

渤海沉积物产脂肪酶细菌的筛选及其多样性分析

伍朝亚^{1,2} 孟宪刚^{1*} 李岩² 曲慧敏² 解志红^{2*}

(1. 兰州交通大学化学与生物工程学院 甘肃 兰州 730070)

(2. 中国科学院烟台海岸带研究所 山东 烟台 264003)

摘要:【目的】从渤海沉积物中分离筛选产脂肪酶细菌,分析其物种多样性,增加人们对渤海生态系统中产脂肪酶菌多样性的认识,获取高效产脂肪酶菌株,为海洋产脂肪酶微生物的挖掘提供菌群资源。【方法】分别将8个渤海沉积物样品梯度稀释涂布至吐温-80 筛选平板和三丁酸甘油酯筛选平板,选择性分离产脂肪酶细菌;分析基于16S rRNA基因序列的系统发育关系,揭示这些细菌的分类地位和遗传多样性;利用对硝基苯酚法测定胞外脂肪酶活性,筛选出高效产脂肪酶菌株。【结果】从8个渤海沉积物样品中分离获得51株产脂肪酶细菌,这些菌株隶属于Bacteroidetes、Proteobacteria和Firmicutes三个门的8个属,其中*Pseudoalteromonas* (35.2%)、*Marinobacter* (23.5%)和*Sulfitobacter* (17.6%)是优势菌群;脂肪酶活性实验表明所有测定菌株都能够分泌脂肪酶,菌株70623分泌的脂肪酶酶活最高,为42.4 U/mL。【结论】渤海沉积物中可培养产脂肪酶细菌类群较为丰富,*Pseudoalteromonas*、*Marinobacter*和*Sulfitobacter*菌株是优势菌群,测定菌株所产胞外脂肪酶能力不同,获得了一株高效产脂肪酶菌株*Marinobacter* sp. 70623。

关键词: 海洋沉积物, 产脂肪酶细菌, 多样性, 酶活, 渤海

Screening and diversity of lipase-producing bacteria in the sediments of Bohai Sea

WU Chao-Ya^{1,2} MENG Xian-Gang^{1*} LI Yan² QU Hui-Min² XIE Zhi-Hong^{2*}

(1. School of Chemical and Biological Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

(2. Yantai Institute of Coastal Zone Research Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China)

Abstract: [Objective] To uncover the diversity of cultivable lipase-producing bacterial isolated from

Foundation item: Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. XDA11020403); Shandong Independent Innovation and Achievement Transformation Program (No. 2014ZZCX07303)

***Corresponding authors:** MENG Xian-Gang: Tel: 86-931-4956524; E-mail: mengxg@mail.lzjtu.cn
XIE Zhi-Hong: Tel: 86-535-2109183; E-mail: zhxie@yic.ac.cn

Received: January 13, 2017; **Accepted:** May 16, 2017; **Published online** (www.cnki.net): May 25, 2017

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项项目(No. XDA11020403); 山东省自主创新及成果转化专项项目项目(No. 2014ZZCX07303)

***通讯作者:** 孟宪刚: Tel: 86-931-4956524; E-mail: mengxg@mail.lzjtu.cn

解志红: Tel: 86-535-2109183; E-mail: zhxie@yic.ac.cn

收稿日期: 2017-01-13; **接受日期:** 2017-05-16; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-05-25

the sediments of Bohai Sea and expand our knowledge on lipase-producing bacteria. Through screening efficient lipase production strains to expanding the marine lipase-producing microorganism resources. **[Methods]** The lipase-producing bacteria were isolated by using tween-80 plate and tributyrin plate from 8 sediment samples of the Bohai Sea. The diversity of these bacteria was evaluated through phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene sequences. Using the p-nitrophenol method to detect extracellular lipase activity and select high lipase producing strains. **[Results]** A total of 51 lipase-producing strains were isolated from 8 sediment samples. The isolates were classified into 8 genera of three phyla including Bacteroidetes, Proteobacteria, and Firmicutes, with *Pseudoalteromonas* (35.2%), *Marinobacter* (23.5%) and *Sulfitobacter* (17.6%) as the dominant. Enzyme activity test showed that all the strains were able to secrete lipase, and a lipase-producing strain *Marinobacter* sp. 70623 possesses the highest lipase activity of 42.4 U/mL. **[Conclusion]** The cultivable lipase-producing bacteria isolated from the sediment of Bohai Sea are abundant with *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter* and *Sulfitobacter* bacteria as the dominant groups, all the tested strains possess lipase activity, and the highest lipase activity producing strain *Marinobacter* sp. 70623 was obtained in this study.

Keywords: Marine sediment, Lipase-producing bacteria, Diversity, Enzyme activity, Bohai Sea

脂肪酶是甘油酯水解酶^[1], 隶属于羧基酯水解酶类, 能够将甘油三酯水解成甘油和脂肪酸, 广泛存在于动物、植物和微生物中^[2-3]。动植物体内的脂肪酶含量少且活性低, 使用受限^[4]。微生物脂肪酶的种类多、来源广, 具有比动植物脂肪酶更广的 pH、温度作用范围和底物的专一性类型, 以及较高的催化活性和稳定性^[5], 是当代酶工业最受瞩目的酶种之一^[6]。脂肪酶已被广泛应用于食品、石油、化工、洗涤行业、日用化学合成、生物制药、造纸、废物处理^[7-9]、生物柴油和皮革生产等行业^[10], 是重要的工业用酶。目前用于脂肪酶生产的微生物大多来源于陆地或淡水环境, 而随着工业发展其不能满足对脂肪酶不同特征需求的多样性^[11]。地球表面的 2/3 以上由海洋沉积物覆盖, 这些沉积物中存在着大量的产多种酶及代谢产物的微生物。因此, 寻找并开发海洋来源的产脂肪酶微生物, 利于发现新型脂肪酶产生菌种并为酶工业的大量生产提供丰富的菌群资源。

海洋微生物作为产酶资源, 正在成为一个新的研究热点。目前, 国内外关于脂肪酶产生菌的报道多来自极地^[12]和深海海泥中^[13], 脂肪酶微生物大都属于假单胞菌(*Pseudomonas*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)^[14-15]等, 对于浅海沉积物中产脂肪酶微生物则关注较少。本研究根据渤海独特的地理、气

候及环境特征, 从其海底表面沉积物中筛选产脂肪酶的菌株, 以期系统发掘海洋微生物资源, 解决工业生产脂肪酶来源的问题。渤海位于中国大陆东部的最北端, 是一个半封闭的陆缘浅海, 平均水深小于 20 m, 海域面积 77 284 km², 被富集的一环渤海经济圈工业区包围, 是我国重要的经济鱼虾蟹生产海洋系统^[16]。渤海三面环陆, 其海水交换能力较差, 沉积物类型大部分为泥沙和软泥质, 受人类活动影响较大, 而水体环境的改变会引起渤海沉积物生物多样性的变化^[17]。基于此, 本文研究了渤海沉积物中可培养产脂肪酶细菌, 并通过基于 16S rRNA 基因序列的系统发育关系分析, 揭示这些细菌的分类地位和遗传多样性; 利用对硝基苯酚法测定胞外脂肪酶活性, 筛选出高效产脂肪酶菌株, 增加人们对渤海生态系统中产脂肪酶菌多样性的认识, 为海洋产脂肪酶微生物的挖掘提供菌群资源, 对于开发海洋功能性微生物资源具有一定的借鉴作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 酵母提取物、蛋白胨, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 对硝基苯酚棕榈酸酯, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司。PCR 仪, 杭

州晶格科学仪器有限公司; 电泳仪, 北京市六一仪器厂; 凝胶成像仪, 北京友华照钦医疗器械有限公司 Bio-Rad 生命科学授权代理商; 恒温培养摇床、电热恒温水槽, 上海一恒科技有限公司; 小型高速冷冻离心机, 德国 Thermo Fisher 公司; 酶标仪, 深圳市华德维康科技有限公司。

1.1.2 培养基: 初筛培养基(吐温-80 筛选培养基, g/L): 葡萄糖 20.0, 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 5.0, 氯化钙 1.0, 吐温-80 10.0, 琼脂 15.0, 天然陈海水 1.0, pH 自然, 1.0×10^5 Pa 灭菌 20 min。三丁酸甘油酯培养基(g/L): 三丁酸甘油酯 10.00, NaCl 39.45, KNO_3 1.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.45, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6.90, KCl 2.10, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.50, K_2HPO_4 0.05, NaHCO_3 0.02, NaBr 0.05, 痕量金属离子溶液 2.00 mL, 琼脂粉 18.00, 天然陈海水 1.00, pH 7.2–7.5, 1.0×10^5 Pa 灭菌 30 min。痕量金属离子溶液(g/L): $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$ 5.20, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.50, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.19, $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.10, ZnCl_2 0.07, H_3BO_3 0.06, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02, 柠檬酸铁铵 3.00。2216E 培养基(g/L): 酵母提取物 2.5, 蛋白胨 5.0, 琼脂 15.0 (固体培养基), 天然陈海水 1.0, pH 自然, 1.0×10^5 Pa 灭菌 20 min。发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 5.0, 氯化钙 1.0, 吐温-80 10.0, 天然陈海水 1.0, pH 自然, 1.0×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.2 样品采集

沉积物样品采集自 2014 年 9 月中国科学院烟台海岸带研究所渤海航次, 去除表面可能被污染的样品, 收集没有被污染的表层沉积样品。样品通过无菌操作储存在无菌自封袋内, 表层沉积物温度和 pH 值原位测定。采样船上用干冰低温保存样品, 返回实验之后, 用于菌株筛选的样品于 -4°C 保存。

1.3 产胞外脂肪酶细菌的选择性分离及保藏

称取 1 g 沉积物样品, 用无菌海水以 10 倍稀释梯度稀释至 10^{-6} , 混匀后取 100 μL (10^{-2} – 10^{-6}) 的稀释样品涂布于吐温-80 筛选培养基平板上, 置于 20°C 培养, 待脂肪酶筛选培养基上出现明显白色沉淀圈时, 根据菌落形态、颜色、大小等表型差异, 选择能够在

吐温-80 为底物的培养基中产生沉淀圈的不同形态的菌落, 在新的筛选培养基平板上划线纯化, 之后使用 2216E 液体培养基扩大培养至对数期, 取 1 mL 菌液, 加入终浓度为 20% 的甘油, 保藏于 -80°C [18-19]。

1.4 菌株基因组 DNA 的提取

将所有纯化后的菌株接种至 2216E 液体培养基中, 待生长至对数期后收集菌体, 使用细菌基因组提取试剂盒提取所有菌株的基因组 DNA, 提取方法及流程按照试剂盒要求操作。提取后用 NanoDrop 检测 DNA 纯度, 检测合格的 DNA 样品于 -20°C 冷冻保存待用。

1.5 16S rRNA 基因的扩增及序列测定

选用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F/1492R 扩增所有菌株的 16S rRNA 基因序列^[11], 引物序列、PCR 反应体系及条件参照参考文献[18], PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后送北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序^[20-21]。测序得到的序列提交至 NCBI 数据库, 登录号为: KY244042–KY244060 及 KY272021–KY272052。

1.6 菌株系统发育分析

将测得的 16S rRNA 序列在 NCBI 进行 BLAST 程序在线比对, 并从 GenBank 中下载相似性最高近缘物种的模式菌株序列, 使用 MEGA 5.0 的 Clustal 程序比对后, 并选择邻接法(Neighbor-Joining method)构建系统进化树, 选择 Kimura two-parameter model, 自展值设定为 1 000^[22-23], 并通过 MEGA 5.0 计算所有菌株之间及菌株与模式菌株之间的相似性。

1.7 脂肪酶酶活的测定

1.7.1 对硝基苯酚标准曲线的制作: 称取对硝基苯酚(p-Nitrophenol, pNP)溶解于 5 mL 异丙醇中, 使其终浓度为 1 mmol/L, 再用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)配成不同浓度的对硝基苯酚(pNP)溶液, 分别测定 405 nm 下吸光度, 绘制吸光度-浓度关系标准曲线。

1.7.2 对硝基苯酚棕榈酸酯(p-Nitrophenylpalmitate, PNPP)底物溶液的配制: 配制溶液 A (30 mg PNPP 溶解于 10 mL 异丙醇中)和溶液 B (0.1 g 阿

拉伯树胶和 0.4 mL Triton X-100 溶解于 90 mL 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 缓冲液中), 将溶液 A 和溶液 B 混合搅拌, 直到完全溶解^[24]。

1.7.3 脂肪酶活力的测定: 使用对硝基苯酚法测定脂肪酶酶活。分别将活化后的菌体接种到发酵培养基中, 20 °C、180 r/min 摇床培养, 2 d 后取适量发酵液 12 000 r/min 离心 15 min, 上清即为粗酶液^[25], 向 300 μ L 粗酶液中加入 60 °C 预热的 700 μ L PNPP 底物溶液, 60 °C 反应 20 min, 于 405 nm 下测吸光度。脂肪酶活力单位(U)定义为: 在以上条件下, 每分钟释放 1 μ mol 对硝基苯酚(pNP)所需要的酶量为 1 U。

1.7.4 菌株在吐温-80平板上沉淀圈的测定: 将各菌株在 2216E 固体活化培养基上进行划线, 倒置于 28 °C 培养 24 h, 然后挑取单菌落点种至吐温-80 平板上, 20 °C 培养 6 d, 观察脂肪酶沉淀圈的大小, 分别测量沉淀圈直径和菌落直径的大小, 并计算其比值。

1.7.5 菌株在三丁酸甘油酯平板上水解圈的测定: 将各菌株在 2216E 固体活化培养基上进行划线, 倒置于 28 °C 培养 24 h, 然后挑取单菌落点种至三丁酸甘油酯平板上, 25 °C 培养 3 d, 观察脂肪酶水解圈的大小, 分别测量水解圈直径和菌落直径的大小, 并计算其比值。

1.7.6 模式菌株 *Marinobacter* sp. EF10^[5] 的阳性对照实验: 为了突出本实验筛选脂肪酶菌株在酶活力上的优势, 在实验中增加了阳性对照实验, 选取的阳性对照模式菌株 *Marinobacter* sp. EF10^[5] 是分离自南大西洋深海沉积物中的一株产脂肪酶细菌, 由哈尔滨工业大学威海分校海洋学院实验室提供。分别利用对硝基苯酚法和吐温-80 平板沉淀圈法对模式菌株 *Marinobacter* sp. EF10^[5] 进行酶活力测定。

1.7.7 温度对产脂肪酶菌株 70623 的酶活影响: 以对硝基苯酚棕榈酸酯(PNPP)为底物, 将产脂肪酶菌株 70623 粗酶液置于 20–90 °C 温度梯度, 以 10 °C 为间隔测酶活, 确定不同反应温度对酶活力的影响。

2 结果与分析

2.1 渤海海底表层样品的特点

8 个站点海底表层沉积物样品的采集地点、海水深度、温度和 pH 如图 1 和表 1 所示。8 个站点中水深最深的是 N4 (36 m), 从表 1 可以看出温度与水深有关系, 水深越深温度越低, 最低温度为 10.66 °C, 各样品的 pH 均是中性偏碱, 最大 pH 为 8.19。

2.2 沉积物样品中产脂肪酶细菌

每个沉积物样品取 3 个重复, 分菌前将 3 个样品合并再称量样品进行分离。在初筛培养基稀释度为 10^{-1} – 10^{-4} 的涂布平板上培养后长出大量的菌落, 根据菌落形态、颜色、大小等表型差异, 选择能以吐温-80 为底物培养基中产生脂肪酶生成脂肪酸钙盐沉淀圈的不同菌落, 经分离纯化后得到 51 株产脂肪酶细菌。

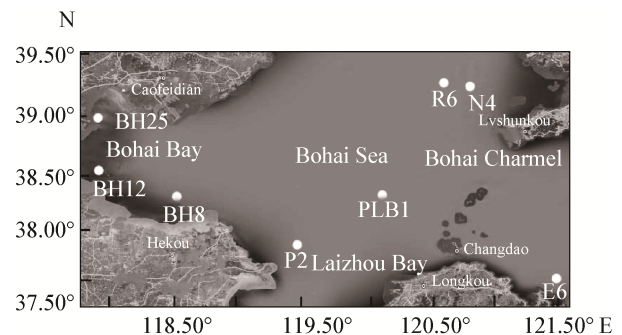


图 1 渤海沉积物位点分布图

Figure 1 Geographic location of sampled sediment stations in Bohai Sea

表 1 站点信息				
Table 1 Characteristics of the sampling stations				
站点 Station	站点坐标 Station location (E, N)	深度 Depth (m)	温度 Temperature (°C)	pH
BH25	117.95°, 38.95°	8.10	22.18	8.19
BH12	117.95°, 38.55°	9.90	21.62	8.17
BH8	118.55°, 38.35°	14.80	19.91	8.09
N4	120.83°, 39.21°	36.00	10.66	7.92
R6	120.63°, 38.23°	25.00	16.83	7.98
P2	119.49°, 37.96°	15.00	19.66	8.07
PLB1	120.15°, 38.36°	15.00	17.12	7.98
E6	121.50°, 37.70°	18.00	19.50	8.05

2.3 产脂肪酶细菌多样性

将测序得到的菌株的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 进行 BLAST 程序在线比对后, 可以得出细菌的分类, 结果显示, 51 株菌分别隶属于 Bacteroidetes、Proteobacteria 和 Firmicutes 三个门的 8 个属。除了菌株 70642 属于 Bacteroidetes 的 *Salegentibacter*, 菌株 70201、70204、70208、70212、70617、70618、70646 和菌株 70619、70634 属于 Firmicutes 的 *Bacillus* 和 *Staphylococcus* 之外, 其余的菌株都隶属于 Proteobacteria 的 *Pseudoalteromonas*、*Marinobacter*、*Sulfitobacter*、*Photobacterium*、*Shewanella*, 其中 *Pseudoalteromonas* (35.2%)、*Marinobacter* (23.5%) 和 *Sulfitobacter* (17.6%) 是优势菌群。对分离自各个站点菌株的分类地位统计如图 2 所示, 18 株属于 *Pseudoalteromonas* 的菌株在 7 个不同站点(除站点 E6 外)的沉积物样品中均有分布, 分离自站点 BH8、N4、E6 的细菌各只有一株, 分别属于 *Shewanella*、*Photobacterium*、*Salegentibacter* 属。在不同站点和不同水深的沉积物里的细菌数量是不同的, 在较深的站点 P2 (15 m) 和 PLB1 (15 m), 产脂肪酶细菌的物种多样性较为丰富, 其中站点 P2 的 14 株属于 *Bacillus* (1 株)、*Staphylococcus* (2 株)、*Sulfitobacter* (3 株)、*Marinobacter* (3 株)、*Pseudoalteromonas* (5 株), 在所有站点中细菌物种多样性最丰富, 站点 PLB1 有 11 株, 菌株数量仅次

于站点 P2, 其菌株分布于 *Bacillus*、*Sulfitobacter*、*Marinobacter*、*Pseudoalteromonas* 四个属。在最浅的站点 BH25 (8.1 m) 和最深的站点 N4 (36 m), 主要的产脂肪酶细菌属是 *Pseudoalteromonas*, 另外各有一株属于 *Bacillus* 和 *Photobacterium*。分离自站点 E6 的 6 株分布于 *Salegentibacter*、*Sulfitobacter*、*Marinobacter* 三个属, 站点 R6 的 4 株属于 *Bacillus*、*Marinobacter*、*Pseudoalteromonas* 三个属, 站点 BH8 的 4 株属于 *Bacillus*、*Shewanella*、*Pseudoalteromonas* 三个属, 站点 BH12 菌株物种多样性最小, 其菌株分布于两个属: *Marinobacter* 和 *Pseudoalteromonas*。

基于菌株的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树如图 3 所示, 共有 18 株菌属于 *Pseudoalteromonas*, 其中 11 株之间相似性为 100%, 它们与 *Pseudoalteromonas halopanktis* LMG 2852^T 的相似性最高为 100%; 70206 和 70207 与 *Pseudoalteromonas spongiae* JCM 12884^T 相似性为 100%, 70214 与 70206 和 70207 进化关系非常亲近, 处于同一分支上, 与 *Pseudoalteromonas spongiae* JCM 12884^T 相似性为 99.9%; 70211 与 *Pseudoalteromonas distincta* KMM 638^T 相似性为 100%; 70203 与 *Pseudoalteromonas prydzensis* ACAM 620^T 在进化树上聚为一个小分支, 其相似性为 99.6%; 这些 *Pseudoalteromonas* 属的细菌进化关系非常接近, 形成了最大的细菌类群。70609 与 *Photobacterium*

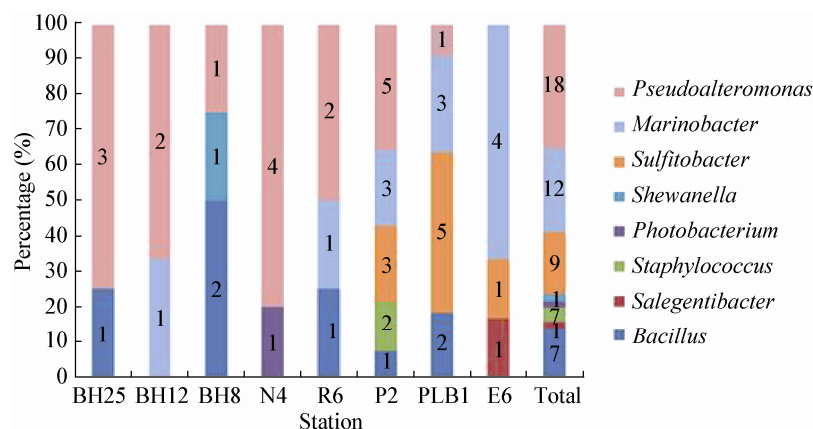


图 2 渤海沉积物中的产脂肪酶细菌的百分比丰度

Figure 2 Relative percentage abundances of the phylogenetic groups of cultivable lipase-producing bacteria recovered from sediment samples of Bohai Sea

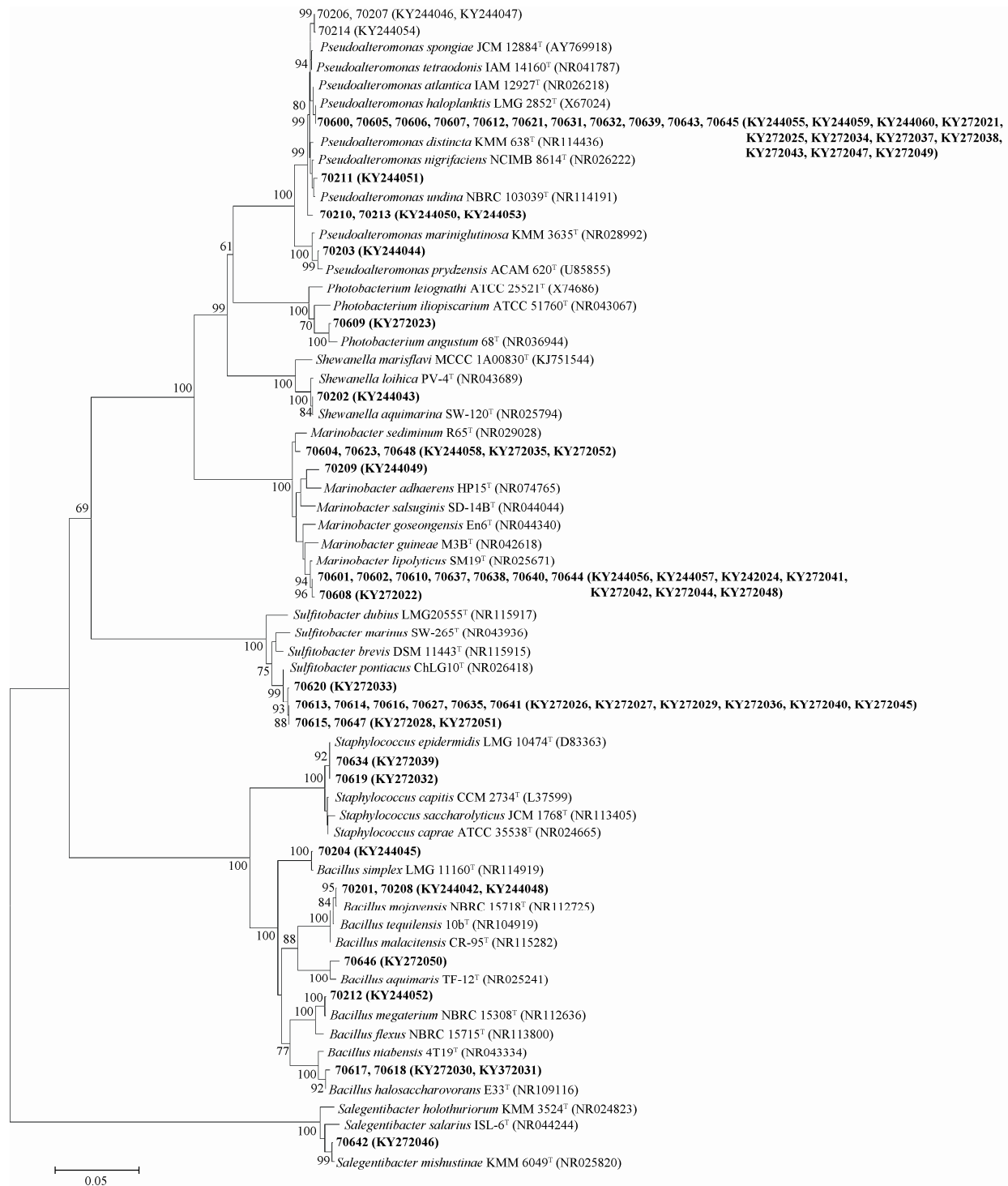


图3 渤海沉积物中产脂肪酶细菌的16S rRNA基因NJ系统发育树

Figure 3 Neighbor-Joining tree of the lipase-producing bacteria isolated from eight sampled sediment stations in the Bohai Sea based on their 16S rRNA gene sequences

注: 粗体是本文筛选的产脂肪酶菌株; 序列的登录号位于圆括号内; 系统发育树分支点处的数字表示置信度(>50%); 标尺表示 100 个核苷酸中有 5 个被替换。

Note: The boldfaced strains are lipase-producing bacteria isolated in this study; The accession number is shown in parenthesis; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values (>50%); The scale bar corresponds to 0.05 substitution per nucleotide position.

angustum 68^T 相似性为 99.8%; 70202 与 *Shewanella aquimarn* SW-120^T 相似性为 100%; 有 12 株属于 *Marinobacter* 属, 它们的进化关系接近, 形成了 *Marinobacter sediminum* R65^T 和 *Marinobacter guineae* M3B^T、*Marinobacter lipolyticus* SM19^T 这三个细菌种的姊妹群; 有 9 株属于 *Sulfitobacter* 属的细菌的进化距离很近, 与 *Sulfitobacter rfontiacus* ChLG10^T 的相似性较高, 为 99.8%。细菌 70634 和 70619 与 *Staphylococcus epidermidis* LMG 10474^T 相似性为 100%; 属于 *Salegentibacter* 的细菌 70642 与 *Salegentibacter mishustinae* KMM 6049^T 相似性最高为 99.9%; 属于 *Bacillus* 属的细菌有 7 株, 其进化关系接近, 其中 70204 与 *Bacillus simplex* LMG 1160^T 相似性为 99.8%; 70201 和 70208 与 *Bacillus malacitensis* CR-95^T 相似性为 100%; 70646 与 *Bacillus aquimaris* TF-12^T 相似性最高为 99.4%; 70212 与 *Bacillus megaterium* NBRC^T 相似性最高为 99.9%; 70617 与 70618 相似性为 100%, 其与 *Bacillus halosaccharovorans* E33^T 相似性最高为 99.8%。

2.4 产脂肪酶细菌胞外脂肪酶酶活

根据方法制作对硝基苯酚标准曲线, 得到标准曲线方程为: $y=0.0225x+0.0565$; 对 51 株菌进行液体发酵培养, 通过对硝基苯酚法测得粗酶液与 PNPP 底物作用后在 405 nm 下的吸光度, 再通过标准曲线方程换算酶活值, 如表 2 所示。筛选到菌株的酶活在 2.6–42.4 U/mL 的范围内, 多数 *Pseudoalteromonas* 和 *Marinobacter* 属细菌的酶活相对较高, 酶活值超过了 10 U/mL, *Pseudoalteromonas* 属细菌 70621 的酶活值为 21.93 U/mL, 是该属细菌酶活最高菌株; *Marinobacter* 属的两株细菌 70604、70623 的酶活分别为 37.23 U/mL 和 42.4 U/mL, 是所有筛选到的产脂肪酶细菌中酶活值较高和最高的菌株。其它属的菌株酶活相对较低, 其酶活值都低于 10 U/mL, 其中, *Staphylococcus* 属的细菌酶活最低, 最低酶活值为 2.6 U/mL。

2.5 产脂肪酶细菌的沉淀圈

产脂肪酶菌株在 2216E 培养基平板划线纯化后

得到单菌落, 单菌落点种至吐温-80 培养基平板, 6 d 后观察到明显的脂肪酶沉淀圈, 说明菌株分泌的脂肪酶分解了吐温-80, 沉淀圈越大说明酶解能力越强。测量所有菌株产生沉淀圈直径和菌落直径大小, 并计算其比值(P/C)(表 2)。

由于初筛培养基是吐温-80 培养基, 因此经筛选分离到的 51 株产脂肪酶细菌均能在吐温-80 平板上产生沉淀圈, 但所筛选到的菌株分泌的脂肪酶对吐温-80 的分解能力不尽相同。从表 2 可以得出, 有 18 株细菌对吐温-80 的分解能力较低, 其 P/C 低于 2, 这些菌株主要是 *Bacillus*、*Sulfitobacter*、*Photobacterium*、*Salegentibacter*、*Staphylococcus* 属; 多数菌株对吐温-80 具有较强的分解能力, 其 P/C 大于 2, 这些细菌主要属于 *Pseudoalteromonas* 和 *Marinobacter* 这两个属, 其中 *Pseudoalteromonas* 属的 70210 对吐温-80 的分解能力最强, 其 P/C 最大, 为 5.8。

2.6 产脂肪酶细菌的水解圈

产脂肪酶菌株在 2216E 培养基平板划线纯化后得到单菌落, 单菌落点种至三丁酸甘油酯培养基平板, 3 d 后观察到明显的脂肪酶水解圈, 说明菌株分泌的脂肪酶分解了三丁酸甘油酯, 水解圈越大说明酶解能力越强。测量所有菌株产生水解圈直径和菌落直径大小, 并计算其比值(H/C)(表 2)。经筛选分离到的 51 株产脂肪酶细菌均能在三丁酸甘油酯平板上产生水解圈, 说明其具有降解三丁酸甘油酯的能力。同样, 所筛选到的菌株分泌的脂肪酶对三丁酸甘油酯的分解能力不尽相同。多数菌株对三丁酸甘油酯的分解能力较低, 其 H/C 低于 2, 这些菌株主要属于 *Pseudoalteromonas*、*Photobacterium*、*Sulfitobacter*、*Bacillus* 和 *Salegentibacter* 属, 有 10 株细菌对三丁酸甘油酯的分解能力较高, 其 H/C 大于 2, 这些菌主要属于 *Marinobacter* 属, 少数分布于 *Pseudoalteromonas*、*Sulfitobacter*、*Bacillus* 和 *Salegentibacter* 属, 其中 *Marinobacter* 属的 70623 对三丁酸甘油酯的分解能力较强, 其 H/C 较大, 为 2.67; *Bacillus* 属的 70212 对三丁酸甘油酯的分解能力最强, 其 H/C 最大, 为 3.25。

表2 渤海沉积物产胞外脂肪酶细菌产脂肪酶活性分析
Table 2 Analysis of the extracellular lipases produced by strains screened from the Bohai Sea sediments

门 Phylum	属 Genus	菌株 Strain	登录号 Accession number	酶活 Enzyme activity (U/mL)	沉淀圈直径/菌落 直径 P/C	水解圈直径/菌落 直径 H/C
Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas</i>	70203	KY244044	5.35	3.14	2.00
		70206	KY244046	5.47	3.37	1.19
		70207	KY244047	7.05	3.38	1.60
		70210	KY244050	12.01	5.80	1.67
		70211	KY244051	8.60	2.67	2.00
		70213	KY244053	10.33	4.60	1.67
		70214	KY244054	12.54	3.56	1.43
		70600	KY244055	20.91	2.70	1.59
		70605	KY244059	11.08	2.8	1.71
		70606	KY244060	11.65	2.56	1.57
		70607	KY272021	10.98	2.40	2.80
		70612	KY272025	20.29	3.57	1.17
		70621	KY272034	21.93	3.88	1.43
		70631	KY272037	13.02	2.78	1.29
		70632	KY272038	14.04	3.50	1.57
		70639	KY272043	10.67	2.36	1.83
		70643	KY272047	21.88	3.63	2.40
		70645	KY272049	17.03	3.13	2.50
	<i>Marinobacter</i>	70209	KY244049	5.83	4.14	1.43
		70601	KY244056	11.50	2.80	1.27
		70602	KY2440657	9.82	2.25	2.00
		70604	KY244058	37.23	3.83	1.43
		70608	KY272022	15.09	3.00	1.63
		70610	KY272024	11.43	2.00	2.00
		70623	KY272035	42.40	3.4	2.67
		70637	KY272041	16.36	2.6	1.75
		70638	KY272042	18.85	2.17	2.50
		70640	KY272044	15.20	2.67	2.20
		70644	KY272048	11.72	1.56	1.75
		70648	KY272052	10.93	2.83	1.50
	<i>Sulfitobacter</i>	70613	KY272026	3.40	1.43	2.00
		70614	KY272027	6.09	1.40	2.40
		70615	KY272028	3.45	1.88	2.00
		70616	KY272029	3.46	1.50	1.38

(待续)

(续表)								
Firmicutes	<i>Shewanella</i>	70620	KY272033	3.50	1.86	1.25		
		70627	KY272036	3.46	1.38	1.67		
		70635	KY272040	3.44	2.00	2.50		
		70641	KY272045	3.41	2.00	1.67		
		70647	KY272051	3.82	1.14	1.56		
	<i>Photobacterium</i>	70202	KY244043	6.53	2.29	1.33		
		70609	KY272023	5.83	4.14	1.71		
	<i>Bacillus</i>	70201	KY244042	5.19	1.17	1.27		
		70204	KY244045	4.24	1.11	1.86		
		70208	KY244048	3.76	1.17	1.12		
		70212	KY244052	2.89	1.13	3.25		
		70617	KY272030	3.44	1.67	1.43		
		70618	KY272031	5.30	2.00	1.54		
		70646	KY272050	4.66	1.4	1.28		
		<i>Staphylococcus</i>	70619	KY272032	2.60	1.33	1.20	
			70634	KY272039	2.76	1.20	2.33	
			Bacteroidetes	<i>Salagentibacter</i>	70642	KY272046	6.72	1.33

注：沉淀圈直径/菌落直径；产脂肪酶菌株在吐温-80 平板上沉淀圈菌落直径比值；水解圈直径/菌落直径；产脂肪酶菌株在三丁酸甘油酯平板上水解圈菌落直径比值。

Note: P/C: The ratio of the precipitation zone diameter versus the colony diameter of a colony on tween 80 plate; H/C: The ratio of the hydrolytic zone diameter versus the colony diameter of a colony on three butyric acid glyceride plate.

2.7 模式菌株 *Marinobacter* sp. EF10^[5]的酶活

利用对硝基苯酚法和吐温-80 平板沉淀圈法相结合测定模式菌株 *Marinobacter* sp. EF10^[5]的脂肪酶活性。结果显示，模式菌株 *Marinobacter* sp. EF10^[5]在吐温-80平板上能够产生白色沉淀圈，测得其沉淀圈直径与菌落直径比值(P/C)为 1.23，利用对硝基苯酚法测定其酶活为 6.04 U/mL，与本文分离到的菌株酶活对比，其比本文分离到的同一属(*Marinobacter*)产脂肪酶细菌的酶活低，相对于本文 *Pseudoalteromonas* 属的脂肪酶菌株的酶活也较低，相对本文其他属的大部分产脂肪酶的菌株酶活也较低，说明本文从渤海沉积物中分离筛选到的产脂肪酶菌株的酶活力相对较高，对于开发海洋微生物脂肪酶资源具有一定的借鉴作用。

2.8 产脂肪酶菌株 70623 在不同温度条件下的酶活

以对硝基苯酚棕榈酸酯(PNPP)为底物，将产脂

肪酶菌株 *Marinobacter* sp. 70623 粗酶液置于 20–90 °C 温度梯度，以 10 °C 为间隔测酶活，确定不同反应温度对酶活力的影响，结果如图 4 所示，菌株 70623 在 20–60 °C 条件下随温度的增加酶活逐渐增强，在 60 °C 时酶活最高，之后随温度升高酶活迅速下降。

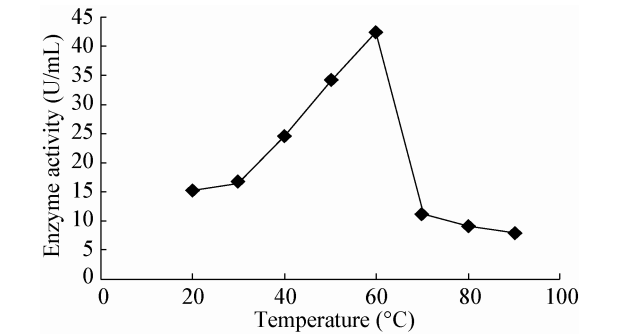


图 4 温度对脂肪酶产生菌 70623 酶活力的影响
Figure 4 Effect of temperatures on enzyme activity of the lipase-producing strain of 70623

3 讨论

细菌脂肪酶是一类广泛应用于工业领域的生物催化剂,具有重要的应用价值。脂类水解酶广泛存在于动物、植物和微生物中,由于动植物脂肪酶作用底物的范围窄,体外活性和产量都很低,所以现在工业上所用的脂肪酶都来源于微生物^[26]。据统计,大约有 65 个种属的微生物可以产生脂肪酶,包括细菌、酵母、放线菌及其他真菌^[27]。微生物脂肪酶的商业化生产主要是通过 *Rhizopus delemar*、*Aspergillus niger*、*Geotrichum candidum*、*Candida rugosa* 和 *Chromabacterium viscosum* 等真菌、酵母和细菌的发酵获得^[28-29]。海洋中蕴含着丰富的微生物资源,海洋微生物逐渐成为新型酶制剂的重要来源,多种海洋微生物如细菌、放线菌和真菌能够产生活性酶^[30]。

本文选用吐温-80选择培养基,从 8 个渤海沉积物样品中筛选出 51 株产脂肪酶菌株,通过对其 16S rRNA 基因的系统发育分析,51 株细菌属于 3 个门的 8 个属,包括 Proteobacteria 的 *Pseudoalteromonas*、*Marinobacter*、*Sulfitobacter*、*Photobacterium*、*Shewanella*, Firmicutes 的 *Bacillus*、*Staphylococcus*, Bacteroidetes 的 *Salegentibacter*, 其中 *Pseudoalteromonas* (35.2%)、*Marinobacter* (23.5%) 和 *Sulfitobacter* (17.6%) 是优势菌群。说明吐温-80 平板用于筛选作用于较短碳链底物的脂肪酶和酯酶,产作用于短碳链的脂肪酶的菌株多样性丰富。徐宇丽等用吐温-80 选择培养基从新疆天山冻土筛选到 17 株产低温脂肪酶细菌,分布于 *Pseudomonas*、*Duganella*、*Brevundimonas*、*Chryseobacterium*、*Arthrobacter* 和 *Rhodococcus* 六个属^[1],与本文筛选到的产脂肪酶细菌在属的水平上完全不相同,可能是陆地和海洋中的各种环境条件的差异,导致了陆源与海洋生态系统中物种的多样性不同。本文筛选到产脂肪酶优势菌群主要是 *Pseudoalteromonas* 细菌与 Zhang 等从南太平洋环流区深海海水中分离到产脂肪酶优势菌群为 *Pseudoalteromonas* 和 *Alteromonas* 属^[31]相似,它

们都属于 Gammaproteobacteria 细菌。据报道, Gammaproteobacteria 是各种酶主要的产生菌^[31],国内外同行的研究表明 Proteobacteria,特别是 Gammaproteobacteria 细菌是亚南极地区乔治王岛和中国南海、胶州湾沉积物中产蛋白酶细菌的优势菌,同时 *Pseudoalteromonas* 菌株也在这些样点被分离到,而且也是中国南海沉积物中的优势菌群^[18-19,32]。这些研究说明了 *Pseudoalteromonas* 产酶细菌广泛存在于海洋的不同环境中。Zhang 等分离到的 *Shewanella*、*Marinobacter*、*Bacillus*、*Staphylococcus* 产脂肪酶细菌^[31]在本文中也分离到,而本文分离到的 *Sulfitobacter*、*Photobacterium*、*Salegentibacter* 产脂肪酶细菌之前未见报道。

通过比较 8 个不同取样点细菌,分离自站点 BH25、BH12、BH8、E6 的脂肪酶菌株多样性相对较少,可能是这些站点位于渤海的近岸海域,受人类活动的影响及环渤海经济圈的工业化不断密集产生大量污染物质排入渤海沿海海域,造成了严重的环境污染,引起近岸水体和沉积物环境发生富营养化,生物多样性降低^[33]。位于渤海较中央处 P2、PLB1 站点,其分离到的细菌在属水平上多样性较为丰富,这可能是该站点受渤海与南黄海物质与能量交换较大,而养殖业等人类干预的影响较少造成产脂肪酶细菌的多样化。而在水深较深、温度最低的两个站点(N4、R6)分离到的脂肪酶菌株主要是 *Pseudoalteromonas* 细菌,与之前报道的产酶 *Pseudoalteromonas* 细菌具有较强的适冷性相关^[34]。

通过对筛选到的菌株的胞外脂肪酶酶活测定,结果得出多数 *Pseudoalteromonas* 和 *Marinobacter* 属细菌的酶活相对较高,酶活值超过了 10 U/mL,其在吐温-80 平板上产生的沉淀圈与菌落直径比值也较大,其 P/C 大于 2;其它 6 个属的菌株产生的酶活相对较低,酶活值都低于 10 U/mL,其在吐温-80 平板上产生的沉淀圈与菌落直径比值也相对较小,除了 *Shewanella* 的菌株 70202 的 P/C 为 2.29 外,其余的 P/C 均小于 2,表明了 *Pseudoalteromonas*

和 *Marinobacter* 是渤海沉积物中主要的产脂肪酶细菌。近几年来,有越来越多的研究报道从海洋环境中分离得到产脂肪酶菌株,如郝文惠等从南极深海沉积物中分离到产脂肪酶芽孢杆菌 XZ18 的最高产酶量为 4.65 U/mL^[27];邵铁娟等从 2 000 多份渤海海区海水海泥样品中分离获得一株新型脂肪酶高产菌株 *Yarrowia lipolytica* bohaisea-9145, 最高酶活达 25.6 U/mL^[35];王全富等从鄂霍次克海域沉积物样品 (lv39-06-06-04-18H) 分离筛选到菌株 *Bacillus* sp. 130 产脂肪酶活性最高,其活性达到 42 U/mL^[36],而本文筛选到的 *Marinobacter* 属的细菌 70623 产脂肪酶活最高,达到 42.4 U/mL,在 20–60 °C 条件下可以检测出随温度的增加酶活逐渐增强,最适产酶温度为 60 °C,确定其为中温脂肪酶产生菌,有较好的开发应用价值。目前新的一项研究报道来自于 Bakir 等^[37]从土耳其的天然温泉中筛选到 22 株能够产脂肪酶菌株,其中有一株属于中温脂肪酶产生菌株 *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 的产酶能力最高。作者采用同样的方法,即对硝基苯酚法,在相同的条件下测定菌株 *Anoxybacillus flavithermus* HBB-134 在 30–80 °C 不同温度下的酶活,结果得到,在温度 30–45 °C 条件下随温度的增加酶活逐渐增强;在温度为 45 °C 时酶活最高,为 79.96 U/mg;45 °C 之后的酶活逐渐降低,在 60 °C 时的酶活降为 40.52 U/mg。与本文筛选到的高效产脂肪酶菌株 *Marinobacter* sp. 70623 相比,它们的共同点是均为中温脂肪酶产生菌株,不同点是两者的最优产酶温度不同, *Anoxybacillus flavithermus* HBB-134 的最适产酶温度为 45 °C, *Marinobacter* sp. 70623 的最适产酶温度为 60 °C。此外,两者在最适产酶温度下的最高酶活也不同, *Anoxybacillus flavithermus* HBB-134 的最高酶活(79.96 U/mg)高于 *Marinobacter* sp. 70623 的最高酶活(42.4 U/mL),但在温度为 60 °C 时, *Anoxybacillus flavithermus* HBB-134 的酶活(40.52 U/mg)低于 *Marinobacter* sp. 70623 的酶活(42.4 U/mL),表明不同来源的中温脂肪酶菌株代谢产酶的能力有所差异,但它们的酶活

相对较高,具有良好的开发应用前景。

本文采用 3 种方法测定脂肪酶活力,对硝基苯酚法测定脂肪酶活力是以对硝基苯酚棕榈酸酯(PNPP)为底物,使发酵粗酶液与底物发生显色反应,然后采用分光光度计法进行测定。以对硝基苯酚作为标准物,绘制标准曲线,根据测出的光密度值和标准曲线计算出酶活值。该方法的优点是能够精确地、定量地测定脂肪酶活力值,是测定脂肪酶活性一种常用的方法,缺点是该方法实验周期长,实验中所用到药品试剂多、成本高。三丁酸甘油酯水解圈法是以三丁酸甘油酯为碳源,脂肪酶能够以三丁酸甘油酯为底物,在具有分泌脂肪酶菌落的周围形成透明的水解圈,达到鉴别目的。该方法的优点是可以直接观察水解圈的有无来确定菌株是否具有脂肪酶活性,方便又快捷,缺点是配制三丁酸甘油酯培养基所要的药品试剂多,价格成本高。吐温-80 平板沉淀圈法测定脂肪酶活力的原理是在 Ca^{2+} 存在的条件下,脂肪酶能够以吐温-80 为底物,在具有分泌脂肪酶菌落的周围形成白色的 Ca^{2+} 复合白色沉淀颗粒,从而与非分泌的脂肪酶菌落相区分,达到鉴别效果。该方法的优点是吐温-80 培养基不使用植物油和指示剂,可以替代相关的油剂培养基使用,在成本上较为经济。缺点是该方法仅适合初筛脂肪酶使用,只能定性鉴别出脂肪酶活性,不能测定酶活力的大小。因此,通常情况下,采用吐温-80 平板沉淀圈法和对硝基苯酚法结合测定脂肪酶活力,吐温-80 平板沉淀圈法用于脂肪酶的初步定性鉴别,对硝基苯酚法则可以进一步地测定其酶活力的大小。此外,通过模式菌株的阳性对照实验表明:本文从渤海沉积物中分离筛选到的产脂肪酶菌株的酶活力相对较高,对于开发海洋微生物脂肪酶资源具有一定的借鉴作用。

海洋的高盐、高压、寡营养和无光照等特殊生态环境决定了海洋微生物种类的多样性和特殊性,因而造成了具有独特的代谢途径和遗传背景,并且能够产生具有独特结构和功能的酶类物质。本文从渤海 8 个沉积物站点分离到 51 株产脂肪酶细菌,

属于 3 个门的 8 个属, 其中 *Pseudoalteromonas* (35.2%)、*Marinobacter* (23.5%) 和 *Sulfitobacter* (17.6%) 是优势菌群, 而筛选到的 *Sulfitobacter*、*Photobacterium*、*Salegentibacter* 产脂肪酶细菌为首次报道, 这些研究结果丰富了浅海微生物的脂肪酶资源, 增加了研究者们对渤海生态系统中产脂肪酶细菌多样性的认识 and 了解, 为工业生产脂肪酶提供了重要的菌群资源。本文获得了一株高效产脂肪酶菌株 *Marinobacter* sp. 70623, 为挖掘海洋产脂肪酶细菌及新脂肪酶具有一定的借鉴作用。

参考文献

- [1] Xu YL, Wang DW, Shi XW, et al. Selective isolation and diversity of cold-adapted lipase-producing strains from permafrost soil at the terminus of a glacier in the Tianshan Mountains[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 233-240 (in Chinese)
徐宇丽, 王大伟, 史学伟, 等. 天山冻土产低温脂肪酶菌株的筛选及其多样性分析[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 233-240
- [2] Zhang Y, Sun XC, Wang KF, et al. Study on the character of a lipase produced by a bacterium[J]. Journal of Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(1): 53-55 (in Chinese)
张勇, 孙新城, 王开放, 等. 一株细菌产生的脂肪酶性质研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(1): 53-55
- [3] Zhong GF, Yuan HX, Shi WT, et al. Screening of lipase producing strains and studying on enzymatic properties of lipase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(20): 221-224 (in Chinese)
钟桂芳, 袁海晓, 史文婷, 等. 产碱性脂肪酶菌株的筛选及酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(20): 221-224
- [4] Yang JF. Isolation of alkaline lipase producing strain and purification and characterization of alkaline lipase[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University of Science and Technology, 2004 (in Chinese)
杨军方. 产脂肪酶细菌的筛选和酶学性质研究[D]. 南京: 南京理工大学硕士学位论文, 2004
- [5] Wang K, Liu HG, Jiang K, et al. Study on classification and enzymatic properties of deep-sea bacteria producing lipase[J]. Current Biotechnology, 2015, 5(3): 246-249 (in Chinese)
王凯, 刘洪国, 姜昆, 等. 产脂肪酶深海细菌的筛选鉴定及酶学性质研究[J]. 生物技术进展, 2015, 5(3): 246-249
- [6] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(2): 235-251
- [7] Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases[J]. Annual Review of Microbiology, 1999, 53(1): 315-351
- [8] Alquati C, de Gioia L, Santarossa G, et al. The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*. Heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling[J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(13): 3321-3328
- [9] Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review[J]. Bioresource Technology, 2003, 89(1): 17-34
- [10] Wang JY, Wu QJ, Bao YM, et al. Screening of lipase producing alkalophiles bacteria and study of enzymatic properties[J]. Biotechnology, 2010, 20(6): 57-61 (in Chinese)
王静云, 武秋娟, 包永明, 等. 产脂肪酶嗜碱细菌的筛选及酶学性质研究[J]. 生物技术, 2010, 20(6): 57-61
- [11] Chen MX, Li HY, Chen WW, et al. Isolation, identification and characterization of 68 protease-producing bacterial strains from the Arctic[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(7): 702-709 (in Chinese)
陈明霞, 李和阳, 陈维维, 等. 68 株北极产蛋白酶菌株的筛选、鉴定以及部分酶学性质[J]. 微生物学报, 2013, 53(7): 702-709
- [12] And OK, Christensen MW. Lipases from *Candida antarctica*: unique biocatalysts from a unique origin[J]. Organic Process Research and Development, 2002, 6(4): 446-451
- [13] Bowman JP, Mccammon SA, Brown MV, et al. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3068-3078
- [14] Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, et al. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 4064-4069
- [15] Arpigny JL, Lamotte J, Gerday C. Molecular adaptation to cold of an Antarctic bacterial lipase[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1997, 3(1/4): 29-35
- [16] Yang FL. Response and degradation potential of bacterial communities against petroleum hydrocarbons in the surface-sediments of Bohai Sea, China[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2015 (in Chinese)
杨凤龙. 渤海表层沉积物中细菌群落对石油烃污染的响应及其降解潜力研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2015
- [17] Wang YT, Zhang CB, Qi L, et al. Diversity and antimicrobial activities of cultivable bacteria isolated from Jiaozhou Bay[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(12): 1892-1900 (in Chinese)
王怡婷, 张传波, 齐麟, 等. 胶州湾沉积物可培养细菌的多样性及其抑菌活性[J]. 微生物学报, 2016, 56(12): 1892-1900
- [18] Zhou MY, Chen XL, Zhao HL, et al. Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and their extracellular proteases in the sediments of the South China Sea[J]. Microbial Ecology, 2009, 58(3): 582-590
- [19] Zhang XY, Han XX, Chen XL, et al. Diversity of cultivable protease-producing bacteria in sediments of Jiaozhou Bay, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1021
- [20] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977, 74(12): 5463-5467
- [21] Li Y, Li XY, Liu YJ, et al. Genetic diversity and community structure of rhizobia nodulating *Sesbania cannabina* in saline-alkaline soils[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2016, 39(3): 195-202
- [22] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA 5: molecular

- evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739
- [23] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425
- [24] Massadeh MI, Sabra FM. Production and characterization of lipase from *Bacillus stearothermophilus*[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(61): 13139-13146
- [25] Chen XL, Zhang YZ, Gao PJ, et al. Two different proteases produced by a deep-sea psychrotrophic bacterial strain, *Pseudoalteromonas* sp. SM9913[J]. *Marine Biology*, 2003, 143(5): 989-993
- [26] Cieřliński H, Kur J, Białkowska A, et al. Cloning, expression, and purification of a recombinant cold-adapted β -galactosidase from antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b[J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 39(1): 27-34
- [27] Hao WH, Wang FY, Guo Y, et al. Screening of cold-active lipase producing strains from Antarctic sediments and cloning of the gene[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2014, 33(3): 306-311 (in Chinese)
- 郝文惠, 王凡羽, 郭玉, 等. 南极深海沉积物中产低温脂肪酶菌株的筛选与基因克隆[J]. *应用海洋学学报*, 2014, 33(3): 306-311
- [28] Gandhi NN. Applications of lipase[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1997, 74(6): 621-634
- [29] Chen GY, Ji XL, Lin LB, et al. Isolation and identification of a cold-adapted lipase producing bacterium, study on fermentation conditions and lipase properties[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Science Edition)*, 2010, 32(1): 108-113 (in Chinese)
- 陈贵元, 季秀玲, 林连兵, 等. 低温脂肪酶产生菌筛选与鉴定、产酶条件及酶学性质研究[J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2010, 32(1): 108-113
- [30] Shi CJ, Yan PS, Zhao RX, et al. Advances on enzymes from marine microorganisms[J]. *Current Biotechnology*, 2015, 5(3): 185-190 (in Chinese)
- 史翠娟, 闫培生, 赵瑞希, 等. 海洋微生物酶研究进展[J]. *生物技术进展*, 2015, 5(3): 185-190
- [31] Zhang L, Wang Y, Liang J, et al. Degradation properties of various macromolecules of cultivable psychrophilic bacteria from the deep-sea water of the South Pacific Gyre[J]. *Extremophiles*, 2016, 20(5): 663-671
- [32] Zhou MY, Wang GL, Li D, et al. Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and bacterial extracellular proteases in the coastal sediments of king george island, antarctica[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79668
- [33] Tian F. The study of ammonia-oxidizing bacteria from sediments in Bohai Sea[D]. Beijing: Master's Thesis of China University of Petroleum (East China), 2012 (in Chinese)
- 田方. 渤海沉积环境硝化过程氨氧化细菌的研究[D]. 北京: 中国石油大学(华东)硕士学位论文, 2012
- [34] Yu ZC, Zhao DL, Ran LY, et al. Development of a genetic system for the deep-sea psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1): 133-139
- [35] Shao TJ, Sun M, Zheng JS, et al. Study on low-temperature alkaline lipase from bohaisea-9145[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(6): 789-793 (in Chinese)
- 邵铁娟, 孙谧, 郑家声, 等. Bohaisea-9145 海洋低温碱性脂肪酶研究[J]. *微生物学报*, 2004, 44(6): 789-793
- [36] Wang QF, Hou YH, Lin YF, et al. Screening and classification of deep-sea microbes producing low-temperature lipase and characterization of the lipase[J]. *Food Research and Development*, 2012, 33(11): 180-183 (in Chinese)
- 王全富, 侯艳华, 蔺一飞, 等. 产低温脂肪酶深海菌株的筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(11): 180-183
- [37] Bakir ZB, Metin K. Screening for industrially important enzymes from thermophilic bacteria; selection of lipase-producing microorganisms and optimization of culture conditions[J]. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 2015, 3(6): 43-48