

文章编号: 1004 - 7271(2007)06 - 0531 - 06

北极海冰低温微生物的生长条件及其胞外水解酶的研究

李晓晖^{1,2}, 俞勇³, 李会荣³, 张琳², 任大明¹

(1. 复旦大学遗传工程国家重点实验室, 上海 200433;

2. 上海水产大学食品学院, 上海 200090;

3. 中国极地研究中心, 上海 200136)

摘要:对北极海冰获得的14株低温微生物进行培养条件和胞外水解酶活力的研究,结果表明:(1)菌株最适生长温度均为15℃和20℃左右,最适pH在8.0左右,在酸性条件下几乎不生长。生长需要一定浓度的盐,在3% NaCl的培养基中能很好的生长,而在没有NaCl的培养基中不生长。(2)14株菌株能不同程度的分泌胞外水解酶。(3)菌株i429,i539在低温下产纤维素酶的活力最高,具有低温酶的特性。

关键词:低温微生物; 筛选; 蛋白酶; 脂肪酶; 淀粉酶; 纤维素酶

中图分类号: Q 939.9

文献标识码: A

The studies of culture condition and extracellular hydrolase of psychrophilic bacteria from Arctic sea ice

LI Xiao-hui^{1,2}, YU Yong³, LI Hui-rong³, ZHANG Lin², REN Da-ming¹

(1. State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

3. Polar Research Institute of China, Shanghai 200136, China)

Abstract: Studies was done on the culture condition and screened of extracellular hydrolase from 14 different cold adapted microorganisms. The result showed that optimal temperature of most of microorganisms was 15℃ and 20℃, The optimal pH at 8.0, hardly grown in acid condition, growth need the presence of NaCl, 14 strains produce extracellular hydrolase with different activities, Strain i539 and i429 produced protease, cellulose and lipase, further results indicated that celluloses from i539 and i429 were low-temperature cellulose.

Key words: cold adapted microorganism; screening; protease; lipase; amylase; cellulose

在地球这个大生态系统中存在着广泛的低温环境,如占地球表面14%的两极地区及海洋深处(90%的海水其平均温度为5℃或更低)等,在这些特殊的环境中生活着低温微生物(cold-adapted microorganisms)。随着低温菌在食品、医药、环境保护、星际生命探索等诸多方面的应用和理论研究价值的日益显著,开展对低温微生物的研究在近年得到较大发展^[1-2]。

收稿日期: 2007-02-02

基金项目: 国家自然科学基金(40376001)

作者简介: 李晓晖(1975-),女,河南南阳人,讲师,博士研究生。Tel: 021-65710331, E-mail: xhli@shfu.edu.cn

通讯作者: 任大明, Tel: 021-65642506; E-mail: dmren@fudan.edu.cn

低温微生物及其相关产物如抗冻蛋白、低温酶类、多聚不饱和脂肪酸、胞外多糖、色素、抗生素、抗肿瘤药物以及质粒等的研究意义以及它们在现代生物工程中的潜在价值,逐渐为人们所认同并引起广泛关注,成为一个新的研究热点^[3-5]。尽管人们发现嗜冷菌已有10多年,但对其研究远远落后于生活在高温、高盐环境中的其他嗜极端微生物^[6]。本文研究了14株来自北极海冰中的低温微生物生长特性和产胞外水解酶的特性,筛选到几株产淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶和脂肪酶活力较高的几株微生物,为低温酶的开发利用奠定前期基础。

1 材料和方法

1.1 菌株

由中国极地研究中心提供编号为i510、i567、i540、i476、i480、i541、i429、i473、i590、i569、i570、i580、i539、i560等14株南极低温菌。其中i510为黄杆菌属*Flavobacterium*,i567为海单胞菌属*Marinomonas*,其余属于假交替单胞菌属*Pseudoalteromonas*不同菌株。

1.2 初筛培养基^[7]

1.2.1 海水母液

KBr 0.096 g、NaCl 24.477 g、MgCl₂ 4.981 g、Na₂SO₄ 3.917 g、CaCl₂ 1.102 g、KCl 0.664 g、NaHCO₃ 0.192 g、SrCl₂ 0.024 g、H₃BO₃ 0.026 g、NaF 0.003 9 g、蒸馏水 1 000 mL。

1.2.2 2216E 固体培养基

蛋白胨 0.5 g、酵母膏 0.1 g、磷酸铁 0.01 g、琼脂 2 g、海水 100 mL,pH 7.6~7.8。

1.2.3 蛋白酶初筛培养基

A液:蛋白胨 0.03 g、酵母膏 0.05 g、琼脂 3 g、磷酸铁 0.01 g、人工海水 100 mL;B液:10%~20%用双蒸水配制的脱脂奶溶液。B液在110℃灭菌15 min,A液在121℃灭菌20 min,冷却至50℃左右,A、B液等体积混合,制成平板。

1.2.4 淀粉酶初筛培养基

添加1%可溶性淀粉的2216E固体培养基。

1.2.5 脂肪酶初筛培养基

添加1%Tween 80的2216E固体培养基。

1.2.6 纤维素酶初筛培养基

添加了0.5%羧甲基纤维素钠(CMCNa)的2216E固体培养基。

1.3 培养条件

1.3.1 菌株生长温度

将14株菌用牙签点种在2216E固体培养基,分别在4℃、15℃、20℃、25℃、30℃、37℃下培养8 d,每天测量菌落直径,观察菌落的生长情况。根据菌落直径的生长速率得各菌株的最适生长温度。

1.3.2 菌株生长的pH

分别在pH为4.5、6、7、8、10的2216E固体培养基上点种,培养7 d,每天测量菌落直径,观察菌落的生长情况。根据菌落直径的生长速率得各菌株的最适pH。

1.3.3 菌株的耐盐实验

分别在NaCl含量为0、3%、5%的2216E固体培养基上点种,每天测量菌落直径,观察菌落的生长情况。

1.4 产酶特性的研究

1.4.1 蛋白酶初筛方法

将待测菌株点种蛋白酶初筛培养基,在20℃下培养4~7 d,观察菌落周围是否有透明圈,有透明圈者为阳性。

1.4.2 淀粉酶初筛方法

将待测菌株点种在淀粉酶初筛培养基,20 ℃培养 3 d,倾倒稀碘液,观察并记录透明圈大小。有透明圈者为阳性。根据透明圈和菌落直径之比的大小选择产酶菌株。

1.4.3 脂肪酶初筛方法

将待鉴定菌株用牙签接种到脂肪酶初筛培养基,20 ℃下培养 2-3 d,产脂肪酶的菌株能分解 Tween 80并在菌落周围形成白色沉淀圈,依据沉淀圈和菌落直径之比的大小选择产酶菌株。

1.4.4 纤维素酶初筛方法

将待鉴定菌株用牙签接种到纤维素酶初筛培养基,20 ℃培养 2-4 d,往培养皿中加入适量 1 mg/mL 的刚果红溶液,染色 1 h;弃去染液,加入适量 1 mol/L 的 NaCl 溶液,洗涤脱色 2 h。若细菌产生纤维素酶,则在菌落的周围会出现清晰的透明圈,依据透明圈的直径大小选择产酶菌株。

1.4.5 温度对产酶能力的影响

将产纤维素酶和淀粉酶的菌种点种在相应的筛选培养基上 20 ℃和 4 ℃下培养,测量透明圈直径 D 与菌落直径 d,以 D/d 比值测定酶活力的高低。

2 结果与讨论

2.1 菌株的基本特性的研究

2.1.1 菌株的最适生长温度

在 4~37 ℃的不同温度下,测量各菌株的菌落直径,由生长速率观察菌株的最适生长温度,结果如表 1。结果表明:菌株 i476、i541、i590、i569、i580、i539 的最适温度为 20 ℃;菌株 i480、i567、i540、i429、i473、i510、i570、i560 的最适温度为 15 ℃。

Morita^[8]根据生长温度的上限不同,对嗜冷菌(*psychrophile*)和适冷菌(*psychrotrophic*)进行了区分:嗜冷菌是指温度低于 0 ℃时能生长,最适生长温度低于 15 ℃,高于 20 ℃则不能生长;适冷菌是指在 0 ℃能够生长,但最适生长温度在 20~30 ℃的一类微生物。由定义看出,这 14 株菌符合耐冷菌的生长特性。

表 1 各菌株在不同温度下的生长速率
Tab.1 Strain growth rate at different temperature

菌种	4 ℃	15 ℃	20 ℃	25 ℃	30 ℃	37 ℃
i476	+	+++	+++++	+++	+++	+
i480	+++	+++++	+++++	+++	++	+
i540	++	+++++	+++++	++	+	-
i541	++	+++++	+++++	+++	++	-
i429	++++	+++++	+++++	+++	++	+
i473	+++	+++++	+++++	+++++	+	
i590	++	+++++	+++++	+++	++	+
i569	+++	+++++	+++++	+++	++	+
i570	++	+++++	+++++	++	++	+
i580	++	+++++	+++++	+++	++	+
i539	++	+++++	+++++	+++	++	-
i560	++++	+++++	+++	++	+	-
i567	++	+++++	+++	+++	+	-
i510	++	+++++	+++++	+++	++	+

注: - 菌体不生长; + + + + +, + + + +, + + +, + +, + 依次表示生长速率由高到低

2.1.2 菌株的最适生长 pH

在 20 ℃下,在不同 pH 的培养基条件下,测量各菌落的直径,结果如表 2。结果表明:菌株的最适生长 pH 为 7~8,为耐碱性菌株。

表2 各菌株在不同 pH 下的生长速率
Tab.2 Strain growth rate at different pH

菌种	pH 4	pH 6	pH 7	pH 8	pH 10
i476	-	-	+++	++	-
i480	-	-	++	+++	-
i540	-	-	+++	++	++
i541	-	-	++	+++	+
i429	+	++	+++	++++	+++
i473	-	-	++	+++	++
i590	-	-	+++	++	+
i569	-	-	++	+++	+++
i570	-	-	++	+++	-
i580	-	-	++	++++	++
i539	-	-	++	+++	-
i560	-	-	++	+++	+
i567	-	-	-	++	-
i510	-	-	+	++	+

注: - 菌体不生长, + + + +, + + +, + +, + 依次表示生长速率由高到低

2.1.3 菌株对 NaCl 的耐盐情况

分别用含 0、3%、5% NaCl 的 2216 培养基培养 14 株菌,研究 NaCl 对菌株生长的影响,结果如表 3。结果表明,菌株的生长需要 NaCl,在 3% 的 NaCl 菌株生长最适。i429 和 i539 能在 5% NaCl 环境下生长良好。

表3 不同菌株在不同 NaCl 浓度下的生长情况
Tab.3 Strain growth rate at different concentraton of NaCl

菌落直径 (mm) NaCl (%)	i476	i480	i567	i540	i541	i429	i473	i510	i590	i569	i570	i580	i539	i560
0	0	0	0	0	0	0	0	4.0	0	0	0	0	0	0
3	8.1	7.5	7.1	4.5	8.0	8.5	8.5	3.2	8.0	9.2	7.5	7.0	12.0	5.5
5	0	0	0	1.9	2.2	4.0	1.0	0	0	0	0	0	6.0	0

2.2 菌株产酶特征的研究

2.2.1 产酶情况

筛选 14 株菌产蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶的产酶情况,如图 1~7。结果表明:i429 和 i539 产蛋白酶;i560、i590、i580、i541、i480、i473 和 i540 产淀粉酶;i569、i570、i580、i473、i540、i480、i539、i590、i429 产脂肪酶;i429 和 i539 产纤维素酶。其中 i429 和 i539 既产蛋白酶也产纤维素酶和脂肪酶,具有一定的研究价值。

2.2.2 培养温度对纤维素酶活力的影响

将产纤维素酶筛选平板在 20℃ 和 4℃ 下培养,结果如表 4,表明 4℃ 时酶活性较高,i539 和 i429 为低温产纤维素酶菌。

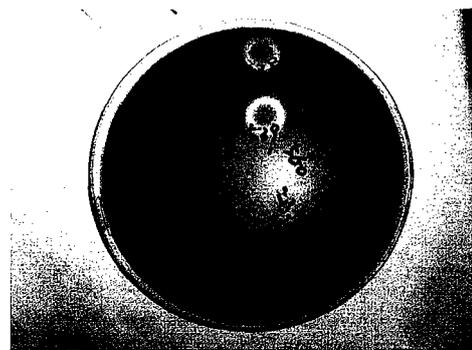


图1 蛋白酶初筛平板(呈现阳性的有 i429、i539 两株菌)
Fig.1 The protease activity was determined by incubating the milk agar plates

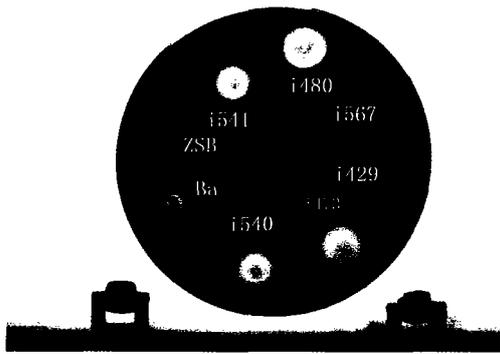


图 2 淀粉酶初筛平板 A
(呈阳性的有 i541、i480、i473、i540)

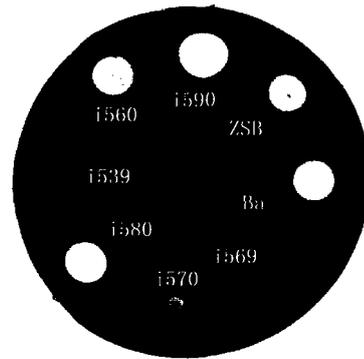


图 3 淀粉酶初筛平板 B
(呈阳性的有 i560、i590、i580)

Fig. 2 - 3 The amylase activity was determined by incubating the starch agar plates



图 4 脂肪酶初筛平板 A
(呈阳性的有 i569、i570、i580、i539、i590)



图 5 脂肪酶初筛平板 B
(呈阳性的有 i473、i540、i480、i429)

Fig. 4 - 5 The lipase activity was determined by incubating the Tween80 agar plates

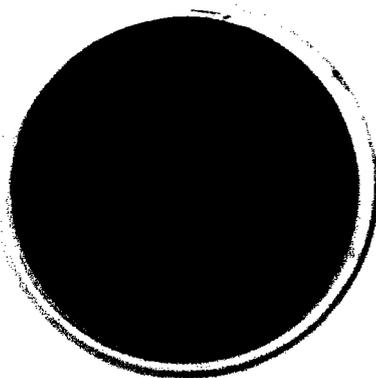


图 6 纤维素酶初筛平板 A
(菌株 i539 形成明显透明圈)

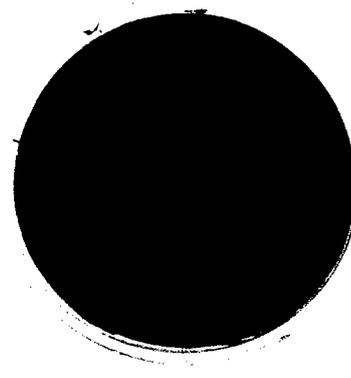


图 7 纤维素酶初筛平板 B
(菌株 i429 形成明显透明圈)

Fig. 6 - 7 The cellulase activity was determined by incubating the CMCNa agar plates

表4 20℃与4℃对菌株产纤维素酶活力的影响
Tab.4 Influence of culture temperature on cellulose activity

菌株	4℃			20℃		
	D(mm)	d(mm)	D/d	D(mm)	d(mm)	D/d
i429	19	2.3	8.3	25	5.2	4.8
i539	11	2.5	4.4	21	6	3.5

3 讨论

尽管从极地分离得到许多耐低温的微生物,但很少对这些菌株的生长特性进行研究,本实验对北极海冰中分离的14株来源三个不同种属的耐冷微生物进行了培养条件的研究,其中来自海单胞菌属 *Marinomonas* sp i567 在37℃下不能生长,5% NaCl 抑制菌体的生长,不能分解实验中使用的几种碳水化合物,表现与其他菌株明显的差异。假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas* 主要存在于海洋环境中,生长绝对需要 NaCl^[9],目前报道假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas* 能够产生低温淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、蛋白酶等多种水解酶和胞外活性物质^[10],具有广泛的应用前景。研究发现12株假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas* 菌株生长条件和产酶能力有很大的不同,能够在 pH 7~10 的条件下生长,温度生长范围在4~37℃,耐盐5% NaCl,其中2株产蛋白酶,7株产淀粉酶,9株产脂肪酶,2株产纤维素酶,表明这个种属的菌株对环境的广泛适应性。

Feller 等^[11]研究发现低温菌通常在低温条件下才能高效地分泌活性产物,Hellio 等^[12]研究发现低温菌的最适产胞外酶温度通常低于最适生长温度,我们在研究纤维素酶过程中也发现了类似的现象。菌体在4℃生长时所产的纤维素酶活力比20℃生长时所产酶活力高。研究中发现菌株产淀粉酶的平板放置在4℃下酶活力仍继续升高,显示酶在低温条件下比较稳定(数据未显示)。

低温酶在应用研究和基础理论研究中具有非常重要的研究价值,在食品工业中低温酶在啤酒的处理,面包生产中的发酵,发酵食品的生产,奶酪生产中具有巨大的应用潜力^[13],本文筛选到的几株产低温酶的菌株为进一步进行基础和理论研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 光南,傅世宗,蔡海洋. 极端环境微生物研究概况[J]. 福建热作科技,2000,(2):12-15.
- [2] 林影,凌晨晖. 海洋微生物极端酶的研究[J]. 海洋科学,1999,(2):19-21.
- [3] 方金瑞,黄维真. 海洋极端微生物的分离及其开发研究[J]. 中国海洋药物,1996,(1):5-9.
- [4] 刘晨光,刘成圣,刘万顺,等. 海洋生物酶的研究和应用[J]. 海洋科学,2000,24(7):24-26.
- [5] 张锐,曾润颖. 极端微生物产碱性蛋白酶菌株的筛选及发酵条件研究[J]. 微生物学通报,2001,28(4):5-9.
- [6] 曾胤新,陈波. 南极低温微生物研究及其应用前景[J]. 极地研究,1996,(6):143-144.
- [7] 张树正. 酶制剂工业(下册)[M]. 北京:轻工业出版社,1984.
- [8] Morita R Y. Psychrophilic bacteria[J]. Bacteriol Rev,1975,39:144-167.
- [9] 席宇,朱大恒,刘红涛,等. 假替单胞菌及其胞外生物活性物质研究进展[J]. 微生物学通报. 2005,32(3):108-112.
- [10] Giudice AL, Michaud L, Gentile G, et al. Ecophysiological Characterization of cultivable Antarctic psychrotolerant marine bacteria able to degrade hydrocarbons[J]. Classe Di Scienze Fisiche Matematiche Naturali,2005:1-11.
- [11] 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.
- [12] Hellio F C, Orange N, Guespin-Michel J F, et al. Growth temperature controls the production of a single extracellular protease by *Pseudomonas fluorescens* MFO, in the presence of various inducers[J]. Res Microbiol,1993,144(8):617-625.
- [13] 曾胤新,俞勇,蔡宏宏,等. 低温微生物及其酶类的研究概况[J]. 微生物学杂志,2004,24(5):83-88.