

南大洋深海嗜冷菌 2-5-10-1 及其低温脂肪酶的研究

林学政¹, 杨秀霞², 边 际¹, 黄晓航¹

(1 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 2 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 从南大洋普里兹湾的水样中筛选到一株产低温脂肪酶的深海嗜冷菌 2-5-10-1, 对其生长及产酶情况和酶性质做了初步研究. 该菌株的最适生长温度为 5 °C, 此时分泌的胞外脂肪酶最多; 添加 Tween80, 橄榄油可显著促进脂肪酶的产生. 该脂肪酶的最适作用温度为 35 °C, 在 0~20 °C 均保持较高的酶活性, 在 0 °C 可保持 37% 的相对酶活性; 酶的最适作用的 pH 值为 7.5, 在 pH 6~9 的范围内均存在较高酶活性; 对热较敏感, 在 60 °C 保温 15 min 可丧失 50% 以上的酶活性. 该脂肪酶的催化作用不需要金属离子的参与, Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对酶活有着强烈的抑制作用.

关键词: 南大洋; 深海嗜冷菌; 低温脂肪酶

中图分类号: Q556

文献标识码: A

文章编号: 0253-4193(2005)00-0154-05

1 引言

极端环境下微生物的生长特性及其对生境的适应机制是目前微生物学研究的热点, 极端微生物是亟待开发的微生物资源宝库. 南北极、深海等环境由于终年低温而存在着一个庞大的低温生态系统, 其生物多样性和生物资源开发受到越来越多的关注, 有许多新的生物种类、新药物和新酶等资源正有待于研究和开发^[1-4].

目前有关低温微生物的研究除从酶的低温催化机制^[5-8]、细胞膜^[9,10]、细胞质^[11]及 DNA 的复制转录、翻译^[12]等各个层次研究其生境适应性外, 对多不饱和脂肪酸和低温酶的应用基础研究也受到越来越多的关注^[2].

脂肪酶作为广为应用的一种工业用酶, 目前使用的基本都是中温酶, 酶活性最适温度一般都在 50 °C 左右. 同中温酶相比, 低温脂肪酶具有极高的催化常数 (K_{cat}) 值, 同时有较低和较稳定的米氏常数 (K_M) 值, 其主要特征是具有较低的活化能和低温下的酶活力, 在某些领域有着中温脂肪酶所不可比

拟的优越性, 因此在洗涤业、食品加工、生物制药、环境生物技术等领域有着广阔的应用前景. 目前国内对极端生物低温酶的研究尚处于初始阶段, 仅有低温蛋白酶^[1,13]、淀粉酶^[14]、脂肪酶^[15]的零星报道, 以南极样品为材料进行低温酶的研究与开发尚未见报道. 为加强研究与开发极地微生物这一宝贵资源, 本研究从中国第十八次南极科学考察的南大洋 CTD 水样中分离到产低温脂肪酶的极地微生物 120 多株, 经筛选比较, 以 2-5-10-1 为研究对象, 对其生长与产酶特性、酶学性质进行了初步研究, 以期为今后极地深海微生物低温酶的低温适应机制及其应用打下一定的工作基础.

2 材料和方法

2.1 样品的采集

中国第十八次南极科学考察南大洋考察于 2002 年 1~2 月进行, CTD 采样, 水深从表层水到 3 300 m 不等.

2.2 培养基

脂肪酶筛选培养基(Tween80): 胰蛋白胨 5 g,

收稿日期: 2003-03-21; 修订日期: 2003-07-31.

基金项目: 大洋协会“十五”计划资助项目(DY105-04-04-03).

作者简介: 林学政(1971—), 男, 山东省栖霞市人, 副研究员, 博士, 从事极端微生物活性物质的研究. E-mail: linxz@fio.org.cn

酵母粉 1 g, CaCl₂ 0.1 g, Tween80 10 cm³, 过滤陈海水 1 000 cm³, 琼脂 15 g, 制备平板. 取适量水样涂布筛选平板, 5 ℃ 条件下倒置培养 5~6 d, 在菌落周围出现模糊的晕圈者为脂肪酶阳性菌株.

发酵培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 30 g, MgSO₄ 1 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, K₂HPO₄ 2 g, Tween80 10 cm³, 蒸馏水 1 000 cm³. 5 ℃ 下 150 r/min 摇床培养.

2.3 脂肪酶活性的测定

参照李建武等^[16]的方法. 以发酵液为粗酶液, 进行酶活性的测定. 反应时间为 15 min, 温度为 30 ℃. 脂肪酶的活力单位采用国际单位(IU): 在上述反应条件下, 每分钟释放 1 μmol 脂肪酸为一酶活力单位.

3 结果

3.1 产低温脂肪酶菌株的筛选

从南大洋普里兹湾 CTD 水样中共筛选到 500 余株(种) 菌株, 经脂肪酶筛选平板(Tween80) 上共筛选得到产低温脂肪酶的阳性菌株 120 株. 经液体培养基发酵培养测其酶活, 发现只有 4 株菌株的酶活高于 10 IU/cm³, 其中菌株 2-5-10-1(采样点: 66°00′S, 70°30′E; 深度为 1 500 m; 温度为 0.113 ℃; 盐度为 34.640) 的酶活最高, 因此本研究以菌株 2-5-10-1 为研究对象.

3.2 温度对菌株 2-5-10-1 的生长及产酶的影响

从图 1 和 2 可以看出, 随着培养温度的升高, 菌株的生长受到抑制, 延缓期增加; 当培养温度达到

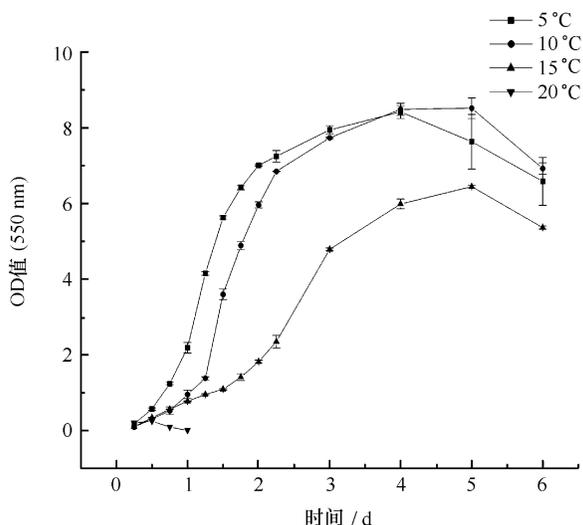


图 1 温度对菌株 2-5-10-1 生长的影响

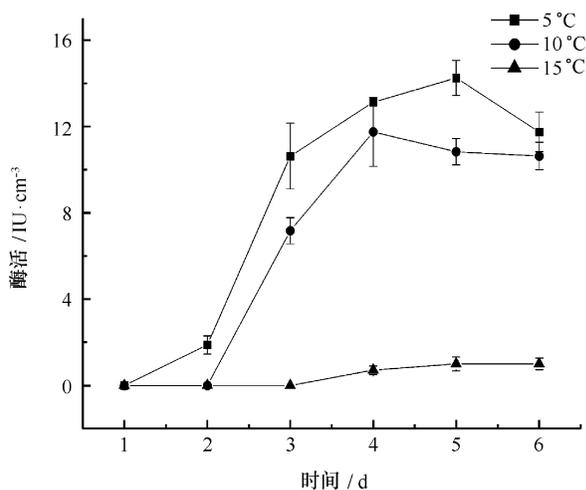


图 2 温度对菌株 2-5-10-1 产酶的影响

20 ℃ 时, 菌株生长明显受到影响, 而且菌株产酶的趋势也是如此, 在 5 ℃ 培养时酶的产量最高, 而在 15 ℃ 培养时酶的产量很低.

3.3 培养基对菌株 2-5-10-1 产酶的影响

在发酵培养基按 1% 的浓度添加各种脂肪酶的作用底物中, 以去除 Tween80 的发酵培养基作对照组, 对菌株 2-5-10-1 脂肪酶产生的影响结果如图 3 所示. Tween80, 橄榄油和橄榄油乳化液对脂肪酶的产生均有明显的促进作用, 其中 Tween80 的效果最明显, 同对照组相比, 酶产量可高出 4~5 倍, 这说明添加 Tween80 和橄榄油对脂肪酶的产生具有一定的诱导作用. TritonX-100 明显抑制脂肪酶的产生.

3.4 菌株 2-5-10-1 产低温脂肪酶性质的研究

3.4.1 最适作用温度

在 0~60 ℃ 测定不同温度下脂肪酶的活力. 结果表明(见图 4), 菌株 2-5-10-1 所产低温脂肪酶的最适作用温度为 35 ℃, 在 0 ℃ 可保持约 37% 的相对酶活力.

3.4.2 最适作用 pH 值

用 pH 4.0~11.0 的各种 pH 值的缓冲液, 在 35 ℃ 下测定酶活力, 结果表明, 菌株 2-5-10-1 所产低温脂肪酶的最适作用的 pH 为 7.5, 在 pH 6~9 均存在着较高酶活力(见图 5).

3.4.3 温度稳定性

菌株 2-5-10-1 所产低温脂肪酶的温度稳定性与低温酶的特点相一致. 该酶对热较为敏感, 在 60 ℃ 保温 15 min 即可丧失 50% 以上的酶活性, 但在较低温度(20 ℃) 时, 酶的热稳定性较好, 保温 60 min 仍可保持 90% 以上的酶活性(图 6).

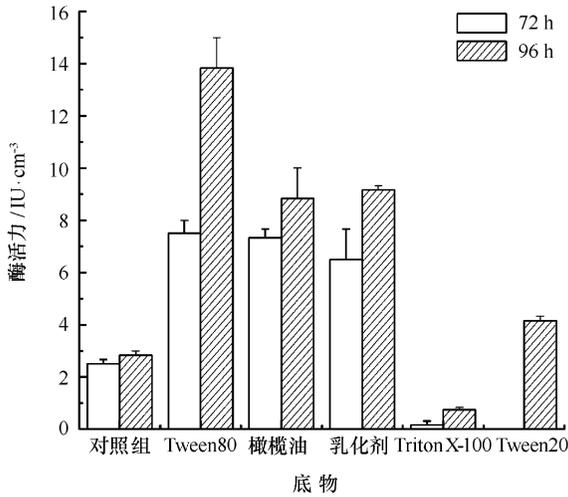


图 3 不同底物对菌株 2-5-10-1 产酶的影响

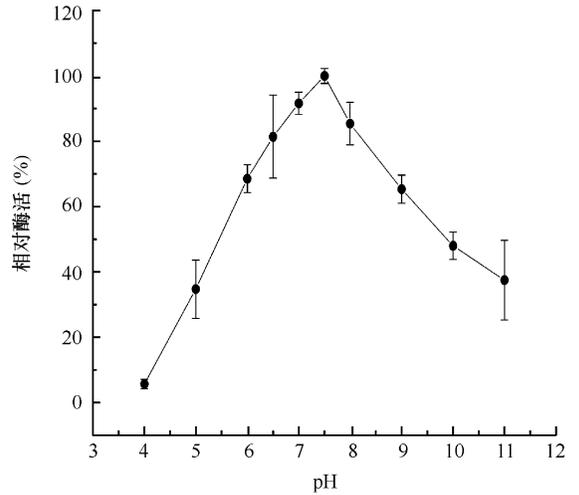


图 5 pH 值对酶活力的影响

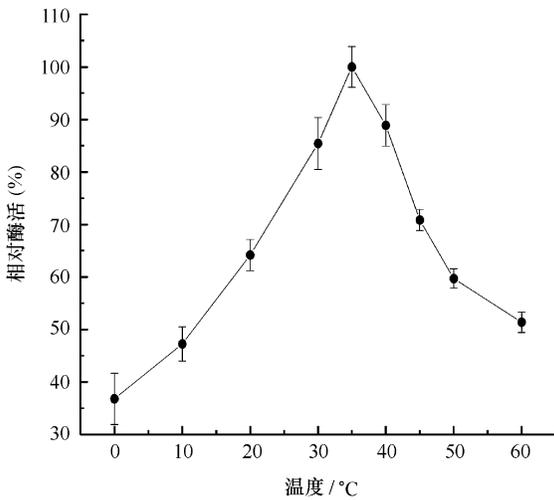


图 4 温度对酶活力的影响

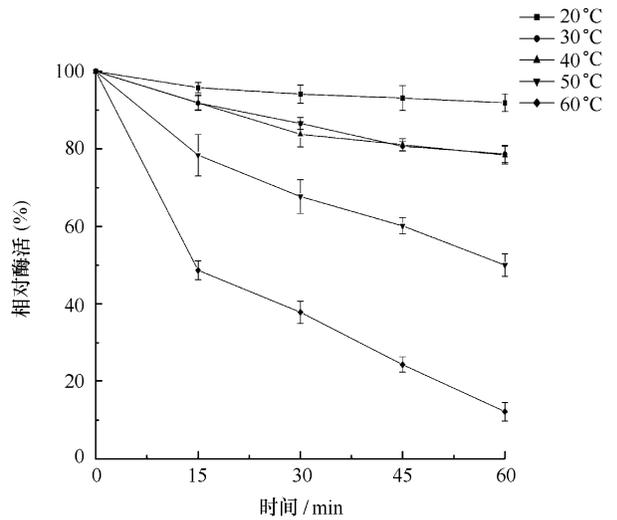


图 6 酶的热稳定性

3.4.4 金属离子对酶活性的影响

二价金属离子对酶活性的影响如表 1 所示。EDTA 对酶活性没有影响, 这表明该酶的催化作用不需要金属离子的参与。Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 对酶有着强烈的抑制作用, Co²⁺ 和 Mn²⁺ 也有着较强的抑制作用, Fe²⁺, Sr²⁺, Ca²⁺ 在浓度为 5 mmol/dm³ 时也存在着一定的抑制作用。

表 1 金属离子对酶活性的影响

离子	相对酶活性 (%)	
	1 mmol · dm ⁻³	5 mmol · dm ⁻³
Mg ²⁺	98.52 ± 3.98	94.97 ± 5.19
Fe ²⁺	86.59 ± 8.27	68.04 ± 5.48
Sr ²⁺	82.54 ± 5.99	75.48 ± 11.50

续表 1

离子	相对酶活性 (%)	
	1 mmol · dm ⁻³	5 mmol · dm ⁻³
Co ²⁺	55.14 ± 13.35	46.07 ± 8.57
Ca ²⁺	85.08 ± 8.29	65.45 ± 12.17
Zn ²⁺	38.29 ± 2.39	34.75 ± 4.54
Cu ²⁺	19.10 ± 6.55	15.40 ± 8.04
Mn ²⁺	65.35 ± 14.01	26.04 ± 4.96
EDTA	95.57 ± 3.66	97.46 ± 5.85

4 讨论

目前最为广泛接受的对低温微生物的划分是由 Morita^[17] 提出来的, Morita 将低温微生物分为嗜冷

菌(psychrophile)和适冷菌(psychrotrophic bacteria)两大类群。嗜冷菌是指在温度低于0℃能缓慢生长、最适生长温度低于15℃,高于20℃则不能生长的细菌;适冷菌是指在0℃能够生长、最适生长温度在20~30℃的细菌。根据此分类标准,本研究的实验菌株2-5-10-1属于嗜冷菌,该菌分离自南大洋深海(66°00'S, 70°30'E; 1500 m深),终年水温为0℃左右,其生长特性与其生境一致。

根据 Margsin 等^[1] 1991年的定义,通常把最适催化温度在30℃左右而在0℃左右仍有一定催化效率的酶称为低温酶,其特点是低温下的酶催化活力和热不稳定性。本研究的脂肪酶最适作用温度为35℃,在0℃仍保持着37%的相对酶活性,因而是一种低温脂肪酶,而且酶的最适作用的pH值为7.5,这些都与其生境相适应。Rashid等^[18]报道的深海适冷假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) KB700A产生的低温脂肪酶的最适酶活性温度也为35℃,而方金瑞等^[15]从深海泥样分离到的菌株EQ-23产生的低温脂肪酶的最适作用温度仅为10℃,这是一种嗜冷酶,在30℃时酶活很低,40℃未测到酶活性。Choo等^[19]从阿拉斯加土壤分离到适冷菌(*Pseudomonas* sp.) B11-1,产生的冷适应(cold-adapted)脂肪酶尽管最适作用温度为45℃,但在0℃仍保持着一定酶活性。低温酶的上述特征与酶分子蛋白结构特征密切相关。Deming认为,低温酶由于酶蛋白结构部分或全部柔性的增加与降低活化能有关,使其在低温下具有较高的酶活力;同样,由于柔性的增加,酶的热不稳定性增强,而且分子结构柔性的增加更有利于底物与酶活中心的相互靠近,从而增加了底物的

有效浓度^[4]。

本研究发现,温度的升高对嗜冷菌2-5-10-1低温脂肪酶的产生具有抑制作用与已有的报道相一致,如 Feller 等^[20]报道南极嗜冷菌莫拉氏菌(*Moraxella*) TA317在3和17℃均能生长,而且两者的代时差别并不大,但在17℃培养不产生脂肪酶。适冷菌莫拉氏菌TA144在3,17和25℃培养,胞外脂肪酶的活力分别为1150,380和85 IU/cm³。Feller认为,胞外酶的热不稳定性并不能完全解释这种现象,因为在18℃时该脂肪酶的半衰期最少为30h,这预示着对低温微生物来说,温度升高对胞外酶产生的强抑制作用并不完全是由于酶失活,一定有其他附加作用。本研究也证明了这一现象,嗜冷菌2-5-10-1尽管在15℃能生长,而且在此温度下所产脂肪酶稳定性较好,但脂肪酶产量仍很低,究竟温度升高对嗜冷菌产酶抑制作用的机制如何,还需进一步研究与探讨。

本项研究还发现,嗜冷菌2-5-10-1所产低温脂肪酶的催化作用不需要金属离子的参与,这与Choo等^[19]的研究结果相似,而与Rashid等^[18]的研究结果相反。Rashid添加EDTA于反应体系中能完全抑制适冷假单胞菌KB700A所产的低温脂肪酶的活力,而添加Ca²⁺能显著提高酶活性(为对照组的5.6倍),因此笔者认为这是一种Ca²⁺依赖型脂肪酶,而且Mn²⁺,Sr²⁺对酶活性均有一定的促进作用。Ca²⁺对酶活性的促进,笔者认为与酶蛋白的G-末端Ca²⁺结合基元(GXXGXG)的存在有关,Ca²⁺能便捷地去除油水界面上酶促反应生成的游离脂肪酸,从而对酶活性具有促进作用。

参考文献:

- [1] 陈秀兰,张玉忠,王运涛,等. 深海适冷菌SM9913产生的低温蛋白酶[J]. 海洋科学,2001,25(1):4-8.
- [2] THOMAS D N, DIECKMANN G S. Antarctic sea ice-a habit for extremophiles[J]. Science, 2002, 295(25): 641-644.
- [3] GOUNOT A M. Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications[J]. J Appl Bacteriol, 1991, 71(4): 386-397.
- [4] DEMING J W. Psychrophiles and polar regions[J]. Current Opinion in Microbiology, 2002, 5(3): 301-309.
- [5] RUSSELL N J. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles[J]. Extremophiles, 2000, 4(1): 83-90.
- [6] LONHIENNE T, GERDAY C, FELLER G. Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility[J]. Biochimica Biophysica Acta, 2000, 1543(1): 1-10.
- [7] FELLER G, NARINX E, ARPIGNY J L, et al. Enzymes from psychrophilic organisms[J]. FEMS Microbiol Reviews, 1996, 18(2-3): 189-202.
- [8] FELLER G, GERDAY C. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation[J]. CMLS Cellular and Molecular Life Sciences, 1997, 53: 830-841.
- [9] MINDOCK C A, PETROVA M A, Hollingsworth R I. Re evaluation of osmotic effects as a general adaptative strategy for bacteria in

- sub-freezing conditions[J]. *Biophysical Chemistry*, 2001, 89(1): 13–24.
- [10] DAVID S, NICHOLS, PETER D, et al. Ecology and physiology of psychrophilic bacteria from Antarctic saline lakes and sea-ice[J]. *Science Progress*, 1995, 78(4): 311–347.
- [11] RICHARD N W, PEDRO O M, KEITH J. Influence of growth temperature on lipid and soluble carbohydrate synthesis by fungi isolated from fellfield in the maritime Antarctic[J]. *Mycologia*, 2000, 92(2): 222–229.
- [12] CAVICCHIOLI R, SIDDIQUI K S, ANDREWS D, et al. Low-temperature extremophiles and their applications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(3): 253–261.
- [13] 孙 谧, 王跃军, 张云波, 等. 一株产低温碱性蛋白酶嗜冷海洋细菌 YS-9412-130 的分离和培养条件研究[J]. *海洋水产研究*, 2000, 21(4): 1–5.
- [14] 张 刚, 汪天虹, 张臻峰, 等. 产低温淀粉酶的海洋真菌筛选及研究[J]. *海洋科学*, 2002, 26(2): 3–5.
- [15] 方金瑞, 黄维真. 海洋极端微生物的分离及其开发研究: 嗜碱、嗜冷微生物的分离及其产生的活性物质[J]. *中国海洋药物*, 1996, 16(1): 5–9.
- [16] 李建武, 萧能庚, 金瑞元, 等. *生物化学实验原理和方法*[M]. 北京: 北京大学出版社, 1997. 311–312.
- [17] MORITA R Y. Psychrophilic bacteria[J]. *Bacteriol Rev*, 1975, 39: 144–176.
- [18] RASHID N, SHIMADA Y, EZAKI S, et al. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. Strain KB700A[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(9): 4064–4069.
- [19] CHOO D W, KURIHARA T, SUZUKI T, et al. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. Strain B1F-1: gene cloning and enzyme purification and characterization[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(2): 486–491.
- [20] FELLER G, NARINX E, ARPIGNY J L, et al. Temperature dependence of growth, enzyme secretion and activity of psychrophilic Antarctic bacteria[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 41: 477–479.

Studies on the low-temperature lipase of psychrophilic bacterium 2-5-10-1 isolated from the deep sea of the Southern Ocean

LIN Xue-zheng¹, YANG Xi-xia², BIAN Ji¹, HUANG Xiao-hang¹

(1. *First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China*; 2. *Marine life College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China*)

Abstract: A strain of psychrophilic bacteria, 2-5-10-1, which produces low-temperature lipase, was isolated from the deep sea of the Prydz Bay in the Southern Ocean. The optimal growth temperature of strain 2-5-10-1 is 5 °C, it also produces more extracellular lipase at 5 °C. Tween80 or olive oil in medium enhances the secretion of lipase. The optimal temperature and pH for lipase activity are 35 °C and 7.5 respectively. At 0 °C, the lipase still has 37% relative enzyme activity. The lipase shows high thermolability, remaining less than 50% activity after incubation at 60 °C for 15 min. EDTA has no effect on lipase activity, indicating that the lipase activity is independent of divalent cation. In contrast, the lipase activity is inhibited markedly by Cu²⁺ and Zn²⁺.

Key words: Southern Ocean; deep sea psychrophilic bacteria; low-temperature lipase