

# 一株高产酯酶中度嗜盐菌的分离、鉴定及酯酶部分酶学性质的研究

董 伟 郭立忠 李翠翠 王 琳 卢伟东\*

(青岛农业大学山东省应用真菌重点实验室 山东 青岛 266109)

**摘 要:** 利用平板筛选法从盐场卤水池中筛选到一株高效降解Tween 20 的中度嗜盐菌DF-B6 菌株。通过形态学、生理生化及 16S rDNA序列分析确定该菌株为*Idiomarina*属的成员。底物特异性实验确定DF-B6 菌株分泌的脂裂解酶为酯酶, 而非脂肪酶。在含 8% NaCl的 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中, 50°C条件下作用, 酶活性最高。当反应液中金属离子浓度为 10 mmol/L时,  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 和 $Mn^{2+}$ 对酶活有激活作用, 而 $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 和 $Cu^{2+}$ 则对酶反应有抑制作用。

**关键词:** 中度嗜盐菌, *Idiomarina*, 酯酶, 16S rRNA

## Isolation and Characterization of a Moderately Halophilic Bacterium High-producing Esterase

DONG Wei GUO Li-Zhong LI Cui-Cui WANG Lin LU Wei-Dong\*

(Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

**Abstract:** A moderately halophilic bacterium strain DF-B6 capable of degrading Tween 20 was isolated from solar saltern brine by plate method. Based on the phenotype, physiological and biochemical characteristics, and the phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence, strain DF-B6 was identified as *Idiomarina*. The substrate specificity test showed that the lipolytic enzyme from strain DF-B6 was an esterase, and not a lipase. The maximum esterase activity was observed in 8% NaCl concentration at 50°C, pH 8.0. The effect of various divalent cations was studied on the activity of esterase from *Idiomarina* sp. DF-B6 at the concentration of 10 mmol/L,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  enhanced the esterase activity, while  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  and  $Cu^{2+}$  inhibited its activity.

**Keywords:** Moderately halophilic bacterium, *Idiomarina*, Esterase, 16S rRNA

酯酶(Esterase, EC 3.1.1.1)是一类重要的水解酶, 具有分解和合成酯类化合物的能力, 可以完成酯化、转酯、酯交换等反应, 已广泛应用于农业、食品酿造、医药化学、污水处理和生物修复等领域。

在自然界中能产生酯酶的微生物资源非常丰富, 从分类上看主要是真菌, 其次是细菌, 主要集中在芽孢杆菌属、假单胞菌属以及伯克霍尔德菌属等, 另外放线菌的个别种类也产生酯酶<sup>[1]</sup>。

中度嗜盐菌是一类最适生长盐浓度为 3%~15% 的嗜盐微生物生理类群,它可以在较宽的盐浓度(0.5%~25%)范围内生长,细胞产生的胞外酶在盐度变化较大的条件下仍然保持较高的酶活<sup>[2]</sup>,利用此独特特性可将其用于高盐有机废水的生物处理及环境修复等领域。印染、造纸、农药生产、海水直接利用、石油开发及加工过程中会产生大量含脂(酯)类物质的高盐有机废水,筛选产胞外脂(酯)酶的中度嗜盐菌,研究细胞产酶的最适条件以及酯酶的酶学特性,对于提高对高盐有机废水的生物处理效率具有重要意义。国内外目前尚未有相关中度嗜盐菌酯酶的研究报道。本研究以 Tween 20 为底物筛选高产脂(酯)酶的中度嗜盐菌,对其中一株产酶较高的菌株进行了初步的分类鉴定,并对细胞产生酯酶的部分酶学特性进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

分离材料采自黄海沿海晒盐场卤水池的水样和泥样。*Taq* 酶购自 TaKaRa 公司,对硝基苯乙酸酯、对硝基苯丁酸酯、对硝基苯辛酸酯、对硝基苯月桂酸酯、对硝基苯棕榈酸酯购自 Sigma 公司,橄榄油购自上海国风集团,PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。

DSMZ-755 固体培养基(1 L): NaCl 100 g, 蛋白胨 5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g, 酵母粉 3 g, 琼脂粉 18 g, pH 7.5,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。筛选固体培养基: DSMZ-755 固体培养基中加入 1% (W/V) Tween 20。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌种的初筛:** 采集样品用含 4% (V/V) NaCl 的无菌水适当稀释后,涂布到含有 1% Tween 20 (V/V) 的 DSMZ-755 固体平板上, 30°C 培养 3 d~5 d 观察菌落周围是否有乳白色晕圈,有晕圈的菌落进一步划线纯化,获取纯培养菌株。根据水解晕圈直径与菌落直径比值(HC 值)的大小判定水解 Tween 20 能力的大小。HC 值愈大表示菌株降解酯类能力愈强,从中初步筛选出 10 株 HC 值较大的菌株。

**1.2.2 摇瓶复筛试验:** 将初筛菌株接到 30 mL 液体培养基中(250 mL 三角瓶), 30°C 和 180 r/min 条件下培养 24 h 制成种子液。按 1% 的接种量将种子液分别接种到含 30 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,相同条件下培养 40 h 后,测定发酵液中的酶活力进

行复筛。

**1.2.3 菌种鉴定:** 1) 形态观察: 将活化菌种在 DSMZ-755 固体平板上划线接种, 37°C 培养箱中倒置培养 2 d, 观察菌落形态。细菌样品经处理后用 JEOL-1200 透射电子显微镜观察菌体形态。

2) 菌株的生理生化鉴定: 参照文献[3]进行。

3) 16S rDNA 的 PCR 扩增、序列分析和系统发育树的构建: 参照文献[4]的方法提取细菌基因组 DNA。PCR 引物和反应条件参照文献[3]进行。PCR 产物经纯化后送交上海生物技术有限公司完成测序工作。测序结果在 NCBI 数据库中进行 Blastn 搜索,获得与其同源性相近的序列,然后 Clustal X1.8 软件进行多序列比对,最后利用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树,通过邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树,采用 Kimura 双参数模型计算各序列分化距离,缺少和不确定的位点在计算中被省略,Bootstrap 置信值估算次数 1000 次。

**1.2.4 酶活测定:** 将接种菌株在液体培养基培养后, 12000 r/min 离心 20 min, 取上清液作为粗酶液。参照文献[5]的方法测定酯酶酶活力。1 个酶活力单位定义为每 1 分钟释放 1  $\mu\text{mol}$  对硝基苯所需要的酶量。相对酶活力定义为: 处理样品的酶活力与最大酶活力的百分比。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的筛选

利用筛选平板从生产海盐的卤水池中分离到 155 株中度嗜盐菌菌株,其中在筛选平板上产生乳白色水解晕圈的菌株 73 株,根据 HC 值的大小,选择 10 株高效降解 Tween 20 的菌株进行摇瓶复筛(见图 1)。

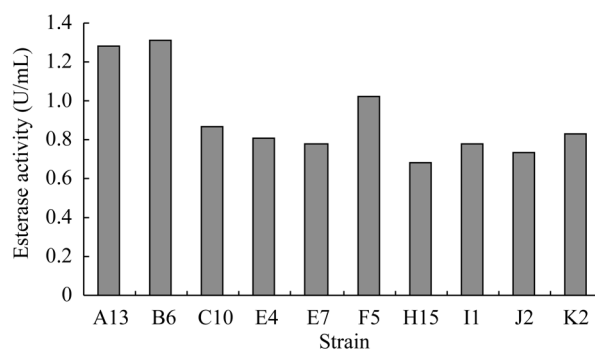


图 1 10 株产酯酶菌株摇瓶复筛后酯酶活力的测定结果  
Fig. 1 The results of esterase activity from 10 Tween 20-degrading strains

其中, DF-B6 菌株较其它菌株能够在较广的培养条件下(pH 7~11、温度 22°C~40°C、1%~12% NaCl 浓度)降解 Tween 20(结果略), 因此选定其作进一步的分类鉴定。

## 2.2 DF-B6 菌株的鉴定

**2.2.1 形态特征:** 菌株在固体培养基上 37°C 倒置培养 3 d 后, 菌落呈乳白色, 圆形, 湿润, 表面光滑, 具有粘性, 不透明, 边缘整齐。电镜下观察(图 2), 弯曲短杆状, 端生鞭毛, 菌体大小约为(0.3  $\mu\text{m}$ ~0.5  $\mu\text{m}$ ) $\times$ (1.4  $\mu\text{m}$ ~1.7  $\mu\text{m}$ )。

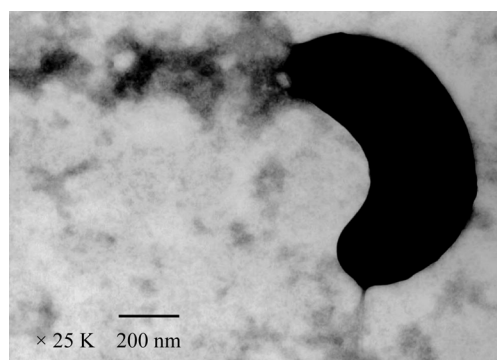


图 2 DF-B6 菌株在透射电子显微镜下的细胞形态

Fig. 2 The cellular morphology of DF-B6 under transmission electron microscope

**2.2.2 生理生化特征:** 革兰氏染色阴性, 严格需氧, 明胶液化阳性,  $\text{H}_2\text{O}_2$  酶阳性, 淀粉酶阴性, 纤维素

酶阴性, 能够利用葡萄糖作为唯一碳源, 但不能够利用蔗糖、乳糖、半乳糖、木糖作为碳源。菌株能够在 0.5%~18% NaCl 范围内生长, 且在 5%~10% 有最佳生长, 0% 及大于 20% NaCl 条件下菌株不生长, 由此确定其为一株中度嗜盐菌<sup>[2]</sup>。

**2.2.3 遗传学特征:** PCR 扩增 16S rDNA 得到大小约 1.5 kb 的 DNA 片段, 将片段回收纯化后测序, 测序结果提交 GenBank(GenBank 登录号为 EU515224), 使用生物软件构建进化树, 结果见图 3。DF-B6 菌株与 *Idiomarina* 属内各种的同源性在 93.27%~98.80% 之间, 系统发育分析归于同一分枝, 结合形态学和生理生化特征, 确定其为 *Idiomarina* 属成员, 命名为 *Idiomarina* sp. DF-B6 菌株。

## 2.3 酯酶的酶学特性

**2.3.1 最适反应温度的确定:** 对硝基苯丁酸酯作为酶反应底物, 改变反应体系的温度条件, 测定不同温度下(30°C~70°C, 间隔 5°C)的酶活力, 以最高值为 100%, 用相对酶活力对温度作图(图 4A)。确定 50°C 为酶反应的最适温度。

**2.3.2 最适反应 pH 的确定:** 配制不同 pH 值的反应缓冲液: 0.05 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6.0~7.0), 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.0~9.0), 0.05 mol/L 甘氨酸-NaOH (pH 9.0~11.0)。反应温度设定为 50°C, 对硝基苯丁酸酯作反应底物, 测定不同 pH 值条件下的酶活力, 以最高值为 100%, 用相对酶活力对 pH

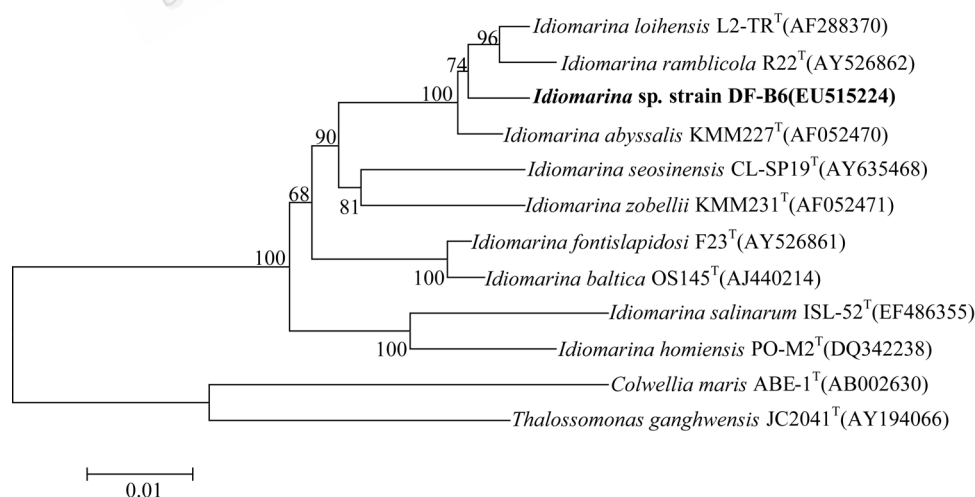


图 3 DF-B6 菌株与 *Idiomarina* 属内各种之间基于 16S rRNA 序列的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences showing the position of strain DF-B6 among the species of the genus *Idiomarina*

Note: *Colwellia maris* ABE-1<sup>T</sup> and *Thalassomonas ganghwensis* JC2041<sup>T</sup> were used as outgroup. The topology of the points are percentages supported by bootstrap evaluation. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers. Bar: 1% estimated sequence divergence.

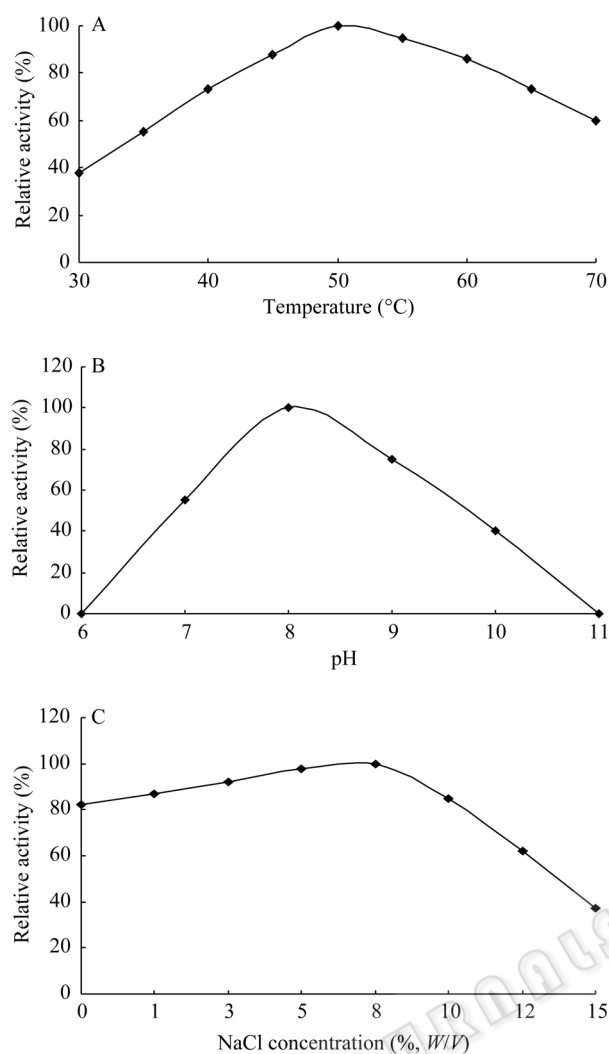


图 4 温度(A)、pH(B)、和 NaCl 浓度(C)对酯酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature(A)、pH(B)、NaCl concentration(C) on the activity of the esterase

值作图(图 4B)。确定酶反应的最适 pH 为 8.0。

**2.3.3 最适反应盐度的确定:** 使用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)配制不同 NaCl 浓度[1%、3%、5%、8%、10%、12%和 15%(W/V)]的反应液, 反应温度为 50°C, 底物为对硝基苯丁酸酯, 测定不同 NaCl 浓度条件下的酶活力, 以最高值为 100%, 用相对酶活力对 NaCl 浓度作图(图 4C)。由图可知, NaCl 浓度为 8%(W/V)时, 相对酶活最高; NaCl 浓度达 12%时, 酶活力仍然保持在 62%左右。

**2.3.4 NaCl 对酶稳定性的影响:** 在 4°C 条件下, 将粗酶液分别置于含不同 NaCl 浓度(0%, 3%, 8%和 12%)的 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液中作用 12 h。间隔 3 h 取样, 测定残余酶活力, 底物为对硝

基苯丁酸酯。由图 5A 可知, 粗酶在含不同 NaCl 浓度的缓冲液中放置 12 h, 对粗酶的稳定性影响甚微。

**2.3.5 pH 对酶稳定性的影响:** 在 4°C 条件下, 将粗酶液分别置于不同 pH 值的缓冲液(pH 7.0~10.5)中作用 12 h。然后测定残余酶活力, 底物为对硝基苯丁酸酯。结果显示: 在 pH 7~10.5 的缓冲液中作用 12 h, 粗酶稳定性好(图 5B)。

**2.3.6 温度对酶稳定性的影响:** 将粗酶液分别置于 60°C、70°C 和 80°C 的水浴, 作用 60 min, 测定残余酶活力, 底物为对硝基苯丁酸酯。由图 5C 可知, 粗酶在 60°C 作用 60 min, 酶活基本没有损失; 70°C 作用 1 h 后仍能够保持高达 51%的酶活力; 80°C 对酶的稳定性影响较大, 15 min 后酶活丧失过半。实验结果初步表明, DF-B6 菌株产生的酯酶热稳定性较高。

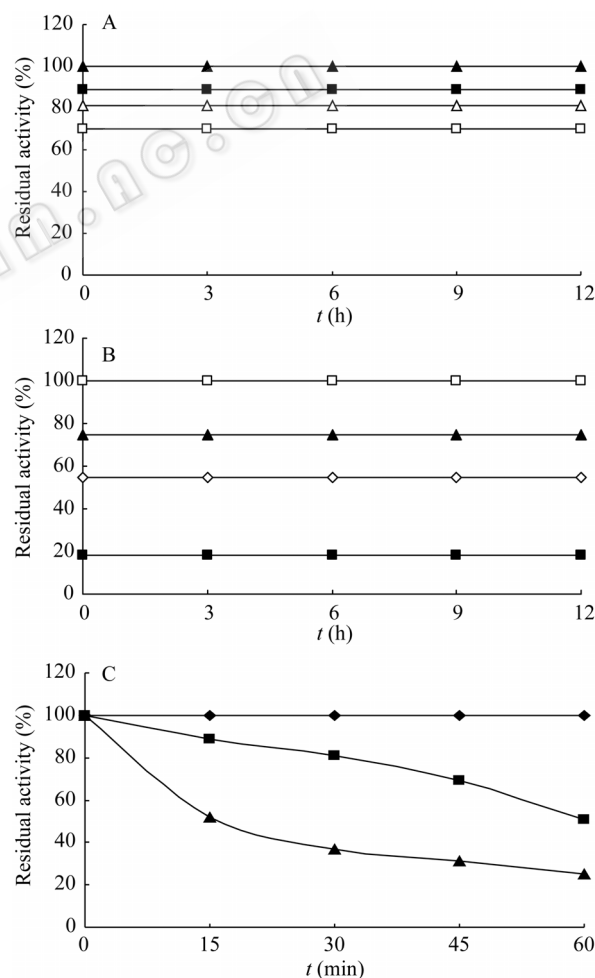


图 5 不同 NaCl 浓度、pH 和温度对酯酶稳定性的影响  
Fig. 5 Effect of NaCl (A), pH(B), and temperature(C) on stability of the esterase

Note: A: NaCl: 0% ( $\Delta$ ), 3% ( $\square$ ), 8% ( $\blacktriangle$ ), 12% ( $\circ$ ); B: pH: 7:  $\square$ ; 8:  $\blacksquare$ ; 9:  $\circ$ ; 10.5:  $\blacktriangle$ ; C: temperature: 60°C ( $\blacklozenge$ ), 70°C ( $\circ$ ), 80°C ( $\blacktriangle$ ).

**2.3.7 金属离子对酶活力的影响:** 在 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液中分别加入不同种类金属离子母液, 使各金属离子终浓度均为 10 mmol/L, 反应温度为 50°C, 对硝基苯丁酸酯为酶反应底物, 测定相对酶活。以未加金属离子的酶活定义为 100%, 用相对酶活力对金属离子作图(图 6)。由图可知,  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 和 $Mn^{2+}$ 对酯酶有激活作用, 而 $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 和 $Cu^{2+}$ 则对酯酶有抑制作用。

**2.3.8 底物特异性检测:** 在含 8% NaCl 的 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液中分别加入不同碳原子长度的对硝基苯酯类物质或橄榄油作为反应底物, 然后加入酶液, 反应温度设为 50°C, 测定酶与不同底物反应的特异性, 以最高值为 100%, 用相对酶活力对不同底物作图(图 7)。结果表明, 酶对碳原子数目 < 10 的对硝基苯酯类底物反应特异性相对较高, 而对碳原子数目 > 10 的底物反应特异性很低, 其中与

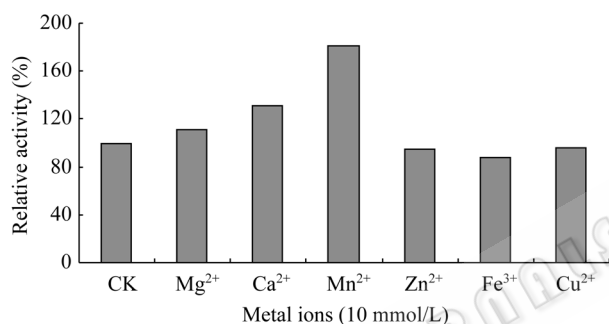


图 6 各种金属离子对酯酶活力的影响

Fig. 6 Effects of metal ions on the esterase activity

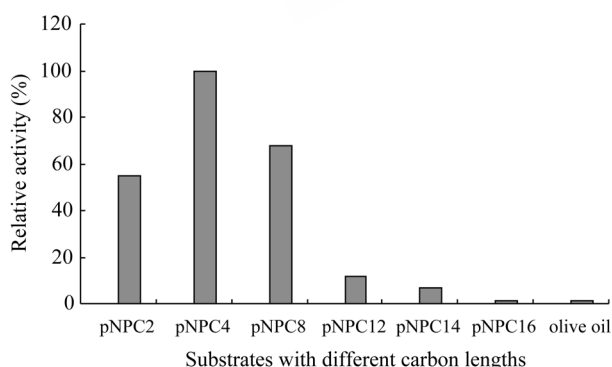


图 7 酯酶对底物碳原子长度反应特异性检测

Fig. 7 Fatty acid specificity of the esterase

硝基苯棕榈酸酯和橄榄油的酶活力几乎为零。据此判定此酶为酯酶, 而非脂肪酶<sup>[6]</sup>。2008 年 Mohammad 等人<sup>[7]</sup>对一株产脂肪酶的嗜热嗜盐菌进行了菌株分类鉴定及脂肪酶酶学性质的研究, 目前国内外尚未有相关中度嗜盐菌酯酶文献报道。

### 3 结论

1) 从黄海海岸晒盐场的卤水池中分离到一株高产酯酶的中度嗜盐菌, 经鉴定确定其为 *Idiomarina* 属成员。

2) 本研究首次对中度嗜盐菌产生酯酶的部分酶学性质进行了研究, 为今后进一步将其用于高盐有机废水的生物处理奠定了基础。

### 参 考 文 献

- [1] 施安辉, 周 波. 酯酶的微生物类群、酯化特性及其应用前景. 中国酿造, 2002, 6: 14-16.
- [2] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology Molecular Biology Review*, 1998, 62(2): 504-544.
- [3] Liu WY, Zeng J, Wang L, et al. *Halobacillus dabanensis* sp. nov. and *Halobacillus aidingensis* sp. nov., isolated from salt lakes in Xinjiang, China. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(5): 1991-1996.
- [4] 卢伟东, 赵百锁, 冯德芹, 等. 嗜盐芽孢杆菌 D8 基因文库的构建及甘氨酸甜菜碱转运蛋白 *betH* 基因的筛选. 微生物学报, 2005, 45(3): 451-454.
- [5] Rhee JK, Ahn DG, Kim YG, et al. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Applied Environmental Microbiology*, 2005, 71(2): 817-825.
- [6] Seligman AM. Concerning overlapping activities of related hydrolases and their inconvenience to scientific study. *The Histochemical Journal*, 1972, 4(6): 561-562.
- [7] Mohammad AA, Ensieh S, Khosro K, et al. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2. *Journal of Basic Microbiology*, 2008, 48(3): 160-167.