

文章编号:1673-1689(2009)04-0550-05

# 一株低温脂肪酶产生菌的筛选鉴定与产酶发酵初探

蓝卉, 蔡宇杰, 廖祥儒\*, 庞建勋

(江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 从无锡惠山采集的土样中筛选得到一株产低温脂肪酶的细菌, 经形态和 16S rDNA 序列鉴定, 命名为 *Serratia marcescens* SYBC Y-R。利用合成培养基初步确定摇瓶发酵产脂肪酶的最适碳源为乳糖(质量浓度 2.5 g/L), 最适氮源为氯化铵(质量浓度 1.5 g/L), 钙离子明显地促进了该菌发酵产脂肪酶。

**关键词:** 低温脂肪酶; 碳氮源; 钙离子; 发酵; *Serratia marcescens* SYBC Y-R

中图分类号: Q 556.1

文献标识码: A

## Isolation and Identification of a Cold Adapted Lipase Producing Strain and the Preliminary Research on the Fermentation to Produce Lipase

LAN Hui, CAI Yu-jie, LIAO Xiang-ru\*, PANG Jian-xun

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** In this manuscript, a cold adapted lipase producing bacterium *Serratia marcescens* SYBC Y-R was isolated, identified by morphology and 16SrDNA sequence analysis, The optimal carbon source and nitrogen source for lipase production was lactose (2.5 g/L) and ammonia chloride (1.5 g/L), respectively. Furthermore, the lipase production was promoted by presenting calcium.

**Key words:** cold adapted lipase, carbon and nitrogen source, calcium, fermentation, *Serratia marcescens* SYBC Y-R

目前脂肪酶是作为工业催化剂用途最广的酶, 但其市场完全被国外少数公司垄断, 其中丹麦 NOVO 公司占有约 80% 市场。根据脂肪酶催化效率, 可分为普通脂肪酶和低温脂肪酶。其中低温脂肪酶的最适温度在 30 ℃ 左右, 在 0 ℃ 左右仍有一定催化活性; 具有: 1) 最适反应温度较低; 2) 低温下, 催化效率高; 3) 热稳定性差, 在有机溶剂中稳定好; 4) 大部分低温脂肪酶对脂肪酸链长 C3-C10 的甘油

酯具有更好的催化效率 4 个特征。迄今为止, 研究的低温脂肪酶多由低温微生物分泌产生的<sup>[1-5]</sup>。这些微生物主要分布于南、北极以及大洋底部等温度较低的区域。这类菌生长慢, 最适产酶温度较低。尽管已经克隆得到不少低温脂肪酶基因并表达成功, 但低温脂肪酶基因的异源表达性能差, 仍需在低温条件下表达<sup>[6]</sup>, 大大限制了其在工业化生产中的应用。因此, 低温脂肪酶结构与功能的研究也受

收稿日期: 2008-11-13

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0532)。

\* 通讯作者: 廖祥儒(1964-), 男, 江西南康人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事酶工程与技术方面的研究。

Email: liaoxiangru@163.com

到一些学者的关注。作者从非极端环境中分离得到一株低温脂肪酶产生菌,对其进行了生理生化和分子生物学鉴定,并初步研究了培养基成分对该菌发酵产酶的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株

从无锡惠山采集土样,经富集培养及筛选获得。

### 1.2 主要仪器及试剂

紫外分光光度计、低温离心机、超净工作台、压力蒸汽灭菌锅、p-NPB 均购自美国 Sigma 公司,其它主要试剂均为分析纯试剂。

### 1.3 培养基

**1.3.1 富集培养基(g/L)** 酵母膏 0.3,葡萄糖 1,蛋白胨 0.5,琼脂 2;pH 值自然。

**1.3.2 初筛培养基(g/L)** 蛋白胨 1,酵母膏 0.3,氯化钠 0.3,琼脂 2,坚果油 5,维多利亚蓝 B (1:5 000) 5,表面活性剂(OP) 1;pH 7.5。

**1.3.3 复筛培养基(g/L)** 蛋白胨 1,氯化钠 1,酵母浸出汁 0.5,坚果油 4,表面活性剂(OP) 1;pH 7.2。

**1.3.4 基本合成培养基(g/L)** 葡萄糖 2,硫酸铵 1,磷酸氢二钾 7,磷酸二氢钾 3,硫酸镁 0.1,柠檬酸三钠 0.5;pH 7.2。

### 1.4 方 法

#### 1.4.1 菌种筛选

1) 初筛:采用平板显色法<sup>[7]</sup>。将分离得到的菌株接种到初筛培养基上,30 ℃培养 48 h 后,观察所长菌落周围有无蓝色水解圈,水解圈直径愈大,表示该菌株产脂肪酶能力愈强,将其中水解圈直径与菌落直径差值较大者挑出来进行复筛。

2) 复筛:采用发酵产酶法。将初筛挑出来的菌株接入复筛培养基中,在 30 ℃、200 r/min 培养 2 d,然后用 p-NPB 法测定酶活性,将产酶能力较好的菌株挑选出来供下一步实验用。

**1.4.2 酶活的测定方法** 脂肪酶活性的测定以对硝基苯丁酸酯(p-NPB)为底物,参考 Margensin 等<sup>[8]</sup>人的测定方法并略作修改。反应体系的成分为:0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 8.5),10 mmol/L 对硝基苯丁酸酯和适量的酶液。反应液先在 30 ℃保温 15 min,之后加入 100 μL 酶液,在 405 nm 下测定吸光值 ε,以 1 min 内催化产生 1 μmol 对硝基酚所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

粗酶液于不同 pH(pH 6~10)磷酸钠缓冲液

中,30 ℃水浴 15 min,测定酶活,以确定该酶的最适 pH 值。

最适温度:粗酶液按上述反应体系在不同温度(0~70 ℃)水浴 15 min,最适 pH 值下测定酶活。

**1.4.3 合成培养基的优化** 菌株于 LB 固体培养基活化 24 h 后,接种于 LB 液体培养基,30 ℃、200 r/min 培养 12 h 制成种子液。转接于合成培养基进行摇瓶发酵,发酵条件为:温度 30 ℃,摇床转速 200 r/min,装液量为 50 mL/250 mL。

1) 碳源:分别以葡萄糖、蔗糖、果糖、乳糖、半乳糖、岩藻糖为碳源,基本合成培养基的其他成分不变。

2) 氮源:分别以硫酸铵、氯化铵、乙酸铵、尿素、硝酸钠为氮源,同时选用确定的最佳碳源,基本合成培养基的其他成分不变。

3) 钙对产脂肪酶的影响:分别加入不同浓度氯化钙、稀土元素镧、EGTA 在优化后的合成培养基中摇瓶发酵,其他条件不变,获得发酵液后以不加上述任何物质的 LB 培养基发酵培养液为对照(100%酶活),计算相对酶活。

**1.4.4 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析** 从平板中直接挑取一环分离菌株细胞,加入 100 μL 无菌 ddH<sub>2</sub>O 中,旋涡混匀后,沸水浴 2 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液做 16S rDNA 扩增。采用细菌 16S rDNA 检测的通用引物上游引物 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';和下游引物 5'-AAGGAGGT GATCCAGCCGCA -3' 进行 PCR 扩增。PCR 扩增循环参数为:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 60 s,57.5 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 100 s,反应 32 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物经 0.8 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检验后,EZ-10 Spin Column DNA Gel ExTracTion KiT 割胶回收,送样至南京金斯特生物技术有限公司进行核苷酸序列测定。在 GenBank 数据库中找出与所得的 16S rDNA 序列相关的种属序列,用 ClusTalw 进行多重序列对比并用 MEGA 软件构建系统发育树。

## 2 结果分析

### 2.1 菌株的筛选

利用维多利亚蓝 B 平板进行初筛,根据水解圈直径的大小从采集的土样中挑选出 12 株形态各异 的单菌落菌株作为复筛对象。把分离得到的单菌落接种于复筛培养基中,30 ℃、200 r/min 摇瓶培养 24 h,发酵液经 4 ℃、10 000 r/min 离心 20 min,取

上清液测定酶活。从表1可以看出,10号菌株产脂肪酶活力较高,定名为Y-R。

表1 待选菌株的脂肪酶活性

Tab. 1 Lipase activity of the isolated strains

编号	初筛酶活	酶活/(U/L)	编号	初筛酶活	酶活/(U/L)
1	+	341±64	7	+++	716±156
2	+++	654±126	8	++++	884±185
3	++	543±105	9	++++	869±198
4	++	556±120	10	++++	936±134
5	++	583±134	11	++	455±126
6	+++	618±78	12	++	529±143

## 2.2 菌株的鉴定

将筛选到的菌株Y-R划线于LB固体培养基上,30℃培养1~2d,观察单菌落形态。培养1d后出现红色菌落,2d后菌落颜色加深,呈深红色,菌落直径达约4mm,不透明,圆形,中间稍隆起,粘稠,边缘整齐光滑,经革兰氏染色,确定其为革兰氏

阴性菌。培养的细胞经扫描电镜观察,细胞呈短杆状,长约1μm,直径约0.3μm,端圆,见图1。其菌落形态和细胞形态符合沙雷氏菌属的特征。

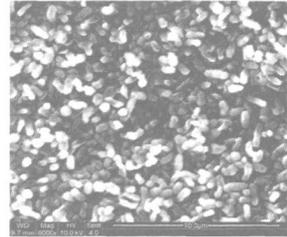


图1 菌株Y-R的电镜照片

Fig. 1 Electroscopic photograph of strain Y-R

该菌的16S rDNA的PCR扩增产物与*Serratia marcescens*的16s rDNA基因的相似性超过99%。经Blast软件将其序列与GenBank中收集的所有细菌基因进行比对,显示其与*Serratia marcescens* A3最为相似,见图2,因此将该菌定名为*Serratia marcescens* SYBC Y-R。

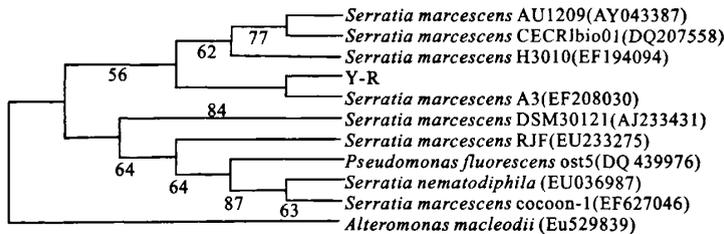


图2 菌株Y-R 16S rDNA的比对分析

Fig. 2 16S rDNA Blast analysis of strain Y-R

## 2.3 合成培养基的优化

为了便于研究钙离子在*Serratia marcescens* SYBC Y-R产脂肪酶中的作用,作者选择合成培养基为基本产酶培养基,确定了该菌的生长曲线,见图3,探讨了碳源、氮源对产脂肪酶的影响,见图4~5。

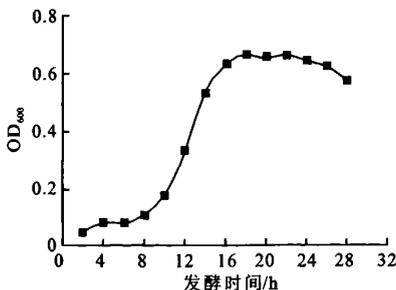


图3 摇瓶发酵过程中*Serratia marcescens* SYBC Y-R的细胞生长

Fig. 3 Time-course of *Serratia marcescens* SYBC Y-R growth in flask culture

由于酶的分泌与细胞数量呈正相关,选择18h为发酵终止时间,检测发酵液脂肪酶活性。从图4可以看出,在以乳糖为惟一碳源时,*Serratia marcescens* SYBC Y-R发酵液脂肪酶活力最高,且当添加的乳糖为2.5g/L时为最佳;图5则显示其最佳氮源为氯化铵(1.5g/L)。

## 2.4 粗酶性质

在不同pH值的缓冲液中,*Serratia marcescens* SYBC Y-R粗酶的活性不尽相同,其中在pH 8时粗酶的活性最高,表明其最适pH为8,见图6。粗酶的活性也随温度的变化而发生改变,其中最适温度为30℃,见图7。该菌的粗酶在0℃时活性为38U/L,是30℃时的15%。根据定义,在最适温度下低温酶催化反应的速率与0℃时催化速率的比值小于1.25%,说明*Serratia marcescens* SYBC Y-R粗脂肪酶具有低温脂肪酶的特性。

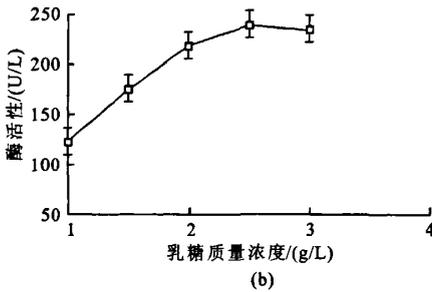
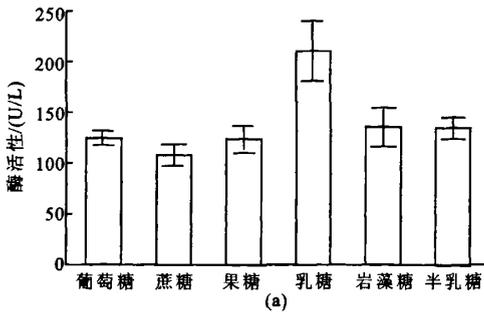


图 4 碳源对 *Serratia marcescens* SYBC Y-R 发酵产脂肪酶的影响

Fig. 4 Effect of carbon source on lipase production by *Serratia marcescens* SYBC Y-R

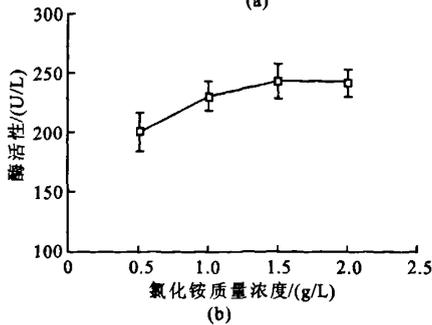
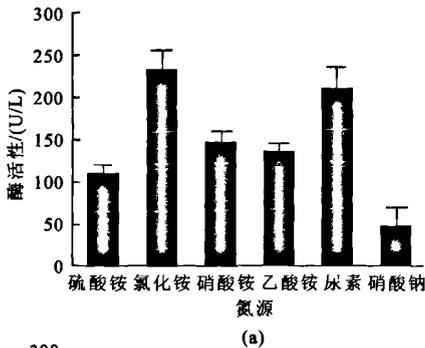


图 5 氮源对 *Serratia marcescens* SYBC Y-R 发酵产脂肪酶的影响

Fig. 5 Effect of nitrogen source on lipase production by *Serratia marcescens* SYBC Y-R

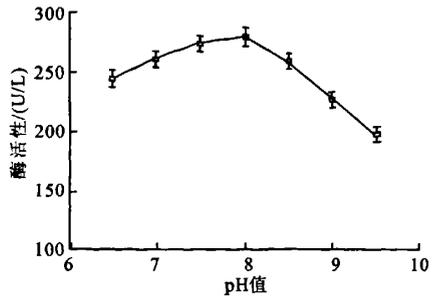


图 6 pH 值对 *Serratia marcescens* SYBC Y-R 脂肪酶活性的影响

Fig. 6 Effect of pH on lipase activity from *Serratia marcescens* SYBC Y-R

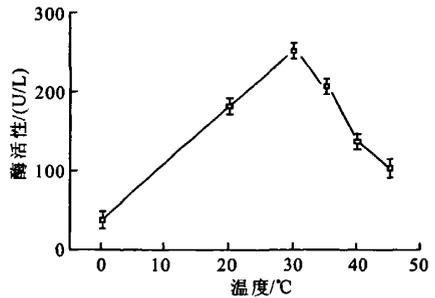


图 7 温度对 *Serratia marcescens* SYBC Y-R 脂肪酶活性的影响

Fig. 7 Effect of temperature on lipase activity from *Serratia marcescens* SYBC Y-R

### 2.5 钙对 *Serratia marcescens* SYBC Y-R 摇瓶发酵产脂肪酶的影响

氯化钙添加量达到或大于 2 mmol/L 时, *Serratia marcescens* SYBC Y-R 发酵液脂肪酶活性明显升高 ( $P < 0.01$ ), 见图 8。较高浓度 ( $> 2$  mmol/L) 的钙离子通道阻塞剂氯化镧则使发酵液脂肪酶活性明显降低 ( $P < 0.01$ ), 但在 10 mmol/L 内钙离子螯合剂 EGTA 对脂肪酶活性无明显影响。

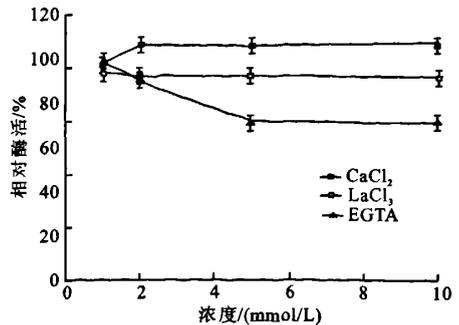


图 8 钙对 *Serratia marcescens* SYBC Y-R 发酵产脂肪酶的影响

Fig. 8 Effect of calcium on *Serratia marcescens* SYBC Y-R fermentation for lipase production

### 3 结 语

目前大多数热稳定性酶和低温酶均来源于极端环境,但其基因多需要在极端环境下才能表达成具有极端酶特性的蛋白质,比如耐热的酶需要在高温的环境表达才有高的热稳定性,低温酶只在低温下表达。蛋白质特定空间构象的形成受一级结构、辅助因子和微环境的影响,因此需要辅助因子和环境条件才能形成极端酶特性的蛋白质难于高效率异源表达。相反,不需要辅助因子的则易达到高效表达的目的。

非极端菌生存条件温和,产酶对环境要求并不

苛刻,从自然生境中筛选得到的产低温脂肪酶非极端菌,其发酵培养较容易,可能属于后一类极端酶。因此,非极端菌可能是较好的产极端酶的基因资源。从实验可以看出,*Serratia marcescens* SYBC Y-R 脂肪酶具有低温脂肪酶的特点,其发酵产酶在一定程度上受钙离子的调控。从其它材料中,作者也分别获得产低温脂肪酶的非极端菌 *Geotrichum* sp. SYBC WU-3<sup>[9]</sup> 和 *Burkholderia mana* SYBC LI-1<sup>[10]</sup>,并优化了其产酶发酵条件,进一步说明在非极端环境中筛选低温脂肪酶是可行的。常温脂肪酶在食品和生物技术中应用广泛<sup>[11-12]</sup>,低温脂肪酶在其中的应用特点如何、其分子特征、表达调控、结构与功能的关系如何都还待深入研究。

### 参考文献(References):

- [1] Roy D, Sengupta S. Structural features of a cold-adapted Alaskan bacterial lipase[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2007, 24: 463-470.
- [2] Lo Giudice A, Michaud L, De Pascale D, et al. Lipolytic activity of Antarctic cold-adapted marine bacteria (Terra Nova Bay, Ross Sea)[J]. *J Appl Microbiol*, 2006, 101: 1039-1048.
- [3] Elend C, Schmeisser C, Hoebenreich H, et al. Isolation and characterization of a metagenome-derived and cold-active lipase with high stereospecificity for (R)-ibuprofen esters[J]. *J Biotech*, 2007, 130: 370-377.
- [4] Männistö M K, Häggblom M M. Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from Finnish Lapland[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2006, 29: 229-243.
- [5] Joseph B, Ramteke PW, Thomas G, et al. Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications[J]. *Biotech Mol Biology Rev*, 2007, 2(2): 039-048.
- [6] Cusano A M, Parrilli E, Marino G, et al. A novel genetic system for recombinant protein secretion in the Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125[J]. *Microbiol Cell Factories*, 2006, 5: 40.
- [7] Samad M Y A, Razak C N A, Abubakar S, et al. A plate assay for primary screening of lipase activity[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1989, 9(1): 51-56.
- [8] Margesin R, Feller G, Hammerle M, et al. A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil [J]. *Biotechnology Letters*, 2002, 24: 27-33.
- [9] 王蕾,蔡宇杰,廖祥儒,等. 一株碱性低温脂肪酶产生菌发酵条件的优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2008, 27(3): 114-119.  
WANG Lei, CAI Yu-jie, LIAO Xiang-ru, et al. Optimization of fermentation conditions for a low-temperature lipase-producing strain[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 27(3): 114-119. (in Chinese)
- [10] 恽丽红,蔡宇杰,金永生,等. 产低温脂肪酶非极端菌的筛选、产酶发酵及粗酶性质研究[J]. *生物技术*, 2008, 18(4): 56-59.  
YUN Li-hong, CAI Yu-jie, JIN Yong-sheng, et al. Isolation, fermentation and the crude enzyme characterization of a cold active lipase producing mesophilic bacterium [J]. *Biotechnology*, 2008, 18(4): 56-59. (in Chinese)
- [11] 曾淑华,周位,杨江科,等. 固定化脂肪酶催化大豆油制备生物柴油[J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26(3): 75-79.  
ZENG Shu-hua, ZHOU Wei, YANG Jiang-ke, et al. Immobilized lipase catalyzing production of biodiesel[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(3): 75-79. (in Chinese)
- [12] 张晓鸣,周健,刘巧瑜,等. 有机相脂肪酶催化合成技术在食品及相关领域的应用[J]. *食品与生物技术学报*, 2006, 25(1): 120-126.  
ZHANG Xiao-ming, ZHOU Jian, LIU Qiao-yu, et al. Application of lipase-catalyzed synthesis in organic solvent for food and related industry[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(1): 120-126. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)