

低温脂肪酶产生菌筛选与鉴定、产酶条件及酶学性质研究^{*1}陈贵元¹, 季秀玲², 林连兵², 魏云林²

(1. 大理学院 基础医学院 生物化学与分子生物学教研室, 云南 大理 671000;

2. 昆明理工大学 生物工程技术研究中心, 云南 昆明 650224)

摘要:昆明东郊一家屠宰厂冷库中筛选到 14 株产脂肪酶低温菌株. 选取 1 株胞外低温脂肪酶高产菌, 进行显微形态及生理生化特征、16S rRNA 基因序列分析, 将其初步鉴定为 *Yersinia enterocolitica* 的一株菌, 命名为 KM1. 对该菌发酵产酶条件研究, 发现其最佳产酶发酵条件为: 培养温度 13 ℃, pH 7.2, 摇瓶培养时间 54 h. 在最佳产酶发酵条件下酶活由 1.8 U/mL 提高到 3.1 U/mL, 提高了 72%. 对该菌脂肪酶的酶学性质研究表明: 在 0 ℃ 时仍具有最高酶活的 20%, 最适反应温度 37 ℃, 最适反应 pH 为 9.0. 在 25 ℃ 以下, pH 7.2~10 范围内均能保持良好的稳定性. 该酶在有机溶剂中较稳定, 即使在 50% 的甲醇中仍能保持 60% 以上的活性, 该酶的最适底物为 C₈ 的酯化物, 且对 C₄~C₁₂ 的酯化物均有较好的催化能力.

关键词:低温微生物; 低温脂肪酶; 鉴定; 发酵; 酶学性质**中图分类号:**Q 939.11 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-7971(2010)01-0108-06

自 1887 年 Forster^[1] 首次从低温环境中筛选到能在 0 ℃ 生长的微生物以来, 人们就对低温微生物产生了浓厚的兴趣, 从而开展了广泛而深入的研究. 近年来低温微生物正成为研究的热点, 不仅在探索地球生命起源和生命在外太空极端环境中的可能性及适应机制等理论研究领域具有重大意义外, 它们及其产生的低温酶在食品、洗涤及化学合成等工业领域也具有广阔应用前景^[2]. 低温酶主要特征是在低于 40 ℃ 的条件下酶活力较高, 热稳定性较中温酶低. 在工业应用上, 低温酶的显著优势在于其作用温度低, 可以节能降耗保护环境^[3].

脂肪酶是一类在油-水界面上催化油脂降解为甘油和脂肪酸的酶类, 微生物细胞、动物组织、植物种子中富含脂肪酶^[4]. 目前中温和高温脂肪酶在工业上已得到了广泛应用, 它们的最适催化温度大多数在 40 ℃ 左右或更高, 在 0 ℃ 左右普遍丧失酶活^[5-6]. 与高温和中温脂肪酶相比, 低温脂肪酶具有柔韧的分子结构, 在 0 ℃ 仍具高活性, 从而能在低温下催化多种反应, 如水解、酯化、酯类手性合

成等^[7], 因此在洗涤、食品、制革、药物合成、生物能源和环保等应用中引起了人们的广泛关注, 具有良好的应用前景. 如食品工业中, 利用低温脂肪酶低温催化食品中的油脂, 不仅能生成有特殊香味的短小碳链脂肪酸, 还增加了食品的香味^[8], 同时脱去油脂, 保证了食品的质量和风味; 在环境修复领域, 大多低温脂肪酶有着接近自然环境的最适催化温度, 在低温状态下处理工业和生活含脂废水和废物, 所需附加热能低, 高效, 而且不会造成二次污染, 对环境保护有积极的意义.

近年来各国科学家对低温脂肪酶进行了广泛的研究, 已纯化或克隆表达了从南北极、深海、高山冻土中分离到的低温微生物产生的低温脂肪酶, 如菌株 *Pseudomonas fragi* IFO3458 (PFL), *Pseudomonas* sp. KB700A, *Pseudomonas* sp. B11-1, *Aeromonas* sp. LPB4 的脂肪酶^[9-12]. 随着人们生活水平的不断提高, 人工低温环境也给人们带来了极大的方便, 对人工低温环境中的微生物进行研究, 不仅可以有效预防微生物的污染, 还可以丰富我国的低

* 收稿日期: 2009-04-10

基金项目: 大理学院科研基金资助项目(2007X26); 云南省自然科学基金面上项目资助(2007C186M).

作者简介: 陈贵元(1975-), 男, 云南人, 硕士, 助教, 主要从事低温酶方面的研究.

通讯作者: 魏云林(1969-), 男, 云南人, 教授, 主要从事微生物学方面研究, E-mail: weiyunlin@yahoo.com.cn.

温微生物资源和开发低温酶. 本文从屠宰场冷库中分离到 14 株产低温脂肪酶菌株, 选取其中 1 株酶活较高的菌株, 进行了形态学、生理生化及 16S rRNA 基因鉴定. 并对其发酵产酶条件进行优化及所产的低温脂肪酶的酶学性质进行了初步研究.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品及菌株来源 昆明市东郊屠宰场冷库.

1.1.2 主要仪器 离心机(Beckman-coulter)、蒸汽灭菌器 YX400 III(日本双哈)、高低温恒温振荡培养箱 HZQ-F160A(上海一恒科学仪器有限公司)、紫外分光光度计(日本岛津)、JEM-1200EXII 型电子显微镜(日本电子).

1.1.3 试剂 蛋白胨和酵母粉(OXOID)、氯化钠(天津化学试剂六厂三分厂)、橄榄油(中国医药集团上海化学试剂公司)、聚乙烯醇 PVA-124(广东西陇化工厂)、对硝基棕榈酸酯(pNPB)(SIGMA).

1.1.4 培养基 基本 Luria-Bertani (LB) 固体培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 琼脂粉 20, 调 pH 至 7.2. LB 液体培养基(pH 7.2). 选择性橄榄油培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 25% 橄榄油乳化液 8% (体积比), 琼脂粉 20, 调 pH 至 7.2. 25% 橄榄油乳化液参照文献[13]制备.

1.2 方法

1.2.1 初筛 用无菌水将采集的样品进行 100 倍稀释, 取 50 μ L 于 LB 平板上涂布, 置 13 $^{\circ}$ C 培养 72 h. 挑取形态颜色均一的菌落于 LB 平板上划线培养, 直至产生单菌落. 将单菌落转接至橄榄油选择性平板上培养, 根据水解圈直径与菌落直径的比值大小筛选产脂肪酶菌株.

1.2.2 复筛 挑取适量初筛获得的产脂肪酶菌株于 5 mL LB 液体培养基中, 13 $^{\circ}$ C, 115 r/min, 培养 60 h. 4 $^{\circ}$ C, 6 000 r/min 离心 15 min 收集发酵上清和菌体, 菌体用 pH 7.2, 25 mmol/L 的磷酸盐缓冲液清洗 2 遍, 然后用 pH 7.2, 25 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 5 mL 溶解菌体, 冰浴超声破碎, 4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min 离心 15 min 收集上清. 参照文献[14]方法测定发酵液和破碎液酶活.

酶活定义: 在 37 $^{\circ}$ C 条件下, 脂肪酶催化对硝基棕榈酸酯(pNPB), 每分钟生成 1 μ mol 对硝基苯酚

定义为一个酶活单位.

1.2.3 菌株鉴定

(1) 形态学、生理生化特征 产酶菌株的形态学观察及生理生化实验参照文献[15-16]的方法进行.

(2) 16S rRNA 基因序列测序和分析 参照文献[17]的方法抽提菌株染色体 DNA. 菌株 16S rRNA 基因序列 PCR 扩增参照文献[18]方法进行, 引物为 8f: 5' - GAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'; 1492r: 5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3'. PCR 产物经华舜胶回收试剂盒纯化后, 与 pMD18T 载体 (Takara 产品) 连接, 并用 CaCl_2 法转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞. 以 M₁₃(RV/M₄) 为引物, 通过菌落 PCR 扩增检测转化产物. 引物序列 M13 (RV): 5' - ATTTACACAGGAAACAGCTATGAC - 3', M₁₃ (M₄): 5' - GTTTCCCAGTCACGACGTTC TAAA - 3'; 菌落 PCR 的反应体系及扩增条件参照文献[18]方法进行. 转化产物交由北京华大基因公司测序. 将获得的序列提交 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 根据 BLAST 数据库中细菌 16S rRNA 基因序列进行相似性比较分析. 利用 DNASTar 软件进行系统进化分析.

1.2.4 发酵条件

(1) 发酵时间对产酶的影响 挑取适量菌体于 LB 液体培养基中, 置于 13 $^{\circ}$ C, 115 r/min 摇床培养, 从 12 h 之后开始, 每隔 6 h 取样 1 次, 测定菌株的生长曲线及其相应的酶活.

(2) 发酵温度对产酶的影响 挑取适量菌体于 LB 液体培养基中, 并于 8, 13, 25, 37, 115 r/min 摇床培养 48 h, 测定不同温度下的生物量及酶活.

(3) 培养基 pH 对产酶的影响 挑取适量菌体于 pH 分别为 4.5, 5.5, 6, 7.2, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 11 的 LB 液体培养基中, 于 13 $^{\circ}$ C, 115 r/min 摇床培养 48 h, 测定脂肪酶酶活.

1.2.5 酶学性质

(1) 温度对酶活的影响 将酶液分别在 0 ~ 75 $^{\circ}$ C 条件下测定脂肪酶的活力.

(2) pH 对酶活力的影响 选用柠檬酸缓冲液 (pH 3.0 ~ 5.0)、磷酸盐缓冲液 (pH 6.0 ~ 8.0)、Tris-HCL 缓冲液 (pH 9.0)、碳酸钠缓冲液 (pH 10.0 ~ 11.0) 作为缓冲体系进行脂肪酶水解活力的测定.

(3) 酶的热稳定性 将酶液分别在 13, 25,

37, 50 ℃ 和 75 ℃ 下保温, 每隔 15 min 取样测定酶活.

(4) 酶的底物特异性 选取不同链长的酯类化合物作为作用底物, 以测定其底物特异性.

(5) 有机溶剂对酶活的影响 在酶液中加入各种有机溶剂, 并保持试(体积)剂终质量分数分别为 10%, 30%, 50%, 80%, 在 4 ℃ 下静置 2 h, 测定酶活.

2 结果与分析

2.1 产酶菌株的筛选 根据水解圈直径与菌落直径比值的大小, 初步筛选出 14 株产低温脂肪酶菌株. 其中 1 号菌株水解圈直径与菌落直径比值 (R_1/R_2) 最大, 为 2.5, 从理论上讲 1 号菌株所产脂肪酶酶活为最高. 经复筛发现 14 株均为分泌型脂肪酶产生菌, 且 1 号菌株酶活最高, 达到 1.8 U/mL, 与初筛的结果相符. 因此选择 1 号菌株作为后续实验研究菌株, 命名为 KM1.

2.2 菌种鉴定

2.2.1 形态学、生理生化特征 KM1 在 LB 培养基上 13 ℃ 培养 72 h 后, 菌落呈乳白色、边缘整齐、湿润、粘稠、颜色均一易挑取. 革兰氏染色为阴性, 菌体大小为 $0.5 \mu\text{m} \times 0.9 \mu\text{m}$, 为周生鞭毛短杆菌. 研究发现 KM1 能以葡萄糖、山梨醇、侧金盏花醇、丙二酸盐和西蒙氏枸橼酸盐作为唯一碳源生长, 不能以乳糖和卫矛醇作为唯一碳源生长, 不能利用尿素, 不能产生 H_2S , 赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶和苯丙氨酸脱氨酶反应为阳性. 根据 KM1 的

形态及生理生化特征, 结合《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版)^[19], 将 KM1 初步鉴定为小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 的菌株, 命名为 *Yersinia enterocolitica* KM1.

2.2.2 16S rRNA 基因序列及系统发育分析 经 16S rRNA 基因测序, 所获得的序列长度为 1 465 bp, GenBank 中的登录号为 EU523225. 将 KM1 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比对, 发现 KM1 与小肠结肠炎耶尔森氏菌属的 16S rRNA 基因序列自然聚类, KM1 的 16S rRNA 基因序列与 15 条相似性较高的序列构建系统发育树见图 1, 从图中可以看出 KM1 与 *Yersinia enterocolitica* (Z75316) 聚为一群, 相似性也最高, 表明 KM1 与 *Yersinia enterocolitica* (Z75316) 的亲缘关系最近.

2.3 KM1 发酵条件

2.3.1 发酵时间对产酶的影响 从 KM1 的生长曲线和测定的相应酶活可看出, 在培养 54 h 时酶活达到最高. 因此, 在培养 54 h 收集发酵液较好 (图 2), 选取 54 h 为最佳培养时间.

2.3.2 发酵温度对产酶的影响 从表 1 可看出在 13 ℃ 培养 48 h, 菌株的生物量及产酶活性均为最好, 选取 13 ℃ 为最佳培养温度. 其为典型的低温菌.

2.3.3 发酵 pH 对产酶的影响 从图 3 可看出, 发酵培养基的初始 pH 值为 7.2 ~ 9.5 时菌体产酶良好. 因此选取 pH 7.2 为发酵最佳 pH 值.

图 1 基于 16S rRNA 基因序列相似性的菌株 KM1 与 15 株细菌的系统进化树

Fig. 1 The Phylogenetic tree of KM1 and other 15 strains based on 16S rRNA

较高,pH 9.0 酶活最高.

2.4.3 酶的热稳定性 研究发现在 25 ℃ 以下酶能保持稳定. 该酶热稳定性差,在 37 ℃ 保温 60 min 酶活下降近 50% ,75 ℃ 保温 15 min 仅残留近 18% 的酶活,表明其为典型的低温酶.

图2 KM1 的生长曲线与酶活变化

Fig.2 Growth curve and enzyme - producing of stain KM1

表1 温度对 KM1 的生长及产酶的影响

Tab.1 Effects of temperatures on growth and enzyme - producing of stain KM1

统计指标	培养温度/℃			
	37	8	13	25
生物量/OD ₆₀₀	1.3	3.84	3.08	1.85
酶活/(U · mL ⁻¹)	0.1	0.85	0.28	0.22

图4 温度对 KM1 脂肪酶活性的影响

Fig.4 Effect of temperature on the activity of KM1 lipase

图3 发酵培养基的初始 pH 值对 KM1 产酶的影响

Fig.3 Effect of pH in fermentative medium on enzyme production of KM1

2.4 菌株 KM1 的脂肪酶性质

2.4.1 温度对酶活的影响 用相对酶活绘制曲线(图4). 从图上可看出 KM1 脂肪酶的最适反应温度为 37,60 ℃ 时酶活保持在 50% ,75 ℃ 下降很快,仅为 9.8% .

2.4.2 pH 对酶活力的影响 在 37 ℃ 下,测定不同 pH 值条件下的酶活,用相对酶活绘制曲线(图5). 发现 KM1 所产脂肪酶在 pH 8 ~ 11 范围内活力

图5 pH 对 KM1 脂肪酶活性的影响

Fig.5 Effects of pH on the activity of KM1 lipase

2.4.4 酶的底物特异性 该酶对 C₄ ~ C₁₂ 的酯类化合物具有较好的催化作用,最适底物为 C₈ 酯类化合物. 这表明该酶对中长碳链的酯类具有较好的催化作用(表2).

2.4.5 有机溶剂对酶活的影响 研究发现低浓度有机溶剂对该酶有激活作用,其中 10% 甲醇激活作用最强,能使酶活提高 44.5% ,该酶在有机溶剂中较稳定,即使在 50% 的甲醇中仍能保持 60% 以上的活性(表3).

3 讨论

目前已报道的产低温脂肪酶细菌多为假单胞菌属(*Pseudomonas*) 和气单胞菌属(*Aeromonas*), 而

本研究分离的产酶菌株根据 16Sr RNA 基因序列并结合生理生化分析可鉴定为 *Yersinia enterocolitica* 的菌株,命名为 *Yersinia enterocolitica* KM1. 关于此属菌株能够产低温脂肪酶的研究尚未见报道. KM1 的最佳产酶发酵条件为:13 °C, pH 7.2, 54 h, 在该条件下酶活由 1.8 U/mL 提高到 3.1 U/mL. 橄榄油的存在对产酶有明显的诱导作用,在体积分数 2% 橄榄油的条件产酶可提高约 5 倍,这与董宏伟等^[20]的报道一致. 但由于橄榄油会严重影响后续的酶纯化,而目前本研究只是小量实验研究,因此暂时选用 LB 培养基培养该菌. 今后扩大培养,将在培养基的优化及橄榄油的去除方面开展研究.

表 2 KM1 脂肪酶对不同底物的催化特异性

Tab. 2 The substrate speciality of KM1 lipase

底物	相对酶活/%
<i>p</i> -nitrophenyl acetate (C ₂)	24
<i>p</i> -nitrophenyl butylate (C ₄)	36.4
<i>p</i> -nitrophenyl caprate (C ₈)	100
<i>p</i> -nitrophenyl decanoate (C ₁₀)	68.4
<i>p</i> -nitrophenyl laurate (C ₁₂)	40.3
<i>p</i> -nitrophenyl myristate (C ₁₄)	28.9
<i>p</i> -nitrophenyl palmitate (C ₁₆)	19.1

表 3 有机溶剂对酶活的影响

Tab. 3 Effect of organic solvents on enzyme activity

有机溶剂	相对活力/%			
	10%	30%	50%	80%
乙腈	101.4	13.2	0	0
甲醇	144.5	106.9	62.4	16.8
乙醇	114.5	65.5	44.5	19.1
二甲基亚砜	105	96	53.3	39.8

对 KM1 所产脂肪酶的酶学性质初步研究发现,该脂肪酶在 25 °C 以下、pH 7.2 ~ 10 范围内保持良好的稳定性,其最适作用温度为 37 °C,最适作用 pH 值为 9.0. 但热稳定性差,75 °C 作用 15 min 后酶活力下降了 82%,其为一典型的低温酶. 与已报道的 *Pseudomonas fragi* IFO 3458 (PFL)^[9], *Aeromonas* sp. LPB4^[12] 菌株低温脂肪酶相似,该酶也对中长碳链 C₄ ~ C₁₂ 的酯化物具有较好的催化作用,在有机

溶剂中能保持良好的稳定性,即使在 50% 的甲醇中仍能保持 60% 以上的活性,其耐受能力较已报道的 *Aeromonas* sp. LPB4^[12] 脂肪酶稍低, KM1 脂肪酶的热稳定性与假单胞菌 *Pseudomonas* KB700A^[10] 和 BII-1^[11] 及 *Acinetobacter* Strian No. 6.^[21] 等低温细菌分泌的脂肪酶较相似,其热敏感性普遍低于中温菌来源的脂肪酶^[22].

KM1 脂肪酶具有酶反应温度低,作用 pH 值范围广 (pH 7.2 ~ 10.0) 和对中长碳链酯化物的高催化作用以及较好的有机溶剂耐受性等特点,因此该脂肪酶在洗涤添加剂、食品加工、低温转酯化反应生产生物柴油和低温环境修复等工业应用领域均具有较好的应用潜力. 有关 KM1 所产脂肪酶的分 离纯化及克隆表达方面的研究尚在进行之中,其结果以后将作进一步的报道.

参考文献:

- [1] GERDAY, AITTALEB M, BENTAHIR M, et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology [J]. *Tibtech*, 2000, 18: 103-107.
- [2] 魏云林, 林连兵, 季秀玲, 等. 低温菌穿梭质粒的构建及转化方法研究 [J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2007, 29 (5): 525-528.
- [3] GEORGES F, MICHEL T, JEAN-LOUIS A. Lipase from psychotropic antarctic bacteria [J]. *J FEMS Microbiology Letters*, 1990, 66: 239-244.
- [4] SHIMIZU S, NAKANO M. Structural characterization of triacylglycerol in several oils containing gammalinolenic acid [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67: 60-67.
- [5] CHAHINIAN H, VANOT G, IBRIK A. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of partial acylglycerol lipase [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64: 215-222.
- [6] ZHU K, JUTILA A. Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability [J]. *J Biochim Biophys Acta*, 2001, 1547: 329-338.
- [7] ROHIT S, YUSUF C, UTTAN C. B. Production, purification, characterization, and applications of lipases [J]. *Biotechnology Advances*, 2001, 19: 627-662.
- [8] 孙宏丹, 孟秀香, 贾莉, 等. 微生物脂肪酶及其相关研究进展 [J]. *大连医科大学学报*, 2001, 23 (4): 292-295.
- [9] ALQUATI C, GIOIA LD, SANTAROSSA G, et al. The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*: Heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling [J]. *FEBS*, 2002, 269: 3321-3328.
- [10] 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):4 064-4 069.
- [11] SUZUKI T, NAKAYAMA T, et al. Cloning, heterologous expression, renaturation, and characterization of a cold-adapted esterase with unique primary structure from a psychrotroph *Pseudomonas* sp strain B11-1[J]. Protein Expr Purif, 2003, 30(2):171-178.
- [12] Han-Ki Lee, Min-Jung Ahn. Purification and characterization of cold active lipase from Psychrotrophic *Aeromonas* sp. LPB 4[J]. The Journal of Microbiology, 2003, 41(1):22-27.
- [13] 李建武, 陈丽蓉, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [14] SHIRAI K, JACKSON R L. Lipoprotein lipase - catalyzed hydrolysis of *p*-Nitrophenyl butyrate[J]. Journal of Biological Chemistry, 1982, 257:1 253-1 258.
- [15] 钱存柔, 黄仪秀, 林稚兰, 等. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999.
- [16] 潘园园, 陈雯莉, 黄巧云. 一株抗重金属铜镉细菌的分离、鉴定及其 16S rDNA 的序列分析[J]. 微生物学通报, 2005, 32(3):68-72.
- [17] TOMOMI K, NORIMATSU L, NAKAYAMA H, et al. Genetic variation in 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions and the possible use of this genetic variation for molecular diagnosis of Bacteroides species[J]. Microbiology and Immunology, 2001, 45(3):191-199.
- [18] BOSSHARD P P, SANTINI Y, GRÜTER D, et al. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine lake Cadagno a reveal by 16S rDNA analysis[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2000, 31:173-182.
- [19] 布坎南 R E, 吉本斯 N E, 等. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [20] 董宏伟, 孙谧, 王跃军, 等. 海洋微生物低温碱性脂肪酶的纯化与性质研究[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(4):376-383.
- [21] WEI Yun-lin, KURIHARA T, SUZUKI T, et al. A novel esterase from a psychrotrophic bacterium, *Acinetobacter* sp Strian No. 6[J]. J Mol Catal, B Enzym, 2003, 23:357-365.
- [22] ERICK A, SNELLMAN, ELISE R, et al. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp RAG-1[J]. Eur J Biochem, 2002, 269:5 771-5 779.

Isolation and identification of a cold-adapted lipase producing bacterium, study on fermentation conditions and lipase properties

CHEN Gui-yuan¹, JI Xiu-ling², LIN Lian-bing², WEI Yun-lin²

(1. Biochemistry and Moleculebiology Department of Basic Medicine College, Dali University, Dali 671000, China;

2. Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

Abstract: Fourteen bacterial strains with potential lipase activity were collected from a refrigerators of a meat factory in Kunming, Yunnan Province, China. The strain showing the highest lipase activity was selected for lipase assay and named KM1. Based on morphological characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis, KM1 were identified as *Yersinia enterocolitica* KM1. It showed that the optimal fermentation condition were 13 °C, pH 7.2, 54 h, and the lipase activity was increased from 1.8 U/mL to 3.1 U/mL. The enzyme was stable at 25 °C, pH 7.2-10, and the optimal temperature and pH of the enzyme were 37 °C and 9.0, respectively. The enzyme showed good thermal lability, only 18% of the original activity was remained by incubation at 75 °C for 15 min. The substrate specificities of the lipases toward various *p*-nitrophenyl were examined. The higher hydrolytic activity was obtained with C₄-C₁₂ *p*-nitrophenyl esters, with the highest activity toward *p*-nitrophenyl caprylate (C₈). The lipase exhibited good tolerance to low concentration of organic solvents (acetonitrile, methanol, ethanol and DM-SO), it could keep nearly 60% activity even at 50% methanol.

Key words: cold-adapted microorganism; cold-adapted lipase; identification; fermentation; lipase-properties