

徐晓梅, 薛双红, 袁俊超, 等. 2 株产低温蛋白酶耐冷菌株的筛选及酶学性质[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(10): 209–213.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.058

## 2 株产低温蛋白酶耐冷菌株的筛选及酶学性质

徐晓梅<sup>1</sup>, 薛双红<sup>1</sup>, 袁俊超<sup>1</sup>, 郑连爽<sup>1</sup>, 熊燕飞<sup>1</sup>, 张建坤<sup>1</sup>, 苏宝连<sup>2</sup>, 谢 浩<sup>1</sup>

(1. 武汉理工大学化学化工与生命科学学院, 湖北武汉 430070; 2. 武汉理工大学材料复合新技术国家重点实验室, 湖北武汉 430070)

**摘要:**采用低温液体富集、酪蛋白筛选平板、温度复筛等方法从黑龙江省大庆油田土壤这一非极端自然环境中筛选分离获得 2 株产低温蛋白酶的耐冷细菌 LS3 和 LS4, 通过菌落形态和显微观察, 结合 16S rDNA 全序列分析确定前者为假单胞菌属(*Pseudomonas*), 后者为微小杆菌属(*Exiguobacterium*)。LS3 和 LS4 菌株在低温(10 ℃)下均能较好地生长及产酶, 最适酶活温度分别为 40、30 ℃, 最适作用 pH 值均为 8, 对热敏感, 低温仍能维持较好的酶活, 属于低温碱性蛋白酶。其中, LS3 菌株在含尿素培养基中产酶活性较高(52.46 U/mL), LS4 菌株产的蛋白酶对盐有一定耐受性。本研究结果丰富了对低温蛋白酶的研究开发, 为其在食品工业、农业复合菌剂等领域的应用提供了基础。

**关键词:**耐冷菌株; 低温蛋白酶; 酶学性质

**中图分类号:**S182; Q814.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)10-0209-04

微生物的生命活动和温度密切相关, 可分为高温、中温和低温微生物三大类。Morita 将低温微生物分为嗜冷菌(psychrophile)和耐冷菌(psychrotroph), 前者最低可低于 0 生长, 最高生长温度约 20 ℃, 最适生长温度不超过 15 ℃; 后者最适温度可高于 15 ℃, 最高生长温度大于 20 ℃, 在 0~5 ℃可生长繁殖<sup>[1]</sup>, 该定义已被广泛接受。James 等在《Modern Food Microbiology》一书中提出, 耐冷菌又有狭义(stenopsychrotroph, 40 ℃不生长)和广义(eurypsychrotroph, 可高于 40 ℃生长)之分<sup>[2-3]</sup>。这些低温微生物是低温酶(cold-active enzyme or psychrophilic enzyme)来源的重要资源库。蛋白酶是目前应用最多的一种酶, 占世界酶市场的 60% 以上<sup>[4]</sup>。低温蛋白酶最适作用温度一般比同功能的中温蛋白酶(50 ℃)低 20~30 ℃, 在低温(0~20 ℃)和中温环境下均具有较高催化活性, 且对热不稳定, 因而有着中温蛋白酶无法取代的优越性<sup>[5]</sup>, 已被广泛应用于分子生物技术、环境生物修复、食品工业、医药行业等各大领域<sup>[6]</sup>。已报道的产低温蛋白酶的微生物大多分离自两极、深海、冰川、冻土等常冷环境<sup>[7-10]</sup>。本研究对大庆油田土壤样品中微生物进行分离筛选, 得到 2 株产低温碱性蛋白酶的耐冷菌, 即狭义耐冷菌 LS3 和广义耐冷菌 LS4, 经鉴定分别属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)和微小杆菌(*Exiguobacterium* sp.), 并进一步对粗酶液进行酶学性质研究, 为低温蛋白酶的广泛应用提供基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株来源及培养基

收稿日期: 2016-02-23

基金项目: 武汉理工大学教学研究项目(编号: w2015003); 武汉理工大学实验室开放试验项目(编号: KFXM16028)。

作者简介: 徐晓梅(1992—), 女, 湖北咸宁人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物研究。E-mail: ximomn@163.com。

通信作者: 谢 浩, 博士, 教授, 主要从事生物化学与微生物学研究。E-mail: h.xie@whut.edu.cn。

1.1.1 菌株来源 土壤样品来自黑龙江省大庆油田, 为无结核硅质黏土, 颜色较黑, 质地较硬。

1.1.2 培养基 (1) LB 富集培养基。蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L, 调 pH 值至 7.0~7.2。固体培养基另加 15~20 g/L 琼脂粉。(2) 初筛培养基。酪蛋白 10 g/L, 蛋白胨 0.5 g/L, 酵母提取物 0.3 g/L, 琼脂粉 1.5%~2.0%, 调 pH 值至 7.0~8.0。(3) 摇瓶发酵培养基。酪蛋白 10 g/L, 蛋白胨 0.5 g/L, 酵母提取物 0.3 g/L, 调 pH 值至 7.0~8.0。

#### 1.2 产低温蛋白酶耐冷菌株的筛选及鉴定

1.2.1 耐冷菌富集 5 g 土壤样品加入 45 mL 无菌水, 充分搅拌后静置 30 min 浸出, 取土壤浸出液于 LB 培养基中, 于 10 ℃、130 r/min 富集培养并如此转接富集 3~4 次, 以上所有过程均在无菌条件下完成。

1.2.2 产低温蛋白酶耐冷菌株初筛 将富集菌液按梯度稀释法取合适稀释度移入初筛平板中, 涂布均匀, 10 ℃倒置培养, 挑选透明圈较大、菌落直径较大的菌株继续涂布或划线直至菌落形状完全一致。

1.2.3 产低温蛋白酶耐冷菌株温度复筛 以 43 ℃为生长上限温度, 该温度下即不生长的菌株为耐冷菌, 如前所述 40 ℃用于区分狭义和广义耐冷菌<sup>[2-3]</sup>。将初筛得到的产蛋白酶菌株在初筛平板上点样, 分别置于 4、20、37、43 ℃上培养, 4 ℃生长、43 ℃下不生长的菌株为试验菌株, 液体培养后加灭菌甘油于 -70 ℃下保存。

1.2.4 蛋白酶活力测定 按照 QB/T 1803—1993《工业酶制剂通用试验方法》的紫外分光光度法测定粗酶液酶活力。20 g/L 酪蛋白底物用 pH 值为 7.5 的磷酸盐缓冲液配制, 相应温度下反应 30 min 后加 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 275 nm 处测定吸光度 D 值。酶活力定义为: 在上述条件下, 1 mL 酶液催化酪蛋白水解形成 1 μg 酪氨酸的酶量为 1 个单位(U/mL)。

1.2.5 16S rDNA 全序列测序 细菌克隆测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。通用引物为: 7F, 5'-CA-

GAGTTTGATCCTGGCT - 3'; 1540R, 5' - AGGAGGTGATC-CAGCCGCA - 3'。

### 1.3 菌株生长产酶特性

1.3.1 温度对产酶耐冷菌生长的影响 将产酶菌株的液体培养液按 2% 的接种量接入 10 mL LB 富集培养基中,分别置于 4、10、20、25、30、37、40、43 ℃ 下 130 r/min 下振荡培养,每隔 2 h 测其  $D_{600\text{ nm}}$  值。

1.3.2 pH 值对产酶耐冷菌生长的影响 同“1.3.1”节接种,于 30 ℃、130 r/min 下振荡培养,调节培养基 pH 值分别为 5、6、7、8、9,每隔 2 h 测其  $D_{600\text{ nm}}$  值。

1.3.3 盐度对产酶耐冷菌生长的影响 同“1.3.2”节接种培养,调节培养基 NaCl 浓度分别为 0、5、10、20、30、40、50、60、70 g/L,每隔 2 h 测其  $D_{600\text{ nm}}$  值。

1.3.4 培养时间对菌株生长及产酶影响 将产酶菌株的液体培养液按 2% 的接种量接入 50 mL 发酵培养基中,于 10 ℃、130 r/min 下振荡培养,每 24 h 测其  $D_{600\text{ nm}}$  值及上清液酶活力。

#### 1.3.5 不同碳源、氮源对耐冷菌生长及产酶影响

1.3.5.1 碳源试验 以酪蛋白为氮源,在培养基中分别加入葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉和酵母膏为碳源,使终浓度为 10 g/L,培养 96 h 后测酶活力。

1.3.5.2 氮源试验 以酵母膏为碳源,在培养基中分别加入胰蛋白胨、尿素、氯化铵、硫酸铵、硝酸钠、硝酸铵和酪蛋白为氮源,使终浓度为 5 g/L,培养 96 h 后测上清液酶活力。

### 1.4 粗酶液部分酶学性质研究

1.4.1 酶的最适温度 将酶活力测定中的反应温度分别控制在 10、20、30、40、50、60 ℃,其他条件不变,分别测定酶活力。

1.4.2 酶的最适 pH 值 在最适反应温度下,将酶活力测定中的反应 pH 值分别控制在 7、8、9、10、11,其他条件不变,分别测定酶活力。

1.4.3 酶的热稳定性 将粗酶液分别在 30、40、50、60 ℃ 等 4 个温度下保温 10、20、30、40 min,再放入冰水混合物中冷却,测定蛋白酶活力,以未做保温处理的酶活力为对照。

1.4.4 酶的耐盐性 在酶的最佳反应温度和 pH 值条件下,于酶反应体系中分别加入 0、10、20、30、40、50 g/L NaCl,以未加 NaCl 的酶活力为 100%,分别测定酶活力。

1.4.5 部分金属离子及抑制剂对酶活力的影响 在酶的最佳反应温度和 pH 值条件下,于酶反应体系中加入不同金属离子及抑制剂,以未加金属离子或抑制剂的酶活力为 100%,测定加入化学试剂后的酶活力。

## 2 结果与分析

### 2.1 产低温蛋白酶耐冷菌株的筛选和鉴定

经过低温富集、平板初筛、温度复筛及酶活力检测,从土壤样品中筛选得产蛋白酶活力较高的耐冷菌 LS3 和 LS4。LS3 菌株呈细长杆状,长约 2  $\mu\text{m}$ ,宽约 0.5  $\mu\text{m}$ ;LS4 菌株呈粗短杆状,长不到 1  $\mu\text{m}$ ,宽约 0.8  $\mu\text{m}$  (图 1)。在酪蛋白平板上,两菌均呈圆形,不透明,表面光滑、边缘整齐、易挑取,产生明显透明圈,其中 LS3 为乳白色,LS4 呈土黄色。经 16S rDNA 全序列测序鉴定,乳白色 LS3 菌株为假单胞菌属,土黄

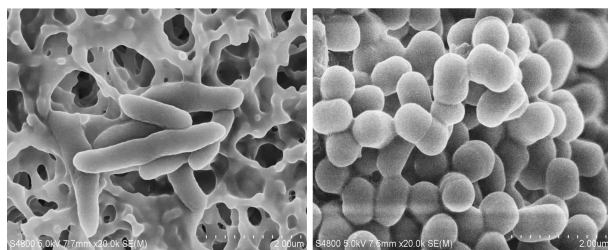


图1 LS3(左)和LS4(右)的SEM图

色 LS4 菌株为微小杆菌属。

### 2.2 菌株生长产酶特性

2.2.1 温度、pH 值及盐浓度对菌株生长的影响 2 株菌株在不同温度、pH 值及盐浓度培养条件下的生长情况不同。LS3 和 LS4 在低温(4、10 ℃)下生长状态较好,LS3 在 33 ℃ 不生长,符合狭义耐冷菌的定义,而 LS4 在 43 ℃ 下不生长,为广义耐冷菌。2 株菌株对 pH 值均有一定耐受性,LS3 在 pH 值为 6~8 之间生长良好,LS4 在 pH 值为 5~8 之间生长良好, pH 值达到 9 时对 2 株菌株生长稍有不。LS3 在 0~20 g/L 盐浓度范围内生长状态良好,在盐浓度超过 30 g/L 以后随着盐度升高,菌株生长逐渐受到抑制,当盐浓度为 50 g/L 时即不生长,在 60 g/L 以上时  $D$  值呈下降趋势,因为在该条件下,耐冷菌受到高渗透胁迫,胞内失水,细胞凋亡。LS4 菌株的耐盐性与 LS3 相似,但其在不含盐条件下生长也会受到抑制,在盐浓度为 50 g/L 时也能生长,只是在高盐环境下生长受阻而十分缓慢。

2.2.2 培养时间对菌株生长及产酶的影响 2 株菌株在 10 ℃ 下生长和产蛋白酶曲线(酶反应温度为 10 ℃)结果见图 2。由图 2 可知,2 株菌株在 60 h 前处于对数生长期,后进入一段较长时间的稳定期,且酶活力在达到稳定期之前呈直线上升趋势,之后也渐趋于稳定。培养液中蛋白酶量与菌体生物量呈正相关关系,当菌体生长进入对数生长期后期时,菌株开始大量合成蛋白酶并分泌至胞外,随后酶继续产生,培养液中酶活力迅速升高;当菌体生长达稳定期后,培养液中酶活力保持基本恒定,并能维持较长时间。

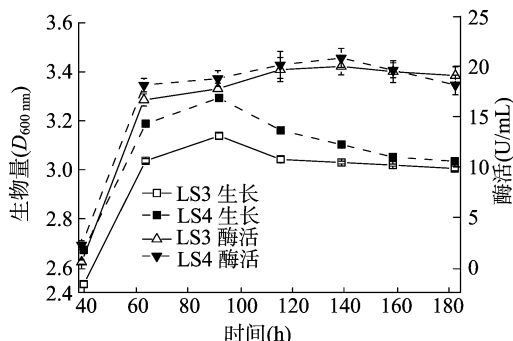


图2 培养时间对菌株生长及酶活力影响

2.2.3 不同碳源和氮源对耐冷菌生长及产酶的影响 利用不同碳源和氮源对 LS3 与 LS4 等 2 株耐冷菌进行发酵培养,其生长及产酶情况分别见表 1、表 2。由表 1 可知,2 株菌株均不能在含葡萄糖的液体培养基中生长;对麦芽糖和可溶性淀粉利用率很低,酶活力极低或没有酶活力;能较好地利用蔗糖,且有较高酶活力;在含酵母膏的液体培养基中生长最旺

盛,但就酶活力而言,LS3 菌株利用酵母膏的产酶情况不及蔗糖,LS4 菌株利用酵母膏和蔗糖的产酶情况相当。由表 2 可知,在所试 7 种氮源中,LS4 菌株虽能利用不同氮源生长,但仅在酪蛋白的存在下才产生蛋白酶,可认为其分泌的蛋白酶是诱导酶而非组成酶。LS3 菌株与 LS4 菌株相似,但除了酪蛋白,其还能更好地利用尿素分泌蛋白酶,酶活力达到 52.46 U/mL。

表 1 不同碳源对耐冷菌生长及产酶的影响

碳源	酶活力(U/mL)		菌体生长情况	
	LS3	LS4	LS3	LS4
葡萄糖	0.00 ± 0.02	0.00 ± 0.02	—	—
麦芽糖	2.05 ± 0.39	3.59 ± 0.36	+	+
蔗糖	27.89 ± 1.48	29.07 ± 2.05	+++	+++
可溶性淀粉	0.00 ± 0.02	0.00 ± 0.02	+	+
酵母膏	17.36 ± 2.36	27.26 ± 1.58	++++	++++

注:“—”表示不生长;“+”表示菌浊程度,“+”越多,表示菌体生长越旺盛。下表同。

表 2 不同氮源对耐冷菌生长及产酶的影响

氮源	酶活力(U/mL)		菌体生长	
	LS3	LS4	LS3	LS4
胰蛋白胨	0.00 ± 0.02	0.00 ± 0.02	+++++	+++++
尿素	52.46 ± 2.68	0.00 ± 0.02	+++	+++
NH <sub>4</sub> Cl	0.00 ± 0.02	0.00 ± 0.02	+	+
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.00 ± 0.02	0.00 ± 0.02	+	+
NaNO <sub>3</sub>	0.00 ± 0.02	0.00 ± 0.02	+++	+++
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.00 ± 0.02	0.00 ± 0.02	++++	++++
酪蛋白	17.36 ± 2.36	27.26 ± 1.58	++++	++++

## 2.3 粗酶液部分的酶学性质

**2.3.1 酶的最适温度** 设置不同的温度梯度,对菌株酶活力进行检测。图 3 显示,狭义耐冷菌 LS3 产蛋白酶的最适作用温度约在 40 ℃,50 ℃ 仍维持 95% 左右的酶活力,而在 60 ℃ 降到 50% 左右,且在 10、20 ℃ 维持较高酶活力,分别为 40%、55% 左右。广义耐冷菌 LS4 产蛋白酶的最适作用温度较 LS3 的低,在 30 ℃ 左右,在 10、20 ℃ 下分别维持 45%、60% 左右的较高酶活力,60 ℃ 高温下仅存最高酶活力的 25% 左右。根据 Margesin 等的定义,通常把最适作用温度在 35 ℃ 左右的低温下仍具一定催化效率的酶称为低温酶<sup>[11]</sup>。已报道的由耐冷菌分泌的蛋白酶最适作用温度一般处在 25 ~ 50 ℃ 范围<sup>[12]</sup>。已知耐冷菌产蛋白酶的最适作用温度最低的为 19 ℃<sup>[13]</sup>,也有更高的最适温度(55 ~ 60 ℃)<sup>[14-16]</sup>,可视为中温酶。由此表明,耐冷菌所产酶不一定是低温酶,要鉴定是否为产低温蛋白酶的菌株,也须要比较所产蛋白酶在不同温度下的酶活力以及酶的热稳定性。

**2.3.2 酶的最适 pH 值** 设置不同的 pH 值梯度,对菌株酶活力进行检测,结果见图 4。2 株菌株最适作用 pH 值均在 8 左右,LS3 菌株所产蛋白酶在碱性环境(pH 值为 8 ~ 11)下维持较高酶活力,虽呈递减趋势,但 pH 值在 11 时仍保持最高酶活力的 60% 左右。而 LS4 菌株所产蛋白酶活力受 pH 值影响较大,随 pH 值升高,酶活力迅速下降,pH 值为 11 时仅为最高酶活力的 15% 左右。2 株菌株所产低温蛋白酶均为碱性蛋白酶。

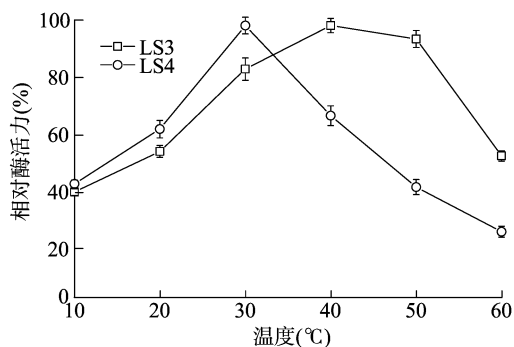


图 3 温度对蛋白酶活性的影响

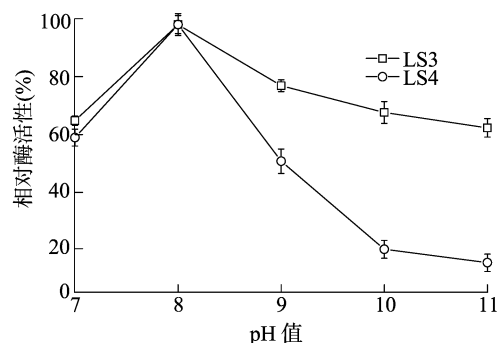


图 4 pH 值对蛋白酶活性的影响

**2.3.3 酶的热稳定性** 蛋白酶的耐热性检测试验结果显示,LS3 和 LS4 等 2 株菌株所产生的蛋白酶对热的稳定性不同(图 5)。30 ℃ 保温处理对 LS3 菌株产生的蛋白酶影响不大,该温度下保温 40 min 后仍持有 65% 左右的活性;40 ℃ 处理 30 min,50 ℃ 保温 10 min 后仍保持 60% 左右,但 50 ℃ 处理 20 min 则几乎丧失 100% 的酶活力。相对 LS3 而言,LS4 菌株产生的蛋白酶对热更不稳定,其在 30 ℃ 保温 30 min 之后即丧失 45% 左右的活力,40 min 后仅剩 30% 左右;40 ℃ 保温 10 min 之后则只剩 50% 左右的酶活力,40 ℃ 处理 30 min,50 ℃ 处理 10 min 即丧失所有酶活力。LS3 和 LS4 等 2 株菌株产生的蛋白酶对热的稳定性不同,应该与酶的最适作用温度有关,前者为 40 ℃ 左右,后者约为 30 ℃,所以 LS4 菌株产生的蛋白酶热稳定性更差。总而言之,2 株菌株所产生的蛋白酶均对热不稳定,在较高温度(>50 ℃)下可快速失活,这是低温酶的一个重要特性。

**2.3.4 酶的耐盐性** 由图 6 可知,盐浓度对蛋白酶活力影响较为明显,尤其是对 LS3 菌株产生的蛋白酶而言,盐浓度为 10 g/L 时即可抑制 50% 左右的酶活力,盐浓度为 30 g/L 时几乎丧失 100% 的酶活力。LS4 菌株产生的蛋白酶对盐有一定耐受能力,盐浓度为 10 g/L 时仍保持 70% 左右的酶活力,盐浓度为 40 g/L 时保持 15% 左右的酶活力。

**2.3.5 部分金属离子及抑制剂对酶活力的影响** 金属离子对酶活力的影响与酶的特殊结构有关,研究金属离子对酶活力的影响在今后的理论及应用研究中都具有重要的意义。由表 3 可知,受试金属离子对 LS3 菌株产蛋白酶的活力均有一定程度的抑制作用,Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Ba<sup>2+</sup> 浓度的抑制作用没有 Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 浓度的抑制作用明显,而 Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup> 浓度对 LS4 菌株产生的蛋白酶无明显影响,Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 浓度则会使蛋白酶完全失活。吐温 80 对 2 个蛋白酶均有明显的激

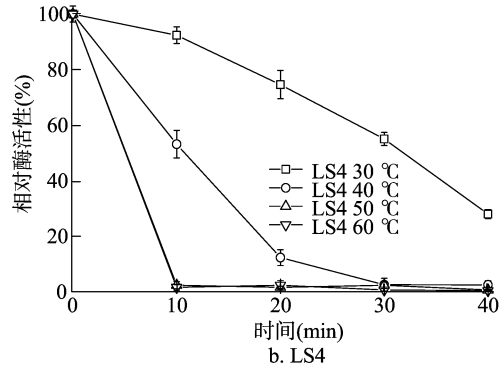
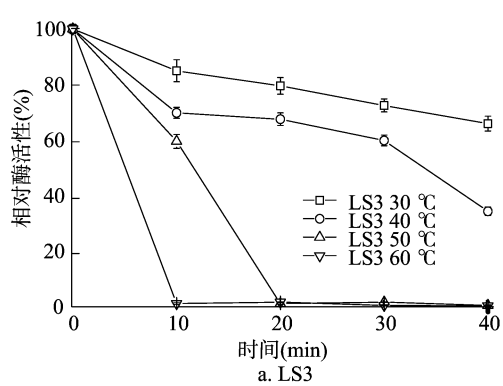


图5 LS3、LS4 所产蛋白酶的热稳定性

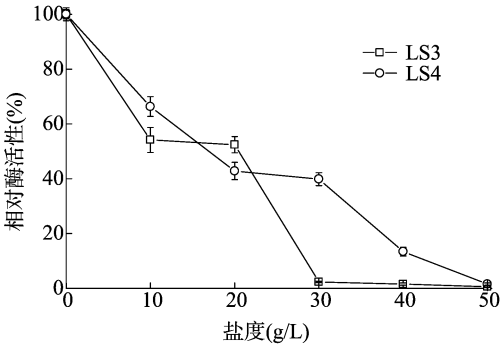


图6 NaCl 浓度对蛋白酶活力的影响

表 3 金属离子及抑制剂对酶活力的影响

试剂	终浓度	相对酶活力(%)	
		LS3	LS4
无	—	100	100
Mg <sup>2+</sup>	5 mmol/L	87	96
K <sup>+</sup>	5 mmol/L	90	103
Ca <sup>2+</sup>	5 mmol/L	64	83
Mn <sup>2+</sup>	5 mmol/L	68	73
Cu <sup>2+</sup>	5 mmol/L	62	2
Zn <sup>2+</sup>	5 mmol/L	61	5
Ba <sup>2+</sup>	5 mmol/L	86	76
SDS	0.1%	2	3
吐温 80	0.5%	116	165
DMSO	0.5%	109	136
$\beta$ -巯基乙醇	0.5%	11	18
EDTA	5 mmol/L	94	1

活效果,其中机理尚不清楚。已有研究表明,吐温 80 可在蛋白药物中用作稳定剂,起保护作用,防止蛋白质分子之间发生反应或吸附聚集<sup>[17]</sup>。变性剂十二烷基硫酸钠(SDS)对 2 株菌株的蛋白酶均有强烈的抑制作用,使蛋白酶的氢键、疏水键打开并插入其疏水内部,形成蛋白酶-SDS 复合物,从而使酶失活。研究表明,二甲基亚砷(DMSO)存在一定的毒性作用,与蛋白质疏水基团发生作用,能导致蛋白质变性。然而试验显示,DMSO 对蛋白酶无抑制作用且对 LS4 菌株产生的蛋白酶有激活作用(136%),其中机理有待进一步探究。 $\beta$ -巯基乙醇对 2 株菌株产蛋白酶均有明显的抑制作用,其通过将蛋白酶中二硫键还原为一SH 基团而使之失活。金属蛋白酶抑制剂乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)对 LS4 产的蛋白酶有强烈的抑制作用,对 LS3 产的蛋白酶无

影响,说明 LS4 产的蛋白酶属于金属蛋白酶。

3 结论

本试验从大庆油田土壤这一非极端自然环境中分离获得 2 株产低温碱性蛋白酶的耐冷菌株 LS3、LS4,丰富了产低温碱性蛋白酶耐冷菌的资源库。菌株对 pH 值(5~9)及盐浓度(0~4%)均有一定耐受性。LS3 菌株为狭义耐冷菌,经鉴定为假单胞菌属,LS4 菌株为广义耐冷菌,经鉴定为微小杆菌属。2 株菌株在低温下能够良好生长并产酶,在尿素存在下,LS3 产酶活力达到 52.46 U/mL,为投入实际应用提供了有力依据,是良好的出发菌种。LS3 和 LS4 菌株所产酶的最适作用温度分别为 40、30 °C 左右,最适作用 pH 值为 8 左右,低温碱性环境中蛋白酶均维持较高活性,而热稳定性差,在较高温度(>50 °C)下快速失活,为蛋白酶的应用提供基本条件。金属离子对 LS3 菌株产蛋白酶的活力均有一定程度的抑制作用,Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 浓度的抑制作用较为明显,表明此蛋白酶的作用不需要金属离子的参与,EDTA 对其无影响也可证实这一点。Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 浓度可使 LS4 菌株产的蛋白酶完全失活,其对 EDTA 敏感,说明属于金属蛋白酶。而吐温 80 作为稳定剂,对 2 个蛋白酶均有激活效果。该研究对蛋白酶的实际应用具有指导性意义。

参考文献:

[1] Morita R Y. Psychrophilic bacteria[J]. Bacteriological Reviews, 1975,39(2):144-167.

[2] James M J, Martin J L, David A G. Modern food microbiology[M]. Berlin:Springer,2004:395-413.

[3] Mossel D A, Zwart H. The rapid tentative recognition of psychrotrophic types among Enterobacteriaceae isolated from foods[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1960,23(2):185-188.

[4] Baghel V S, Tripathi R D, Ramteke P W, et al. Psychrotrophic proteolytic bacteria from cold environment of Gangotri glacier, Western Himalaya, India[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005,36(5/6):654-659.

[5] Dastager S G, Dayanand A, Li W J, et al. Proteolytic activity from an alkali-thermotolerant *Streptomyces gulbargensis* sp. nov[J]. Current Microbiology, 2008,57(6):638-642.

[6] Fornbacke M, Clarsund M. Cold-adapted proteases as an emerging class of therapeutics[J]. Infectious Diseases and Therapy, 2013,2(1):15-26.

刘紫英,袁 斌,冷桂华. 1 株华木莲内生真菌的抗氧化活性分析和菌株鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):213-216.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.059

# 1 株华木莲内生真菌的抗氧化活性分析和菌株鉴定

刘紫英<sup>1</sup>,袁 斌<sup>2</sup>,冷桂华<sup>1</sup>

(1. 宜春学院化学与生物工程学院/江西省天然药物活性成分重点实验室,江西宜春 336000;

2. 宜春学院生命科学与资源环境学院,江西宜春 336000)

**摘要:**华木莲(*Sinomanglietia glauca* Z. X. Yu et Q. Y. Zheng)为木兰科中我国特有的单种属植物,全世界唯宜春特有的珍稀濒危新树种,对从华木莲叶片中分离的多株内生真菌进行抗氧化活性分析,筛选出抗氧化性较高的菌株并鉴定。筛选华木莲叶片的内生真菌,制备其发酵液提取物,采用 TBA 反应法、超氧阴离子自由基( $O_2^- \cdot$ )、羟基自由基( $\cdot OH$ )清除能力的分析测定其抗氧化活性,对抗氧化活性高的内生真菌菌株利用试剂盒提取内生真菌总 DNA,扩增其 rDNA 的 ITS 序列并测序。结果显示,菌株 SL-3 的总抗氧化活性很高,比对照、以维生素 C 为底物的高。通过对抗氧化活性成分的分析可知,该菌株含有黄酮类化合物。对菌株 SL-3 进行形态和分子鉴定,确定为产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)。说明内生真菌 SL-3 产黄青霉具有明显和稳定的抗氧化活性,可用于抗氧化活性成分发酵生产的微生物资源。

**关键词:**华木莲;内生真菌;抗氧化活性;ITS 序列;黄酮类化合物;菌株鉴定;产黄青霉;微生物资源

**中图分类号:** S567.23<sup>+</sup>9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0213-04

华木莲(*Sinomanglietia glauca* Z. X. Yu et Q. Y. Zheng)别称落叶木莲,为我国特有单种属植物,属于木兰科,已被列为国家 I 级重点保护植物,全球仅狭域分布于江西省宜春市,是特有的珍稀树种。目前,国内外仅施建敏等对华木莲叶黄酮类化合物和多糖的抗氧化作用进行了研究,结果显示,华木莲叶内黄酮类化合物和多糖的抗氧化性效果很好<sup>[1-2]</sup>,华木莲具有潜在的利用价值,可成为抗衰老保健品辅料或功能因子<sup>[3]</sup>。现有研究结果表明,植物内生真菌可能产生与其宿主

体内相同或相似的生理活性成分,植物内生菌是分离新的天然活性成分和开发新药的潜在资源,成为当今的研究热点<sup>[4-5]</sup>。笔者前期已研究过华木莲叶中内生真菌的群落结构<sup>[6]</sup>,分离并鉴定 74 株华木莲叶内生真菌。现以华木莲的内生真菌为研究对象,通过对多株内生真菌进行发酵振荡培养,利用硫巴比妥酸(TBA)反应法、超氧阴离子自由基( $O_2^- \cdot$ )、羟基自由基( $\cdot OH$ )清除能力研究其培养液提取物具有抗氧化活性,筛选出抗氧化活性成分的内生真菌并鉴定其种属。

收稿日期:2016-01-25

基金项目:江西省天然药物活性成分重点实验室开放基金。

作者简介:刘紫英(1979—),女,江西万年人,硕士,副教授,从事微生物工程技术研究。E-mail:yingziliu2008@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

华木莲取材于江西省宜春市明月山风景区周边林木种植

- [7] Kuddus M, Ramteke P W. Cold-active extracellular alkaline protease from an alkaliphilic *Stenotrophomonas maltophilia*: production of enzyme and its industrial applications [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55(11): 1294-1301.
- [8] Wang Q F, Hou Y H, Xu Z, et al. Purification and properties of an extracellular cold-active protease from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ276 [J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 38(3): 362-368.
- [9] Acevedo J P, Rodriguez V, Saavedra M, et al. Cloning, expression and decoding of the cold adaptation of a new widely represented thermolabile subtilisin-like protease [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(2): 352-363.
- [10] 陈吉刚, 李文晨, 罗 楠, 等. 产蛋白酶北极海洋耐冷菌 ArcB82306 的筛选及其蛋白酶性质 [J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(6): 858-862.
- [11] Margesin R, Palma N, Knauseder F. Protease of psychrotrophic bacteria isolated from glaciers [J]. Journal of Basic Microbiology, 1991, 31(5): 377-383.

- [12] Kasana R C. Proteases from psychrotrophs: an overview [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2010, 36(2): 134-145.
- [13] Huston A L, Methe B, Deming J W. Purification, characterization, and sequencing of an extracellular cold-active aminopeptidase produced by marine psychrophile *Colwellia psychrerythraea* strain 34H [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(6): 3321-3328.
- [14] Kim J I, Lee S M, Jung H J. Characterization of calcium-activated bifunctional peptidase of the psychrotrophic *Bacillus cereus* [J]. Journal of Microbiology, 2005, 43(3): 237-243.
- [15] Vazquez S, Ruberto L, Cormack W M. Properties of extracellular proteases from three psychrotolerant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Antarctic soil [J]. Polar Biology, 2005, 28(4): 319-325.
- [16] 曾胤新, 陈 波. 极区低温海洋细菌及其产酶情况的初步研究 [J]. 生物技术, 2002, 12(1): 10-12.
- [17] Deechongkit S, Wen J, Narhi L O, et al. Physical and biophysical effects of polysorbate 20 and 80 on darbepoetin alfa [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 98(9): 3200-3217.