀粉酶菌株 <i>Pseudomonas sp.</i> NJ270 的选育及酶学性质研究		69
1	研究背景	69
2	材料与方法	71
2.1	菌种	71
2.2	培养基	71
2.3	细菌分离及筛选.....	71
2.4	菌株 16S rDNA 分析	71
2.5	淀粉酶活力测定.....	71

2.6	碱性淀粉酶产生菌生长与发酵条件的研究.....	72
2.7	淀粉酶分离纯化.....	73
2.8	酶学性质研究.....	73
3	结果与分析.....	75
3.1	菌株筛选结果.....	75
3.2	菌株 16S rRNA 序列分析结果.....	75
3.3	菌株生长曲线与发酵周期.....	76
3.4	菌株发酵产酶最适条件.....	76
3.5	淀粉酶的纯化结果.....	77
3.6	淀粉酶的酶学性质分析结果.....	78
4	讨论与总结.....	81
	参考文献.....	83
	附录一. 脂肪酶基因 <i>LipA</i> DNA 序列及开放阅读框氨基酸序列.....	91
	附录二. 蛋白酶基因 <i>AprA</i> DNA 序列及开放阅读框氨基酸序列.....	92
	附录三. <i>LipA</i> ABC Transporter 基因簇 DNA 序列.....	93
	致谢.....	98

Contents

Chinese abstract..... VII

English abstract..... VIII

Chapter 1 Characterization of Complex Enzyme-Producing Strain *Pseudomonas* sp. Dspro004 From Deepsea And Cloning , Expression of the Enzymes.....1

1 PROLEGOMENON.....1

1.1 Introduction of deepsea environment.....1

1.2 deepsea microorganisms and cold-active enzymes.....2

1.2.1 General research of deepsea microorganisms2

1.2.2 Extremophiles.....2

1.2.3 Cold adapted microorganisms and cold-ative enzymes2

1.3 Review of microbial lipases.....3

1.3.1 Sources of microbial lipases and the screening methods4

1.3.2 Catalysing features of microbial lipases.....4

1.3.3 Fermentation of microbial lipases5

1.3.4 Mutagenesis breeding of microbial lipases5

1.3.5 Application of microbial lipases.....6

1.3.6 Research and application potential of cold-active lipases.....8

1.4 Microbial genomics research progress9

1.4.1 Review of microbial genome sequencing.....9

1.4.2 Genome sequencing strategy9

1.4.3 Research of genomics and bioinformatics.....10

1.5 Aim and significans of this study 11

2 Materials and methods.....12

2.1 Materials.....12

2.2 Routine methods20

2.3 Screening and characterization of lipase-producing strains from deepsea sediment and characterization of the enzymes27

2.4 Cloning and expression of the lipase and protease from strain Dspro00430

2.5 UV-Mutagenesis and screening for lipase-production-increased

mutant strain of Dspro004	34
2.6 Genomic sequencing and analysis of the strain Dspro004.....	35
3 Results and analysis.....	37
3.1 Screening and characterization of lipase-producing strains from deepsea sediment and characterization of the enzymes	37
3.1.1 Isolation and identification of strains.....	37
3.1.2 Identification of 16S rDNA and phylogenetic analysis of Dspro004	37
3.1.3 Strain growing and lipase-fermentation feature of Dspro004.....	39
3.1.4 Characterization of Dspro004 lipase LipA	42
3.1.5 Characterization of Dspro004 protease AprA.....	44
3.2 Cloning and expression of the lipase and protease genes from strain Dspro004.....	47
3.2.1 Cloning and expression of the lipase <i>lipA</i>	47
3.2.2 Cloning and expression of the protease <i>aprA</i>	51
3.3 UV-Mutagenesis and screening for lipase-production-increased mutant strain of Dspro004	54
3.3.1 UV-Mutagenesis and preliminary screening.....	54
3.3.2 Secondary screening and hereditary stability test.....	55
3.4 Genomic sequencing and general analysis of strain Dspro004	56
3.4.1 Genomic sequencing, assembling and characterization of Dspro004.....	56
3.4.2 COGs analysis of Dspro004 genome	57
3.4.3 Analysis of ABC transporter of <i>lipA</i> operon in Dspro004 genome	59
3.4.4 Research of potential hydrolytic enzyme genes in Dspro004 genome ...	60
4 Discussion and summary	63
Chapter 2 Screening and Enzyme Characterization of Alkaline Amylase-producing Strain <i>Pseudomonas</i> sp. NJ270 from Antarctica	
1 Research background.....	69
2 Materials and methods.....	71
2.1 Strains sources	71
2.2 Cultures	71
2.3 Screening and isolation of strains	71
2.4 Analysis of 16S rDNA sequence	71
2.5 Assay of amylase activity	71

2.6	Strain growing and fermentation study of NJ270	72
2.7	Isolation and purification of amylase	73
2.8	Characterization of amylase.....	73
3	Results and analysis.....	75
3.1	Result of Screening of amylase-producing strains.....	75
3.2	Result of Analysis of 16S rDNA sequence	75
3.3	Feature of growth and fermentation of NJ270	76
3.4	Features of amylase production of NJ270	76
3.5	Result of amylase purification.....	77
3.6	Features of amylase from NJ270.....	78
4	Discussion and summary	81
	Reference.....	83
	Appendix I. Sequence of DNA and amino acids of <i>lipA</i>	91
	Appendix II. Sequence of DNA and amino acids of <i>aprA</i>	92
	Appendix III. Sequence of gene cluster of <i>lipA</i> ABC Transporter	93
	Acknowledge	98

摘 要

从东太平洋深海沉积物中筛选到一产脂肪酶菌株 Dspro004, 结合形态学观察和 16SrDNA 序列分析鉴定为 *Pseudomonas* 属。最适生长温度和 pH 为 15~25°C、pH 7.0~7.5; 产脂肪酶最适温度、pH 值、盐度和时间分别为 15°C、pH 6.0~8.0、0.5%NaCl 质量浓度和 48~60h, 油脂类物质的添加会抑制产酶。

对脂肪酶基因 *lipA* 进行了克隆表达和性质鉴定。野生 LipA 蛋白 50kDa, 最适反应温度、pH 值为 30°C, 8.5~9.0, 50°C 及以上表现热不稳定性, 具低温碱性脂肪酶性质。高浓度 SDS、Tween-80、尿素、盐酸胍和 EDTA 抑制酶活力, 巯基乙醇影响微弱。Ca²⁺、Mg²⁺、Sr²⁺ 激活作用明显, Hg²⁺ 强烈抑制酶活力。对蛋白酶 *aprA* 进行了克隆表达, AprA 50 kDa, 最适温度、pH 为 40°C、8.5, 热不稳定, 受 Mg²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺ 激活, 受 EDTA 强烈抑制, 属碱性金属蛋白酶。

对该菌进行了紫外诱变筛选脂肪酶高产突变菌株, 获得突变子 UM03, 最大产酶活力达 2.7 U/mL, 较出发菌株提高 39%, 传代培养 5 代, 产酶能力无显著差异, 显示较好的遗传稳定性。

使用全基因组鸟枪法 (WGS) 对 Dspro004 进行了全基因组测序, 获得基本框架图。全基因组为一个环状染色体, 全长 7157353bp, GC 含量 60.85%, 预测基因个数 6559, 编码序列占基因组全长 88.10%。其上共有 rRNA 序列 6 个, tRNA 55 个, 241 个串联重复区域, 转座子 9 个; IS 序列数量 120 个。分析发现 *lipA*, *aprA* 位于一个 ABC 转运系统操纵子中, 利用 ABC 复合体以 I 型分泌机制分泌。在基因组中发现一些水解酶类, 为进一步发掘该菌的应用研究潜力奠定了基础。

从南极中山站排污口筛选到一株产淀粉酶菌 NJ270, 形态学观察和 16S rDNA 序列分析表明其属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。该菌具耐冷菌性质, 发酵中添加淀粉有效诱导产酶。硫酸铵沉淀、Q Sepharose XL 离子交换层析和 Sephadex G-75 凝胶层析对其分离纯化, 获得比活 122.5U/mg、大小为 55kDa 的淀粉酶蛋白, 该酶最适 pH 和温度为分别为 9.0 和 50°C, 具有碱性中温淀粉酶属性, 该酶水解淀粉产生麦芽五糖。Mg²⁺ 对该酶有较高的激活作用, 而 Fe³⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Hg²⁺、EDTA 则能抑制酶活力。该酶作为耐碱性中温淀粉酶, 在洗涤剂制造等工业生产中有一定的应用潜力。

关键词: 深海沉积物; 低温脂肪酶; 紫外诱变; 基因组; 淀粉酶

Abstract

A lipase-producing strain Dspro004 is isolated from the deepsea sediment of eastern Pacific ocean. Morphological identification and phylogenetic analysis indicate that this strain belongs to genus *Pseudomonas*. The optimum growth condition is 15~25°C, pH 7.0~7.5. Dspro004 can produce lipase and protease, while the optimum condition for lipase producing is 48 h at 15°C, 0.5% NaCl and pH 6.0-8.0, respectively. adding of lipin substance may restrain the producing of lipase.

A lipase gene *lipA* is obtained by cloning, expression and purification was proceeded. The mass weight of the wild LipA is 50 kDa, the optimum condition for activity is 30°C, pH 8.5~9.0, respectively, it is thermal-unstable at 50°C or higher temperature, indicate it belongs to alkaline cold-active lipase. The activity is restrained by high concentration of SDS, urea, Tween-80, guanidine hydrochloride and EDTA, while affected little by beta-mercaptoethanol. Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} enhance the lipase activity whereas Hg^{2+} shows strong suppression. A protease gene *aprA* is identified, cloned and expressed, the MW of which is 50 kDa. The optimum condition for protease activity is 40°C, pH 8.5. It is sensitive to high temperature, possessing cold-adaptive enzyme features and may belong to alkaline metalloproteinase, AprA can be activated by Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} while repressed by EDTA.

UV-Mutagenesis is processed with the strain Dspro004 for increasing of LipA production. A mutant strain UM03 is obtained by screening of the mutagenesis, with the maximal lipase activity producing of 2.7 U/mL, increasing by 39%. The results of inspecting the strain through 5 generation cultures showed that the enzyme activity of the strain was stable.

The genome of Dspro004 is sequenced by WGS method and the main frame map is formed, which is a circular chromosome of 7,157,353 bp with the GC content of 60.85%, encoding 6559 genes with a sum length of 88.10% of the genome sequence, there are 6 rRNA genes, 55 tRNA genes, 241 tandem repeat sequences, 9 transposons and 120 IS sequences. It is found that the genes *lipA* and *aprA* are located in the same ABC transporter operon, the secretion of the LipA and AprA depend on the ABC transporter system via pattern I secretion mechanism. Besides, a lot of hydrolytic

enzymes are found in the Dspro004 genome, the further research of them will be carried out on the next step, and it will be valuable for exploring the further application potential of the strain Dspro004.

An amylase-producing strain NJ270 is isolated from the samples collected at the waste pipe of Zhongshan Station, Antarctica. Morphological identification and phylogenetic analysis indicate NJ270 belongs to genus *Pseudomonas*. Growth of NJ270 shows characteristics of psychrotolerant bacteria. Secretion of amylase is introduced by adding of starch. The enzyme purification is performed by ammonium sulfate precipitation, Q Sepharose XL anion-exchange chromatography and Sephadex G-75 exclusion chromatography, obtaining an amylase of mass weight of 55 kDa and specific activity of 122.5 U/mL. Enzyme characterization shows the optimum pH and temperature for reaction were pH 9.0 and 50°C, respectively, indicated mesothermal-active amylase features. It hydrolyses starch to produce selectively maltopentaose as the only final product. The enzyme activity is enhanced by adding Mg^{2+} , while restrained by Fe^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} . As an alkaline mesothermal-active amylase, it showed great industrial application potential.

Key words: deepsea sediment; cold-active lipase; UV-Mutagenesis; genome; amylase

第一章 深海细菌 *Pseudomonas* sp. Dspro004 产低温复合酶的性质分析及酶基因克隆表达

1 前言

1.1 深海环境简介

地球表面约 $5.1 \times 10^8 \text{km}^2$ 的总面积，由陆地和海洋组成，其中的 70.8% ($3.6 \times 10^8 \text{km}^2$) 为海洋覆盖。它包含十四亿立方公里的水,占地球水资源 90%，大洋是海洋的主体部分，一般远离大陆，面积广阔，约占海洋总面积的 90.3%，深度一般大于 2000m，盐度平均为 30‰，且年变化小，盐度、温度、物质组成等环境要素不受大陆影响，具有独立的潮汐系统和强大的洋流系统。

海洋中阳光可穿透的水体称为透光带，一般介于 100 m~200 m 的深度范围内。而透光带以下到 1000 m 的深度区域内，由于动物和化能有机异养微生物的作用，仍存在相当多的生物活动。相比较而言，1000 m 以下的水域生物活动相对较少，这就是所说的“深海”^[1,2]，占海洋总面积 65%。与陆地和近海环境相比，深海环境相对比较稳定，具有高压、低温、黑暗和寡营养的特点。在高压力的深海中，5000 m 深度的生物，必须能耐受 500 个大气压的压力^[3]；同时，深海世界除了海底火山口及其附近的地方，绝大部分都始终处于低温之中，一般保持在 $3^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 温度范围内^[4]，生物在这里生存必须能耐受低温；由于阳光的穿透力有限，一般在 1000 m 以下的深海几乎没有光照^[5]，因此在黑暗的深海几乎没有进行光合作用的生物存在，而深海生物的生存可能与海底存在的化能自养微生物有关^[6]；与陆地的某些生态环境相比，海水尤其是深海，营养相对贫乏，微生物活动不是十分剧烈，但从海水表面到 108600 m 深的海底淤泥中都存在着微生物的生命活动^[4]，深海存在着数量庞大的生物群落，蕴藏着巨大的生物资源，已成为并列于陆地表面和海洋水体的地球三大生存域之一^[5]。深海生物与陆地生物及一般海洋生物相比有很大的特殊性，深海生物在各种极端的环境条件下形成了独特的组织结构、酶系统及代谢机制以进行生存和繁衍，对这些独特的生理结构及机能进行研究，探讨深海生物适应特殊的生存环境而发生的基因变异，在研究生物种类、生理活动、应激反应等方面的多样性具有重要的科学意义^[7,8,9]。

1.2 深海微生物与低温酶

1.2.1 深海微生物研究概况

深海是人类财富的巨大宝库，蕴藏着大量的资源，其中深海中蕴藏着的生物资源极为丰富，而其中最主要的是深海微生物，仅海底软泥中原核生物的生物量估计占地球总生物量的1/10到1/3之多^[10]。但这些微生物大部分还鲜为人知。深海微生物主要包括：病毒、古菌、细菌、放线菌、酵母菌及真菌等^[11]。深海微生物为适应海洋恶劣的环境条件，形成了独特的代谢系统和机体防御系统，产生了许多具有特异、多种多样化学结构的生物活性物质，它们中相当一部分有陆上生物物质所没有的独特优势^[12,13]，因而，深海微生物及其活性物质资源的开发已经日益引起了国内外的重视。

当前对深海微生物资源的开发利用主要包括：深海微生物基础性研究，包括方法、仪器、器材、设备、过程、分类、生态、生理特征等等^[14,15]；应用性基础研究，如冷活性酶等活性成分的确证等^[16]；微生物资源的开发性利用研究，如嗜盐菌素等小分子提取与利用、活性成分的药学研究^[17,18]，海洋污染环境的生物修复^[19]等。值得注意的是，由于深海中存在着各种繁衍于独特生态系统的极端环境微生物，如嗜压微生物、嗜冷微生物、嗜热微生物、嗜碱微生物等^[20]，深海环境下极端微生物的研究不仅是目前生命科学最前沿的领域之一，也是海底深部生物圈研究和海底流体活动研究重要的组成部分^[21]。

1.2.2 极端微生物

极端生物（extremophiles）是指在极端自然环境（extreme natural environments）下生存的生物，这些极端环境包括恒定的低温、高温、高压、强碱、强酸、干燥、辐射、高盐浓度等^[22]。在极端环境中，普通生物不能生存，而极端生物却生长良好，甚至赖以为生。从分类角度看，极端生物的成员包括细菌、古菌（archaea）和真核生物。所有的超高温生物（hyperthermophiles）不是古菌就是细菌，而真核生物常见于嗜冷生物（psychrophiles）、嗜酸生物（acidophiles）、嗜碱生物（alkaliphiles）、嗜压生物（baro/piezophiles）、嗜旱生物（xerophiles）、嗜盐生物（halophiles）。

1.2.3 低温微生物与低温酶

低温微生物通常是指那些能在寒冷低温环境下也能生存的特殊微生物，这些低温环境在地球上普遍存在，如平均温度维持在1~3℃的海洋、极地、高

山、冰川和冷库等。根据 Morita^[23]的定义, 低温微生物可以分为两类: 一类是必须在低温条件下生长, 最高生长温度在 20°C 以下, 最适生长温度在 15°C 以下, 在 0°C 可生长繁殖的微生物, 称为嗜冷菌 (psychrophiles)。嗜冷菌主要分布在常冷的环境中如南北极地区、冰窟、高山、深海和土壤等低温环境中^[24]。还有一类是最高生长温度高于 20°C、最适生长温度高于 15°C、在 0~5 °C 可生长繁殖的微生物称为耐冷菌 (psychrotrophs)。这两类微生物的生态分布和适应低温的分子机制存在一定差异。低温微生物具有广泛的微生物区系, 已发现的低温微生物既有真细菌、蓝细菌、又有酵母菌、真菌和藻类。最近又发现嗜冷古细菌^[25]。

应用低温微生物具有许多优势: 在可防止微生物污染的 0~20°C 温度范围内, 低温微生物具有高生长速率、高酶活力及高催化效率; 有些分离自嗜冷菌的水解酶在相对低的温度下具有活性^[26]。相对中温型酶而言, 0~30°C 以内, 来自低温微生物的低温酶要比中温酶的活力高。为适应低温环境下的代谢, 低温酶在蛋白结构上的变化包括特殊的序列修饰、二硫键和盐桥含量减少、螺旋偶极净电荷减少、与溶剂互作增加、氢键和疏水作用减少^[27]。这些适应性调整使蛋白质结构柔韧、富有弹性, 并且使其在低温条件下的催化效率得以提高。具有高活性的低温酶在中、低温环境有潜在的商业价值^[28-33], 在如家居洗涤, 食品烘焙, 食品保存运输, 皮革脱皮等方面较中高温酶有着独特的优势, 同时这些低温酶的热不稳定性能确保它们在复杂的混合物中进行迅速、高效和有选择性的失活。然而, 尽管低温酶在生物工艺领域上有如此多的应用, 但它们并未得到充分的应用。部分原因是低温下进行的生产和加工工艺的成本比目前使用的商业酶还要高^[34]。

1.3 微生物脂肪酶研究进展

脂肪酶 (Lipase, EC3.1.1.3), 又称三酰基甘油酰基水解酶, 是一类能催化长链脂肪酸甘油酯水解为甘油和长链脂肪酸及其逆反应的酶类^[35]。它可以催化脂类化合物的分解, 合成和脂交换, 具有高度的化学选择性和立体异构性。羧酸酯酶和脂肪酶很类似, 区别在于两者重点作用底物不同, 一般前者催化短链甘油酯水解, 而脂肪酶催化长链甘油酯水解; 其标准底物分别为三丁酸甘油酯(4 碳)和甘油三油酸酯(18 碳)^[36]。

脂肪酶广泛存在于动植物、微生物及人体中, 是最早研究的酶类之一, 已

有上百年的研究史。而微生物脂肪酶是在本世纪初才发现的,我国微生物脂肪酶的研究始于 60 年代^[37],由于微生物脂肪酶种类多,作用温度及 pH 范围比动植物脂肪酶广,底物专一性高,并且可以分泌到细胞外而易于提取,便于工业生产和获得较高纯度的酶制剂,因此微生物脂肪酶已成为工业生产脂肪酶的主要来源,目前工业化生产的微生物脂肪酶有近 20 种^[38]。

1.3.1 微生物脂肪酶的来源及其筛选方法

脂肪酶在微生物界分布很广泛,目前已发现包括细菌、放线菌、酵母菌和真菌等至少有 60 多个属的微生物可以产生脂肪酶^[39],已发现的微生物的作用条件因菌种的不同差异很大,不同的筛选方法对被分离的微生物种类及酶的特性有相当大的影响。筛选分离脂肪酶产生菌常用的方法是用含有甘油三酯的琼脂平板,酶催化水解产生清晰的环带或浑浊的脂肪沉淀,也可利用生色底物或产脂肪酶微生物的某些特性。如 Yeoh 利用生色底物 P-硝基苯辛酸盐, P-硝基苯肉蔻酸盐和 P-硝基苯棕榈酸盐筛选对不同碳链长脂肪酸具有专一性的脂肪酶产生菌^[40]; Satyanarayata 观察固体培养基中脂肪酸沉淀以确定酶活力大小的方法^[41];我国研究者施巧琴采用维多利亚蓝与脂肪酸反应产生蓝绿色透明圈筛选出产碱性脂肪酶的扩展青霉^[42];金其荣以氢化油为唯一碳源,筛选耐高温根霉等^[43]。

1.3.2 微生物脂肪酶的催化特性

从已知结构的几种脂肪酶来看,其分子量在 20~60kDa 之间,整个分子由亲水部分和疏水部分组成,活性中心靠近分子的疏水端。脂肪酶可催化酯化、转酯、酯交换、对映体拆分等化学反应^[44]。按其底物专一性,微生物脂肪酶可以分为三类:非专一性脂肪酶、1, 3 专一性脂肪酶和脂肪酸专一性脂肪酶。许多脂肪酶的底物专一性已得到详细研究,如 *Mucor miehes* 和 *penicillium* sp. 为 1, 3 专一脂肪酶,而 *candida cylindracea*, *Pseudomonas spp.* 和 *Rhizopus spp.* 则为随机酶。有些脂肪酶对脂肪酸具有高度专一性,如 *Fusarium oxysporum* 脂肪酶对饱和脂肪酸有专一性^[45]。

脂肪酶的催化反应具有界面激活(interfacial activation)的特点(Sarda, 1958),即只能在异相系统(即油水界面)或有机相中作用,并且可以降解长链油脂分子。Semeria 利用肠 *zopnsarrhizns* 脂肪酶对三醋酸甘油酯和三丙酸甘油酯的催化分解来说明底物的聚集状态对酶解反应的影响:只有当底物在高于临界微粒浓度时才可观察到脂解反应。底物饱和后以微粒、小聚体或乳浊粒形式存在时,增

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库