

产酯酶海洋微生物的筛选、鉴定及系统发育分析

郑鸿飞^{1,2} 孙 谧^{1*} 王跃军¹ 郝建华¹ 高 强¹

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋产物资源与酶工程实验室, 青岛 266071)

(²上海海洋大学食品学院, 201306)

摘要 通过以三丁酸甘油酯和 α -乙酸萘酯为底物, 建立了一种快速、准确的酯酶产生菌的筛选方法, 并从样品中分离到 1 株产酯酶活力和稳定性较高的菌株 EB-1, 对其进行了形态学、生理生化特征鉴定和 16S rDNA 序列分析。结果表明, 该菌株与 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 模式菌株的同源性高达 99.79%; 又根据其产黑色素这一特性, 最终将其确定为 *Bacillus subtilis* var. *niger*, 其 16S rDNA 序列在 GenBank 的注册号为 EU016526。

关键词 海洋微生物 酯酶 16S rDNA 系统发育学分析

中图分类号 Q55 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)03-0068-06

Screening, identification and phylogenetic analysis of marine microorganisms producing extracellular esterase

ZHENG Hong-fei^{1,2} SUM Mi^{1*} WANG Yue-jun¹

HAO Jian-hua¹ GAO Qiang¹

(¹Laboratory of Marine Products and Enzyme Engineering, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²College of Food Science, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT With α -naphthyl acetate and tributyrin as substrate, a precise and rapid screening method was developed. One stable strain-EB-1, which was isolated from related samples, showed the highest esterase-producing ability among the 281 strains. Through study on its morphological, physiological and biochemical characteristics as well as 16S rDNA sequence homology comparison, strain-EB-1 was identified as *Bacillus subtilis* var. *niger*, which was almost the closest relative to the standard strain with 99.79% similarity in sequence under the phylogenetic tree. The 16S rDNA sequence of strain-EB-1 has been deposited in GenBank, registration number was EU016526.

KEY WORDS Marine microorganism Esterase α -Naphthyl acetate
Phylogenetic analysis

国家高技术研究发展(863)计划项目(2007AA091602)和国际科技合作重点计划项目(2005DFA30830)共同资助

* 通讯作者。E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85825265

收稿日期: 2008-03-14; 接受日期: 2008-05-22

作者简介: 郑鸿飞(1981-), 男, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物酶工程研究。E-mail: zhf-0619@163.com

海洋环境包括低温、高温、高静水压、强酸、强碱及营养条件极为贫乏的各种极端环境。微生物要在这种环境中得以适应生存,必须从自身的生理结构、代谢方式及生活行为等各方面发生适应性的改变。因此,从中筛选得到的微生物可能具备某些特殊的生理活性,能够产生特殊的代谢产物,具有重要的应用价值(郭琪等 2005)。

近年来,随着海洋生物技术的兴起和人们对开发海洋资源意识的增强,国内外对海洋微生物及其酶的研究进展很快,寻找具有全新性质的酶已成为国际酶制剂研究的热点,有关海洋微生物产生新型生物酶的报道也逐渐增多,而海洋微生物酯酶就是其中的一个重要方向。

酯酶(Esterase, EC 3. 1. 1. 1), 又称羧酸酯酶, 是一类能够对羧酸酯键作用的水解酶, 可以催化不同底物出发的水解和合成反应。这些反应通常具有较高的底物专一性、区域选择性或对映选择性, 使酯酶成为有机合成中重要的生物催化剂, 广泛地应用于食品、化妆品和医药等领域(何国庆等 2006)。产酯酶的微生物在自然界中分布十分广泛。国外在这个领域的相关研究报道较多, 但国内并不多见。在已报道的可产生酯酶的微生物中, 野生型菌株的酶活都不高, 同时这些酯酶又因其温度和 pH 的稳定性局限而不适应于工业化生产(Faiz *et al.* 2007)。因此, 从海洋微生物中筛选出独具特性的酯酶就成了开发新型工业酶制剂亟待解决的首要问题。

本文根据微生物酯酶的特性, 对产胞外酯酶的海洋微生物进行了分离筛选和菌种鉴定以及系统发育学分析, 为下一步的实验研究奠定了坚实的基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品 及 处 理

样品来源于青岛前海和胶州湾海区; 将样品中的水样和泥样混匀, 取 25 ml 于 10 000 r/min 下离心 30 min, 去上清液, 沉淀用 3 ml 无菌去离子水重悬, 混匀后备用。

1.1.2 培 养 基

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 5.0, 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, NaCl 10.0, pH 7.0; 选择性培养基(g/L): 三丁酸甘油酯乳化液 20.0, 琼脂 20.0, pH 7.0; 检测培养基(g/L)(Prim *et al.* 2000): Rhodamine B 0.002, 橄榄油乳化液 10.0, 琼脂 20.0, pH 7.0。(注: 三丁酸甘油酯和橄榄油均需乳化 6 min; 溶剂均为过滤陈海水。)

1.2 方 法

1.2.1 平 板 法 初 筛

将处理过的样品适当稀释后, 各取一定量涂布于选择性培养基上, 30 ℃ 恒温培养 24~72 h, 每隔 8 h 观察一次结果, 直至出现透明水解圈, 再通过平板划线分离纯化; 依据产生透明圈的早晚和透明圈直径与菌落直径比值的大小分离出活性高且产酶周期短的菌株, 经无菌牙签转接于检测培养基上, 30 ℃ 下再培养 72 h 后, 在 350 nm 紫外下观察水解圈, 如果菌落周围出现橙黄色荧光圈则舍弃, 反之则接种于 LB 固体培养基上保存备用。

1.2.2 摇 瓶 法 复 筛

从 LB 固体培养基上挑取少许菌种, 接入装有 3 ml 发酵培养基的试管中, 36 ℃、200 r/min 条件下摇瓶发酵培养 18 h 进行种子活化; 将种子液接入装有 25 ml 培养基的 250 ml 的三角瓶中, 同样的条件下发酵培养 24 h, 培养后的发酵液在 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 30 min 后, 取上清液测定酶活。

1.2.3 酯 酶 活 力 测 定 法

采用改进过的 α -乙酸萘酯比色法(许学勤等 2004; 禹邦超等 1996)测定酶活。

(1) α -萘酚标准曲线的制作。用蒸馏水将 5% α -萘酚乙醇溶液稀释成不同浓度; 向各试管中分别加入 3.70 ml pH 10 的 Tris-HCl 缓冲液和 50 μ l 不同浓度的 α -萘酚乙醇溶液, 37 ℃ 下振荡反应 15 min; 加入 250 μ l

0.4% 坚牢兰 RR 盐溶液(溶剂为 3.4% SDS),37 °C 下静置 15 min 后,在 595 nm 处测其吸光值,以不加 α -萘酚的空白管调零。以吸光值为纵坐标, α -萘酚浓度为横坐标,制作标准曲线。

(2) 酯酶活力的测定。在试管中依次加入 3.20 ml pH 10 的 Tris-HCl 缓冲溶液、50 μ l 1% α -乙酸萘酯的乙醇溶液和 0.5 ml 稀释后的粗酶液,混匀后在 37 °C 下振荡反应 15 min;加入 250 μ l 0.4% 坚牢兰 RR 盐溶液(溶剂为 3.4% SDS),37 °C 下静置 15 min 后,在 595 nm 处测其吸光值,以不加 α -乙酸萘酯的空白管调零。酶活力定义为:37 °C 条件下,每分钟催化得到 1 μ mol α -萘酚所需的酶量为 1 个酶活单位,即 1 U。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 形态学、生理生化特征鉴定

依据《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)和《常见细菌鉴定手册》(东秀珠等 2001)。

1.3.2 微量 DNA 的提取

采用改进的 CTAB/NaCl 法(赵运胜等 2006)提取菌种的基因组 DNA。

1.3.3 16S rDNA 序列的 PCR 扩增

采用 16S rDNA 通用引物进行扩增,引物如下:

16(+): 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 16(-): 5'-CGGCTACCTTGTTACGAC-3'

1.3.4 PCR 扩增条件

反应体系:模版 DNA 2 μ l,10 \times PCR 缓冲液 10 μ l,dNTPs 8 μ l,Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l,总体积为 100 μ l;循环参数:94 °C 预热 4 min,94 °C 变性 1 min,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,36 个循环,72 °C 延伸 10 min。

1.3.5 16S rDNA 序列扩增产物的测序及系统发育学分析

PCR 产物经 DNA 纯化系统纯化后,由上海生工完成测序工作;将测得的序列在 NCBI 的 Genbank 中进行 Blast 分析,调出相关性较高的核酸序列,与试验菌株一起经 Clustal X 软件进行匹配后,用 Mega 4.0 软件进行分子系统学分析并构建系统树。

2 结果与分析

2.1 α -萘酚标准曲线

经测定, α -萘酚标准曲线解析式为 $A_{595} = 0.6557C$, $R^2 = 0.997$, C 为 α -萘酚的浓度;测定酶活时,根据此解析式可计算产物生成量,由酶活定义换算成酶活力。

2.2 产酯酶菌株的筛选

2.2.1 初筛结果

样品经过选择性培养 24 h 后,分离到目标单菌落 281 个(图 1);经过检测培养后,得到 45 株不产荧光圈的菌株,转接于 LB 固体培养基,4 °C 下保藏备用;其余产生荧光圈的菌落则舍弃(图 2)。这是因为三丁酸甘油酯是酯酶的常用底物,但脂肪酶对其也具有水解作用;脂肪酶优先水解检测平板上的橄榄油(主要成分是三丁酸甘油酯)产生脂肪酸,脂肪酸能与 Rhodamine B 的阳离子发生作用,形成橙黄色的荧光物质,而酯酶却不水解橄榄油(Prim *et al.* 2000);由此可以得到真正的微生物胞外酯酶。

2.2.2 复筛结果

上述 45 株菌株经摇瓶发酵培养后,测定酶活。将酶活力最大者定义为 100,其他与之比较,计算出相对酶活。结果显示,相对酶活大于 80% 的菌株仅有 5 株;该 5 株菌又经 8 次摇瓶传代培养后,仅有 1 株的产酯稳定性较好,相对于第 1 代酶活为 91.6%,其他菌株均低于 72%,故确定该菌为下一步的试验菌株,并命名为 EB-1。



图 1 透明水解圈平板筛选法

Fig. 1 Isolation of transparent halo

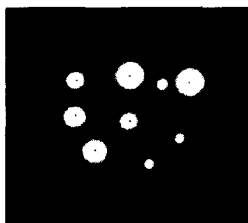


图 2 罗丹明 B-橄榄油平板检测法

Fig. 2 Fluoremetry of Rhodamine B

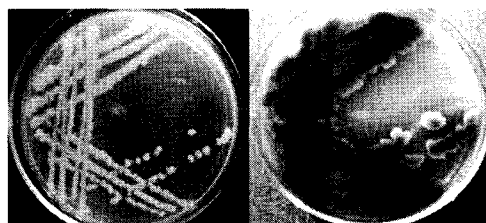


图 3 菌株 EB-1 及产黑色素菌落形态

Fig. 3 Inchoate and niger colony of strain EB-1

2.3 菌株鉴定结果

2.3.1 形态特征

菌体大小约为 $(0.6 \sim 0.7) \mu\text{m} \times (1.5 \sim 2.5) \mu\text{m}$;革兰氏染色阳性菌;呈杆状,圆端,单个或短链状排列;14 h 后有单芽孢生成,中生或偏中生,不使菌体明显膨大;菌落初期为乳白色,表面光滑、黏稠;24 h 后呈乳黄色,表面干燥;48 h 后随着时间的延长有大量的黑色素产生(图 3);在液体培养基中有菌膜产生,振之不散。

2.3.2 生理生化特征

进一步对菌株 EB-1 进行了生理生化鉴定试验,结果见表 1。同时,该菌在含有酪氨酸的培养基中也产生黑色素,所以根据《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)所述,初步判定该菌株为 *Bacillus subtilis* var. *niger*。另外,海洋菌株 EB-1 的各项生理特征基本与陆源的 *Bacillus subtilis* 相同,但也有些特有的性质,如同化甘油、耐中盐以及能在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生长等。

2.3.3 16S rDNA 的基因序列分析

以菌株 EB-1 的总 DNA 为模板,利用 16S rDNA 引物进行 PCR 扩增后,电泳验证结果显示:在约 1.5 kbp 处有清晰高亮的单条带(图 4);其 16S rDNA 的序列经测定后,全长为 1 425 bp,在 GenBank 的注册号为 EU016526。

2.3.4 系统发育学分析

将得到的基因序列在 GenBank 中进行同源序列检索。结果显示,所检索的 100 个相似性较高菌株的 16S rDNA 序列中,全部为 *Bacillus* sp.,其中有 76 个为 *Bacillus subtilis*,3 个 *Bacillus licheniformis*,其余为

表 1 菌株 EB-1 和模式菌株的特征比较

Table 1 Characteristic comparison of *Bacillus* sp. EB-1 strain with model strain

特征 character	菌株 EB-1 strain	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
厌氧生长 Anaerobic growth	-	-
柠檬酸盐的利用 Citrate utilization	+	+
丙酸盐的利用 Propionate utilization	-	-
硝酸盐还原 Nitrate recovery	+	+
甘油同化 Assimilation of glycerol	+	-
D-葡萄糖产酸 Production of acid;D-glucose	+	+
D-甘露醇 D-mannitol	+	+
葡萄糖产气 Gas of glucose	-	-
酪氨酸水解 Hydrolysis of tyrosine	-	-
酪朊水解 Hydrolysis of casein	+	+
明胶水解 Hydrolysis of gelatin	+	+
淀粉水解 Hydrolysis of starch	+	+
形成吲哚 Production of indole	-	-
V-P 反应 V-P	+	+
接触酶 Catalase	+	+
5% NaCl	+	+
10% NaCl	+	-
生长温度 Growth temperature	0~55 $^{\circ}\text{C}$	5~55 $^{\circ}\text{C}$

注: + 为反应呈阳性或者可以生长、利用和产生; - 为反应呈阴性或者不可以生长、利用和产生

未鉴定到的种属;同时,菌株 EB-1 与标准的 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (AB271744) 的序列同源性最高,达 99.79%;以 16S rDNA 序列同源性为基础,采用 Neighbor-Joining 分析法经过 10^3 次置换式取样计算出 Bootstrap 值(已标注在图上)并生成系统发育树(图 5)。细菌分类学家普遍认为当 16S rDNA 序列同源性高于 97%,可以认为是属内的同种,低于 93%~95% 则可能为属外成员(Vandamme *et al.* 1996)。因此,将菌株 EB-1 鉴定为枯草芽孢杆菌的亚种——*Bacillus subtilis* var. *niger*。

3 讨论

对产酯酶微生物的筛选方法有很多,传统的方法是利用酯酶在一定时间内水解反应后的产物用标准碱液进行滴定。此外,已报到的测定方法还有许多,如平板法、比色法、色谱法、同位素法和荧光法等。除平板检测法外,其他方法主要用酶活的精确测定,一般对设备的要求较高,检测过程也比较复杂。

酯酶与脂肪酶同属于可以水解和合成酯键的羧基酯水解酶(EC 3.1.1)。酯酶对底物催化作用的要求是优先水解短链酯类(≤ 10),脂肪酶则是优先作用于长链酯类($C \geq 10$)(何国庆等 2006;Jun *et al.* 2007),三丁酸甘油酯和三油酸甘油酯则分别是它们标准的底物(Hotta *et al.* 2002;Jaeger *et al.* 1999);但研究发现三丁酸甘油酯也可以被脂肪酶水解,因此,在筛选微生物酯酶时须再通过鉴别脂肪酶特异性的检测方法(Rhodamine B-橄榄油平板法)进一步验证。另外, α -乙酸萘酯也是酯酶特异性较高的底物(何国庆等 2006),其被水解后的产物 α -萘酯与偶氮盐(如固蓝盐 B、BB、RR 等)反应生成褐色偶氮化合物,并在一定条件下,溶液的吸光度与酶反应产物的浓度呈正比(禹邦超等 1996)。在此原理的基础上本实验进行了大量的筛选工作,最终得到了产酶稳定性和酶活力较好的菌株 EB-1 作为目标菌株。

目前已研究证实的产酯酶微生物有:*Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Ochrobactrum anthropi*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* 等(王玉玲 2003),还包括海洋微生物中的耐盐 *Bacillus* sp. (Sana *et al.* 2007) 和 *Yarrowia lipolytica* (Jun *et al.* 2007) 以及与海洋海绵 *Aplysina aerophoba* 共生的芽孢杆菌(Karpushova *et al.* 2005)等。

微生物酯酶种类多,且能够适应各种不同的环境,尤其是海洋微生物酯酶更具有独特的生理功能和性质。本实验通过对筛选于海洋的菌株 EB-1 进行了常规分类鉴定和 16S rDNA 分子分类鉴定,最终确定了该菌为 *Bacillus subtilis* var. *niger*。

海洋微生物酶的研究在全球范围内仍是刚刚起步,其开发应用的潜力巨大。随着酶学基础理论和应用研究的发展,海洋微生物酯酶的研究也将深入到更高的层次,必将对发展我国药物和食品事业及日用化工领域具有较大的经济和社会效益,同时也将对海洋生物资源的可持续利用和发展具有重要的战略意义。

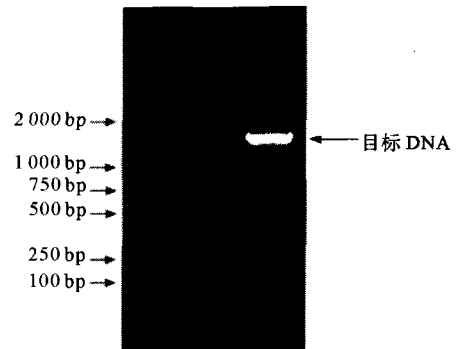


图 4 16S rDNA 序列 PCR 产物电泳

Fig. 4 PCR product of 16S rDNA

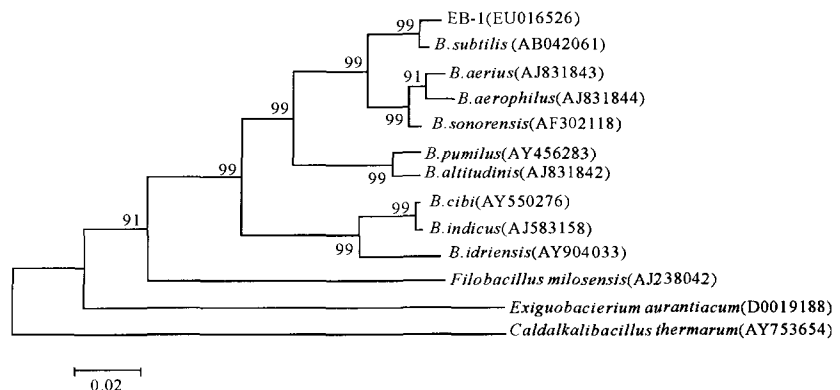


图 5 菌株 EB-1 的系统发育学地位

Fig. 5 Phylogenetic tree of EB-1 based on 16S rRNA sequence homology

参 考 文 献

- 王玉玲. 2003. 细菌酯解酵素的生物化学特性. 见:台湾逢甲大学化学工程学系硕士论文
- 东秀珠,蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社,43~65
- 许学勤,徐斐,吴燕雯,吴瑛,华泽钊. 固定化对动植物酯酶性质的影响. 食品与发酵工业,30(7):38~42
- 何国庆,丁立孝. 2006. 食品酶学. 北京:化学工业出版社,122~130
- 禹邦超,邓辉胜,王旭,刘德立. 1991. 多种形式酯酶总活力的混合底物分光光度测定法. 华中师范大学学报(自然科学版),30(1):87~91
- 赵运胜,卜友泉,张宏娟,廖飞. 2006. 苛求芽孢杆菌基因组 DNA 提取方法的比较. 生物技术,16(2):41~42
- 郭琪,王静雪. 2005. 海洋微生物酶的研究概况. 水产科学,24(12):41~44
- Faiz,Ö.,Colak,A.,Saglam,N. *et al.* 2007. Determination and characterization of thermostable esterolytic activity from a novel thermophilic bacterium *Anoxybacillus gonensis* A4. *Biochemistry and Molecular Biology*,40(4):588~594
- Hotta,Y.,Ezaki,S.,Atomi,H. *et al.* 2002. Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hypermophilic archaeon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68(8):3 925~3 931
- Jun,T. K.,Sung,G. K.,Jung,H. W. *et al.* 2001. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment; characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(4):820~828
- Jaeger,K. E.,Dijkstra,B. W.,and Reetz M. T. 1999. Bacterial biocatalysts: Molecular biology three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:315~351
- Karpushova,A.,Brümmer,F.,Barth S. *et al.* 2005. Cloning, recombinant expression and biochemical characterisation of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:59~69
- Prim,N.,Blanco,A.,and Martines, J. 2000. *estA*, a gene coding for a cell-bound esterase from *Paenibacillus* sp. BP-23, is a new member of the bacterial subclass of type B carboxylesterases. *Res. Microbiol.* 151:303~312
- Sana,B.,Ghosh D.,Saha M. *et al.* 2007. Purification and characterization of an extremely dimethylsulfoxide tolerant esterase from a salt-tolerant *Bacillus* species isolated from the marine environment of the Sundarbans. <http://www.elsevier.com/locate/procbio>; *Process Biochem.* ,2007
- Vandamme,P.,Pot,B.,Gillis M. *et al.* 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60(2):407~438