

南极产低温几丁质酶菌株的筛选及分子鉴定

曾润颖¹, 林念炜², 连明珠², 张锐¹

(1. 国家海洋局 海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 从南极普里兹湾深海底泥样品中分离得到一批嗜冷细菌, 对这些嗜冷细菌进行了产几丁质酶菌株的筛选, 对其中一株具有较高产酶活性的菌株 AC167 所分泌的几丁质酶进行了性质分析, 并通过 16S rDNA 序列分析进行了菌株的分子鉴定。该菌株最适生长温度为 10e, 最高生长温度为 25e, 是典型的嗜冷菌, 经 16S rDNA 序列比较及系统发育分析鉴定为假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。该菌株只在低于 25e 的条件下分泌几丁质酶, 酶的最适反应温度为 30bC, 属于低温酶。

关键词: 南极; 低温几丁质酶; 嗜冷菌; 分子鉴定

中图分类号: Q93.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2006)10-0035-04

自然界中几丁质的降解主要由几丁质酶来完成。现已发现许多动物、植物和微生物都可产生几丁质酶, 其中对植物和微生物研究较多, 而微生物几丁质酶的用途最为广泛。与中温酶相比, 低温几丁质酶在低温下具有较高的活力, 因而在工业中具有重要的应用前景。同时, 由于低温酶在维持低温微生物的生命活动中的关键作用, 其研究将有利于揭示低温微生物适应极端环境的生物学机制, 具有重要的理论意义, 因此近年来低温几丁质酶的研究正日益广泛地开展。

南极地区长年低温, 并且具有丰富的磷虾资源, 因此成为筛选低温几丁质酶的良好来源。目前微生物低温几丁质酶的筛选和基因克隆研究已有一些报道, 这些菌株基本上都是从南极地区获得的^[1-4]。与中温几丁质酶相比, 低温几丁质酶的研究开展得还很少, 在国内则尚未见报道。作者对南极海域沉积物样品进行了微生物的分离筛选, 得到多株产低温几丁质酶的嗜冷菌株, 应用 16S rDNA 作为分子指标对其中一株具有较高活力的菌株进行分类鉴定, 并对其分泌的低温几丁质酶的性质进行了初步的研究。

1 材料

1.1 材料

所用海底沉积物样品于中国第 18 次南极考察航次期间采集自普里兹湾, 经纬度范围为 72b57~74b25cE, 66b55c~67b70cS, 水深 590~900 m。

1.2 培养基

1.2.1 胶体几丁质制备

称取 25 g 几丁质, 加 250 mL 85% 磷酸, 30e 反应 1.5 d 后加入蒸馏水, 待胶体沉淀后, 反复水洗直至中性。用 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0) 调整终浓度至 2%。

1.2.2 选择性培养基

胶体几丁质 0.5%, 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 1%, 用陈海水配制, 固体培养基另加 1.5% 琼脂。

1.2.3 改进的 2216E 培养基

酵母膏 0.2%, 蛋白胨 1%, 陈海水, 固体培养基另加 1.5% 琼脂。

2 实验方法

2.1 产几丁质酶低温菌株的筛选

按常规稀释法^[5]对泥样进行稀释, 将稀释 1 000 倍后的上清液直接涂布于选择性平板培养基, 将平板放置于 4e 冰箱中培养约 5~7 d, 共得到 8 株产生透明水解圈的菌株, 挑取其中透明水解圈与菌落大小之比最大的菌株进行进一步分析, 菌株编号 AC167, 所在站点的经纬度为 74b25cE, 66b55cS。

收稿日期: 2004-02-19; 修回日期: 2004-06-19

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (4406029); 国家海洋局青年基金资助项目 (98310)

作者简介: 曾润颖 (1972), 男, 厦门人, 副研究员, 博士, 主要从事极端微生物研究, 电话: 059222195323, E2mail: runying2zeng@yahoo.com.cn

2.2 酶活力测定

采用 3, 5-二硝基水杨酸(DNS)比色法。将 0.25 mL 0.5% 胶体几丁质与 0.25 mL 适量稀释的待测酶液混合, 于 30℃ 中反应 1 h, 离心去沉淀, 上清加 1.5 mL 蒸馏水与 1.5 mL DNS 溶液, 混匀, 沸水浴 5 min 后, 冷却至室温, 补加 21.5 mL 蒸馏水, 混匀, 测 A_{540} 的比色值, 用 NAG 绘制标准曲线。酶活力单位(U)定义为在最适条件下(即 30℃, pH6.0 的 20 mmol/L 磷酸缓冲液中)每分钟产生 1 μmol 还原糖所需的酶量。

蛋白浓度测定采用 Lowry 方法^[6]进行, 以牛血清白蛋白为对照。

2.3 菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增及序列分析

细菌染色体 DNA 制备和 16S rDNA 序列的 PCR 扩增参照文献^[7]进行, 序列测定由上海生工生物工程技术有限公司完成。将所得序列提交 EMBL (European Molecular Biology Laboratory) 数据库, 应用 FASTA(version 3.3)程序与数据库中已有的细菌 16S rDNA 序列进行相似性比较分析。序列的比较及系统发育分析采用 Clustal W 1.81 软件进行。

3 结果

3.1 温度对菌株 AC167 生长和产酶的影响

按 10% 的接种密度将菌株 AC167 接入 2216E 培养基和选择性培养基, 于 10, 20, 25, 30, 37℃ 等温度下进行振荡培养, 以分析温度对菌株生长和产酶的影响(图 1)。结果表明菌株 AC167 在 10~20℃ 范围内生长良好, 而在 25℃ 以上的温度下不能生长。相比而言, 10℃ 下培养时所达到的菌体浓度和稳定期均较好, 因此 10℃ 为其最适生长温度, 表明 AC167 菌株属于嗜冷菌^[8]。

产酶实验表明, 菌株 AC167 在 10~20℃ 能产生较高酶活, 25℃ 时仅能检测到轻微的酶活力, 在 30℃ 以上完全不能检测到酶活, 与菌株生长特性相吻合。

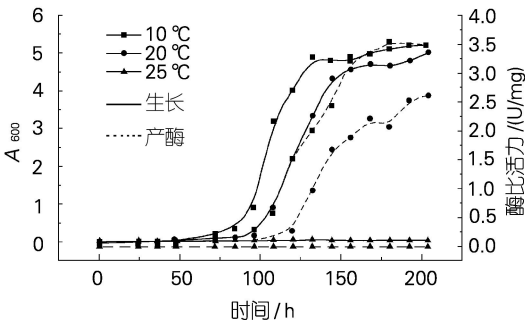


图 1 温度对菌株 AC167 生长和产酶的影响

Fig. 1 The effects of temperature on growth and enzyme producing of strain AC167

3.2 菌株 AC167 的分子鉴定

3.2.1 16S rDNA 序列分析结果

根据序列分析比较结果(表 1), AC167 菌株与假单胞菌属(*Pseudomonas*)具有 97% 以上的同源性, 而且与丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的几个变种同源性较高, 最高可达 98.776%。一般认为, 16S rDNA 序列同源性小于 98%, 可以认为属于不同的种, 同源性小于 93%~95%, 可以认为属于不同属^[9,10], 因此菌株 AC167 属于假单胞菌属。

3.2.2 菌株 AC167 系统发育分析

选取 10 株细菌的 16S rDNA 全序列进行遗传距离计算, 并根据遗传距离计算结果绘制系统发育树(图 2)。所选取的菌株包括: AC167 和数据库中与它同源性较高的假单胞菌属细菌。

由菌株 AC167 的系统发育分析可见, 它处在丁香假单胞菌的分支之中, 但是系统发育位置相对独立, 因此菌株 AC167 有可能属于丁香假单胞菌的一个变种。

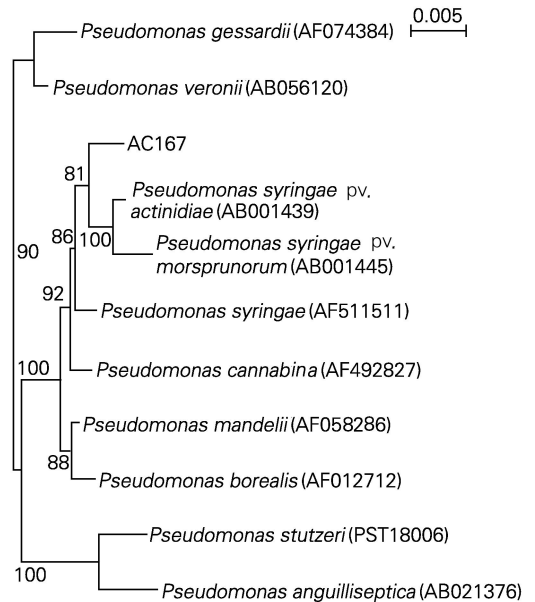


图 2 菌株 AC167 系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of strain AC167

表 1 AC167 菌株 16S rDNA 序列同源性比较结果

Tab. 1 Homology comparison of strain AC167 16S rDNA sequence

菌株	与 AC167 菌株的同源性(%)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	98.776
<i>Pseudomonas mandelii</i>	98.128
<i>Pseudomonas scannabina</i>	98.401
<i>Pseudomonas stremae</i>	98.401
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	97.868
<i>Pseudomonas slini</i>	97.868
<i>Pseudomonas borcalis</i>	98.176
<i>Pseudomonas frederiksbergae</i>	98.521
<i>Pseudomonas veronii</i>	97.668
<i>Pseudomonas syringae</i>	98.198

3.3 菌株 AC167 几丁质酶性质

3.3.1 酶的最适作用温度

分别在不同温度下进行酶反应, 绘制酶活温度曲线(图 3)。结果表明, 该酶在 30℃ 时活力最高, 在 50℃ 时仍保持约 30% 的活力。

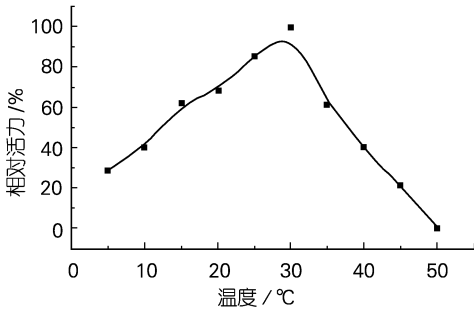


图 3 AC167 几丁质酶最适作用温度

Fig. 3 Optima temperature for AC167 chitinase activity

3.3.2 酶的热稳定性

将酶置于不同温度的 pH6.0 磷酸缓冲液中保温, 每隔一段时间取样测定酶活力(图 4), 结果表明 AC167 几丁质酶在低于 20℃ 下比较稳定, 保温 24 h 仍能基本保持 90% 的活力, 而在 30℃ 保温 2 h 后就很快失活, 在 50℃ 时仅 20 min 就完全检测不到酶活, 表明该酶具有典型的低温酶热不稳定性特征。

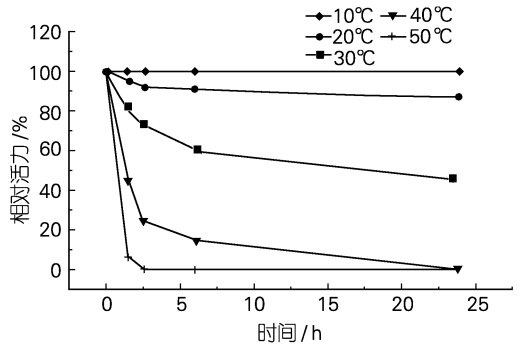


图 4 AC167 几丁质酶热稳定性

Fig. 4 Thermostability of strain AC167 chitinase

3.3.3 酶的最适作用 pH 值

用不同 pH 值的缓冲液配制底物溶液, 于 30℃ 进行酶促反应, 以确定该酶的最适作用 pH 值, 结果(图 5)表明, 该酶属酸性酶, 最适 pH 值为 6, 在 pH 5~8 范围内均能保持较高活力。

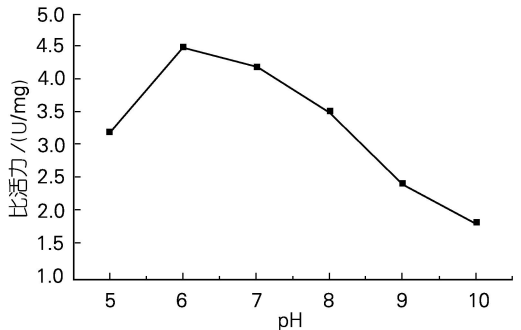


图 5 AC167 几丁质酶最适作用 pH 值

Fig. 5 Optima pH value for AC167 chitinase activity

4 讨论

菌株 AC167 仅能在低于 25℃ 的温度下生长, 因此作者在采用 BIOLOG 微生物鉴定系统对其进行鉴定时, 无法全部获得其在 37℃ 时对各种底物的利用情况, 无法参照数据库得出确定的结果。随着分子分类理论与方法的日趋成熟以及数据库的日趋完善, 应用 16S rDNA 作为分子指标进行鉴定已经逐步成为微生物鉴定和微生物生态调查研究的一种普遍的方法。作者的实验表明, 菌株 AC167 属于假单胞菌属, 并且与丁香假单胞菌具有最高的同源性, 可能是一个新的变种。

作者所筛选到的 AC167 几丁质酶的最适作用温度为 30℃, 与目前研究报道中的低温几丁质酶性质相同^[1-4]。该酶的最适产生温度为 10℃, 对温度较

敏感,在 30e 以上时,酶很快就丧失活力,这些都是低温酶的典型特征,因此 AC167 几丁质酶属于低温酶,其基因表达调控机制值得进一步研究。

作者采用相同的检测标准进行实验与表述,结果表明 AC167 几丁质酶粗酶液的活力高于目前国际工业化几丁质酶产生菌黏质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 原始出发菌株^[11],最高可达 4.5 U/mg (图 5),而且该酶在 5e 时仍能保持 30% 的酶活力,因此具有较高的潜在工业应用价值。

参考文献:

[1] Bendt A, Huller H, Kammel U, et al. Cloning, expression, and characterization of a chitinase gene from the Antarctic psychrotolerant bacterium *Vibrio* sp. strain Fi: 7 [J]. *Extremophiles*, 2001, 5: 119-126.

[2] Lonhiene T, Mavromatis K, Vorigas C E, et al. Cloning, sequences, and characterization of two chitinase genes from the Antarctic *Arthrobacter* sp. strain TAD20: isolation and partial characterization of the enzymes [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183: 1773-1779.

[3] Mavromatis K, Feller G, Kokkinidis M, et al. Cold adaptation of a psychrophilic chitinase: a mutagenesis study [J]. *Protein Eng*, 2003, 16: 497-503.

[4] Orikoshi H, Baba N, Nakayama S, et al. Molecular analysis of the gene encoding a novel cold-adapted chitinase (ChiB) from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain Q7 [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185: 1152-1160.

[5] 赵斌,何绍江. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2002. 692-70.

[6] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265-275.

[7] 曾润颖, 赵晶. 深海微生物的分子鉴定分类 [J]. *微生物学通报*, 2002, 29: 122-16.

[8] Morita R Y. Psychrophilic bacteria [J]. *Bacteriol Rev*, 1975, 39: 144-167.

[9] Devereux R, He S H, Doyle C L, et al. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family [J]. *J Bacteriol*, 1990, 172: 3609-3619.

[10] Fry N K, Warwick S, Saunders N A, et al. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae [J]. *J Gen Microbiol*, 1991, 137: 1215-1222.

[11] Enrico C. Chitinase from *Serratia marcescens* [J]. *Methods in Enzymology*, 1988, 161: 460-462.

Screening and molecular identification of cold-active chitinase-producing bacteria from Antarctica

ZENG Runying¹, LIN Nianwei², LIAN Mingzhu², ZHANG Rui¹

(1. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China;
2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Feb., 19, 2004

Key words: antarctica; cold-active chitinase; psychrophilic bacterium; molecular identification

Abstract: An amount of psychrophilic bacteria was isolated from deep sea sediment collected from Prydz Bay, Antarctica. The strain AC167, which showed high cold-active chitinase activity, was screened from these bacteria. It was identified as a *Pseudomonas* species by 16S rDNA sequence comparison. The optimal and highest temperatures for the growth of *Pseudomonas* strain AC167 were 10e and 25e respectively, indicating that it was a typical psychrophilic bacterium. The chitinase produced by *Pseudomonas* strain AC167 belonged to cold-active enzyme because it was most active at 30e and was secreted only at temperatures under 25e.

(本文编辑:张培新)