

嗜盐脂肪酶产生菌的筛选及其粗酶性质

张 萌^{1,2} 张晓梅¹ 窦文芳¹ 许泓瑜¹ 许正宏^{1,2*}

(1. 江南大学医药学院制药工程研究室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘 要: 从内蒙古锡林浩特地区盐湖菌种样品分离获得一株嗜盐脂肪酶高产菌, 结合生理生化试验和 16S rDNA 序列分析结果, 鉴定并命名为 *Haloterrigena thermotolerans* Z4。该菌最适生长 NaCl 浓度为 3.5 mol/L, 最高生长温度为 60°C, 属于嗜盐耐热古生菌。粗酶性质研究表明, 金属离子 (Ba^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+}) 对酶有激活作用, 酶活不同程度的提高了 20%~30%; 该酶受 EDTA 的抑制, 酶活下降了 20%, 受 PMSF 的完全抑制。该酶对 NaCl 有较高的依赖专一性, 至少需要 0.5 mol/L NaCl 维持活性并且高浓度 NaCl 可以提高其耐热水平。醇类物质对于提高酶的热稳定性有一定作用, 丙三醇效果最好。该酶对短链底物对硝基苯酚丁酸酯(*p*-NPB)的最适水解条件为: pH 8.0、70°C、3.5 mol/L NaCl; 而对长链底物对硝基苯酚十六酸酯(*p*-NPP)的最适水解条件为: pH 8.0、80°C、2.5 mol/L NaCl。
关键词: 嗜盐脂肪酶, 嗜盐古生菌, 鉴定, 酶学性质

Screening of a Halobacteria Strain Producing Halophilic Lipase and Characterization of Crude Enzyme

ZHANG Meng^{1,2} ZHANG Xiao-Mei¹ DOU Wen-Fang¹
XU Hong-Yu¹ XU Zheng-Hong^{1,2*}

(1. Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Medicine and Pharmaceutics,
Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: A halobacteria strain Z4 producing extracellular halophilic lipase screened from Hypersaline lakes of Inner Mongolia was identified as *Haloterrigena thermotolerans*. The crude lipase from Z4 was partially characterized using *p*-NPB. The activity of crude lipase was markedly increased 20%~30% by metal ions (Ba^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}), but was obviously decreased 20% by EDTA. The lipase was completely inhibited by PMSF. The activity and heat resistance of enzyme was increased by NaCl, suggesting that the enzyme has strong dependence and specificity on NaCl. The thermostability of the crude enzyme was increased by alcohols, the glycerin is the best one. The optimum conditions for the crude lipase hydrolyzing *p*-NPB were followed: 3.5 mol/L NaCl, 70°C and pH 8.0, and the optimum conditions for the crude lipase hydrolyzing *p*-NPP were followed: 2.5 mol/L NaCl, 80°C and pH 8.0.

Keywords: Halophilic lipase, Halophilic archaeon, Identification, Characterization

基金项目: 江苏省博士后基金(No. SY20061019); 国家“973 计划”项目(No. 2007CB707804); 国家“863 计划”重点项目资助(No. 2006AA020104); 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-07-0380)资助

* 通讯作者: Tel: 86-510-85918206; 信箱: zhenghxyu@163.com

收稿日期: 2008-05-26; 接受日期: 2008-07-07

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

随着工业生物技术的不断发展,脂肪酶在工业生物技术领域的应用逐渐成为研究的热点,脂肪酶广泛应用于洗涤剂、食品、医药、制革、纺织及废物处理等领域^[1]。脂肪酶按其作用特点主要可以分为碱性脂肪酶、酸性脂肪酶耐热脂肪酶和低温脂肪酶,而来自嗜盐古生菌的嗜盐脂肪酶却鲜见报道。嗜盐古生菌是生长在盐湖、盐碱湖、盐沼、死海和盐场等高盐环境中的一类微生物,它是极端微生物的一个重要成员,嗜盐古生菌最显著的生理特征是生长依赖高浓度 NaCl,生长最适盐浓度为 3 mol/L~4 mol/L NaCl^[2]。嗜盐古生菌产生的酶能在高盐的条件下维持高活性和稳定性,而普通的酶在这种条件下失去活性,正是由于嗜盐酶的这种独特性质,来自于嗜盐古生菌的酶成为生物化学和酶学等基础研究中非常令人感兴趣的材料。

Baratti 等 2006 年首次报道了来源于嗜盐古生菌 *Natronococcus* sp. TC6 的嗜盐脂肪酶^[3],而来源于嗜盐古生菌 *Haloterrigena thermotolerans* 的嗜盐脂肪酶的相关研究并未见国内外文献报道。本研究室从盐湖分离到一株嗜盐脂肪酶高产嗜盐古生菌 *Haloterrigena thermotolerans* Z4,并首次对其分泌的胞外嗜盐脂肪酶性质进行了初步研究,为进一步开展嗜盐脂肪酶的应用研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌种

Haloterrigena thermotolerans Z4 分离自内蒙古锡林浩特地区盐湖样品,样品由中科院微生物研究所马延和教授惠赠。

1.2 培养基

种子培养基(g/L): NaCl 200.0, KCl 2.0, MgSO₄·7H₂O 20.0, FeSO₄·7H₂O 0.04, 酪蛋白氨基酸 7.5, 酵母粉 10.0, 柠檬酸三钠 3.0, pH 7.5

发酵培养基(g/L): NaCl 200.0, KCl 2.0, MgSO₄·7H₂O 20.0, FeSO₄·7H₂O 0.04, 酪蛋白氨基酸 7.5, 酵母粉 10.0, 柠檬酸三钠 3.0, 橄榄油 10.0, pH 7.5

筛选培养基(g/L): NaCl 200.0, KCl 2.0, MgSO₄·7H₂O 20.0, FeSO₄·7H₂O 0.04, 酪蛋白氨基酸 7.5, 酵母粉 10.0, 柠檬酸三钠 3.0, 橄榄油 10.0, 若丹明 B 1.0, pH 7.5

1.3 脂肪酶活力测定

发酵液于 4℃、12000 r/min、离心 15 min,上清液即为粗酶液,供酶学性质研究使用,酶活力测定以 *p*-NPB 为底物参照文献[4]方法进行。

溶液 A: 176 μL *p*-NPB 溶于 10 mL 异丙醇, 4℃保存; 溶液 B: pH 8.0, 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(可根据需要调整 pH)。使用时将溶液 A 与溶液 B 按 1:9 的体积比配制成 3.6 mL 底物反应液,并在底物反应液中加入 3.5 mol/L NaCl,加入 400 μL 粗酶样品, 37℃ 反应 10 min,在 410 nm 测定吸光值。

脂肪酶酶活单位的定义:每分钟释放 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量定义为一个酶活单位。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 生理生化实验:按照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)方法进行碳源利用试验、过氧化氢酶试验、硫化氢试验、吲哚试验、硝酸盐和亚硝酸盐还原试验等试验。

1.4.2 16S rDNA 序列扩增:PCR 扩增利用古生菌通用引物:

5'-ATTCCGGTTGATCCTGC-3

5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCAG-3

扩增条件:95℃ 5 min; 95℃ 45 s, 50℃ 45 s, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物测序由上海生工完成。

1.5 粗酶性质研究

1.5.1 酶最适作用温度:于不同温度按 1.3 方法测定脂肪酶活力,以相对酶活绘制温度-酶活曲线。

1.5.2 酶最适作用 pH:以不同 pH 缓冲液配制底物反应液,按 1.3 方法测定脂肪酶活力,以相对酶活绘制 pH-酶活曲线。

1.5.3 酶最适作用盐浓度:配制不同 NaCl 浓度的底物反应液,按 1.3 方法测定脂肪酶活力,以相对酶活绘制盐浓度-酶活曲线。由于粗酶液含有 3.5 mol/L 的 NaCl,所以考查无 NaCl 条件下的酶活时需将粗酶液用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液透析除去 NaCl,而其他 NaCl 浓度条件下使用未透析的粗酶液,粗酶液中的 NaCl 浓度已计算在内。

1.5.4 金属离子及抑制剂对酶活力的影响:在 10 mL 未透析除盐的粗酶液中分别加入金属离子(20 mmol/L)、PMSF(1 mmol/L)、EDTA 二钠盐(30 mmol/L)、SDS(5%, W/V)和 DMSO(10%, V/V),室温静置 30 min 后取 400 μL 在最适条件下(70℃、

3.5 mol/L NaCl、pH 8.0)测定脂肪酶活力,以不含添加物的粗酶酶活为 100%,计算相对酶活。

1.5.5 不同浓度 NaCl 对酶热稳定性的影响:将分别含 3.5 mol/L NaCl 和 0.5 mol/L NaCl 的粗酶液 10 mL 在不同温度保温 1 h 后取 400 μ L 在最适条件下(70°C、3.5 mol/L NaCl、pH 8.0)测定酶活,绘制温度-酶活曲线。

1.5.6 醇类对酶热稳定性的影响:在 10 mL 未透析除盐的粗酶液中添加醇类(5% V/V),在 70°C 水浴静置 1 h 后取 400 μ L 在最适条件下(70°C、3.5 mol/L NaCl、pH 8.0)测定酶活,以未加醇类的粗酶经同样条件处理为对照,以初始粗酶酶活为 100%,计算相对酶活。

1.5.7 不同浓度的 NaCl、KCl 和 NaBr 对脂肪酶活力的影响:用 pH 8.0 的缓冲液配制以 *p*-NPB 为底物的反应液,在底物反应液中分别加入不同浓度的 NaCl、KCl 和 NaBr,取 400 μ L 未透析除盐的粗酶在 70°C 测定脂肪酶活力,绘制酶催化曲线。

1.5.8 脂肪酶底物作用特性:pH 8.0 条件下,考查脂肪酶对短链底物对硝基苯酚丁酸酯(*p*-NPB)和长链底物对硝基苯酚十六酸酯(*p*-NPP)的水解活力,绘制酶催化曲线。

2 结果

2.1 产嗜盐脂肪酶菌株的筛选鉴定

通过平板初筛和摇瓶复筛获得一株脂肪酶高产菌 Z4,其生长和产酶关系见图 1。从图 1 中可以看出,Z4 菌株在对数生长期就可以检测到胞外嗜盐脂肪酶的活性,随着菌体密度的增加,发酵液上清的嗜盐脂肪酶活性逐渐增强,到达稳定期时活性最高。

对 Z4 菌株的进一步研究表明,该菌在高盐培养基上生长良好,菌落表面光滑,边缘整齐,红色。革兰氏染色阴性,镜检为杆状。该菌好氧或兼性厌氧,生长温度范围为 30°C~60°C,最适生长温度为 42°C;适宜生长 pH 范围 6.0~9.0,最适生长 pH 7.0;在 0.5 mol/L~5.2 mol/L NaCl 范围内均能生长,最适生长浓度为 3.5 mol/L。该菌仅能较好的利用蔗糖、果糖,淀粉水解试验、明胶水解试验、酪素降解试验、硝酸盐还原试验呈阳性;吡啶试验、过氧化氢酶试验、硫化氢试验呈阴性。Z4 菌株 16S rDNA 全长序列为 1581 bp(GenBank 登录号 EU557270),与菌株

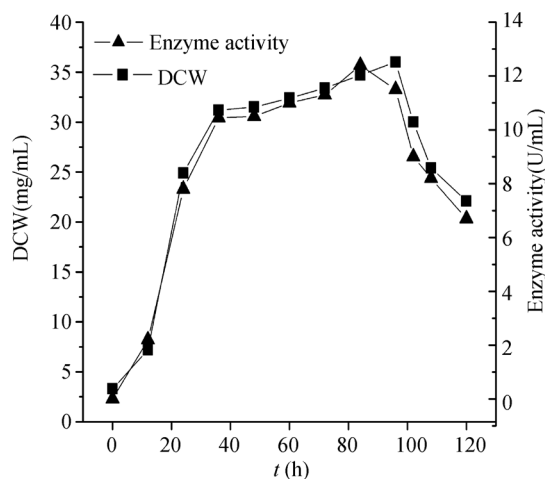


图 1 生长曲线及酶活测定

Fig. 1 Enzyme activity in the culture supernatant during growth of Z4 at 37°C

Haloterrigena thermotolerans 10R(GenBank 登录号 AY994199)的同源性为 99%,结合生理生化特性,鉴定并命名为 *Haloterrigena thermotolerans* Z4。

2.2 粗酶性质研究

2.2.1 酶最适作用条件:Z4 脂肪酶性质(图 2)研究表明,以 *p*-NPB 为底物,其最适作用条件为 pH 8.0、70°C 和 3.5 mol/L NaCl。该酶最适反应温度较高,在 50°C~90°C 高温范围内保持较高活性;在 pH 3.0~6.0 的酸性条件下有微弱酶活,pH 10~12 时几乎无酶活。

该酶透析除盐后失去活性,将经过透析除盐的粗酶在不同的盐浓度条件下静置 7 d,以 24 h 为间隔取样测定酶活仍然无活性,表明该酶在无盐条件发生不可逆变性。该酶在低于 0.5 mol/L NaCl 条件下无活性(表 1),至少需要 0.5 mol/L NaCl 维持其活性,说明 Z4 脂肪酶属于嗜盐脂肪酶兼有耐热性质但不耐碱。

2.2.2 金属离子及抑制剂的影响:实验结果显示(表 2),金属离子 Ba^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 对酶具有激活作用,酶活不同程度地提高了 20%~30%,金属离子的促进作用可能是由于金属离子与酶结合对酶的最佳活力构象起到稳定作用,从而提高酶催化活性^[5];该酶受丝氨酸脂肪酶抑制剂 PMSF 的完全抑制,判断该酶与已报道的大多数脂肪酶一样具有以丝氨酸为活性中心的催化三元组;该酶亦受到 EDTA、SDS 和 DMSO 的抑制,酶活不同程度地下降了 20%~30%。

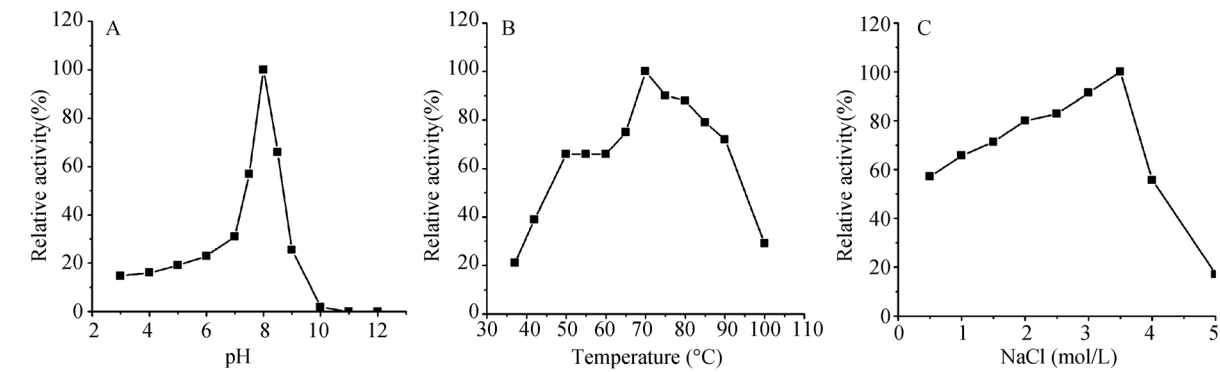


图 2 pH、温度和 NaCl 浓度对酶活的影响

Fig. 2 Effect of pH, temperature and NaCl concentrations on lipolytic activity

表 1 不同 NaCl 浓度对酶活力的影响 Table 1 Effects of different concentrations on lipolytic activity				
NaCl 浓度 NaCl concentration(mol/L)	0	0.35	0.4	0.5
酶活 Enzyme activity(U/mL)	0	0	0	7

表 2 添加剂对酶活力的影响 Table 2 Effects of different factors on lipolytic activity from Z4		
添加剂 Additives	浓度 Concentration	相对酶活 Relative enzyme(%)
对照 Control	—	100
Ba ²⁺	20 mmol/L	120
Fe ²⁺	20 mmol/L	130
Cu ²⁺	20 mmol/L	119
K ⁺	20 mmol/L	99
Mn ²⁺	20 mmol/L	100
Mg ²⁺	20 mmol/L	100
Zn ²⁺	20 mmol/L	100
Ca ²⁺	20 mmol/L	100
EDTA	30 mmol/L	80
SDS	5%(W/V)	70
PMSF	1 mmol/L	0
DMSO	10%(V/V)	75

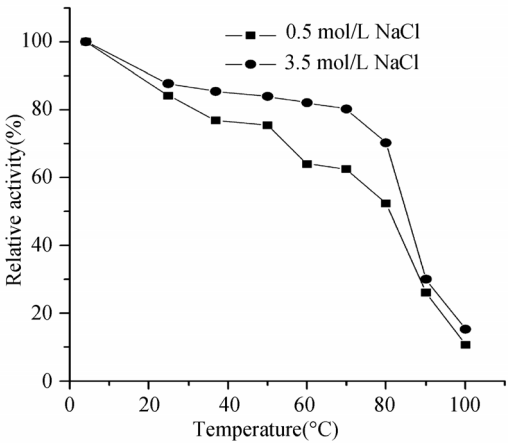


图 3 粗酶热稳定性

Fig. 3 Thermostability profile of lipolytic activity of the crude lipase

2.2.3 不同浓度 NaCl 对酶热稳定性的影响 将不同 NaCl 浓度的粗酶在不同温度静置 1 h 后取样在最适条件下测定酶活, 结果表明(图 3), 该酶在 4°C~80°C 范围内具有较好的稳定性, 90°C 时酶活力迅速下降, 且含有低浓度 NaCl 的粗酶随温度升高, 酶活力下降更快, 结果表明高浓度 NaCl 对提高酶的热稳定性可以起到一定作用。

2.2.4 醇类对酶热稳定性的影响: 添加醇类的粗酶

在 70°C 条件下保温 1 h 后, 取样测定酶活, 结果显示(表 3), 醇类对提高脂肪酶的热稳定性有一定的作用, 其中丙三醇的效果最好, 这种稳定机理可能是多羟基醇类通过共价键连接到酶分子表面, 形成一层覆盖层, 起到对酶的保护作用, 有利提高酶的热稳定性, 或是醇类减少了介质的介电常数加强了酶分子的疏水作用, 这类物质与水分子结合, 降低水的活度, 使酶蛋白受水分子的影响减少^[6]。

2.2.5 不同浓度的 NaCl、KCl 和 NaBr 对酶活力的影响:嗜盐酶需要 NaCl 或者 KCl 维持活性^[7], 实验已经证明 Z4 脂肪酶至少需要 0.5 mol/L NaCl 维持活性, 在 70°C、pH 8.0 条件下, 比较了不同浓度的 NaCl、KCl 和 NaBr 对维持脂肪酶活性的作用, 结果表明(图 4), 除了 NaCl 可以维持 Z4 脂肪酶催化活性外, KCl 亦可维持其催化活性, 但效果不及 NaCl; 单独添加 NaBr 不能起到维持活性的作用。由此推断 Z4 脂肪酶对 NaCl 有较高的依赖专一性。

表 3 醇类物质对粗酶热稳定性的影响
Table 3 Effects of alcohols on thermostability of crude lipase

名称 Title	添加量 Concentration(%)	相对酶活 Relative enzyme(%)
对照 Control	0	79
甘露醇 Manicol	5.0	51
乙二醇 Ethylene alcohol	5.0	84
丙三醇 Glycerin	5.0	94
1,2-丙二醇 1,2-Propylene glycol	5.0	90
聚乙二醇 2000 Polyethylene glycol 2000	5.0	81
聚乙二醇 4000 Polyethylene glycol 4000	5.0	89
聚乙二醇 6000 Polyethylene glycol 6000	5.0	92
聚乙二醇 8000 Polyethylene glycol 8000	5.0	89

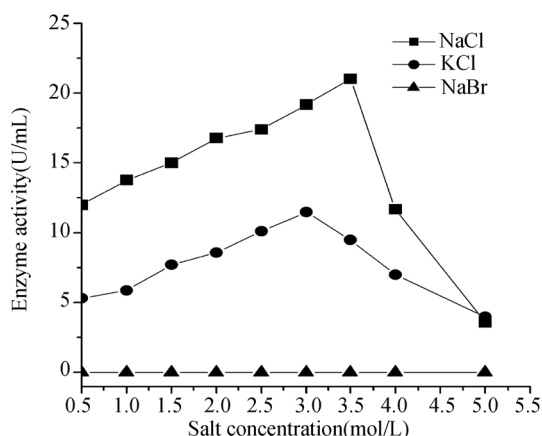


图 4 NaCl、KCl 和 NaBr 对脂肪酶活力的影响
Fig. 4 Effect of NaCl, KCl and NaBr concentrations on lipolytic activity

2.2.6 脂肪酶底物作用特性:考查了 Z4 脂肪酶对长链底物 *p*-NPP(对硝基苯酚十六酸酯)和短链底物 *p*-NPB(对硝基苯酚丁酸酯)的酯解活力,结果表明, Z4 嗜盐脂肪酶对 *p*-NPP 的最适作用条件为 pH 8.0、80°C 和 2.5 mol/L NaCl(图 5), 对 *p*-NPB 的最适作用条件为 pH 8.0、70°C 和 3.5 mol/L NaCl(图 6), 且在最适条件下对长短链底物的水解活力相近, 分别为 13 U/mL 和 14 U/mL。

3 结论

迄今为止仅有文献报道 *Haloterrigena thermotolerans* 嗜盐古生菌的生理生化特点^[8], 并未见对其产

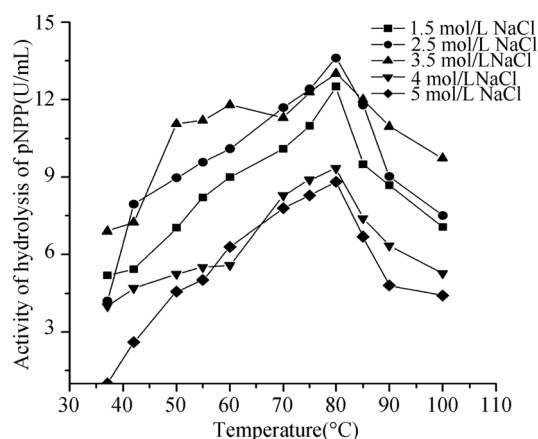


图 5 脂肪酶对 *p*-NPP 的水解活力
Fig. 5 Enzyme activity of hydrolysis of *p*-NPP

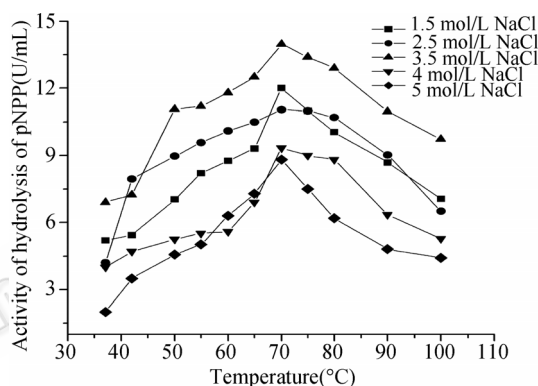


图 6 脂肪酶对 *p*-NPB 的水解活力
Fig. 6 Enzyme activity of hydrolysis of *p*-NPB

物研究的相关报道, 本文首次对 *Haloterrigena thermotolerans* Z4 嗜盐古生菌嗜盐脂肪酶进行了研究, *Haloterrigena thermotolerans* Z4 发酵产酶达到 12500 U/L, 远高于已报道的 *Natronococcus* sp. TC6 嗜盐古生菌产酶水平(50 U/L)。Z4 菌株嗜盐脂肪酶兼有耐热特点, 而且高浓度 NaCl 对于提高其耐热水平有一定作用, 该酶对 NaCl 有较高的依赖专一性, 至少需要 0.5 mol/L NaCl 维持其活性, 在无盐条件下发生不可逆变性。Z4 菌株嗜盐脂肪酶可以在更广的盐浓度范围内维持高活性, 而且具有更高的作用温度, 为其在更苛刻的环境中发挥作用提供了条件。Z4 菌株嗜盐脂肪酶的发现不仅丰富了脂肪酶种类而且为生物化学和酶学研究提供了新的材料。

参考文献

- [1] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 9(2): 235-251.

- [2] 刘铁汉, 周培瑾. 嗜盐微生物. 微生物学通报, 1999, 26(3): 232.
- [3] Boutaiba S, Bhatnagar T, Baratti J C, *et al.* Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp.. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 41: 21–26.
- [4] Namita G, Pooja R, Rani G. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Analytical Biochemistry*, 2002, 311: 98–99.
- [5] 宋欣, 元小宇, 曲音波. 丝孢酵母脂肪酶的酶学性质和化学修饰. 微生物学通报, 2007, 34(4): 723–726.
- [6] 郭诤, 张根旺. 脂肪酶的结构特征和化学修饰. 中国油脂, 2003, 28(7): 5–10.
- [7] 石万良, 钟传奇, 唐 兵, 等. 极端嗜盐古生菌 (*Natrinema* sp.) R6-5 胞外嗜盐蛋白酶的纯化和性质研究. 微生物学报, 2007, 47(1): 161–163.
- [8] Rafael MR, Juan LG, Russell HV, *et al.* *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 1065–1071.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的水稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算, 综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内, 研究报告 4~6 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“*et al.*”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 不加缩写点, 斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘 杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *ns*p14 基因的克隆和表达. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, 276(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, p.4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 璐等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp.115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2008-00-00 ; 接受日期: 2008-00-00

(下转 p.30)