

一株产乙酰酯酶细菌筛选、鉴定及酶学性质研究

陈静¹ 邢岩² 周皓芹² 佟金^{2,3} 陈玉香^{2,3*}

(1. 北京物资学院物流学院 北京 101149)

(2. 吉林大学 生物与农业工程学院 吉林 长春 130022)

(3. 吉林大学 工程仿生教育部重点实验室 吉林 长春 130022)

摘要:【目的】利用筛选培养基,从肉牛瘤胃液中分离筛选产乙酰酯酶的细菌菌株,并研究菌株的产酶特征。【方法】利用厌氧培养技术,以木质素为唯一碳源,筛选并驯化所得菌株。根据菌株 16S rDNA 序列分析、革兰氏染色、伊红美蓝培养基培养、甲基红试验和柠檬酸盐利用试验,鉴定菌株。采用对-硝基苯乙酯测定酶活力。【结果】筛选得到产乙酰酯酶活力较高细菌菌株 RB1,初步鉴定为 *Escherichia coli*。菌株 RB1 的生长曲线表明,0-42 h 为菌株的延迟期,42-60 h 为菌株的对数期,60-66 h 为菌株的稳定期,66-86 h 为菌株的衰亡期。菌株所产乙酰酯酶最适温度为 40 °C,最适 pH 为 8.0,在最适温度与 pH 条件下,培养基中添加玉米秸秆粉,乙酰酯酶最高酶活力达到 0.52 U/mL。【结论】筛选获得产乙酰酯酶的细菌菌株 RB1,其乙酰酯酶活力高于已报道的菌株,是一株具有研究和应用潜力的产乙酰酯酶的菌株。

关键词: 乙酰酯酶, 筛选, 鉴定, 酶学性质

Isolation, identification and enzyme characteristics of a strain producing acetylerase

CHEN Jing¹ XING Yan² ZHOU Hao-Qin² TONG Jin^{2,3} CHEN Yu-Xiang^{2,3*}

(1. Logistics college, Beijing Wuzi University, Beijing 101149, China)

(2. College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun, Jilin 130022, China)

(3. Key Laboratory of Bionic Engineering, Jilin University, Ministry of Education, Changchun, Jilin 130022, China)

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(No. 20110723); 吉林大学基本科研业务费专项资金项目(No. 2009.12-2011.12); 吉林大学“985 工程”项目(No. 450091001009); 国家自然科学基金项目(No. 31101337)

*通讯作者: ✉: chen@jlu.edu.cn

收稿日期: 2011-10-12; 接受日期: 2011-12-12

Abstract: [Objective] The aim of this study was to screen acetylsterase-producing strain and to investigate its characteristics. **[Methods]** Anaerobic culture technique was used in screening and acclimatization of strain, and alkali lignin was a sole carbon source. The strain was identified by analyzing the sequence of 16S rDNA, Gram staining, Eosin Methylene Blue test, Methyl red test, and citrate utilization test. Acetylsterase was determined by ethyl p-nitrobenzoate. **[Results]** Acetylsterase-producing strain RB1 was isolated from rumen fluid of beef. It was identified as *Escherichia coli*. The growth curve showed that 0–42 h was lag phase, 42–60 h was log phase, 60–66 h was stationary phase, and 66–86 h was death phase. The optimum temperature for the acetylsterase was 40 °C, and the optimum pH was 8.0. The highest enzyme activity was 0.52 U/mL under optimum temperature and pH, and corn stover powder as a carbon source. **[Conclusion]** Strain RB1 was an acetylsterase-producing strain with application potential.

Keywords: Acetylsterase, Isolation, Identification, Enzyme characteristics

半纤维素是仅次于纤维素的第二大类植物多糖,由木糖、阿拉伯糖等单元构成的不均一多糖。在大多数植物细胞壁中,半纤维素以木聚糖为骨架,木糖残基的 C-2 或者 C-3 均有不同程度乙酰化,大约每 10 个木糖残基就有 7 个被乙酰化^[1]。由于其结构复杂性,导致其降解比纤维素困难,半纤维素降解涉及到多种酶的协同作用,例如,β-内切木聚糖酶、β-木糖苷酶、乙酰酯酶等。乙酰基的存在导致内切木聚糖酶水解作用被抑制,乙酰酯酶(Acetylsterase, EC 3.1.1.6)在半纤维素降解过程,水解木糖残基的乙酰酯键,将半纤维素的部分侧链水解去除,减小木聚糖主链降解时酶作用的空间位阻效应。在木质纤维素糖化过程中,乙酰酯酶与其他半纤维素酶具有协同作用,优化乙酰酯酶和木聚糖酶的协同作用,可以提高糖化效率^[2]。产乙酰酯酶的微生物主要有 *Penicillium* 属^[3]、*Neocallimastix* 属^[4]、*Trichoderma* 属、*Aspergillus* 属、*Streptomyces* 属、*Fibrobacter* 属等^[5]。具体微生物例如 *Penicillium notatum*^[3]、*Neocallimastix frontalis*^[4]、*Trichoderma reesei*、*Aspergillus awamori*、*A. niger*、*A. oryzae*、*Schizophyllum commune*、*Fibrobacter succinogenes*^[6], 大多数为真菌,只有少数为细菌。目前关于半纤

维素酶系的研究集中于降解半纤维素主链的木聚糖酶和 β-1,4 木糖苷酶^[1],而对降解侧链的酶例如乙酰酯酶研究较少,这主要是由于乙酰酯酶在天然微生物中含量低,缺乏适宜底物^[5],导致对乙酰酯酶的研究工作相对于纤维素酶系和木聚糖酶较晚。本研究从肉牛瘤胃液筛选降解木质素厌氧微生物工作过程中,得到一株产乙酰酯酶细菌菌株,研究了该菌株所产乙酰酯酶的酶学特征,旨在为乙酰酯酶的应用提供一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

瘤胃液收集于吉林省皓月集团新鲜屠宰的肉牛,存放于预先灭菌保温瓶,迅速带回实验室,四层纱布过滤,滤液作为筛选菌株的微生物来源。所用化学试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基: 富集培养基(1 L): 缓冲液 A 165 mL, 缓冲液 B 165 mL, 无细胞瘤胃液 170 mL, NaHCO₃ 5.0 g, 蛋白胨 1.0 g, 酵母浸膏 1.5 g, 葡萄糖 1.0 g, L-半胱胺酸盐 1.5 g, 0.1 g/L 刃天青溶液 1.0 mL, 调节 pH 7.0。

缓冲液 A: 每 100 mL 含有 KH₂PO₄ 0.3 g、

(NH₄)₂SO₄ 0.3 g、NaCl 0.6 g、CaCl₂·2H₂O 0.04 g、MgSO₄·7H₂O 0.06 g;

缓冲液 B: 每 100 mL 含有 K₂HPO₄·3H₂O 0.4 g。

无细胞瘤胃液是将新鲜瘤胃液 8 000 ×g 离心 10 min 所得到的上清液。

筛选培养基(1 L): 缓冲液 A 165 mL, 缓冲液 B 165 mL, 无细胞瘤胃液 170 mL, NaHCO₃ 5.0 g, 碱木质素粉 1.0 g, 琼脂 20 g, 0.1 g/L 刃天青溶液 1.0 mL, 调节 pH 7.0。在筛选培养基中添加放线菌酮(0.05 g/L)和制霉菌素(200 U/mL)抑制真菌生长, 分离细菌菌株。

驯化培养基(1 L): 缓冲液 A 165 mL, 缓冲液 B 165 mL, 无细胞瘤胃液 170 mL, 碱木质素粉 1.0 g, L-半胱氨酸盐酸盐 1.5 g, 0.1 g/L 刃天青溶液 1.0 mL, 调节 pH 7.0。以上所有培养基均在 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.2.2 筛选方法: 样品富集: 将收集新鲜瘤胃液置于预先灭菌的保温瓶, 四层纱布过滤, 滤液作为筛选菌种来源。取 1 mL 瘤胃液接种于 9 mL 富集培养基, 制成 10⁻¹ 稀释液, 厌氧瓶内充入氮气和 CO₂, 39 °C 厌氧培养箱内恒温培养 3 d。

筛选: 取富集后的培养液用无菌水分别稀释至 10⁻²、10⁻⁴ 和 10⁻⁶ 倍, 涂布于筛选培养基平板, 充入氮气和 CO₂, 密封, 置于厌氧培养箱内 39 °C 恒温培养 3 d。待长出菌落后, 选取稀释倍数最高的平板, 挑取单菌落于筛选培养基上反复划线培养, 得到单菌落。

驯化培养: 将筛选得到单菌落, 接种于装有 70 mL 驯化培养基的厌氧发酵瓶内, 瓶内充入氮气和 CO₂, 39 °C 厌氧培养箱培养, 培养 3 d 转接至新鲜培养基内, 转接一次为一代。

1.2.3 菌株分子生物学鉴定: 菌种鉴定委托生工生物工程(上海)有限公司完成。具体方法如下: SK1201-UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA, PCR 扩增 16S rDNA, 上

游引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 下游引物: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', PCR 扩增体系为: 细菌总基因组 10 pmol, 10 μmol/L 上下游引物各 1 μL, dNTPs (10 mmol/L each) 1 μL, Taq 酶(5 U/μL) 0.25 μL, 10×Taq reaction buffer 5 μL, 加入 ddH₂O 补足 50 μL。回收 PCR 产物, 测序, 利用 BLAST 软件分析序列结果, 与 GenBank 的已知基因序列对比, 绘制系统发育树。

1.2.4 菌株特征: 进行了菌株的革兰氏染色试验、伊红美蓝培养基培养、甲基红试验和柠檬酸盐利用试验。

1.2.5 菌株生长曲线测定: 将驯化后得到的单菌落, 接种于装有 100 mL 完全培养基的厌氧发酵瓶内, 从接种后每隔 2 h 测定 630 nm 处的吸光度值。

1.2.6 乙酰酯酶酶活力动态与酶活力测定: 采用完全培养基, 加入粉碎至 40 目的玉米秸秆粉(10 g/L), 接种 RB1, 厌氧培养箱 39 °C 培养, 每天取样测定乙酰酯酶活力。同时以不接种 RB1 的同步培养的培养基作为空白对照。乙酰酯酶活力测定方法: 将不同发酵时间的发酵液 4 °C、2 000×g 离心, 上清即为粗酶液。粗酶液稀释 6 倍, 底物为 2 mmol/L 对-硝基苯乙酯, 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)。向 50 μL 粗酶液中加入 100 μL 磷酸钠缓冲液和 50 μL 底物, 39 °C 反应 30 min, 在 415 nm 波长处测定吸光度^[7]。1 个酶活力单位(U)定义为 1 mL 酶液在 1 min 内从底物生成 1 μmol 对-硝基苯所需要的酶量。每个处理均设置 3 个重复试验。

1.2.7 乙酰酯酶最适 pH 及 pH 稳定性: 使用 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH 4.0–5.0), 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 6.0–8.0)和 50 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 9.0–10.0)代替 1.2.6 中所使用缓冲液, 其他条件相同, 测定在各个 pH 条件下乙酰酯酶活力, 计算相对酶活力^[7]。乙酰酯酶 pH 稳定性测定参考文献[7]。

1.2.8 乙酰酯酶最适温度及温度稳定性: 以 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C 和 45 °C 代替 1.2.6 中的反应温度, 其他条件相同, 测定在各个温度条件下的乙酰酯酶活力, 计算相对酶活力^[7]。乙酰酯酶温度稳定性测定时将粗酶液置于 40 °C 恒温条件下, 分别在 1、3、5、7 和 9 h 后测定酶活力, 测定方法参照文献[7]。

1.2.9 金属离子对乙酰酯酶活力影响: 金属离子对酶活力影响的实验方法参照文献[7]。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

将第一次采用筛选培养基培养后得到的单菌落, 反复划线培养, 得到的单菌落依次命名为 RB1、RB2、RB3、RB4、RB5 和 RB6。将这些单菌落采用驯化培养基进行驯化培养, 培养 16 代后保藏。本文详细研究了菌株 RB1 所产乙酰酯酶特征。

2.2 菌株 RB1 的鉴定

2.2.1 菌株分子生物学鉴定: 为确定 RB1 菌株种属, 分析该菌株的 16S rDNA, 对其 16S rDNA 扩

增, 测序, 将测定结果与 GenBank 中已知序列对比。通过 BLAST 在 NCBI 数据库中搜索, 构建系统发育树, 结果如图 1 所示。菌株 RB1 16S rDNA 序列与 *Escherichia coli* 的同源性达到 99% 以上, 初步确定 RB1 为 *Escherichia coli*。根据文献报道, 产乙酰酯酶的微生物主要有 *Penicillium notatum*^[3]、*Neocallimastix frontalis*^[4]、*Trichoderma reesei*、*Schizophyllum commune*、*Aspergillus awamori*、*A. niger*、*A. oryzae*、*Fibrobacter succinogenes*^[6], 大部分为真菌。而关于细菌产乙酰酯酶的报道相对较少, 本文研究了细菌菌株 RB1 所产乙酰酯酶的性质。

2.2.2 菌株 RB1 特征: 革兰氏染色结果表明, RB1 为革兰氏阴性, 杆状细菌。菌株 RB1 在伊红美蓝培养基上的特征为紫色、光滑、湿润的圆形菌落(图 2)。菌株 RB1 甲基红试验结果为阳性(图 3)。柠檬酸盐利用试验结果表明, 菌株 RB1 不能利用柠檬酸盐, 在该培养基上不生长。以上试验结果均为 *Escherichia coli* 的典型特征。

2.3 菌株生长曲线

RB1 菌株生长曲线如图 4 所示。0-42 h 为菌

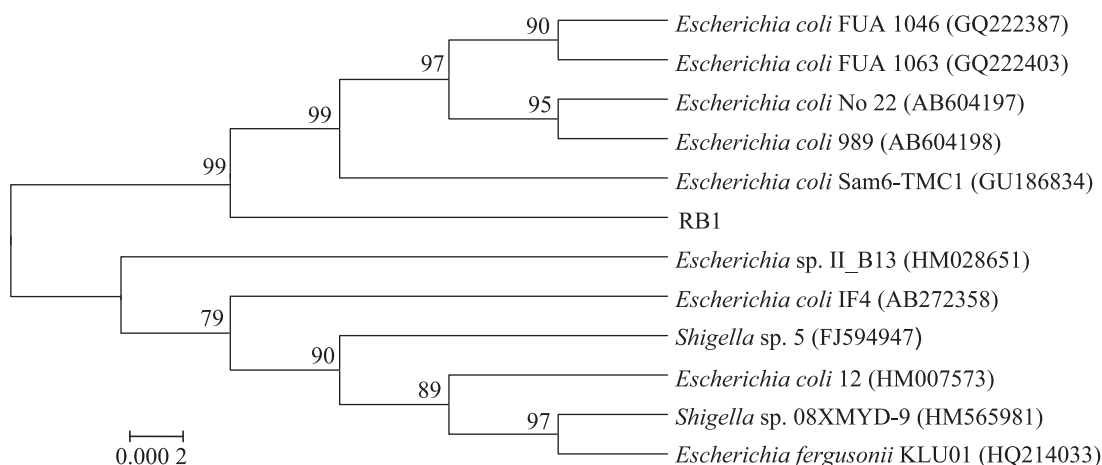


图 1 菌株 RB1 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain RB1

注: 括号中的序号代表序列 GenBank 中登录号; 分支点数字代表步长值; 标尺代表序列间分歧度。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on neighbor-joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.000 2 represents sequence divergence.

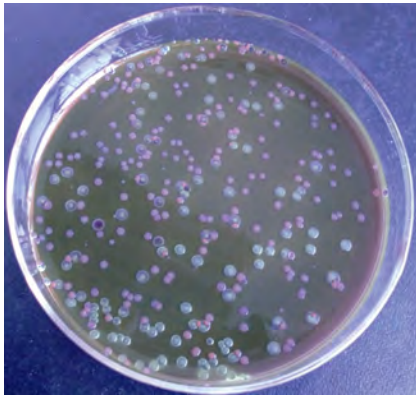


图2 菌株 RB1 伊红美蓝试验
Fig. 2 Eosin Methylene Blue test of RB1

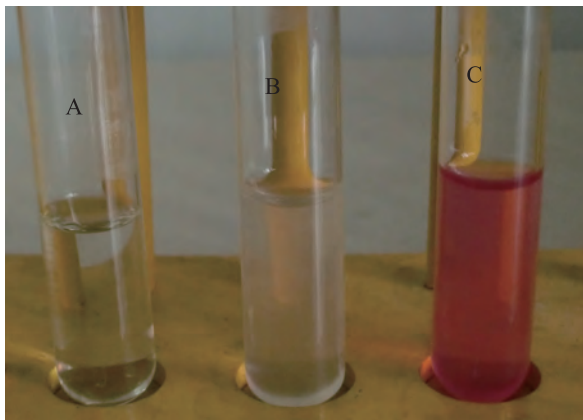


图3 菌株 RB1 甲基红试验
Fig. 3 Methyl red test of RB1

注: A: 未接种 RB1 培养基; B: 接种 RB1 未加甲基红; C: 接种 RB1 加入甲基红。

Note: A: Medium; B: Medium+RB1; C: Medium+RB1+Methyl red.

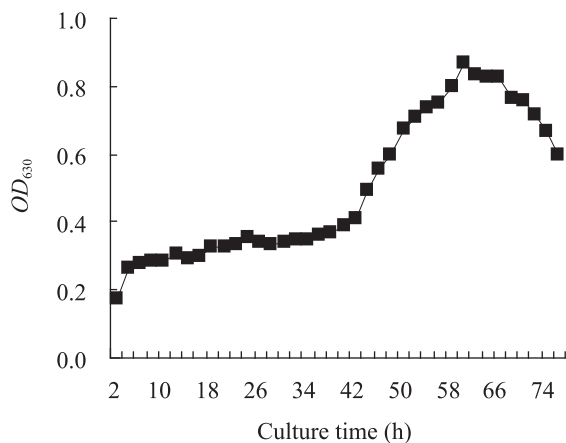


图4 RB1 生长曲线
Fig. 4 Growth curve of strain RB1

株的延迟期, 42–60 h 为菌株的对数期, 60–66 h 为菌株的稳定期, 66–86 h 为菌株的衰亡期。菌株 RB1 生长曲线与 *Escherichia coli* 好氧条件下生长曲线差异较大, 原因可能如下: 本文的试验是在严格厌氧条件下进行的, *Escherichia coli* 是兼性厌氧菌, 在好氧条件下, 通过呼吸作用产能, 而在厌氧条件下, 通过发酵作用产能, 厌氧条件导致其产能效率较低, 生长缓慢。

2.4 乙酰酯酶活力动态变化

RB1 乙酰酯酶活力动态变化如图 5 所示。液体深层培养期间, RB1 乙酰酯酶活力变化趋势是, 先增大, 在培养至第 3 天时, 达到最高酶活力, 为 0.47 U/mL, 到第 4 天时开始下降。菌株 RB1 所产乙酰酯酶活力高于曹阳春等报道的瘤胃厌氧真菌 *Neocallimastix frontalis* 所产乙酰酯酶活力^[4], *Neocallimastix frontalis* 所产乙酰酯酶活力最高为 0.165 U/mL。菌株 RB1 在最适 pH 8.0、最适合温度 40 °C 条件下, 培养时添加玉米秸秆粉, 乙酰酯酶最高酶活力达到 0.52 U/mL, 这与文献报道的 *Streptomyces* sp. PC22 所产乙酰酯酶比较, 活力较高, *Streptomyces* sp. PC22 以桦木木聚糖(Birchwood xylan)为碳源培养, 最高酶活力达到 0.3 U/mL 左右^[8], 出现在第 3 天, 然

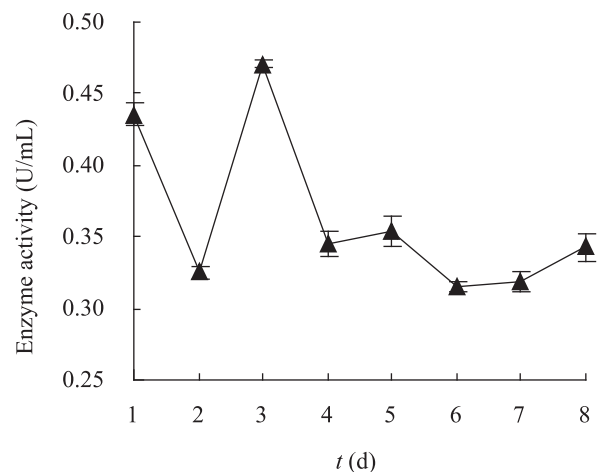


图5 乙酰酯酶活力动态
Fig. 5 Time courses of acetyl esterase production

后开始下降,产乙酰酯酶的趋势与 RB1 相似。秸秆粉可能是菌株 RB1 产乙酰酯酶的一种诱导物。Yue 等研究了瘤胃厌氧真菌 *Neocallimastix* sp. YQ2 所产乙酰酯酶特征^[9],乙酰酯酶最高酶活力达到 0.018 U/mL,低于 RB1 所产乙酰酯酶活力。

2.5 乙酰酯酶最适 pH 及 pH 稳定性

pH 对酶活力影响如图 6A 所示。菌株 RB1 所产乙酰酯酶的最适 pH 为 8.0, 适合 pH 范围较窄, 在 pH 7.0 时, 相对活力只有 30%, 而 pH 9.0 时, 相对活力只有 2%。乙酰酯酶的 pH 耐受范围较窄(图 6B), 将乙酰酯酶与不同 pH 缓冲液在 39 °C 条件下保温 1 h 后测定酶活力, 发现在 pH 6.0 条件下酶相对活力只有 4%, 而在 pH 7.0 条件下酶相对活力只有 30%左右, pH 9.0 条件下保温 1 h 后, 酶几乎完全失活。

Streptomyces sp. PC22 所产乙酰酯酶的最适 pH 为 6.5–7.0^[8], 低于 RB1 所产乙酰酯酶的最适 pH。Basaran 和 Hang 关于 *Candida guilliermondii* 乙酰酯酶的研究表明, 最适合 pH 为 7.5^[6], 略低于本研究菌株所产乙酰酯酶。Blum 等将厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. PC-2 的产乙酰酯酶基因转入大肠杆菌, 重组大肠杆菌表达乙酰酯酶, 最适 pH

为 9.0^[10], 高于本文研究的乙酰酯酶。Degrassi 等研究了 *Bacillus pumilus* 所产乙酰酯酶, 最适 pH 为 8.0^[11], 与菌株 RB1 所产乙酰酯酶的相同。*Schizophyllum commune* 所产乙酰酯酶的最适 pH 为 7.7^[12], 与菌株 RB1 的接近。不同来源乙酰酯酶表现出不同的最适 pH。

菌株 RB1 乙酰酯酶的 pH 耐受范围较窄, pH 从 8.0 上升到 9.0, 酶活力迅速丧失。*Streptomyces* sp. PC22 所产乙酰酯酶从 pH 5.0 到 pH 9.0 基本稳定, pH 耐受范围较宽^[8], *Candida guilliermondii* 乙酰酯酶在 pH 5.8–8.0 之间基本稳定^[6], *Schizophyllum commune* 乙酰酯酶在 pH 6.2–8.5 之间酶活力保持正常^[12]。

2.6 乙酰酯酶最适温度及温度稳定性

温度对乙酰酯酶活力影响如图 7A, 从图中可以看出, RB1 乙酰酯酶最适温度为 40 °C。瘤胃厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. PC-2 乙酰酯酶的最适温度为 30 °C^[10], 菌株 RB1 乙酰酯酶最适温度为 40 °C。同样来源于瘤胃的微生物, 不同种微生物所产乙酰酯酶的最适温度差别较大。乙酰酯酶的温度耐受性试验结果如图 7B, 在 40 °C 恒温条件下, 保温不同时间后测定酶活力, 发现在 40 °C

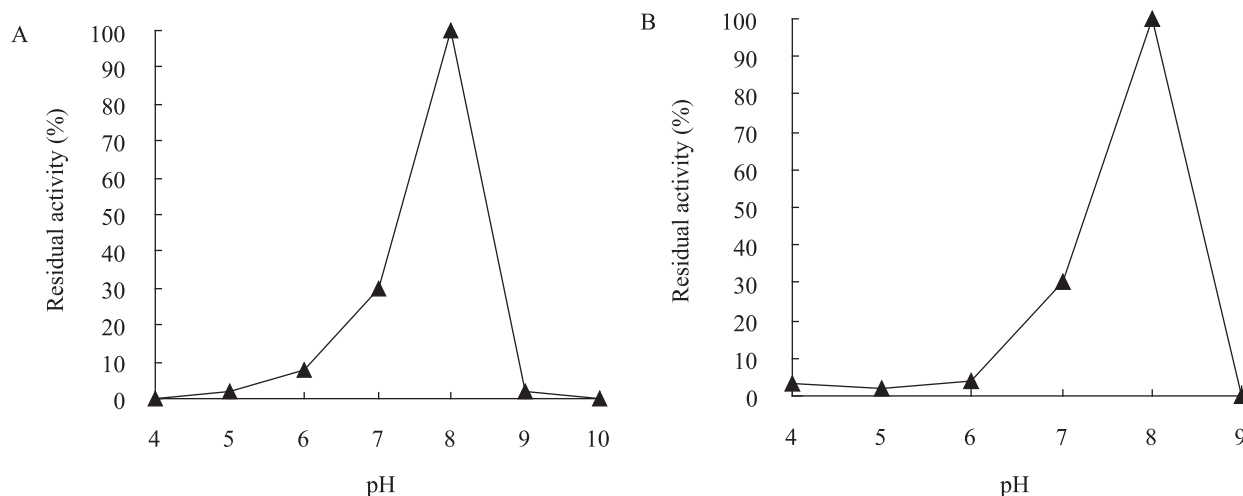


图 6 pH 对酶活性影响(A)及乙酰酯酶 pH 稳定性(B)

Fig. 6 Effect of pH on enzyme activity (A) and stability of enzyme under different pH (B)

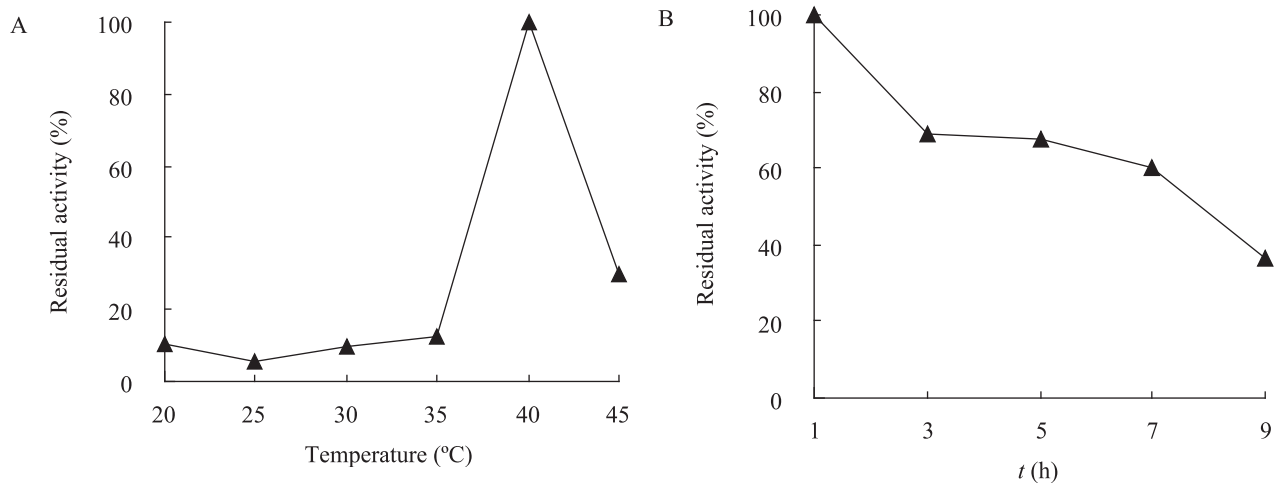


图 7 温度对酶活力影响(A)及乙酯酶温度稳定性(B)

Fig. 7 Effect of temperature on enzyme activity (A) and stability of enzyme under different temperature (B)

保温 7 h 后, 酶仍然保持 60% 以上的酶活力。Chungool 等对 *Streptomyces* sp. PC22 所产乙酯酶研究结果表明, 最适合温度为 50 °C^[8], 高于菌株 RB1 产乙酯酶。*Streptomyces* sp. PC22 所产乙酯酶能够耐受 60 °C 温度。RB1 乙酯酶活力较高, 但是最适温度和 pH 范围较窄, 对于应用于生产实际还需要进一步研究。

2.7 金属离子对乙酯酶活力影响

金属离子对酶活力的影响如表 1 所示。从表 1 可以看出, K^+ 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 对乙酯酶活性具有激活作用, 激活作用尤其明显的是 Fe^{2+} , 酶相对活力达到 362%, 而试验中其他金属离子均抑制乙酯酶活力, Zn^{2+} 几乎使酶完全失活。

Halgašová 等研究了金属离子对 *Schizophyllum commune* 所产乙酯酶活力影响^[12], 0.1 mmol/L Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 抑制酶活力, 酶活力下降 17% 左右, 0.5 mmol/L Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 抑制乙酯酶活力, 抑制作用最强的是 Fe^{2+} , 酶活力下降 70% 左右, 1 mmol/L Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 明显抑制酶活力, 酶活力下降 85%, 尤其是 Cu^{2+} , 使酶完全失活。而本文研究的乙酯酶, K^+ 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 对乙酯酶活性具有激活作用, Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 抑制作用较明显, 两种来源的乙酯酶, Zn^{2+}

都抑制其酶活力, 对于 *Schizophyllum commune* 乙酯酶 Fe^{2+} 有明显抑制作用, 而对 RB1 来源乙酯酶则 Fe^{2+} 具有较强激活作用, Fe^{2+} 对于两种来源的乙酯酶作用方式不同。Degrassi 等研究 *Bacillus pumilus* 乙酯酶, 10 mmol/L Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 明显抑制其活力, 抑制作用最强的是 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} ^[11]。对于 RB1 所产乙酯酶, Fe^{3+} 具有激活作用, Cu^{2+} 具有一定抑制作用, 但是仍能保持 70% 左右酶活力, 而 Zn^{2+} 则完全抑制乙酯酶活力。Yue 等研究了金属离子对瘤胃厌氧真菌 *Neocallimastix* sp. YQ2 所产乙酯酶活力的影响, 发现 Fe^{2+} 对乙酯酶具有明显抑制作用^[9]。综合文献报道及本文研究结果, 即使是来源于瘤胃微生物所产乙酯酶, Fe^{2+} 表现出激活或者抑制作用, 而 Zn^{2+} 均表现为抑制作用。

3 结论

从肉牛瘤胃液中分离得到一株产乙酯酶细菌菌株 RB1, 分析其 16S rDNA 序列, 革兰氏染色、伊红美蓝培养基培养、甲基红试验和柠檬酸盐利用试验, 初步确定 RB1 为 *Escherichia coli*。菌株产酶动态为先逐渐增高, 第 3 天酶活力达到最高, 然后开始下降。该菌株所产乙酯酶最适

表1 金属离子对乙酰酯酶活性影响
Table 1 Effect of metal ions on the activity of acetyl esterase

金属离子 Metal ions	相对酶活力 Relative activity (%)
Ni ²⁺	18
Mg ²⁺	69
Zn ²⁺	0
K ⁺	121
Fe ²⁺	362
Cu ²⁺	72
Co ²⁺	21
Ca ²⁺	111
Mn ²⁺	99
Fe ³⁺	128
CK	100

温度为 40 °C, 最适 pH 为 8.0, 最高酶活力达到 0.52 U/mL, 通过与发表文献对比, 该菌株所产乙酰酯酶活力相对较高。乙酰酯酶与其他半纤维素酶协同作用, 在木质纤维素的生物降解、造纸制浆、反刍动物粗饲料加工等领域具有广泛的应用前景^[13]。本研究筛选得到的菌株 RB1 初步鉴定为 *Escherichia coli*, 据文献报道, *Escherichia coli* O157-H7 在好氧与厌氧条件下, 存活时间长短不同, 在厌氧条件下, 存活时间更长, 在好氧与厌氧条件下, 与其他微生物的竞争能力不同, 在厌氧条件下, 竞争能力更强^[14]。本研究得到的菌株也应该进行好氧与厌氧条件下产酶活力及存活能力的对比试验, 为菌株的进一步应用提供理论基础。

参 考 文 献

[1] 刘士清, 李文鹏, 孙传伯, 等. 产生木聚糖酶的兼性厌氧菌的生物学特性与酶的酶学特征[J]. 现代农业科技, 2007, 24: 188-192.

[2] Selig MJ, Adney WS, Himmel ME, et al. The impact of cell wall acetylation on corn stover hydrolysis by cellulolytic and xylanolytic enzymes[J]. Cellulose, 2009, 16(4): 711-722.

[3] Atta S, Ali S, Akhtar MN, et al. Determination of some significant batch culture conditions affecting acetyl-xylan esterase production by *Penicillium*

notatum NRRL-1249[J]. BMC Biotechnology, 2011, 11(5): 52.

[4] 曹阳春, 杨红建, 沈博通. 高产纤维降解酶牦牛瘤胃厌氧真菌分离株的筛选与鉴定[J]. 中国农业大学学报, 2010, 15(3): 70-74.

[5] 曹杰. 草菇乙酰木聚糖酯酶的重组表达及其酶学特性[D]. 南京: 南京林业大学硕士学位论文, 2007.

[6] Basaran P, Hang YD. Purification and characterization of acetyl esterase from *Candida guilliermondii*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2000, 30(2): 167-171.

[7] 杨红建, 岳群, 曹阳春. 荷斯坦阉牛瘤胃液中阿魏酸酯酶和乙酰酯酶的酶学特性研究[J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(1): 73-78.

[8] Chungool W, Thongkam W, Raweesri P, et al. Production, purification, and characterization of acetyl esterase from *Streptomyces* sp. PC22 and its action in cooperation with xylanolytic enzymes on xylan degradation[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(4): 549-556.

[9] Yue Q, Yang HJ, Cao YC, et al. Feruloyl and acetyl esterase production of an anaerobic rumen fungus *Neocallimastix* sp. YQ2 effected by glucose and soluble nitrogen supplementations and its potential in the hydrolysis of fibrous feedstuffs[J]. Animal Feed Science and Technology, 2009, 153(3): 263-277.

[10] Blum DL, Li XL, Chen HZ, et al. Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(9): 3990-3995.

[11] Degrassi G, Okeke BC, Bruschi CV, et al. Purification and characterization of an Acetyl Xylan Esterase from *Bacillus pumilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 789-792.

[12] Halgašová N, Kutejová E, Timko J. Purification and some characteristics of the acetyl-xylan esterase from *Schizophyllum commune*[J]. Biochemical Journal, 1994, 298(Pt 3): 751-755.

[13] 陈艳. 乙酰木聚糖酯酶的优化表达及催化特性研究[D]. 南京: 南京林业大学硕士学位论文, 2010.

[14] Semenov AV, van Overbeek L, Termorshuizen AJ, et al. Influence of aerobic and anaerobic conditions on survival of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Luria-Bertani broth, farm-yard manure and slurry[J]. Journal of Environmental Management, 2011, 92(3): 780-787.