

文章编号:1674-7054(2012)01-0028-04

海口地区产脂肪酶菌株的分离与 16S rRNA 序列分析

潘晓磊¹, 廖承红^{1,4}, 丛茜¹, 李晓陀¹, 郭桂英³, 张旭¹, 迟亭亭¹, 郑继平^{1,2,4}

(1. 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室/省部共建国家重点实验培育基地, 海南 海口 570228;

2. 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室; 3. 海南大学 教务处, 海南 海口 570228;

4. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228)

摘要: 以橄榄油为碳源, 采用富集和复筛的方法, 于夏季从海口市食堂和汽修场等富油土壤中筛选出 9 株高产脂肪酶活性菌株, 对其形态、生长和 16S rRNA 序列进行分析, 结果表明: 各菌株菌落皆呈暗绿色, 镜检为革兰氏阴性、杆状单细胞, 最适生长 pH 值为 7, 最适生长温度高于 42 °C, 9 株菌株的 16S rDNA 序列完全一致, 皆为绿脓假单胞菌。

关键词: 脂肪酶; 16S rRNA; 绿脓假单胞菌; 海口

中图分类号: Q 93-331

文献标志码: A

微生物脂肪酶(Lipase)是一种特殊的酯键水解酶, 不仅催化水解反应, 而且还催化长链酰基甘油酯的合成, 分解生物所产生的各种天然油脂, 在工业、农业和生物医学等领域均发挥重要作用^[1]。随着石油能源的日趋紧张, 寻找替代能源刻不容缓, 脂肪酶作为生物柴油替代能源生产中的重要用酶, 无疑成为当前的研究热点。目前, 自然界已发现至少 65 个属 100 多种(细菌有 28 个属、放线菌 4 个属、酵母菌 10 个属、其他真菌 23 个属等)的微生物分泌脂肪酶^[2]。由于种属来源不同, 这些脂肪酶具有不同的生化特点, 如适酸性、适碱性、耐高温和适冷性等, 从而应用于工农业的不同生产领域。海南地处热带, 常年高温, 理论上从该地区可分离出耐高温脂肪酶。为获得和研究该地区特有产脂肪酶微生物及其脂肪酶, 笔者从海口市富油土壤中分离出产脂肪酶菌株, 旨在为热带脂肪酶的开发和应用奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集 在夏季从海口市汽车修理厂、油污染海水污泥、饭店和海南大学学生食堂等富油土壤取样 4 份。

1.1.2 主要试剂 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 生物工程公司; pfu DNA Polymerase 购自 Fermentas 生物工程公司; Taq DNA Polymerase 购自上海中能博彩生物科技有限公司; Agarose Gel DNA Extraction Kit 购自 Biotek 公司; DNA Marker、质粒提取试剂盒均为上海生工生物工程技术有限公司产品; DNA 产物纯化试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购自 Biotek 生物公司; 其他常规试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要培养基

1) 富集培养基: 酵母膏 0.2 g · L⁻¹, 磷酸氢二钠 3.5 g · L⁻¹, 磷酸二氢钠 1.5 g · L⁻¹, 七水硫酸镁 0.5 g · L⁻¹, 氯化钠 0.5 g · L⁻¹, 橄榄油 10 g · L⁻¹, pH7.0。

2) 普通鉴别培养基: 酵母膏 2 g · L⁻¹, 牛肉膏 2 g · L⁻¹, 蛋白胨 10 g · L⁻¹, 橄榄油 10 g · L⁻¹, 琼脂粉 15 g · L⁻¹, pH7.0。

收稿日期: 2012-01-12

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(208111); 海南大学青年基金(qnj1147)

作者简介: 潘晓磊(1987-), 男, 江苏南通人, 海南大学农学院 2009 级发育生物学专业硕士研究生。

通信作者: 郑继平. 电话: 0898-66180255; E-mail: jiping.zheng@gmail.com

3) Tween-80 鉴别培养基^[3]: 葡萄糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母提取物 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钙 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 吐温-80 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂粉 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH6.0。

4) 溴甲酚紫鉴别培养基^[4]: 牛肉膏 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钠 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 吐温-80 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 橄榄油 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 溴甲酚紫 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0。

5) LB 培养基: 蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母提取物 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钠 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0, 固体培养基加入 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉。

1.2 方法

1.2.1 产脂肪酶菌株的筛选 以 $m_{\pm}:V_{\text{水}}=1:10$ 的比例制备土水混悬液, 取 3 mL 悬液于 30 mL 富集培养基中, 在 $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下振荡培养 2~4 d, 再以 $V_{\text{富集培养物}}:V_{\text{培养基}}=1:1000$ 转接至新鲜培养基中连续培养富集 3 轮。用无菌水倍比稀释富集菌液 $10^{-1} \sim 10^{-6}$, 分别涂布于普通鉴别培养基、吐温-80 鉴别培养基和溴甲酚紫鉴别培养基, $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 1~2 d, 利用产脂肪酶菌株能分解油脂的原理, 观察培养基上菌落的透明圈、吐温-80 鉴别培养基上菌落的白色沉淀圈以及溴甲酚紫鉴别培养基上菌落的黄色色素圈大小, 选取具有以上明显鉴别性状特征的菌落重复划线于吐温-80 和溴甲酚紫鉴别培养基, 对同时具有以上对应培养基显著鉴别特征菌圈的菌落进行编号保存, 即为产脂肪酶菌株。

1.2.2 细菌形态观察 采用常规革兰氏染色法在光镜下观察菌体形态。

1.2.3 不同温度条件下培养菌株 将菌株接种于液体培养基中, 分别在温度 26, 37, 42 $^{\circ}\text{C}$, $105 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 48 h, 定期测定培养液光密度值 (OD_{600})。

1.2.4 不同 pH 值条件下培养菌株 将菌株分别接种于 pH 值为 5~9 的液体培养基中, 以 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $105 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 48 h, 定期测定培养液光密度值 (OD_{600})。

1.2.5 16S rDNA 的克隆与序列分析 采用试剂盒制备基因组和质粒, 以细菌通用引物 (5'-ATTCCGGTTGATCCTGC-3'; 5'-GGTTA CCTTGTACACTT-3') 扩增 16S rDNA。PCR 条件: $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环; $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 扩增产物克隆至 pUM-T 载体, 送上海生工公司进行上下游序列测定。测序结果经拼接后应用 BLAST 和 MEGA3 软件对序列同源性及其亲源属种进行遗传分析。

2 结果与分析

2.1 产脂肪酶菌株的筛选 采用富集培养和平板鉴别培养基筛选, 最终从样品中获得 9 株产脂肪酶菌株, 分别编号为 HD01~HD09。对比 3 种鉴别培养基发现 (见图 1), 吐温-80 乳化剂对橄榄油在培养基中的均匀分布有重要作用, 缺少吐温-80 时, 橄榄油只能浮于培养基表面, 难以形成产脂肪菌单菌落, 无法进行产脂肪酶菌的分离; 同时证实, 在 Ca^{2+} 存在的条件下, 被脂肪酶分解的油乳化剂吐温-80 可与 Ca^{2+} 结合, 在菌落周围形成特征性的白色沉淀颗粒, 从而可在不使用橄榄油的前提下鉴别菌落的脂肪酶活性。溴甲酚紫培养基是最常用的脂肪酶鉴别培养基, 溴甲酚紫作为酸性指示剂, 当脂肪酶分解甘油酯产生脂肪酸、引起培养基 pH 下降时, 可引起菌落周围形成黄色色素圈。在本实验中, 吐温-80 培养基和溴甲酚紫培养基效果明显。由于吐温-80 培养基不使用植物油和指示剂, 在成本上较溴甲酚紫培养基更经济。

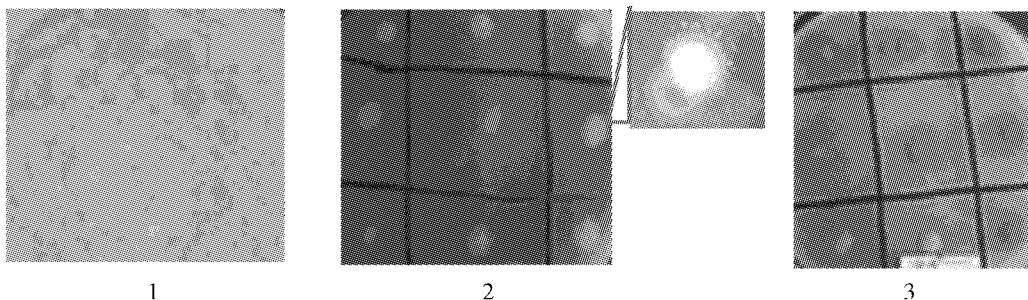


图1 各培养基菌落特征对比

1. 普通鉴别培养基: 菌落聚集在油滴周围;
2. 吐温-80 鉴别培养基: 菌落周围产生白色沉淀;
3. 溴甲酚紫鉴别培养基: 菌落周围形成黄色变色圈。

由图1可以看出,普通鉴别培养基上的菌落随油滴成片分布,难以区分单菌落;吐温-80培养基上的产脂肪酶菌落周围可产生白色的沉淀颗粒(右侧为放大后的菌落);溴甲酚紫培养基上的产脂肪酶菌落周围形成黄色圈。

2.2 产脂肪酶菌的基本特征 取以上9株产脂肪酶菌进行LB平板划线培养观察,发现各菌落具有蓝绿色特点,经革兰氏染色镜检观察,发现9菌株均呈杆状、单细胞,革兰氏阴性。采用分光光度计法,对各菌株进行温度和pH适应性的实验结果显示,在26~42℃温度范围内,上述菌株的生长速度随温度的增加而增大,说明所有菌株具有一定的耐热性。pH为7~8时,各菌株测定的 OD_{600} 值最高,表明该菌宜在中性偏碱的环境中生长。

2.3 16S rDNA 序列分析 16S rDNA的测序结果显示,9菌株16S rDNA序列完全一致,全长1495 bp,由此推测9菌株应为同一种细菌。BLSAT后发现,该16S rRNA基因序列与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,俗称绿脓杆菌)菌株:S164S, J007, K3和G14等完全相同,两者的期望值 $E(\text{expert})$ 为0.0,最大相似度(Max Identities)为100%,说明两者遗传相似度为1,遗传距离为0。除此以外,其菌株还与不可培养菌(Uncultured bacterium)克隆株P7D1-537, P7D1-464等之间的 E 值为0.0,最大相似度为100%,遗传距离为0。因此,不必要进行MEGA3的遗传距离分析。结合9株菌株具有可培养、革兰氏阴性、杆状、单细胞、菌落呈暗绿色(LB培养基)等特点,可推断本次分离的产脂肪酶菌株全部为铜绿假单胞菌。

3 讨论

本实验所获得的9株产脂肪酶菌全部为铜绿假单胞菌。铜绿假单胞菌广泛存在于自然界的水、空气和土壤中,寄生在正常人的皮肤、呼吸道和肠道等部位,该菌因寄生伤口产生绿脓菌素形成暗绿色脓汁而得名,是感染最常见的机会致病菌或条件致病菌。铜绿假单胞菌具有分泌脂肪酶活性,我国已报道的分离株有克拉玛依油田分离株^[5]、无锡株^[6]和天津株^[7]。夏咏梅^[6]对自分离的铜绿假单胞菌脂肪酶的研究结果显示,该酶最佳反应温度为38~42℃,在此温度范围内适宜反应时间为24 h,临界反应温度为44℃;韩振林^[7]的研究结果表明,铜绿假单胞菌脂肪酶最适温度为55℃,最适pH值为7.5。上述研究结果与本实验结果基本一致,说明我国不同地区来源的铜绿假单胞菌脂肪酶的生化特性基本相似,表现为耐热偏碱性脂肪酶。

本实验结果还表明,在Tween-80鉴别培养基含有氯化钙的条件下,脂肪酶能够以吐温-80为底物,在具分泌脂肪酶菌落的周围形成白色的 Ca^{2+} 复合物沉淀颗粒,从而与非分泌脂肪酶菌落相区分,达到鉴别效果,证实该培养基可以替代相关的油剂培养基使用^[3]。

海南具有丰富的油料经济作物和微生物资源,本次研究由于采样数量有限,仅获得了单一的铜绿假单胞菌产脂肪酶菌株。今后要加强对海南特有油料作物相关土壤的微生物研究,为发现和开发海南油料作物特异性产脂肪酶菌株和特异性脂肪酶提供资源,从而提高海南油料作物的综合开发和利用水平。

参考文献:

- [1] JAEGER K E, SCHNEIDMGER B, ROSENAU F, et al. Bacterial lipases for biotechnological applications[J]. Journal of molecular catalysis b-enzymatic, 1997, 3(1/4): 3-12.
- [2] 施文芳, 胡长浩, 沈麟, 等. 低温脂肪酶的筛选、纯化及特性研究[J]. 生物技术, 2009, 19(2): 20-23.
- [3] SUEN W, ZHANG N, XIAO L, et al. Improved activity and thermostability of *Candida antarctica* lipase B by DNA family shuffling[J]. Protein Eng. Des. Sel, 2004, 17: 133-140.
- [4] 王松, 李长春, 徐榕敏, 等. 碱性脂肪酶高产菌株的筛选及产酶条件的优化[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2010, 32(6): 99-103.
- [5] 张煜星, 武寒雪, 祝建波, 等. 铜绿假单胞菌脂肪酶 *Lipase* 基因的原核表达[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(35): 15384-15385, 15388.
- [6] 夏咏梅, 章克昌. 铜绿假单胞菌脂肪酶无溶剂催化棕榈油甘油解 I. 单甘酯酶促合成工艺的研究[J]. 精细化工, 2000, 17(4): 194-201.
- [7] 韩振林, 朱传合, 赵明明, 等. 铜绿假单胞菌脂肪酶基因在枯草芽孢杆菌中的克隆与表达[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(1): 11-14.

Isolation and 16S rRNA gene analysis of lipase strains in Haikou in Hot Summer

PAN Xiao-lei¹, LIAO Cheng-hong^{1,4}, CONG Qian¹, LI Xiao-tuo¹, GUO Gui-ying³,
ZHANG Xu¹, CHI Ting-ting^{1,4}, ZHENG Ji-ping^{1,2,4}

(1. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bio-resources-State Key Laboratory Incubation Base Haikou 570228, China;

2. Ministry of Education Key Laboratory for Tropical Biological Resources, Hainan University, Haikou 570228, China;

3. Academic Affairs Office, Hainan University, Haikou 570228, China; 4. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Nine high producing lipase strains were isolated from rich oil soil at canteens, sea sludge and garages from Haikou in hot summer. All these strains were Gram-negative and rod-shaped single cells and investigated in terms of morphology, growth and 16S rRNA gene sequences. All colonies of these strains were blue green on the plate under light microscope, indicating that the strains might secrete pigments of such color. The optimal growth conditions for these strains were pH7.0 at the temperature of above 42 °C. All the strains had completely the same 16S rRNA gene sequences as *Pseudomonas aeruginosa*, and hence are identified as *P. aeruginosa*.

Key words: lipase; 16S rRNA; *Pseudomonas aeruginosa*; Haikou

(上接第 27 页)

Factors affecting transformation efficiency of *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 competent cells

GAO Shi-wu, GUO Jing-long, QUE You-xiong, XU Li-ping, YANG Ying-ying, CHEN Ru-kai

(Ministry of Agriculture Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding,

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fuzhou, China)

Abstract: Growth of *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, the quality of the competent cells and the heat-shock temperature during transformation are the three main factors affecting the transformation efficiency of *A. tumefaciens* EHA105. The growth of the strain EHA105 with 48 h continuous culture was observed based on which the growth curve was plotted. At the same time, different concentrations of CaCl₂ and different temperatures in heat-shocking during the transformation were tested in preparing the competent cells of EHA105. The number of positive transformants was determined and the factors affecting introduction of exogenous DNA into the strain EHA105 by using the freeze-thaw method were identified. When the OD₆₀₀ value ranged from 1.0 to 1.5, the strain EHA105 was found at the logarithmic growth phase and had the highest vitality. No significant difference was observed in the transformation rates of competent cells prepared with the CaCl₂ at the concentration of between 6 mmol · L⁻¹ and 10 mmol · L⁻¹, but the best transformation rate was 5.322 × 10⁶ · μg⁻¹ at 10 mmol · L⁻¹ CaCl₂. No significant difference was found in transformation rates at the heat-shock temperatures from 20 °C to 37 °C during transformation, but the best transformation rate (5.550 × 10⁶ · μg⁻¹) was achieved at 37 °C. The results provide a reference for improving the transformation efficiency of *A. tumefaciens* EHA105 competent cells.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens* EHA105; growth curve; freeze-thaw method; transformation rate