

Bohaisea-9145 海洋低温碱性脂肪酶研究

邵铁娟^{1,2} 孙 谧^{1*} 郑家声² 王跃军¹ 邱秀宝³

(¹ 中国水产科学院黄海水产研究所 青岛 266071)

(² 中国海洋大学 青岛 266003)

(³ 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 从 2000 多份渤海海区海水海泥样品中分离获得一株新型脂肪酶高产菌株 BohaiSea-9145, 经鉴定为适冷性海洋酵母 (*Yarrowia lipolytica*)。菌株在以豆饼粉、棉籽饼粉和花生粕作为碳氮源并添加 0.5% 花生油的培养基中能较好地生长产酶, 最适产酶温度 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 产酶周期为 23h。所得脂肪酶的最适反应温度为 35°C , 最适 pH 8.5, pH4.0 ~ 9.0 范围内稳定, 热稳定性差。该酶与常见金属离子和化学试剂的配伍性较好, 受表面活性剂 SDS 的激活, 且具有良好的耐盐及抗氧化特性, 是一种新型的海洋低温碱性脂肪酶, 在洗涤剂行业特别是冷洗行业中具有良好的应用前景。

关键词 海洋酵母, 低温, 碱性脂肪酶

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)06-0789-05

海洋具有十分丰富的微生物资源, 海洋微生物分泌的酶与陆源性微生物所产的酶相比, 具有更为独特的酶学性质和应用前景, 引起了国内外研究人员的极大关注。现阶段关于何为真正的海洋微生物仍有争论, 但一般认为, 分离自海洋环境, 其正常生长需要海水, 并可在寡营养、低温条件下生长的微生物可视为严格的海洋微生物。然而有些分离自海洋的微生物, 其生长不一定需要海水, 但可产生不同于陆地微生物的代谢物或拥有某些特殊的生理性质(如盐耐受性、液化琼脂等), 也被视为海洋微生物^[1,2]。生活寒冷环境如极区、洋底等地区的嗜冷性或适冷性微生物为适应环境而产生的低温酶与嗜中温或嗜高温的同类酶相比, 一般在 $0 \sim 30^\circ\text{C}$ 范围内具有高 K_{cat} 值和催化效率以及热稳定性差的特性。这些特性可能是由分子间非共价键作用力减弱导致酶分子具有异常的分子柔性所引起的。除此之外, 目前尚未发现对低温酶的低温催化活性和热不稳定性起决定性作用的因子^[3~5,9,10]。

但由于海洋独特的环境, 包括高盐、高压、低营养、低温等, 造就了海洋微生物有别于陆生微生物的许多特异性, 如不易培养、形态多样且在保藏和移种过程中很容易死亡等, 不利于海洋微生物研究和开发的深入, 限制了海洋微生物资源的开发和利用。现阶段人们常运用分子生物学手段对微生物 rDNA

进行多样性分析以确定其种属分类^[6,7]。现阶段研究的低温脂肪酶主要来源于海洋鱼类和微生物, 目前只有少数几篇关于嗜冷性海洋细菌 *Psychrobacter immunobis* B10 产低温脂肪酶的报道^[3,4]。微生物脂肪酶的商业化生产主要是通过 *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Candida rugosa* 和 *Chromobacterium viscosum* 等真菌、酵母、细菌的发酵来获得的^[8]。本文报道了一种新型海洋低温碱性脂肪酶的产酶菌株的鉴定、产酶条件的优化及部分理化性质的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 采集渤海海域海水、海泥样品 2000 多份。

1.1.2 富集培养基: 每升含蛋白胨 5g, 酵母浸膏 5g, KH_2PO_4 4g, MgSO_4 0.5g, 橄榄油 5g, 以 Na_2HPO_4 调节 pH 为 6.5 ~ 7.0。

1.1.3 初筛培养基: 每升含蛋白胨 5g, 酵母浸出粉 3g, 琼脂 20g, 三丁酸甘油酯 2.5g, pH7.8, 121°C 30min 灭菌后高速匀浆乳化后倒平板备用。

1.1.4 复筛培养基: 每升含豆饼粉 30g, 麦麸 20g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g, 橄榄油 5g, K_2HPO_4 5g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.5g, pH 为 6.5 ~ 7.0。

1.1.5 产酶优化初始培养基: 每升含蛋白胨 30g, 牛

基金项目: 国家 863 计划 (2001AA625070)

* 通讯作者。Tel: 86-532-5833961; Fax: 86-532-5819525; E-mail: sunmi@ysfi.ac.cn

作者简介: 邵铁娟(1978-), 女, 浙江上虞人, 硕士研究生。E-mail: stjoud-2001@sohu.com

收稿日期: 2004-03-18, 修回日期: 2004-05-13

肉浸膏 20g、KH₂PO₄ 2g、MgSO₄ 0.5g ,橄榄油 5g ,以 Na₂HPO₄ 调节 pH 为 6.5 ~ 7.0。

1.1.6 试剂和仪器 :聚乙烯醇(PVA 聚合度 1750 ± 50 购自天津市化学试剂三厂 橄榄油购自上海医药(集团)上海化学试剂公司 ;其它生化试剂或化学试剂均为进口或国产分析纯。

SPS-250B 型生化培养箱购自上海跃进医疗器械厂 ;SW-CJ 型超净工作台购自中外合资苏州安泰空气技术有限公司 ;RoboCyler96 孔梯度 PCR 仪购自美国 STRATAGENE 公司。

1.2 脂肪酶活性测定

根据中华人民共和国行业标准(中华人民共和国轻工业部 ,1993)进行。在测定条件下 ,以每分钟分解底物(橄榄油)释放出 1 μmol 游离脂肪酸所需的酶量定义为 1 个脂肪酶活力单位(U)。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 菌株常规分类学测试 :常规分类方法按照文献[6]进行测定。

1.3.2 26S rDNA D1/D2 区域序列测定及分析 :参考文献[7]并根据实验室条件稍加修改。

1.4 脂肪酶理化性质研究

脂肪酶发酵液经氯仿萃取、超滤及 CM-Sepharose FF 阳离子交换柱层析纯化得到电泳纯脂肪酶 ,并对其进行以下理化性质研究。具体分离纯化方法见文献[22]。

1.4.1 温度、pH 对脂肪酶活性的影响 :用 pH 4 ~ 9.5 的磷酸盐缓冲液 ,分别在 5 ~ 50℃ 下进行脂肪酶水解活力的测定。

1.4.2 温度、pH 对脂肪酶稳定性的影响 :脂肪酶溶解于不同 pH 的 0.25mol/L 磷酸盐缓冲液中 ,分别在 23℃、30℃和 35℃下静置 ,每隔 30min 测定并计算脂肪酶残留活性。

1.4.3 常见金属离子和化学试剂对脂肪酶活性的影响 :在酶反应液中分别加入不同浓度的金属离子和化学试剂 ,放置 30min 后以蒸馏水为对照在最适反应条件下测定酶活力。

2 结果和讨论

2.1 土样分离结果

经过初筛 ,从 2000 多个海泥样品中分离得到 1960 株产脂肪酶菌株 ,经复筛发现 680 株产脂肪酶的能力很弱(< 1U/mL) ,1253 株产脂肪酶的能力一般(1 ~ 15U/mL) ,27 株产酶能力较强 ,最高产酶菌株为 Bohaisea-9145 ,达 25.6U/mL。

2.2 产酶菌种鉴定

2.2.1 形态特征与生理生化特征 :菌株 BohaiSea-9145 在平板上于 25℃培养 24h 后 ,菌落奶酪状 ,奶白色 ,不返光 ,边缘波浪状 ,有树根状隆起 ;细胞卵形 ,大小为(2.0 ~ 5.5) μm × (3.0 ~ 15.0) μm ;单极全壁芽殖 ,25℃麦芽汁液体静置培养 3d 后有环、岛形成 ,无醭膜 ;无掷孢子的产生 ;可形成假丝酵母型(Candida type)假菌丝 ,其它生理生化特征见表 1。

海洋菌株 BohaiSea-9145 的各项生理生化特征基本与陆源 *Y. lipolytica* 相同 ,但也有一些其特有的性质如能同化甘油、耐中盐、液化明胶及能在 0℃生长等。Mortia 根据微生物的最适生长温度和生长的上下限不同 ,将低温微生物分为适冷菌(Psychrotroph)和嗜冷菌(Psychrophile)。适冷菌是指在 0℃能够生长 ,但最适生长温度在 20 ~ 30℃之间 ,极限生长温度在 40℃的一类微生物。这些菌主要分布在南、北极以及大洋底部等温度较低的区域。根据 Mortia 对低温微生物定义和文献[6]可初步将 BohaiSea-9145 确定为适冷性海洋解脂耶罗氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)。

表 1 Bohaisea-9145 主要生理生化特征

Table 1 The major physiological and biochemical characterization of the strain

Items	Result	Items	Result
Glucose	+	Inulin	-
Galactose	-	Soluble starch	-
L-Sorbose	-	D-Xylose	-
Sucrose	-	D-Glucosamine	-
Maltose	-	D-Arabinose	-
Cellobiose	-	Ribose	-
Trehalose	-	L-Rhamnose	-
Lactose	-	Methanol	-
Melibiose	-	L-Arabinose	-
Raffinose	-	Ethanol	+
Melezitose	-	Glycerol	+
Erythritol	+	Hexdecane	-
α-Methyl-D-G	-	Fermentation of Carbohydrate	-
Ribitol	-	Utilization of Nitrate	-
Galactitol	-	Growth in vitamin-free medium	-
D-Mannitol	+	Splitting of arbutin	+
D-Glucitol	-	Formation of amyloid compound	-
Salicin	-	Hydrolysis of urea	+
D L-Lactic acid	+	Gelatin liquefaction	+
Succinic acid	+	Growth at 37℃	-
Citric acid	+	Growth at 0℃	+
Inositol	-		

2.2.2 核酸序列分析 将 BohaiSea-9145 26s rDNA 大亚基单位 D1/D2 区域序列结果在国际核酸数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 中进行同源序列的搜索得到与菌株 *Y. lipolytica* (AF33597.1) 序列匹配率为 494/495。一般而言,两菌株的同源率为 100% 时,可初步确定为同一种;当同源率 < 99% ,可初步确定为准新种;若实验菌株与亲缘关系最近的菌株的同源率在 99% ~ 100% 之间,它们的关系要视不同的情况而定。因而初步可将实验菌株确认为 *Y. lipolytica* ,这与用常规鉴定的方法得到的结果是一致的。但 Fell 等^[23]曾报道不同的种在 26S rDNA 区域具有极高的序列同源性从而不能加以区分。

2.3 产酶条件研究

为适应工业化生产的需求,采用紫外、亚硝基胍诱变等手段复合诱变将菌株逐步驯化至能在淡水培养基中生长产酶后进行产酶条件研究,相关实验及诱变机制另行撰文发表。

2.3.1 氮源对产酶的影响 在无含氮化合物的初始培养基中加入 3% 不同有机氮源和无机氮源^[8,11,12,14,19] ,接种发酵一定时间后测定酶活(图 1)。

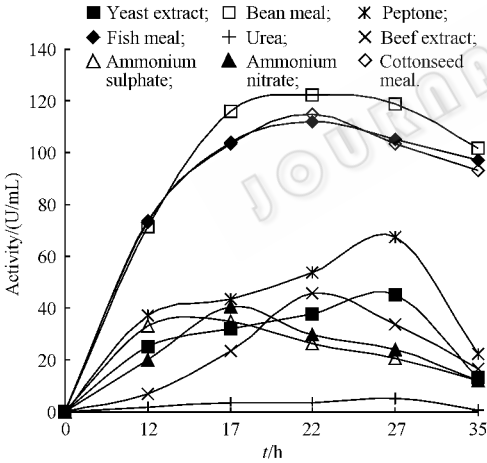


图 1 氮源对脂肪酶产量的影响
Fig.1 Effect of nitrogen source on lipase production

结果表明,添加有机氮源的产酶效果较无机氮源要好。豆饼粉、棉籽饼粉由于价格低廉、来源广泛且对培养基 pH 影响小而成为理想的发酵原料。尿素对菌株 *Y. lipolytica* BohaiSea-9145 的产酶存在严重的抑制作用,与 Gerardo 等^[11]报道的尿素能极大地促进 *Y. lipolytica* 681 产脂肪酶相反,这种差异可能是由菌株对溶氧的需求不同引起的。

2.3.2 碳源对产酶的影响 在氮源优化基础上加入 2% 不同碳源^[8,11,13,14,18] ,接种发酵一定时间后测酶活(图 2)。

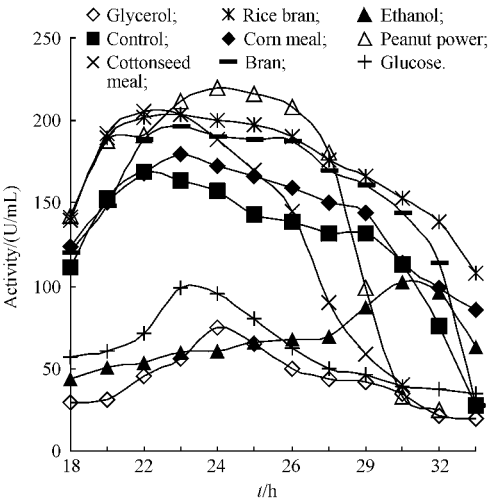


图 2 碳源对脂肪酶产量的影响
Fig.2 Effect of carbon source on lipase production

油脂类碳源的产酶效果明显优于碳水化合物类碳源^[11]。选用的 5 种工业原料都是菌株产酶的理想碳源,以花生粕最佳。该菌种的发酵周期远远短于目前已报道的菌种,20 ~ 26h 为稳定产酶期,这一优良性状可能与海洋菌特殊的代谢途径有关,大大降低了脂肪酶的产业化生产的成本。

2.3.3 诱导剂对产酶的影响 在碳氮源优化培养基中加入一定浓度不同诱导剂,接种发酵 23h 后测活(图 3)。

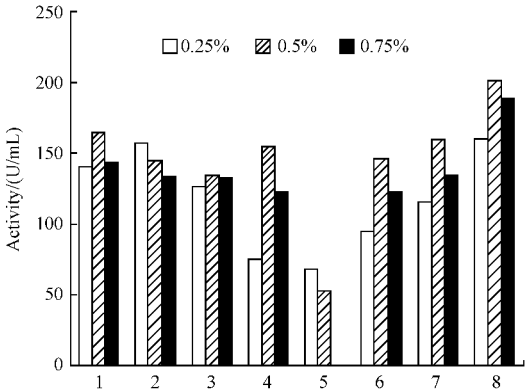


图 3 诱导剂对脂肪酶产量的影响
Fig.3 Effect of inducer on lipase production

1. Corn embryo oil ; 2. Sunflower seed oil ; 3. Sesame oil ; 4. Refine peanut oil ; 5. Glycerol tributryrate ; 6. Crude soybean oil ; 7. Crude peanut oil ; 8. Olive oil .

所选的各种诱导剂对产酶均有一定的促进作用,且长链脂肪酸较短链脂肪酸更为有效。0.5% 添加量最为适宜,当油脂添加量过高时对产酶存在一定的抑制作用^[8,12,20]。

2.3.4 培养温度对产酶的影响 :以改良的液体培养基,在不同温度下发酵培养,定期取样测活(图 4)。

结果表明菌株产酶温度范围较广,以 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 最宜,利于脂肪酶产业化的发酵控制和节约能源。

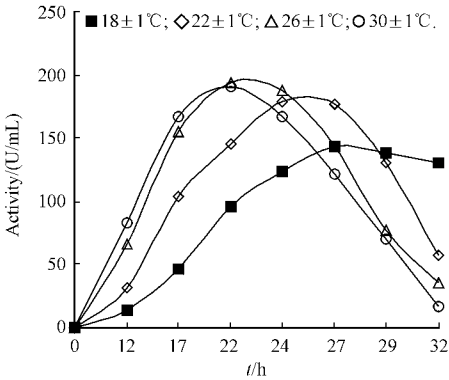


图 4 温度对脂肪酶产量的影响
Fig.4 Effect of temperature on lipase production

经上述产酶条件优化后,适冷性海洋酵母 *Bohaisea-9145* 分泌的脂肪酶活性达 233U/mL ,远高于现有的摇瓶条件下低温碱性脂肪酶的活性^[21]。

2.4 Bohaisea-9145 脂肪酶理化性质研究

2.4.1 温度、pH 对脂肪酶活性及稳定性的影响 实验表明该脂肪酶最适作用 pH 为 8.5,最适反应温度 35°C ,当温度大于 35°C 活性迅速降低,而在低温下脂肪酶活性稳定, 5°C 仍具有 20% 以上的相对酶活,表现出低温碱性脂肪酶的特性^[3,4,9,10]。低温下该酶在 pH4.0 ~ 9.0 范围内具有良好的稳定性。*Bohaisea-9145* 脂肪酶与南极细菌 *Psychrobacter immobilis* B10 低温脂肪酶具有相同的最适作用温度(35°C 左右),低温下的高催化活性(5°C 保留 20% 残留活性)及明显的热不稳定性(60°C 半衰期为 2min),而与嗜温细菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的中温脂肪酶的特性明显不同(最适作用温度 $> 60^{\circ}\text{C}$ 、 20°C 时酶活为 0、 60°C 半衰期为 120min)^[3,4]。现已报道的各种常见不同微生物来源的脂肪酶一般具有较高的作用温度及碱性条件下活性不高等特征^[11~14]。*Bohaisea-9145* 脂肪酶能在低温和碱性条件下发挥最高活性的特点,为该酶成为优良的洗涤剂添加酶奠定了基础。

2.4.2 洗涤剂中常见金属离子和化学试剂对海洋微生物脂肪酶酶活的影响 许多微生物脂肪酶活性在低浓度(1mmol/L)的 EDTA 和某些金属离子的存在下就会受到抑制^[12,14]。研究结果表明,高浓度(100mmol/L)的 Na^{+} 、 Li^{+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等常见洗涤剂离子对该脂肪酶活性没有影响或有一定的促进作用。 Zn^{2+} 引起的抑制效应可能是由于金属离子改变了酶活性部位的构象而引起的^[12,15]。当加入等物质的量的 EDTA 将 Zn^{2+} 螯和除去后可使脂肪酶活性恢

复 74.2%(表 2)。

表 2 常见金属离子及化学试剂对脂肪酶活力的影响
Table 2 Effect of Metal Ions and chemical reagents on lipase activity

Metal ion or other chemical reagents	Concentration	Relative activity/%
Na^{+}	100 mmol/L	108.9
Ba^{2+}	100 mmol/L	78.6
Li^{+}	100 mmol/L	107.1
Ca^{2+}	100 mmol/L	100.0
Mg^{2+}	100 mmol/L	110.0
Mn^{2+}	100 mmol/L	35.5
Fe^{3+}	100 mmol/L	6.7
Zn^{2+}	100 mmol/L	0.9
Zn^{2+}	20 mmol/L	1.3
Urea	10%	115.0
Tris	10%	137.8
SDS	10mmol/L	125.5
EDTA	10mmol/L	23.8
Glycol	10%	108.7
Glycerine	10%	117.2
Mannitol	10%	105.6
H_2O_2	1%	89.5
$\text{Zn}^{2+} + \text{EDTA}$	20 mmol/L	74.2

此外,常见化学试剂与该脂肪酶具有良好的配伍性。阴离子表面活性剂 SDS(10mmol/L)能提高脂肪酶的催化活性(提高了 25.5%),而 1% H_2O_2 对酶活没有明显的影响(具 89.5% 的残留活性),目前尚没有脂肪酶这方面性质的报道。海洋酶具有的抗氧化和耐盐特性可能与海洋菌株适应高盐、高压、低温的海洋环境有关^[16,17]。

综上所述,海洋酵母 *Bohaisea-9145* 分泌的胞外脂肪酶是一种新型的低温碱性脂肪酶,它具有的低温、碱性、抗氧化、为表面活性剂活化及生产成本低、产酶周期短等特性使其具有良好的产业化和应用前景,进一步开拓了海洋微生物资源的利用领域。

参 考 文 献

[1] Okami Y. Marine microorganisms as a source of bioactive agents. *Microb Ecol*, 1986, 12: 65 ~ 78.
[2] 李利君,蔡慧农,苏文金. 海洋微生物活性物质的研究. 集美大学学报(自然科学版) 2000, 5(2): 80 ~ 86.
[3] Charles G, Mohamed A, Jean L A, et al. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1997, 1342: 110 ~ 131.
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [4] Jean L A , Jean L , Charles G , *et al.* Molecular adaption to cold of Antarctic bacterial lipase. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* , 1997 **3** : 29 – 35.
- [5] Jane A I , Gudni A , Anthony J L , *et al.* Purification and characterization of a serine peptidase from the marine psychrophile strain PA-43. *FEMS Microbiology Letters* , 2001 **201** : 285 – 290.
- [6] Kurtzman C P , Fell J W. The Yeast , A Taxonomic Study. 4th ed. Amsterdam :Elsevier Science , 1998.
- [7] 白逢彦 , 贾建华 , 梁慧燕 , 等. 假丝酵母疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义. 菌物系统 , 2002 **21** (1) : 27 – 32.
- [8] Gandhi N N. Application of lipase. *J Am Oil Chem Soc* , 1997 **74** : 621 – 634.
- [9] 史贤俊 , 林 影. 嗜冷酶及其工业应用. 生命的化学 , 2001 **21** (3) : 248 – 249.
- [10] Naeem R , Yuji S , Satoshi E , *et al.* Low-Temperature Lipase from Psychrotrophic *Pseudomonas* sp. Strain KB700A. *Applied and Environmental Microbiology* , 2001 **67** (9) : 4064 – 4069.
- [11] Gerardo C , Sergio R. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresource Technology* , 1999 **70** : 173 – 180.
- [12] Rohit S , Yusuf C , Uttam C B. Production , purification , characterization , and applications of lipases. *Biotechnology Advances* , 2001 **19** : 627 – 662.
- [13] Muralidhar R V , Chirumamila R R , *et al.* A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal* , 2001 **17** : 23.
- [14] Kamini N R , Kurosu T , Iefuji H. Production , purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry* , 2000 **36** : 317 – 324.
- [15] Smith J L , Alford J A. Inhibition of microbial lipases by fatty acid. *Appl Microbiol* , 1996 **14** : 699 – 704.
- [16] 徐 岩 , 李建波 , 王 栋. 解脂假丝酵母脂肪酶的纯化及性质研究. 无锡轻工大学学报 , 2001 **20** (3) : 257 – 260.
- [17] Abel H , Marie D J , Danielle D , *et al.* Production , purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*. *Enzyme and Microbial Technology* , 1999 **25** : 80 – 87.
- [18] Dalmau E , Montesinos J L. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology* , 2000 **26** : 657 – 663.
- [19] 宋庆训 , 林金萍 , 戎一平 , 等. 脂肪酶产生菌 *Candida rugosa* 产酶条件研究. 生物工程学报 , 2001 **17** (1) : 101 – 104.
- [20] Gordillo M A , Obradors N , Montesinos JL , *et al.* Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1995 **43** : 339 – 343.
- [21] 杨从发 , 王淑军 , 陈 静 , 等. 海洋微生物碱性脂肪酶生产菌的分离选育. 淮海工学院学报 , 2000 **9** (4) : 45 – 48.
- [22] 董宏伟 , 孙 谧 , 王跃军 , 等. 海洋微生物低温碱性脂肪酶的纯化与性质研究. 海洋与湖沼 , 2004 **4** : 376 – 383.
- [23] Fell J W , Boekhout T , Fonseca A , *et al.* Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Syst Bacteriol* , 2000 **50** : 1351 – 1371.

Study on Low-temperature Alkaline Lipase from Bohaisea-9145

SHAO Tie-Juan^{1,2} SUN Mi^{1*} ZHENG Jia-Sheng¹ WANG Yue-Jun² QIU Xiu-Bao³

(¹ Yellow Sea Fisheries Research Institute , Chinese Academy of Fishery Sciences , Qingdao 266071 , China)

(² Ocean University of China , Qingdao 266003 , China)

(³ Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract : Lipase-overproducing marine yeast Bohaisea-9145 isolated from the Bohai sea region was identified as psychrotrophic *Yarrowia lipolytica* . The optimum composition of culture medium was ground soybean 4% , rice bran 4% , peanut power 4% , crude peanut oil 0.5% , MgSO₄ 0.05% , KH₂PO₄ 0.2% . The optimum temperature and pH were 26 ± 1℃、pH5.0 , the time of fermentation cycle was 23h. The lipase activity was improved to 258.67U/mL through optimization , four-fold more than that of initial strain. The lipase displayed maximum activity at pH 8.5 , 35℃ and was stable within the range of pH 4.0 ~ 9.0 at low temperature. It had high thermosensitivity , good compatibility with familiar metal ions and chemical reagents. It was antioxidant and had strong resistance to high salinity. As a novel marine low-temperature lipase , it has promising prospect in many fields , especially as an additive of detergent.

Key words : Marine yeast , Low temperature , Alkaline lipase

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA625070)

* Corresponding author. Tel : 86-532-5833961 ; Fax : 86-532-5819525 ; E-mail : sunmi@ysfri.ac.cn

Received date : 03-18-2004