

一株产酯酶中度嗜盐菌的筛选及酶学性质的研究

申玉凤, 张杰*, 张映, 王娇, 熊文, 赵喜云 (东北林业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 [目的] 研究大庆采油厂附近盐碱地产酯酶的中度嗜盐菌菌株的形态和生理生化特点及其所产胞外酯酶的性质。[方法] 利用平板筛选法分离得到一株产酯酶中度嗜盐菌, 对其进行形态、生理生化及分子水平的鉴定, 并对其产生的酯酶的部分酶学性质进行研究。[结果] 初步判断产酯酶的菌株 Z01 为 *Gracilibacillus saliphilus* strain YIM 91119; 对酯酶粗酶液酶学性质的研究结果显示其最适反应温度为 45 °C, 最适反应 pH 为 8.5, 酶反应最适 NaCl 浓度为 10%; 所产酯酶在 50 °C 以下时稳定性好, 对 pH 的碱耐受性好, 对小于 15% 浓度的盐溶液耐性较好。[结论] 分离得到了一株产酯酶活性较高的中度嗜盐菌。

关键词 中度嗜盐菌; 酯酶; 分离; 鉴定; 酶学性质

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)36-13840-03

Isolation, Characterization, and Enzymology Properties of a Moderately Halophilic Bacterium

SHEN Yu-feng et al (College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract [Objective] We separated and identified the moderately halophilic bacteria which produce functional enzymes from saline and alkaline soil near Daqing oil production company. Morphological, physiological and biochemical characteristics and the nature of extracellular esterase of the moderately halophilic bacterium were studied. [Method] The plate screening method was used by adding enzyme specific substrate into the medium to separate and identify the moderately halophilic bacteria which produce esterase enzymes. Moreover, some properties of esterase were studied. [Result] Esterase strains Z-01 was preliminary judged as *Gracilibacillus saliphilus* strain YIM 91119. Through researching crude enzyme properties and producing enzyme optimization from the moderately halophilic bacterias, the optimum reaction conditions were temperature 45 °C, pH 8.5 and NaCl concentration 5%. The enzyme had good thermal stability below 50 °C, good pH tolerance and better salt tolerance for less than 15% concentration of salt solution. [Conclusion] The moderately halophilic bacterium with high yield esterase activity was separated and identified.

Key words Moderately halophilic; Esterase; Isolation; Identification; Enzyme characterization

嗜盐菌是生长在高盐环境中的微生物类群, 根据它们对盐度需求的不同, 可以将其分为轻度嗜盐菌、中度嗜盐菌和极端嗜盐菌。中度嗜盐菌的最适生长盐浓度为 3% ~ 5%, 由于它有极强的环境适应能力, 在自然界中又分布广泛, 因此近些年人们对于中度嗜盐菌在生物技术方面的潜在应用充满了浓厚的兴趣。中度嗜盐菌所产生的各种酶类、大分子多聚物以及功能性分子已经成为研究的主要方向^[1-2]。

盐碱湖、盐碱地、天然盐湖在我国分布相当广泛, 但国内外一直以来对中度嗜盐菌及其所产酯酶的研究却很少^[3-4]。该研究利用平板筛选法分离得到了一株产酯酶活性较高的中度嗜盐菌, 对其进行形态学、生理生化鉴定及 16SrDNA 序列分析, 并对其产生的酯酶的部分酶学性质进行研究。嗜盐酯酶由于其在盐浓度变化较大的情况下仍然可以保持较高的酶活性, 因此可用于高盐有机废水的生物处理及环境修复、化工等领域。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 取样。采用大庆采油四厂附近的盐碱土。

1.1.2 培养基。富集培养基, 即酸水解酪蛋白 5 g/L、酵母

粉 6 g/L、蛋白胨 6 g/L、柠檬酸钠 3 g/L、KCl 3 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 2 g/L、FeSO₄ 0.001 g/L、NaCl 30 ~ 120 g/L (不同盐度梯度), 蒸馏水至 1 000 ml, pH 为 7.5 ~ 8.0; 酯酶筛选培养基, 即蛋白胨 6 g/L、柠檬酸钠 3 g/L、KCl 3 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 2 g/L、FeSO₄ 0.001 g/L、NaCl 30 ~ 120 g/L、溴甲酚紫 0.04 g/L、三丁酸甘油醋乳化液 2%, 蒸馏水至 1 000 ml, pH 为 7.5 ~ 8.0; 基础发酵培养基或种子培养基同富集筛选培养基。以上培养基固体平板均加入 18 ~ 20 g/L 琼脂。

1.1.3 主要试剂。Taq 酶、dNTP、Taq 酶 buffer、16SrDNA 通用引物购自大连 TaKaRa 公司, 凝胶回收试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司, 其他试剂均用国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 菌种的初筛。取 2 ~ 3 g 土样, 加入 100 ml 含有 1% NaHCO₃、4% NaCl 的无菌水中, 置于 37 °C, 160 r/min 的摇床中震荡 2 ~ 3 h 活化, 然后接入不同盐度梯度的富集培养基中集 7 d 左右, 之后采用菌悬液十倍梯度稀释法涂匀在酯酶的筛选平板上, 倒置培养 7 ~ 10 d。当酯酶筛选培养基里的菌落由紫色变成黄色时证明该菌株能产生酯酶, 选取透明圈直径与菌落直径的比值 *K* 大的菌落, 反复划线纯化, 然后用斜面保存法保存菌株, 在培养基中加入 0.2% 维多利亚蓝 B 和一定量橄榄油以检测得到的酶是否为真正的微生物胞外酯酶^[5]。

1.2.2 菌种的复筛。将初筛的菌种接种于装有 50 ml 种子培养基的 250 ml 三角瓶中, 置于 37 °C 振荡培养 24 h, 得到种子液。然后分别将产酯酶的菌液转接到发酵培养基中, 接种量为 2%, 在 37 °C 且转速为 160 r/min 摇床培养 48 h, 之后在 4 °C 条件下, 12 000 r/min 的摇床中离心 20 min, 得到的上清液即为粗酶液。测定粗酶液的酶活力, 进行菌种的复筛。

基金项目 2013 年度大学生创新创业训练计划项目(201310225121); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(DL11CA01); 东北林业大学国家基础科学人才培养基金——科研训练及科研能力提高项目(201218A3); 哈尔滨市青年科技创新人才基金资助项目(RC2009QN015018); 黑龙江省自然科学基金面上资助项目(E201148); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12513038)。

作者简介 申玉凤(1990-), 女, 贵州遵义人, 本科生, 专业: 环境微生物。* 通讯作者, 副教授, 博士后, 从事环境微生物研究。

收稿日期 2013-12-01

1.2.3 菌种鉴定。

1.2.3.1 形态学鉴定。将分离得到的纯菌点种于固体种子培养基中,37 ℃培养 18 h,记录单菌落的颜色(包括正反面、边缘、中央部分颜色)、单菌落的形状(包括菌落及边缘的形状)以及菌落透明度、大小、表面隆起和菌落培养基的颜色等。在光学显微镜下观察细胞形态大小,并做革兰氏染色、芽孢染色及细胞运动性试验。

1.2.3.2 生理生化鉴定。参照文献[5-6]进行氧化酶、过氧化氢酶、酯酶、脂肪酶、淀粉酶、酪素降解、明胶水解等生理生化鉴定。

1.2.3.3 16SrDNA 分子鉴定。参考文献[7]进行 16SrDNA 分子鉴定,利用 ClustalX 1.83 软件进行同源性分析,再用 MEGA 4.0 软件中 N-J 法构建系统发育树^[8-9]。

1.2.4 酯酶活力测定。参照文献[7,10]的方法制备粗酶液和测定酯酶活力。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选 在酯酶筛选培养基分离得到了 2 株酯酶产生菌,而非脂肪酶产生菌,分别标记为 Z01 和 Z02。从菌种初筛和酶活测定的复筛结果(表 1)可见,Z01 的酶活性最高,因此作为试验对象进一步研究。

表 1 产酯酶中度嗜盐菌的初筛和复筛结果

菌种	菌种初筛			酶活复筛	
	水解圈直径 mm	菌落直径 mm	K 值	K 值	酶活力 U/ml
Z01	15.33	2.67	5.74	5.74	10.35
Z02	16.67	8.67	1.92	1.92	7.76

2.2 Z01 菌株的鉴定

2.2.1 形态及生理生化特征。将 Z01 菌株于 37 ℃条件下倒置培养 3 d 后,观察到的菌落形态为圆形,边缘整齐,乳白

色,在基础培养基平板中培养时,菌落中间有 0.5~1.0 mm 不透明的凸起。菌体染色后,在光学显微镜下观察菌体,细胞呈杆状,革兰氏染色呈阳性,无芽孢、穿刺培养有扩散现象(图 1)。部分生理生化特性试验结果显示,氧化酶、过氧化氢酶、酯酶、吲哚反应、硝酸盐还原、葡萄糖、甘油、蔗糖反应为阳性;脂肪酶、淀粉酶、酪素降解、明胶水解、H₂S 产生、乳糖、可溶性淀粉、果糖反应为阴性。

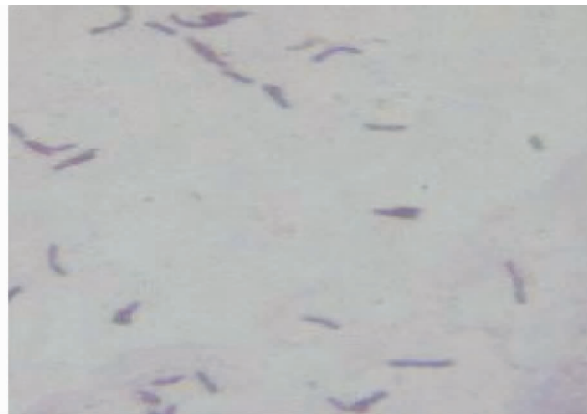


图 1 光学显微镜下 Z01 菌体的形态

2.2.2 16SrDNA 分子鉴定。将 Z01 菌株的 16SrDNA 序列进行 PCR、电泳回收纯化后直接进行测序分析,最终确定所得序列长度为 1 449 bp。在 NCBI 中,将所得序列结果进行 BLAST 同源性查找比对,并用 MEGA 4.0 软件中 N-J 法构建 Z01 菌株的系统发育树(图 2)。比对结果显示,Z01 菌株的 16SrDNA 序列与 *Gracilibacillus saliphilus* strain YIM 91119 的碱基覆盖率和最大相似度均可达 99%,且 Z01 菌株与 *Gracilibacillus saliphilus* strain YIM 91119 在同一分支上,亲缘关系很近。再根据二者的形态特性及生理生化特性中的相似点,可初步认为两者是同一菌种。

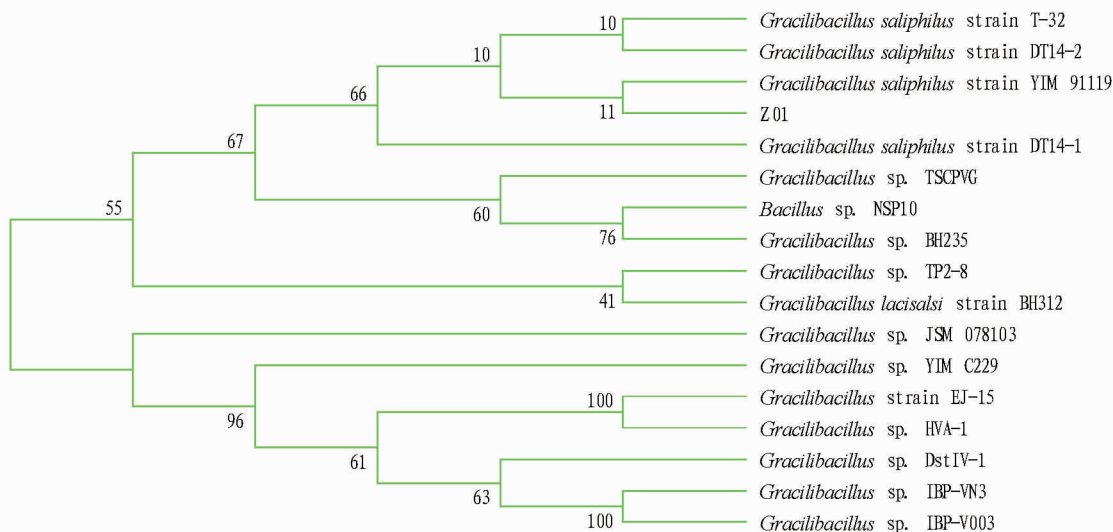


图 2 Z01 菌株 16SrDNA 序列的系统发育树

2.3 酯酶的酶学性质

2.3.1 最适反应温度的确定。在 20、25、30、35、40、45、50、60、70 ℃条件下,利用对硝基苯酚丁酸酯为反应底物,测定酯酶的酶活力,以相对酶活性来表示测定结果(即活性最高的

为 100%)。从不同反应温度条件下的相对酯酶活性曲线(图 3a)可以看出,酯酶的最适反应温度为 45 ℃。

2.3.2 最适反应 pH 的确定。在 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的条件下,利用对硝基苯酚丁酸酯

为反应底物,测定酯酶的酶活力。由不同 pH 下的酯酶活性曲线(图 3b)可以确定,酯酶的最适反应 pH 为 8.5。

2.3.3 最适反应盐度的确定。在 NaCl 浓度为 0、3%、5%、10%、15%、20%、25%、30% 的反应液条件下,利用对硝基苯

酚丁酸酯为反应底物,测定酯酶的酶活力。由酯酶在不同反应 NaCl 浓度下的活性变化曲线(图 3c)可见,酯酶的最适反应 NaCl 浓度为 10%。

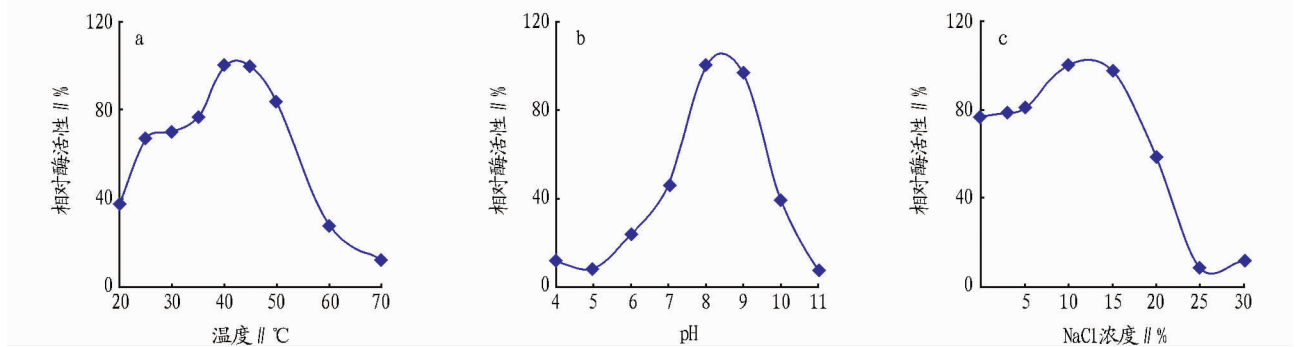


图3 在不同温度(a)、pH(b)和 NaCl 浓度(c)条件下的酯酶活性

2.3.4 温度对酯酶稳定性的影响。在不同温度下将粗酶液分别进行恒温水浴 60 min,在最适 pH 和最适 NaCl 浓度条件下,加入底物反应 10 min,分别测定不同温度条件下的残余酶活性。由不同温度保温情况下酯酶稳定性的变化曲线(图 4a)可见,Z01 菌株胞外酯酶在 50 °C 以下温度时的稳定性较好。

2.3.5 pH 对酯酶稳定性的影响。在不同 pH 的缓冲液中,先将粗酶液在 4 °C 条件下维持 60 min,然后在酯酶反应的最适温度、最适 pH 和最适 NaCl 浓度条件下,加入底物反应 10

min,分别测定不同 pH 下残余的酶活力。结果显示(图 4b),Z01 菌株所产的胞外酯酶能够在碱性条件下保持较高的活性。

2.3.6 NaCl 对酯酶稳定性的影响。在不同 NaCl 浓度的缓冲液中,先将粗酶液在 4 °C 条件下维持 60 min 后,在酯酶反应的最适温度、最适 pH 和最适 NaCl 浓度条件下,加入底物反应 10 min,分别测定不同 NaCl 浓度下的残余酶活性。由图 4c 可见,对小于 15% 浓度的盐溶液酯酶产生的稳定性较好,该产酯酶菌属于中度嗜盐酶。

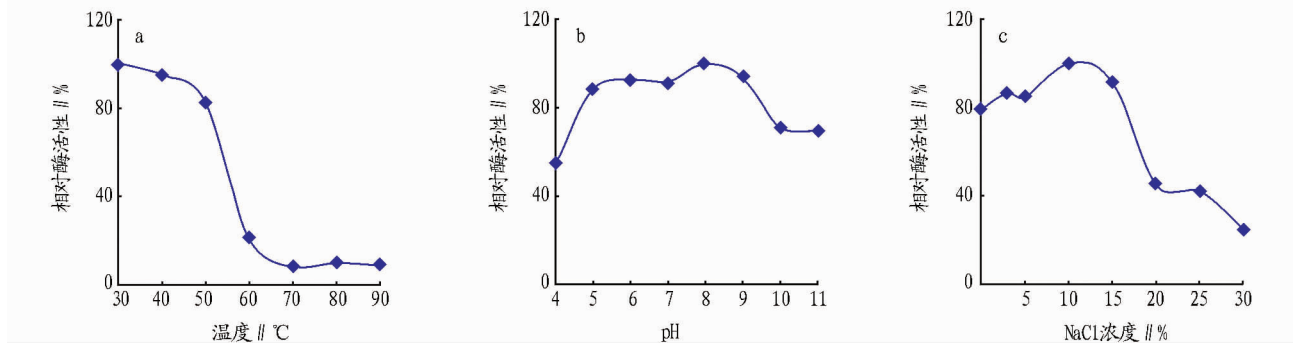


图4 温度(a)、pH(b)和 NaCl 浓度(c)对酯酶稳定性的影响

3 结论与讨论

(1)从大庆采油厂附近盐碱土中分离筛选出一株高产酯酶的中度嗜盐菌,经形态学、生理生化及 16SrDNA 序列分析鉴定确定其为 *Gracilibacillus saliphilus* strain YIM 91119。

(2)对产酯酶中度嗜盐菌的部分酶学性质进行了研究,确定其最适反应温度为 45 °C,最适反应 pH 为 8.5,酶反应最适 NaCl 浓度为 10%。所产酯酶在 50 °C 以下时稳定性好,对 pH 的碱耐受性好,对小于 15% 浓度的盐溶液耐性较好。

(3)该研究摸索出了一种筛选盐碱土中产酯酶中度嗜盐菌的方法,分离鉴定出了产酯酶中度嗜盐菌的新菌株,丰富了我国中度嗜盐菌的物种资源库,也为产酯酶中度嗜盐菌在工业生产中的应用提供了新的思路。

参考文献

[1] 刘莹莹. 中度嗜盐菌分离鉴定及在环境修复中的应用[D]. 大连:大连海事大学,2013.

- [2] 李维国,马放,魏利,等. 一株中度嗜盐菌的分离鉴定研究[J]. 深圳大学学报:理工版,2008,25(2):200-201.
- [3] 汪钊. 产酯酶微生物菌种的筛选研究[J]. 工业微生物,2007,37(6):44-48.
- [4] 叶淑红. 一株产酯酶海洋细菌的筛选及酯酶性质的研究[J]. 食品研究与开发,2011,32(7):133-136.
- [5] 吕爱军,胡秀彩,张冬杰,等. 11 株中度嗜盐菌的分离及生理生化特性研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(4):1325-1326,1349.
- [6] 韩丰敏,赵庆新,袁生,等. 1 株耐盐碱高温淀粉酶嗜盐菌的筛选和鉴定[J]. 安徽农业科学,2008,36(15):6173-6176.
- [7] 刘永强. 中度嗜盐菌产功能酶菌株的筛选及发酵条件优化[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2012.
- [8] 孙溢. 产酯酶海洋微生物的筛选、鉴定及系统发育分析[J]. 渔业科学进展,2009,30(3):68-73.
- [9] BIRGUL OZCAN, GUL OZYILMAZ. Characterization of extracellular esterase and lipase activities from *Wve* halophilic archaeal strains [J]. Microbiol Biotechnol, 2009, 36:105-110.
- [10] RHEE J K, AHN D G, KIM Y G, et al. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library[J]. Applied Environmental Microbiology, 2005, 71(2):817-825.