

DOI:CNKI:61-1390/S.20120223.1728.036

网络出版时间:2012-02-23 17:28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120223.1728.036.html>

脂肪酶和酯酶指纹分析在嗜酸耐热菌快速鉴定中的应用

蔡 瑞,岳田利,袁亚宏,王周利,王 军

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】采用反相高效液相色谱建立嗜酸耐热菌的脂肪酶和酯酶指纹图谱,为建立基于脂肪酶和酯酶指纹分析的嗜酸耐热菌快速鉴定方法提供参考。**【方法】**将 5 个脂肪酶和酯酶底物直接与嗜酸耐热菌反应,通过反相高效液相色谱检测得到了 9 株嗜酸耐热菌的脂肪酶和酯酶指纹色谱图,并对色谱数据进行系统聚类分析。**【结果】**所得脂肪酶和酯酶指纹图谱能将脂环酸芽孢杆菌和芽孢杆菌明显分为 2 个类群,且同一属的 2 个不同种的细菌也能得到正确归类。**【结论】**脂肪酶和酯酶指纹分析能够用于嗜酸耐热菌的快速鉴别,且简便快速、重现性好、经济成本低,具有广阔的应用前景。

【关键词】 嗜酸耐热菌;脂肪酶和酯酶;酶指纹分析;快速鉴定;聚类分析

【中图分类号】 Q814.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)03-0163-06

Application of lipase and esterase fingerprinting in the rapid identification of thermo-acidophilic bacteria

CAI Rui, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong, WANG Zhou-li, WANG Jun

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The research focused on the collection of lipase and esterase fingerprinting of thermo-acidophilic bacteria strains in order to establish a rapid method to identify them based on the activity fingerprinting. **【Method】** Fingerprinting of nine thermo-acidophilic strains were collected using a five-substrate array including four C₈-ester and one C₄-diester. The reaction products were separated and quantified by analytical RP-HPLC and the chromatographic data were analyzed by hierarchical clustering. **【Result】** The results showed that lipase and esterase fingerprinting could represent the specificity of the tested strains. The strains were identified not only strains in different genus, but also different species. **【Conclusion】** The research demonstrated the high potential of lipase and esterase fingerprinting established by HPLC as a tool for rapid microbial identification and classification. The method is simple, rapid, inexpensive and reproducible and has great prospect in industry.

Key words: thermo-acidophilic bacteria; lipase and esterase; enzyme fingerprinting; rapid identification; hierarchical cluster analysis

我国现已成为世界第一大苹果浓缩汁生产国和 出口国^[1],但我国浓缩苹果汁产品的质量还有待提

* [收稿日期] 2011-08-31

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31071550);农业部“948”项目(2011-G8-3)

[作者简介] 蔡 瑞(1987—),女,河南商丘人,在读硕士,主要从事食品安全控制技术研究。E-mail:cairui@nwsuaf.edu.cn

[通信作者] 岳田利(1965—),男,陕西宝鸡人,教授,博士生导师,主要从事食品生物技术及食品安全控制研究。

E-mail:yuetl@nwsuaf.edu.cn

高,尤其是包括嗜酸耐热菌污染在内的四大难题长期困扰着苹果浓缩汁生产厂家。脂环酸芽孢杆菌是嗜酸耐热菌中的典型和主要菌株,其万亿分之一浓度就会引起巴氏杀菌苹果汁的腐败,如产生不愉快的风味,使浊度升高,甚至形成白色沉淀,从而导致产品品质下降^[2-3]。国际贸易中严格要求每 10 mL 浓缩果汁中嗜酸耐热菌的含量不大于 1 个^[4]。由于嗜酸耐热菌的耐热耐酸性,在浓缩苹果汁的加工过程中极难控制和除去,已成为各果汁生产厂家最棘手的问题之一,故越来越受到关注^[5-6]。传统微生物鉴定方法及以 PCR 技术为基础的基因序列分析方法,操作复杂,分析结果往往滞后于生产的需要,很难满足产品安全控制的实时快速的现实需要^[7]。基于以上原因,亟待寻找一种简便快速、准确可靠的嗜酸耐热菌鉴定方法,对苹果及苹果汁生产中的嗜酸耐热菌进行快速鉴定,为在线检测和监控嗜酸耐热菌奠定理论基础,进而提高和保证苹果汁产品的质量和安全。

酶指纹分析(Enzyme fingerprinting)是在 API-ZYM 系统^[8]基础上,由 Reymond^[9]提出的一项新技术,是 APIZYM 系统的扩展。其是指在一系列不同底物下测定单个酶的活性,所得底物图谱能够传达酶的特异性反应信息,从而可以通过这种活性图谱进行酶的识别,将其与其他酶区分开来^[10-11]。由于分离技术的迅速发展,可以用高效液相色谱、液质联用等来分离检测底物混合物或其产物,这样在一次反应中就可以获得酶的指纹图谱^[12-14]。由于酶指纹分析方法快速简便、重现性好,其在医疗诊断和质量控制领域具有广阔的应用前景,但基于酶指纹分析的微生物快速鉴定研究尚未见报道。

为此,本研究以微生物代谢中普遍存在的脂肪酶和酯酶为切入点,将 5 种不同的脂肪酶和酯酶底物直接作用于嗜酸耐热菌菌体,记录分析其反应图谱,将脂肪酶和酯酶的活性指纹作为嗜酸耐热菌的一个分类鉴定工具,以期实现基于脂肪酶和酯酶指纹分析的嗜酸耐热菌快速鉴定,为苹果汁生产中的质量控制提供一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 试验材料 脂环酸芽孢杆菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922^T,购于德国微生物菌种保藏中心;4 株脂环酸芽孢杆菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* 分离菌株,编号为 AAT11、AAT12、

AAT13 和 AAT14,由日本三井公司食品研究实验室赠送;脂环酸芽孢杆菌 *Alicyclobacillus contaminans* YL-5、芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* YL-3、芽孢杆菌 *Bacillus ginsengihumi* LC-8 和 BS-2,均为西北农林科技大学食品科学与工程学院发酵动力学实验室保存菌株,分离于陕西某地果园中。

1.1.2 培养基 AAM 培养基含酵母膏 2 g/L,葡萄糖 2 g/L,(NH₄)₂SO₄ 0.4 g/L,MgSO₄·7H₂O 1 g/L,CaCl₂·2H₂O 0.5 g/L,KH₂PO₄ 1.2 g/L,MnSO₄·H₂O 0.5 g/L。

1.1.3 脂肪酶和酯酶底物及对应产物 所用底物为:S1,7-(2,3-二丁酰氧)丙氧基香豆素;S2,2-羟基-3-(4-香豆素氧基)辛酸丙酯;S3,2-羟基-2-甲基-3-(7-香豆素氧基)辛酸丙酯;S4,7-(2-辛酰氧-3-羟基-3-甲基)丁氧基香豆素;S5,2-羟基-2-甲基-4-(4-甲基-7-香豆素氧基)辛酸丁酯。对应产物为:P1,7-(2,3-二羟基)丙氧基香豆素;P2,4-(2,3-二羟基)丙氧基香豆素;P3,7-(2-甲基-2,3-二羟基)丙氧基香豆素;P4,7-(2,3-二羟基-3-甲基)丁氧基香豆素;P5,3-甲基-7-(3,4-二羟基-3-甲基)丁氧基香豆素。底物和产物均由瑞士伯尔尼大学提供,其结构如表 1 所示。

1.1.4 仪器 岛津 LC-20A 高效液相色谱仪,包括 LC-20AD 高压泵、SPD-M20A 二极管阵列检测器、CBM-20A 系统控制器、CTO-10AS 柱温箱、LC solution 工作站。

1.2 样品制备

1.2.1 底物混合物的配制 用二甲基亚砷分别溶解底物 S1~S5,至质量浓度为 200 mg/L,吸取各底物溶液 1 mL,混匀备用。

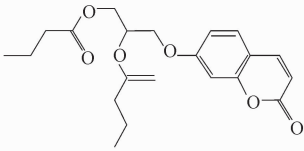
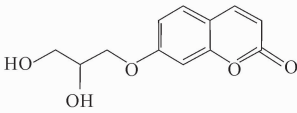
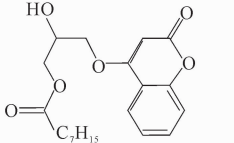
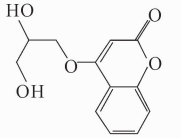
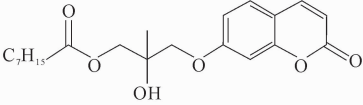
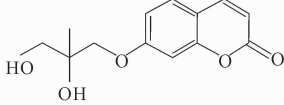
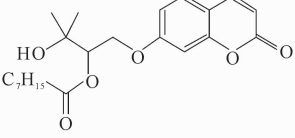
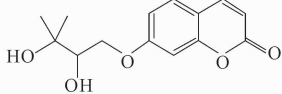
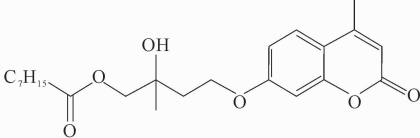
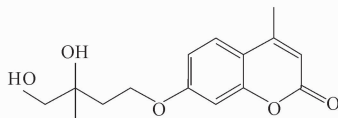
1.2.2 菌悬液的制备 取培养 18~24 h 的新鲜菌液,4 000 r/min 离心 10 min 得到菌体,用生理盐水洗涤 1 次。加入 2 mL 无菌生理盐水制成菌悬液,取菌悬液置 5 mL 生理盐水管中,采用麦氏比浊管,调节浊度至 4 麦氏单位(MCF)。

1.2.3 样品反应体系 分别吸取 25 μL 菌体、25 μL 底物混合物和 50 μL 生理盐水,振荡混匀,在相应菌株的生长条件下反应 1 h。空白对照反应体系为 25 μL 底物混合物和 75 μL 生理盐水。

影响酶反应的因素主要有底物浓度、酶浓度、温度和 pH 等,测试菌株的反应体系为中性环境,各底物浓度相同且底物过量,反应温度为菌株生长的最适温度。同时,考虑到脂肪酶在油水界面上催化活力最大,且表面活性剂 SDS 的加入能增强脂肪酶的

活性^[12],故本研究只考察菌体浓度、反应时间和 SDS 对指纹图谱的影响。

表 1 脂肪酶和酯酶底物 S1~S5 及对应产物 P1~P5 的结构
Table 1 Structures of the substrates S1—S5 and the products P1—P5

底物 Substrate	结构式 Structure	产物 Product	结构式 Structure
S1		P1	
S2		P2	
S3		P3	
S4		P4	
S5		P5	

1.2.4 重复试验的设置 为了避免由于培养时期不同对指纹图谱带来的可能影响,在菌种不同时间培养,进行 3 次重复试验(在菌株编号后加“1”、“2”、“3”进行标示)。对于同一菌株,其培养条件及培养时间设置完全相同。

1.3 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C18(5 μm×4.6 mm×250 mm)。流动相:A 为 H₂O/MeCN (40 : 60),B 为 H₂O。梯度洗脱程序:0~8 min,A/B=30/70~35/65;8~10 min,A/B=35/65~45/35;10~18 min,A/B=45/35;18~20 min,A/B=45/35~30/70;20~28 min,A/B=30/70。进样体积 20 μL。柱温 40 ℃。流速 1.0 mL/min。二极管阵列检测器波长 300 nm。

1.4 数据分析

为了消除菌体浓度和反应时间对脂肪酶和酯酶指纹图谱的影响,以产物中的最大色谱峰为参照峰,指定其相对峰面积为 1.0,计算其他产物色谱峰的相对峰面积。采用 SAS 9.1 中的离差平方和(Ward)算法进行系统聚类分析。

2 结果与分析

2.1 精密度、稳定性及重现性试验

培养 DSM 3922^T 菌株,按 1.2 方法制备样品,按 1.3 方法进样检测。在精密度试验中,取同一份样品液连续进样 6 次,各产物峰的保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.18%~0.25%和 0.97%~2.12%,表明仪器精密度良好。在稳定性试验中,取同一份样品液分别在 0,4,8,12,18 和 24 h 进样,各产物峰的保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.34%~1.01%和 1.72%~2.86%,表明制备的样品溶液至少在 24 h 内是稳定的。重现性试验中,取不同培养时间的 DSM 3922^T 菌株制备 6 份样品液进样,各产物峰的保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.32%~0.95%和 0.71%~2.82%,表明该方法重现性良好。

2.2 菌体浓度对脂肪酶和酯酶指纹图谱的影响

将 DSM 3922^T 菌株的菌体浓度分别调至 2,4 和 6 MCF,考察菌体浓度对脂肪酶和酯酶指纹图谱的影响,结果如图 1 和表 2 所示。

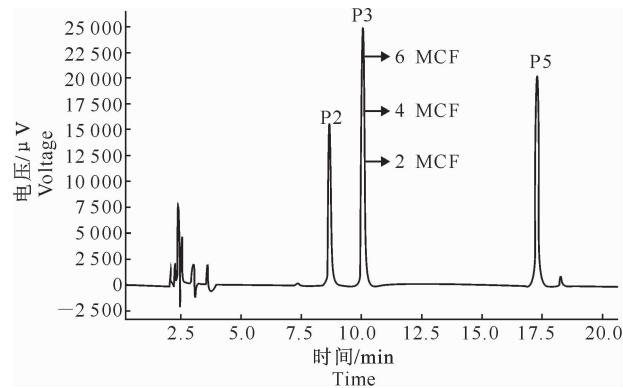


图 1 不同菌体浓度时的脂肪酶和酯酶指纹色谱图

Fig. 1 HPLC analysis of lipase and esterase fingerprinting reactions in different concentrations

表 2 不同菌体浓度各产物相对峰面积差异的比较

产物 Product	菌体浓度/MCF Concentration			平均值±标准差 Mean±standard deviation	变异系数/% Coefficient of variation
	2	4	6		
P1	0	0	0	—	—
P2	0.500	0.529	0.520	0.52±0.014 9	2.89
P3	1	1	1	1.00±0.000 0	0.00
P4	0	0	0	—	—
P5	0.734	0.711	0.730	0.73±0.012 3	0.70

表 3 不同反应时间各产物相对峰面积差异的比较

产物 Product	反应时间/h Reaction time			平均值±标准差 Mean±standard deviation	变异系数/% Coefficient of variation
	0.5	1.0	1.5		
P1	0	0	0	—	—
P2	0.503	0.518	0.529	0.52±0.013 1	2.53
P3	1	1	1	1.00±0.000 0	0.00
P4	0	0	0	—	—
P5	0.724	0.721	0.711	0.72±0.007 1	0.99

由表 3 可以看出,各产物相对峰面积的变异系数均小于 3%,表明不同反应时间下指纹图谱没有显著差异。即随着反应时间的延长,产物的生成也在增加,但各产物峰面积占总峰面积的比值保持不变,说明反应时间的长短不影响菌株的脂肪酶和酯酶指纹图谱,为后续分析各菌株的指纹图谱排除了另一个干扰因素。

2.4 表面活性剂 SDS 对脂肪酶和酯酶指纹图谱的影响

在反应体系中加入 25 μL DSM 3922^T 菌体、25 μL 底物混合物、25 μL 生理盐水和 25 μL 质量分数为 0.01% 的 SDS,反应结果见图 2。由图 2 可以看出,没有检测到 P1 和 P4,P5 的量增加,但 P2 和 P3 的量减少,为了简化反应体系,故以不加入 SDS 为宜。

由表 2 可知,各产物相对峰面积的变异系数均小于 3%,说明不同菌体浓度间没有显著差异。即随着菌体浓度的增加,产物的生成也在增加(图 1),但各产物峰面积占总峰面积的比值保持不变,说明菌体浓度的大小不影响菌株的脂肪酶和酯酶指纹图谱,为后续分析各菌株的指纹图谱减少了干扰因素。

2.3 反应时间对脂肪酶和酯酶指纹图谱的影响

将同一菌体浓度的 DSM 3922^T 与底物混合物分别反应 0.5、1.0 和 1.5 h,考察反应时间对脂肪酶和酯酶指纹图谱的影响,结果如表 3 所示,所得色谱图与图 1 相似(未列出)。

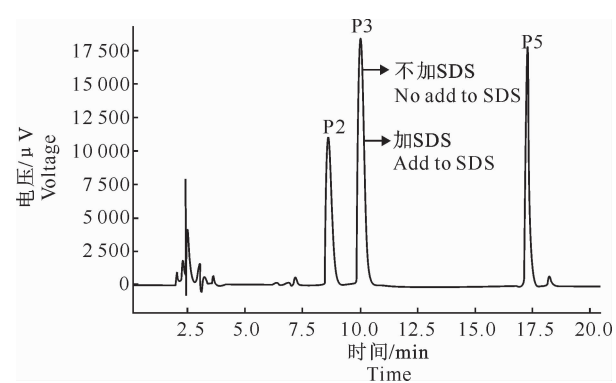


图 2 SDS 对 DSM 3922^T 菌株脂肪酶和酯酶指纹图谱的影响

Fig. 2 The effect of SDS to the lipase and esterase fingerprinting of DSM 3922^T

2.5 脂肪酶和酯酶指纹色谱图的比较与分析

图 3 为各嗜酸耐热菌消耗底物生成各产物的色

谱图。图 3 表明,由于 S2、S3 和 S5 为 C₈-伯酯,其空间阻力小,容易被脂肪酶和酯酶水解,故在测试菌株中均检测到了 P2、P3 和 P5,且生成的各产物中 P3 最大。S1 为 C₄-二酯,需要水解 1 个伯酯键和 1 个仲酯键才能得到产物 P1;S4 为 C₈-仲酯,由于空

间阻力大,不容易被水解,故在测试菌株中都没有检测到产物 P1 和 P4。观察色谱图还可以发现,芽孢杆菌属的菌株生成 P2 的量大于 P5,而脂环酸芽孢杆菌属的菌株生成 P5 的量大于 P2,同时,也说明所用底物能很好地反映各菌株的特异性。

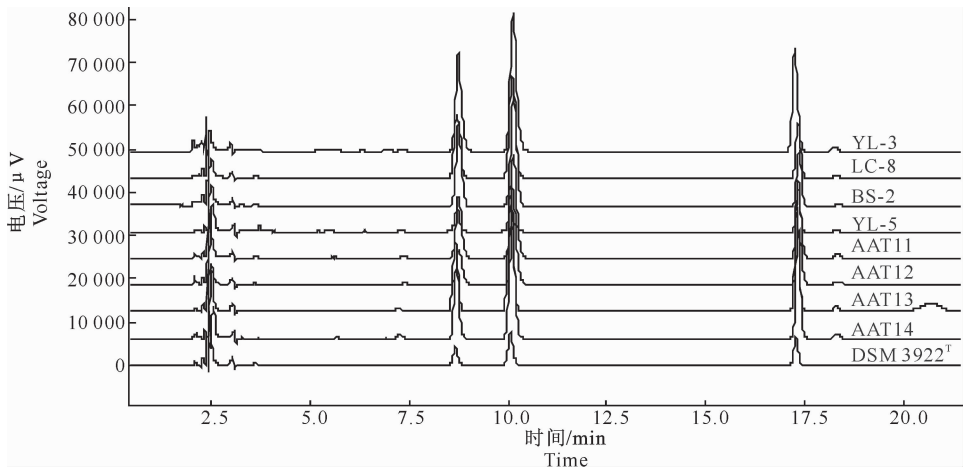


图 3 9 株测试菌株的脂肪酶和酯酶的指纹色谱

Fig. 3 HPLC analysis of lipase and esterase fingerprinting reactions with the nine tested strains

2.6 脂肪酶和酯酶指纹聚类分析

聚类分析是根据“物以类聚”的道理,将特性相近的样品聚为一类,是研究分类问题的重要手段。本研究采用欧式距离,应用离差平方和算法对试验菌株进行系统聚类分析,结果如图 4 所示。图 4 结果表明,同一菌株的 3 次重复都可以正确地归为一类,说明利用液相检测得到的指纹色谱图的重现性

和稳定性较好。芽孢杆菌属和脂环酸芽孢杆菌属明显分为 2 个类群,脂环酸芽孢杆菌属中 2 个不同的种 *A. acidoterrestris* 和 *A. contaminans*,以及芽孢杆菌属中 2 个不同的种 *B. subtilis* 和 *B. ginsengihumi* 也被明显分开,与通过 16S rRNA 得到的层次等级保持一致^[15]。说明利用脂肪酶和酯酶指纹区分嗜酸耐热菌,可以获得较好的区分效果。

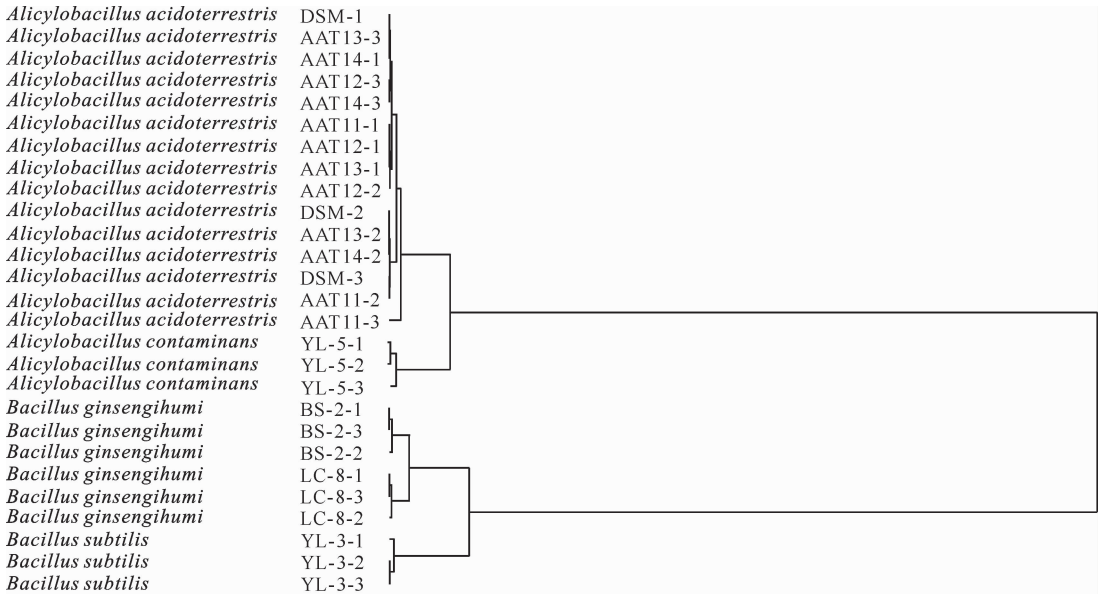


图 4 9 株测试菌株的脂肪酶和酯酶的指纹聚类结果

Fig. 4 Hierarchical clustering of the nine tested strains

3 结论和展望

本研究通过反相高效液相色谱检测获得了 9 株嗜酸耐热菌的脂肪酶和酯酶指纹色谱图,采用聚类分析得到了与已知菌种系统分类相一致的“系统-脂肪酶和酯酶”发育树,鉴定可以达到种的水平,从而验证了脂肪酶和酯酶指纹分析应用于嗜酸耐热菌鉴定的可行性。

为了将该方法扩大应用,需要增加试验菌株的种类和数量,建立嗜酸耐热菌标准菌株的脂肪酶和酯酶指纹数据库。同时,要不断地改进脂肪酶和酯酶底物混合物的组成,进一步合成更易于检测的底物,如引入荧光或显色基团。在此基础上,建立基于脂肪酶和酯酶指纹分析的嗜酸耐热菌快速鉴定试剂盒,从而更广泛地应用于实际生产。

总之,基于脂肪酶和酯酶指纹分析的嗜酸耐热菌快速鉴定方法操作较为简单,一般的工作人员即可操作,且经济成本低,快速准确,故具有广阔的应用前景。

[参考文献]

[1] 赵贵宝. 我国浓缩苹果汁加工出口的形势、问题与对策 [J]. 陕西农业科学, 2004(5): 63-66.
Zhao G B. The export situation, problems and countermeasures of Chinese apple juice concentrate [J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2004(5): 63-66. (in Chinese)

[2] Gousa A P, Gie L, Pretorius A, et al. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate [J]. Int J Food Sci& Tech, 2005, 40: 789-792.

[3] Alpsh H, Alma L, Bozoglu F. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juice by high hydrostatic pressure [J]. World Microbiol& Biotech, 2003, 19: 619-623.

[4] 许占位, 余清谋, 刘永建. 浓缩果汁生产中嗜酸耐热菌的控制 [J]. 饮料工业, 2003, 6(5): 32-34.
Xu Z W, Yu Q M, Liu Y J. Control on acidophilic and heat-resistant bacteria in fruit juice concentrate processing [J]. The

Beverage Industry, 2003, 6(5): 32-34. (in Chinese)

[5] 冯再平. 浓缩苹果汁中耐热菌 PCR 法定量检测技术研究 [D]. 陕西西安: 陕西师范大学, 2004: 18-26.
Feng Z P. Studies on quantitative PCR for rapid detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate [D]. Xi'an, Shaanxi: Shaanxi Normal University, 2004: 18-26. (in Chinese)

[6] 陈颖. 臭氧对耐酸耐热菌杀灭作用的研究 [D]. 陕西西安: 陕西师范大学, 2004: 33-35.
Chen Y. Studies on sterilizing effect of ozone to *Alicyclobacillus acidoterrestris* [D]. Xi'an, Shaanxi: Shaanxi Normal University, 2004: 33-35. (in Chinese)

[7] 沈萍, 陈向东. 微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 392-410.
Shen P, Chen X D. Microbiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2009: 392-410. (in Chinese)

[8] Humble M W, King A, Phillips I. APIZYM: A simple rapid system for the detection of bacterial enzymes [J]. J Clin Pathol, 1977, 30: 275-277.

[9] Reymond J L. Substrate arrays for fluorescence-based enzyme fingerprinting and high-throughput screening [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1130: 12-20.

[10] Reymond J L, Wahler D. Substrate arrays as enzyme fingerprinting tools [J]. Chembiochem, 2002, 3: 701-708.

[11] Wahler D, Badalassi F, Crotti P. Enzyme fingerprints of activity, and stereo- and enantioselectivity from fluorogenic and chromogenic substrate arrays [J]. Chemistry-A European Journal, 2002, 8(14): 3211-3228.

[12] Goddard J P, Reymond J L. Enzyme activity fingerprinting with substrate cocktails [J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(36): 11116-11117.

[13] Yang Y Z, Reymond J L. Protease profiling using a fluorescent domino peptide cocktail [J]. Mol Bio Syst, 2005, 1: 57-63.

[14] Basile F, Ferrer I, Furlong E T, et al. Simultaneous multiple substrate tag detection with ESI-ion trap MS for *in vivo* bacterial enzyme activity profiling [J]. Analytical Chemistry, 2002, 74: 4290-4293.

[15] Wang Y, Yue T L, Yuan Y H, et al. Isolation and identification of thermo-acidophilic bacteria from orchards in China [J]. J Food Prot, 2010, 73(2): 390-394.