

天山冻土产低温脂肪酶菌株的筛选及其多样性分析

徐宇丽¹, 王大伟², 史学伟¹, 郑晓吉¹, 周红¹, 刘娅¹, 倪永清^{1*}

石河子大学,¹ 食品学院, ² 动物科技学院, 石河子 832000

摘要:【目的】通过天山冻土细菌的分离和产低温脂肪酶菌株的筛选,了解天山冻土微生物的物种多样性和产脂肪酶菌株的系统发育多样性,为高效低温脂肪酶生物技术奠定基础。【方法】采用稀浓度的 R2A、TSB 平板涂布分离天山冻土中可培养细菌,通过选择性培养基筛选产低温脂肪酶的菌株。采用细菌常规生理生化实验、最适生长温度、耐盐性、产酶性能对分离菌株的生理学进行研究,通过 16S rRNA 基因序列分析确定产脂肪酶菌种的系统进化地位,通过 BOX-PCR 指纹技术对 16S rRNA 基因高度同源性的菌株进一步区分。【结果】分离筛选到 78 株可培养低温菌,选择培养基显示有 17 株可产低温脂肪酶,其中 8 株在两种选择培养基中均可产脂肪酶和酯酶。17 株产酶菌分别隶属于 5 个系统发育类群、6 个属,其中假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 占大多数 (58.9%)。【结论】天山冻土中产低温脂肪酶的细菌具有较丰富的系统发育多样性,依据生长温度,均属于耐冷菌。

关键词: 天山冻土, 低温脂肪酶, 16S rDNA, 多样性

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 02-0233-08

脂肪酶是甘油酯水解酶,能将甘油三酯催化水解为游离脂肪酸和甘油并且能进行催化酯化作用、交换酯化作用、酸解、醇解、氨解从而提高甘油三酯的水解活性^[1]。脂肪酶已被广泛应用于食品、石油化工、洗涤剂行业^[2-4]、日用化学品合成、生物制药、造纸、废物处理^[5-6]等行业,是重要的工业用酶,其温度稳定性被认为是工业应用上的最重要因素。由于低温脂肪酶较低的最适温度以及低温下的高活性而被应用于手性分子的有机催化合成,近来备受关注。与已开发的中高温脂肪酶相比,低温脂肪酶经过温和的热处理即可活力丧失,甚至可使产低温脂肪酶菌株选择性失活,可以大大缩短处理过程的时

间并省却昂贵的加热冷却系统^[7-9],其较低的活化能和反应最适温度^[10-11],也可以节约能源、保护环境。因此低温脂肪酶在某些领域中有着中高温脂肪酶所不可比拟的优越性,已成为酶学研究的热点之一。

嗜冷或者耐冷微生物是低温脂肪酶的目前最主要的潜在来源。研究发现,不同特殊环境分离得到的低温微生物,其所产脂肪酶的热稳定性、最适 pH 等特性上有很大不同,目前国内外关于低温脂肪酶产生菌的报道多来自极地^[12-13]和深海海泥中^[14]。本研究根据新疆的气候特点与独特环境,从天山冻土中筛选产低温脂肪酶的菌株,以期系统发掘低温微生物资

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40961002/D010104); 中国博士后科学基金特别资助项目 (201003339); 面上项目 (20090450848); 教育部科学技术研究重点项目 (210250); 石河子大学高层次人才计划项目 (RCZX200820); 石河子大学研究生创新基金项目 (YJXC2010-Y14)

* 通信作者。Tel: +86-993-2058756; Fax: +86-993-2058093; E-mail: niyqlzu@sina.com

作者简介: 徐宇丽 (1985-), 女, 福建南平人, 硕士研究生, 主要从事食品微生物方向研究。E-mail: xyli19851231@126.com

收稿日期: 2010-10-09; **修回日期:** 2010-11-22

源,解决低温酶来源的问题。天山冻土属于我国高海拔高山常年冻土类型,在这种冻土环境中微生物产生了一系列适应低温、寡营养、强辐射、冻融等极端因子的分子机制。本文研究了天山冻土中低温脂肪酶产生菌株的筛选、纯化及其系统发育多样性,为后续研究开发高效低温脂肪酶奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:用于 PCR 扩增的全套试剂及扩增引物均购自 TaKaRa 公司。相关生理生化试验所用试剂均购自于天津市巴斯夫化学试剂厂。高速冷冻离心机为 Eppendorf 公司 5810R 型;PCR 仪为 Techne 公司 TC-512;凝胶成像系统为 BioRad 公司 Gel DOC XR;水平电泳仪为美国 BioRad 公司 PowerPac Universal。

1.1.2 培养基:①分离培养基:1/4 × R2A、1/10 × TSB(Typtone soya broth)培养基,加入琼脂到 1.5%;②液体富集培养基:1/4 × TSB;③选择培养基:Tween-80 选择培养基^[15]、橄榄油选择培养基^[10];④斜面保存培养基:1/4 浓度 TSB 培养基、1.5% 琼脂。以上培养基 pH 值均 7.2,121℃ 灭菌 20 min。

1.2 样品采集

冻土样品于 2009 年 5 月 17 日采自天山一号冰川西支的冰川尾部,海拔 3833 m(43°07.125N,86°48.707E)。沿 3.3 m 深的冻土剖面每隔 20 cm 取样,然后将冻土样品迅速装入已灭菌的保鲜盒内,置于车载冰箱中保存。运回实验室后,在超净工作台上削去表层可能受到污染的样品,于 -20℃ 保存备用。用标准 pH 计测定土壤浸出液 pH 值。以上所有过程均在无菌条件下完成。

1.3 菌株的分离与纯化

采用稀释平板涂布法对土壤样品进行分离,10℃ 培养 7 d。转接划线培养 3 次后,根据菌落颜色、大小、形态等表型差异进行初步分离筛选并纯化,所得纯培养物转接 TSB 斜面培养基 4℃ 保藏备用。

1.4 产低温脂肪酶菌株筛选

经液体培养基增菌后,选择适宜的稀释菌液分别划线于 Tween-80 琼脂平板和橄榄油油脂平板上,以菌落直径与反应圈直径之比作为初筛依据,选取比值较大的菌株于斜面培养基 4℃ 保存。

1.5 产酶菌株生长特性

菌株最适生长温度测定^[16]:将产酶菌株的液体培养液按 0.5 mL 的接入量接入装有 5 mL 液体富集培养基的试管中,分别置于 4℃、10℃、18℃、24℃、30℃、37℃ 6 个温度下培养,培养 24 h 后 420 nm 测 OD 值。

菌株的耐盐性测定:在液体培养基中分别加入 0.4%、6%、8%、12%、16% 浓度的氯化钠溶液,适温下培养一周后,420 nm 测 OD 值。

1.6 产酶菌株生理生化鉴定

按照东秀珠、蔡妙英描述的方法进行^[17]。

1.7 16S rRNA 基因 PCR 扩增和系统进化分析

参照文献^[18]方法提取单菌落 DNA,应用细菌 16S rRNA 基因通用引物(正向引物 27f:5'-GAGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3',反向引物 1492r:5'-CTACGGCTACCTTGT AC GA-3')进行 PCR 扩增^[19]。PCR 产物用 EZ-10 column PCR Product Purification kit (BIO BASIC INC, Canada) 纯化后,由上海生工生物科技有限公司采用 ABI377DNA 自动测序仪上直接测序。将测序结果提交到 GenBank 数据库中,用 BLAST 进行相关序列的搜索,与 GenBank 数据库中现有的近缘菌株的序列比较,并从数据库获得相关属、相关种的 16S rDNA 序列,建立系统发育树。序列用 CLUSTAL X 1.81 软件对齐序列^[20],进化距离的计算采用邻接法 neighbor-joining method^[21],依据 p-distances 法和 Kimura-2parameter 双参数法进行,进化树分支模式的稳定性用 MEGA v. 4.0^[22] 软件分析,采用 bootstrap 法,重复次数为 1000,构建进化树。

1.8 产酶菌株 rep-PCR 指纹图谱分析

采用单引物 BOXAIR(5'-CTACGGCAAGGCGAC GCTGACG-3')进行 PCR 扩增^[23],取 10 μL 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶、0.5 × TBE 电泳缓冲液、4 V/cm 条件下电泳检测 2 h。根据 PCR 扩增产物指纹带谱的有无,再统计分析将条带转化为只含有 1 和 0 两值变量的矩阵,使用 NTSYS-pc 2.01 (Applied Biostatistics, Inc) 软件采用非加权算术平均连锁法 (UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic mean) 进行聚类分析。

2 结果

2.1 产酶菌株的筛选

纯化后的菌株依据菌落形态、颜色、细胞形态、革兰氏染色与液体培养特征观察初步从冻土样品中共分离得到 78 株可培养物。选择培养基筛选结果表明:78 株菌株中 17 株菌株能在以 Tween-80 为底物培养基中产生脂肪酶生成脂肪酸钙盐沉淀,进一步用罗丹明橄榄油琼脂平板检测,其中 8 株(A27、R2、D9-1、M12-2、Y14、a13、M16-2、L100、)能产脂肪酶并在紫外光下出现明显的荧光圈(表 1)。图 1-A、B 为分离物 D9-1 在两种产酶培养基上的菌落形态。17 株菌大部分菌落为淡黄色和乳白色,仅 Y14 为红色菌落,菌落和细胞形态见表 1。

2.2 产酶菌株最适生长温度与耐盐性

实验结果表明,17 株产酶菌株大多数最适生长温度为 24℃ 左右,生长温度范围在 4℃ - 37℃,属耐冷菌范畴(表 1)。其中菌株 a13 与 Y10-2 的最适生长温度相对较低为 18℃,且温度到达 30℃ 时菌株停止生长,很可能属于专性嗜冷菌。Y16、A30、L100 在 37℃ 条件下完全停止生长。耐盐性实验表明,产酶菌株最适生长 NaCl 浓度在 6% 左右,大多数属微好盐细菌,其中 A27、a13、Y10-2 耐盐性较差,盐浓度高于 6% 条件下即停止生长;菌株 a4、D9-1、Y14、Y10-1 耐盐性较高,在 8% 盐浓度下仍可生长,但在高于 12% 条件下生长缓慢,甚至停止生长(表 1)。

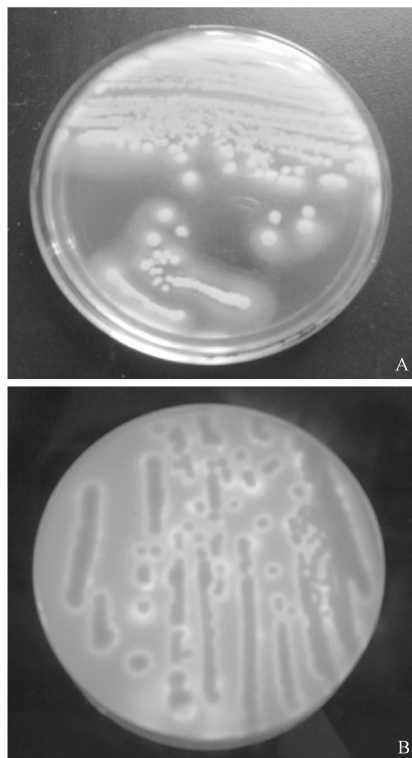


图 1 菌株 D9-1 在 Tween-80 琼脂平板的沉淀圈及橄榄油油脂平板的荧光圈

Fig. 1 Colony characteristic of strain D9-1 growing on medium Tween-80 plate (A) and medium olive oil plate (B).

2.3 基于 16S rRNA 基因序列的产酶菌株系统发育分析

将 17 株产酶菌株所获得的 16S rDNA 序列提交

表 1 天山一号冰川尾部冰下冻土产低温脂肪酶菌株的特征

Table 1 Enzymatic activities and characteristics of lipase-producing strains isolated from Tianshan mountains permafrost

No.	Selective isolation		Growth characteristics		Phylogenetic affiliations		Morphological properties		
	Tween-80	Olive oil	Range temp /°C	Range NaCl/%	Nearest relative	Similarity /%	Cell shape	Gram staining	Colony description
D8-1	++	-	4-24 ^a -37	0-6	Chryseobacterium sp. TM3_8	98	Rod	G ⁻	Orange, small
Y10-2	++	-	4-18-30	0-4	Rhodococcus fascians	99	Short rod	G ⁺	Orange, medium
A27	++	+++	4-24-37	0-4	Pseudomonas reactans	99	coccoid	G ⁺	White, small
R2	+	+	4-24-37	0-6	Pseudomonas reactans NO8	99	Rod	G ⁻	White, medium
Y16	+	-	10-30-37	0-6	Pseudomonas japonica	96	coccoid	G ⁺	White, small
a4	+	-	10-30-37	0-8	Pseudomonas sp. KAR75	100	Rod	G ⁻	White, small
D9-1	++	+	4-24-37	0-8	Pseudomonas brenneri F9	99	Rod	G ⁻	Yellow, small
M12-2	+++	+++	10-30-37	0-6	Pseudomonas sp. BCw159	98	coccoid	G ⁻	Yellow, small
a13	+	+++	4-18-30	0-4	Pseudomonas reactans	98	coccoid	G ⁺	Yellow, medium
Y14	+	+++	4-24-37	0-8	Uncultured Brevundimonas	98	Rod	G ⁻	Red, small
A16	++	-	4-24-37	0-6	Arthrobacter humicola	99	coccoid	G ⁺	White, small
T8	++	-	10-24-37	0-6	Chryseobacterium sp. TM3_8	98	coccoid	G ⁻	Yellow, small
Y10-1	+	-	10-30-37	0-8	Rhodococcus sp. D2	97	Short rod	G ⁺	Yellow, small
Y5	+++	-	10-24-37	0-6	Duganella zooglooides	99	Rod	G ⁺	Yellow, medium
A30	++	-	4-24-37	0-6	Pseudomonas reactans NO8	99	Rod	G ⁻	White, small
M16-2	+	+	10-24-37	0-6	Brevundimonas bullata zf-69-197	99	Rod	G ⁻	White, small
L100	++	+++	4-24-37	0-6	Pseudomonas sp. BCw159	98	Short rod	G ⁻	Yellow, small

Note: +++: diameter ratio ≥ 3 , ++: diameter ratio ≥ 2 , +: diameter ratio ≥ 1 , -: negative. ^a: The optimal growth temperature.

NCBI,通过 Blast 工具在 GenBank 数据库中与已发表的 16S rDNA 序列进行同源性比较,选取同源性在 98% 以上的序列构建系统发育树(图 2),由系统发育树可知 17 株产酶菌株分属于 α 变形细菌亚纲 (*Alphaproteobacteria*)、 β 变形细菌亚纲 (*Betaproteobacteria*)、 γ 变形细菌亚纲 (*Gammaproteobacteria*)、高 G + C 革兰氏阳性菌 (*Actinobacteria*)、CFB (Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides) 5 个系统发育类群(表 1)。菌株 A27、R2、A30、Y16、a4、a13 隶属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*),与已知种 *Pseudomonas reactans* 和 *Pseudomonas japonica* 系统发育关系最接近,序列同源性均达到 98% 以上;菌株 M12-2、D9-1、L100 在系统发育上与 *Pseudomonas brenneri* 关系最近;菌株 Y5 与 *Duganella zoogloeoides* 的 16rDNA 序列相似性达到 100%,可确定隶属于该种;菌

株 Y14 与 M16-2 归于 *Brevundimonas* 属,其中 Y14 与已知菌株 *Brevundimonas vesicularis* EQH12 相似性为 99%,M16-2 与菌株 *Brevundimonas bullata* zf-69-1 基因序列相似性达到 99%;菌株 T8、D8-1 属于 CFB 的 *Chryseobacterium* 属;菌株 A16 与 Y10-1、Y10-2 都属于高 G + C 革兰氏阳性菌,其中 A16 隶属于 *Arthrobacter* 属,而 Y10-1、Y10-2 同属于 *Rhodococcus* 属。

2.4 产酶菌株 rep-PCR 指纹聚类分析

17 株产酶菌株共出现 28 种不同条带(图 3-A 为产酶菌株 BOX-PCR 指纹图谱),聚类分析显示(图 3-B),在 70% 的相似性水平上,17 个菌株可以划分为 7 个亚群,其中具有极高 16S rDNA 序列同源性(98% 以上)的假单胞菌菌株表现出极高的遗传差异,分属于 4 个亚群,其中 M16-2 与 Y14 的特征条带较相近,而菌株 a13、A27、A30 条带完全相同,

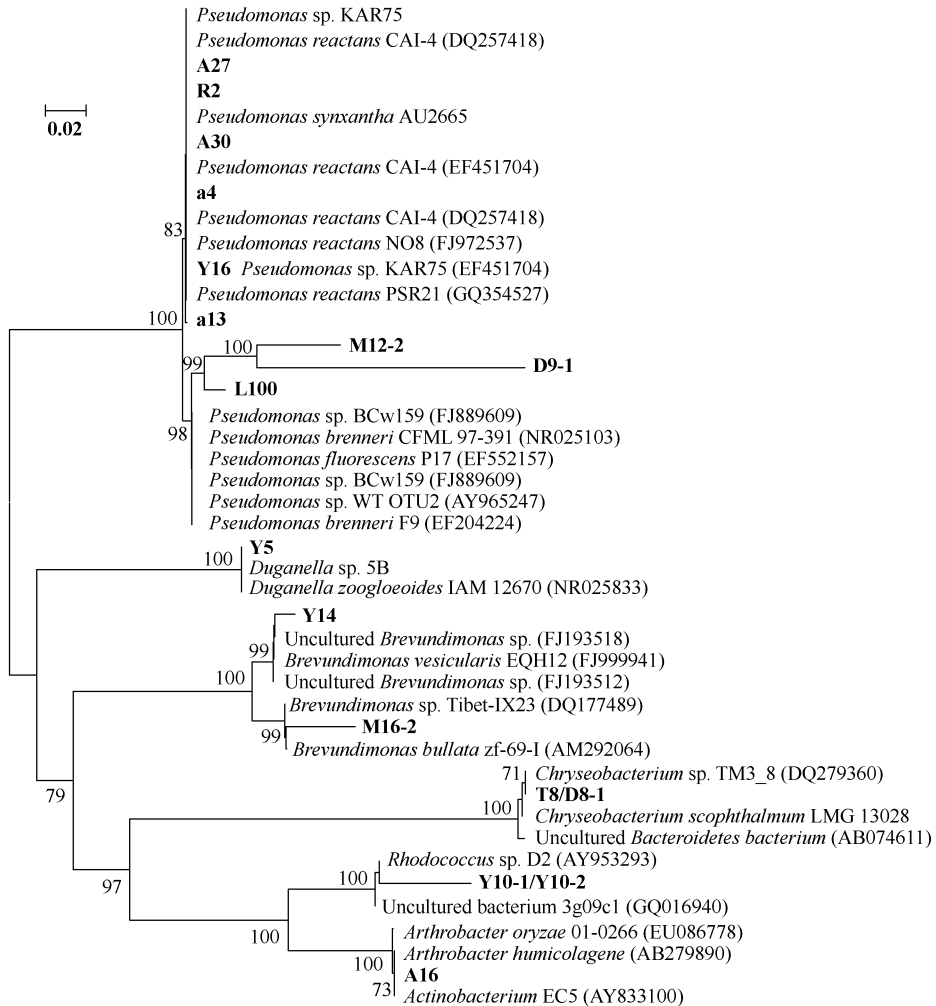


图 2 基于 16S rDNA 序列的 17 株产脂肪酶菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the 17 lipase-producing strains based on partial 16S rDNA sequences.

菌株 D9-1、a4、L100、M12-2 带谱完全相同,菌株 Y16 差异最大,独立于其它假单胞菌株独处于一个亚群。相反,其它同属于一个属的菌株表现出较高的相似性,隶属于同一亚群,如 T8 与 D8-1, Y10-1 与 Y10-2 相似性均较高。唯一例外的是属于 β 变形细菌亚纲的 Y5 与高 G + C 革兰氏阳性菌的 A16 具有较高的相似性。

2.5 产酶菌株典型生理生化特征

根据《常见细菌系统鉴定手册》进行相应的生理生化试验(表 2),结果表明假单胞菌属(*Pseudomonas*)的产酶菌株触媒阳性,大部分明胶水解呈阴性,多数 V-P 实验阳性; Y10-1、Y10-2 同属于 *Rhodococcus*,明胶水解阳性, M. R.、V-P、触媒阴性; T8、D8-1 生理生化特征基本一致,明胶水解、硝酸盐还原阳性, V-P、触媒实验阴性。

3 讨论

低温脂肪酶主要由生存在低温冷冻环境中的微生物产生,目前大多数产酶菌株是从南、北极和常年恒定在低温($0 \pm 2^\circ\text{C}$)的极端环境中分离而得,但只有少部分的细菌和酵母菌菌株被用于研究开发生产低温脂肪酶^[24]。本实验冻土采集地为乌鲁木齐河源天山一号冰川尾部冰下常年冷冻的含冰土壤,海拔 3833 m,年平均气温为 -4.95°C ,夏季融水季节温度 $-0.5^\circ\text{C} - 0^\circ\text{C}$ 并且随着海拔的升高,地温降低,冻土厚度增加。在这样低温、强辐射、冻融极端条件下分离的冻土微生物属于寡营养微生物,在普通培养基的富营养状态下难以培养,本实验采用分离培养基初始浓度为 $1/10 \times \text{TSB}$ 或 $1/4 \times \text{R2A}$,分离效果良好^[25]。

本文选用 Tween-80 选择培养基与橄榄油选择

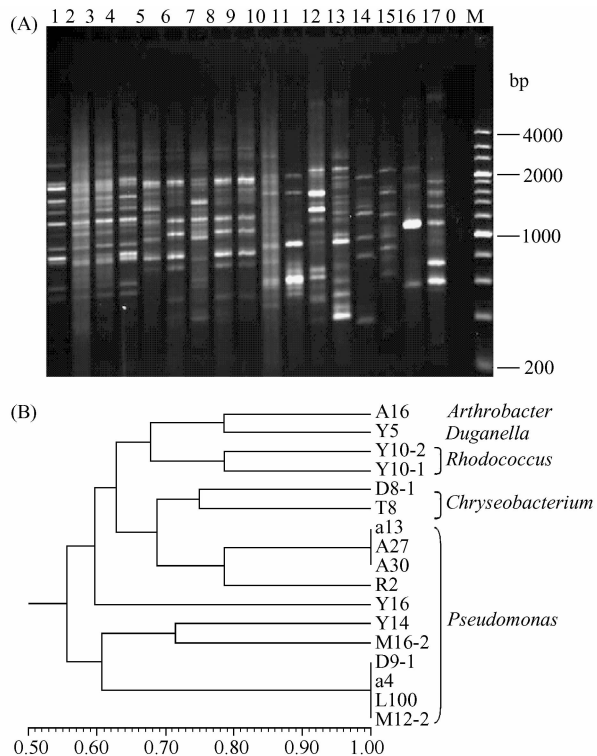


图 3 产脂肪酶菌株的 BOX-PCR 指纹图谱 (A) 及聚类分析树状图 (B)

Fig. 3 BOX-PCR fingerprint patterns of isolates in 1% agarose (A). Lanes: 1, M12-2; 2, L100; 3, a14; 4, D9-1; 5, R2; 6, A30; 7, Y16; 8, A27; 9, a13; 10, Y10-1; 11, Y10-2; 12, M16-2; 13, Y14; 14, T8; 15, D8-1; 16, Y5; 17, A16; 0, blank; M, mark 4000bp ladder. Dendrogram obtained by UPGMA cluster analysis of the BOX-PCR data sets (B).

培养基分别筛选,以确定不同菌株所产脂肪酶的底物特异性。从大量低温菌中筛选出 17 株产低温脂肪酶菌株,其中 9 株在橄榄油油脂平板上不产脂肪酶。Tween-80 平板用于筛选作用于较短碳链底物的脂肪酶和酯酶,而橄榄油主要含 16 个碳的长碳链酯类,因此可以筛选作用于较长碳链底物的脂肪

表 2 产脂肪酶菌株常见生理生化特征

Table 2 Physiological characteristics of bacteria strains isolated from Tianshan mountains permafrost

Physiological characteristics	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Gelatinliquefaction	+	+	-	-	-	-	-	-	+	nd	-	+	+	+	-	-	-
M. R.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
V-P	-	-	-	+	-	+	+	+	+	nd	-	-	-	+	nd	+	+
Citrate test	-	nd	-	+	-	+	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
hydrogen sulphide test	-	nd	-	+	+	nd	+	+	+	-	nd	+	+	+	+	-	+
Nitrate reduction	+	-	+	nd	+	+	+	+	+	-	-	+	-	nd	nd	-	+

1-17: D8-1、Y10-2、A27、R2、Y16、a4、D9-1、M12-2、a13、Y14、A16、T8、Y10-1、Y5、A30、M16-2、L100; nd: not determined.

酶。实验结果显示,产作用于短碳链的脂肪酶的菌株较多,生物多样性也较丰富,相反只有部分假单胞菌能产生作用于长碳链的脂肪酶。温度决定着生物的生化反应过程,较低的温度是微生物细胞最有利的保存条件。长期稳定的低温冻土环境不仅限制了微生物生长、代谢,还是其生化性状得以长期保存下来的重要的因素。本实验中所筛得 17 株产酶菌株最适生长温度大多属于耐冷菌范畴,很可能是喜温微生物在低温冷冻环境下长期进化的结果。此外,不同耐冷菌的耐盐性差别明显,这可能预示着冻土盐分是冻土微生物种群和数量的决定因素之一,而且微生物的抗冻性与其耐盐性也有密切关系^[26]。

从天山冻土可培养微生物中筛选出的 17 株产低温脂肪酶菌株,分布于五个系统发育类群、六个属,其中假单胞菌属 (*Pseudomonas* spp.) 占 58.9%,对冻土中产低温脂肪酶细菌多样性贡献最大,其次是红球菌 (*Rhodococcus*) 和短波单胞菌 (*Brevundimonas*) 分别占 11.7%。虽然同一系统发育类群的菌株其 16S rDNA 序列相似性很高,但其形态特征、生理生化特征有明显差异,因此同一种属的产酶菌株不能仅仅依据 16S rDNA 序列同源性来区分^[27],应该结合表型特征以及更精确的分子指纹技术来区分和筛选高效产酶菌株。如菌株 M12-2 与 D9-1 同属于假单胞菌属、Y10-1 与 Y10-2 同属于红球菌属,虽然其 16S rDNA 基因序列相似性极高,但其表型特征不同,M12-2 相对于 D9-1 来说,M. R. 与硫化氢实验阳性(表 2); Y10-1 与 Y10-2 的区别在于 Y10-1 柠檬酸盐利用实验阴性、硫化氢实验阳性,而 Y10-2 此两实验现象不明显。尤其是 16S rDNA 序列同源性很高的假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.), 依据 BOX 指纹技术明显可区分为 4 个亚群,基本与其生理生化特征差异相一致,因此四个亚群很可能代表四个种。这可能与不同菌株在冻土中的不同生存环境有关,土壤温度、盐分与土层厚度的隔离等因素改变了菌株的生理生化和表型特征,但并没有改变保守的、非蛋白质编码基因 16S rRNA 基因^[28]。因此,仅仅依据免培养的 16S rRNA 基因测

序技术并不能反应产酶微生物的多样性。只有通过产酶微生物功能酶基因分析,才能真正了解产酶菌株的生物多样性,筛选到优质的产酶微生物和基因资源,为高活性产低温脂肪酶生物技术的应用奠定理论基础。

参考文献

- [1] Carriere F, Thirstrup K, Hjorth S and Boel E. Cloning of the classical guinea pig pancreatic lipase and comparison with the lipase related protein. *FEBS Letters*, 1994, 338: 63-68.
- [2] Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalyst: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews Microbiology*, 1999, 53: 315-351.
- [3] Alquati C, Gioia LD, Santarossa G, Alberghina L, Fantucci P, Lotti M. The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi* Heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269: 3321-3328.
- [4] Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, *Bioresource Technology*, 2003, 89: 17-34.
- [5] Harwood J. The versatility of lipases for industrial uses. *Trends in Biochemical Sciences*, 1989, 14: 125-126.
- [6] Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1999, 29: 119-131.
- [7] Margesin R, Schinner F. *Biotechnological Applications of Cold-Adapted Organisms*. Springer, Heidelberg, 1999.
- [8] Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold-adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, 2003, 13: 200-208.
- [9] Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa J, Claverie P, Collins T, D' Amico S, Dumont J, Garsoux G, Georgette D, Hoyoux A, Lonhienne T, Meuwis MA and Feller G. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18: 103-107.
- [10] Mayordomo I, Randez-Gil F, Prieto JA. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48: 105-109.

- [11] Zhang Shu-Zheng. Enzyme Preparation Industry. Beijing: Science Press, 1984:655-669.
- [12] Morita R Y. Psychrophilic bacteria. *Bacteriology Reviews*, 1975,39: 144 -167.
- [13] Kirk O, Christensen MW. Lipases from *Candida antarctica*: unique biocatalysts from a unique origin. *Organic Process Research & Development*, 2002, 6: 446-451.
- [14] Bowman JP, Mccammon SA, Brown MV, Nichols DS and McMeekin TA. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 3068-3078.
- [15] Chen-You li, Chu-Yuan cheng, Teh-liang chen. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using tween 80 as the carbon source. *Biochemical engineering journal*, 2004, 19: 25-31.
- [16] Rashid N, Yuji S, Satoshi E, Haruyuki A, and Tadayuki I. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 4064-4069.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英.《常见细菌系统鉴定手册》.北京:科学出版社, 2001:364-398.
- [18] Ausubel FM, Kingston RE, Sadman J G. Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1995, 39-40.
- [19] Fischer M, Pleiss J. The Lipase engineering database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 319-321.
- [20] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- [21] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4:406-425.
- [22] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [23] Versalovic J, Schneider M, DeBruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 1994, 5: 25-40.
- [24] Adrienne LH. Biotechnological Aspects of Cold-Adapted Enzymes// Margesin R, Schinner F, Marx J-C, Gerda C y. Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology. Berlin Heidelberg: Springer, 2008:347-364.
- [25] Vishnivetskaya T, Kathariou S, McGrath J, Gilichinsky D, Tiedje JM. Low-temperature recovery strategies for the isolation of bacteria from ancient permafrost sediments. *Extremophiles*, 2000, 4: 165-173.
- [26] Rodrigues DF and Tiedje JM. Coping with Our Cold Planet. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74: 1677-1686.
- [27] Rossello-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, 25: 39-67.
- [28] Margesin R. Permafrost Soils. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.

Selective isolation and diversity of cold-adapted lipase-producing strains from permafrost soil at the terminus of a glacier in the Tianshan Mountains

Yuli Xu¹, Dawei Wang², Xuewei Shi¹, Xiaoji Zheng¹, Hong Zhou¹, Ya Liu¹,
Yongqing Ni^{1*}

¹School of Food Science, ²School of Animal Science and technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China

Abstract: [**Objective**] The diversity of culturable lipase-producing bacterial strains from permafrost soils at the terminus of a glacier in the Tianshan Mountains was investigated. Isolation and molecular phylogenetic analysis were performed to expand our knowledge on diversity of psychrotrophic and psychrophilic bacteria. In addition, efforts were made focusing on screening for cold active lipases. [**Methods**] Lipase-producing bacterial strains were detected on tween 80 and olive oil plates, respectively. Identity and genetic diversity of strains isolated were determined by spatial 16S rRNA gene sequences and rep-PCR fingerprint. The physiological tests were carried out to determine the phenotypic differences between strains showing high similarity of 16S rRNA gene sequences. [**Results**] Of the total 17 bacterial strains exhibiting cold-adapted lipase activity, we found that only 8 strains were able to hydrolyze olive oil. Based on 16S rRNA gene sequences, the lipase-producing bacterial isolates fell in five phylogenetic groups: subclasses (, (and (of *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and the Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB) phylum. Nearly 59% of the isolates were affiliated with the genus *Pseudomonas*. [**Conclusion**] The results enrich our knowledge on the psychrotrophic bacterial diversity and biogeographic distribution of cold active lipases-producing bacteria in cold environments.

Keywords: alpine permafrost, Tianshan Mountains cold active lipase, 16S rDNA, diversity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40961002/D010104), by the General and Special Program of the Postdoctoral Science Foundation of China (20090450848, 201003339), by the Key Project of Science and Technique Foundation of Ministry of Education of China (210250) and by the Program for the High-level Talents in Shihezi University (RCZX200820)

* Corresponding author. Tel: +86-993-2058576; Fax: +86-993-2058093; E-mail: niyqlzu@sina.com

Received: 9 October 2010 / Revised: 22 November 2010