

产海洋细菌 MP-2 酯酶菌株的鉴定 及酯酶理化性质的研究

平芮巾^{1,2} 孙 谥^{1*} 刘均忠¹ 王跃军¹ 郝建华¹ 张胜军³

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋酶与酶工程实验室, 青岛 266071)

(²大连水产学院, 116023)

(³青岛市环境保护监测站, 266003)

摘要 从渤海海泥样品中分离获得1株新型酯酶菌株,经鉴定为地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*。所得的MP-2酯酶的最适作用温度范围50~70℃,在60℃表现出了最高活性,属于耐热酶;最适作用pH为10,属于碱性酶,其pH值作用范围比较窄;具有良好的热稳定性;金属离子Co²⁺, Li⁺对酶具有激活作用, Ca²⁺对酯酶的活力没有显著影响,化学试剂SDS、EDTA及Tween-20对酯酶的抑制效果显著,对常见有机溶剂具有良好的耐受力;该酯酶对碳链长短不同的底物表现出不同的酶活。

关键词 海洋地衣芽孢杆菌 酯酶 鉴定 性质

中图分类号 Q55 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-7075(2009)02-0083-06

Identification of MP-2 esterase-producing marine *Bacillus* and study on properties of the esterase

PING Rui-jin^{1,2} SUN Mi^{1*} LIU Jun-zhong¹

WANG Yue-jun¹ HAO Jian-hua¹ ZHANG Sheng-jun³

(¹ Laboratory of Marine Enzyme and Enzyme Engineering,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² Dalian Fisheries University, 116023)

(³ Environmental Monitoring Station of Qingdao, 266003)

ABSTRACT A novel marine esterase-producing bacteria isolated from the Bohai Sea sediment was identified as *Bacillus licheniformis*. The MP-2 esterase was primarily purified and characterized. The optimal range of temperature of the esterase was 50~70℃, and the maximum activity was achieved at 60℃ and pH10.0. The esterase was alkaline and its optimum range of pH was narrow. The thermal stability of the esterase was good. Co²⁺, Li⁺ ions were found to activate the esterase, but Ca²⁺ had no significant effects on the activity of the esterase. While SDS, EDTA and Tween-20 had significantly suppressive effects on the esterase. It showed strong resistance to ordinary organic solvents. The enzyme exhibited different esterase

国家自然科学基金项目(30571429)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)85819525; Fax: (0532)85819525

收稿日期: 2007-05-22; 接受日期: 2007-07-23

作者简介: 平芮巾(1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋生物资源利用研究。E-mail: Pingruijin@126.com, Tel: (0532)85833961

activities towards substrates with different length of carbon chains.

KEY WORDS Marine *Bacillus licheniformis* Esterase Identification Characteristics

微生物酯酶(Esterase, EC3. 1. 1. 1)属于水解酶类(Hydrolases),来源于微生物,是指能够催化水解羧酸酯的所有酶的总称,又称羧酸酯水解酶(Carboxylaster-Hydrolases)。微生物酯酶作为重要的工业酶类,广泛应用于医药、化工和食品等行业,特别是在医药化工和有机合成工业(张树政 1984; Mentlien *et al.* 1984)。然而现有陆源微生物酯酶常因耐酸、耐碱或耐热性能差,应用范围受到很大的限制。因此寻找具有特殊性质的微生物酯酶已引起人们的重视。由于海洋环境条件的特殊性,海洋性微生物酶与陆源性微生物酶相比,具有更为独特的酶学特性和应用前景。现阶段人们常运用分子生物学手段通过对未知微生物 DNA 序列的测定和比较分析,达到以其进行快速、有效的鉴定分类的目的(Gloria *et al.* 2002; 白逢彦等 2002; Kurtzman *et al.* 1997)。本文报道了一种新型海洋酯酶的产酶菌株的鉴定及部分酶学性质的研究,为海洋酯酶工业化生产和应用奠定了良好基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养基

菌株筛选自渤海海域底泥。

初筛培养基:葡萄糖 1%, NaCl 0.5%, 牛肉膏 1%, 蛋白胨 1%, 琼脂 2%, 三丁酸甘油酯 0.25%, pH 7.8, 121 °C 30 min 灭菌后高速匀浆乳化后倒平板备用。

发酵培养基:花生粕 0.9%; 豆饼粉 2.29%; (NH₄)₂SO₄ 0.2%; KH₂PO₄ 0.1%; K₂HPO₄ 0.1%; Mg-SO₄ 0.05%; Tween80 0.8%; 花生油 0.8%; pH 7.0。

1.1.2 试剂和仪器

对硝基苯棕榈酸酯(*p*-Nitrophenyl palmitate, *p*-NPP, Amresco)购自上海生工(美国 BBI)PCR 扩增相关试剂和核酸 Marker, 购自宝生物工程(大连)有限公司; TS100-F 型相差显微镜(日本 NIKON 公司)、RoboCycler96 孔梯度 PCR 仪(美国 STRATAGENE 公司)、5943-05 型酸度计、752 型紫外光栅分光光度计(上海分析仪器总厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 酯酶的活性测定(Lowry *et al.* 1951)

以每分钟分解对硝基苯棕榈酸酯释放出 1 μmol 对硝基酚(*p*-Nitrophenol) 所需的酶量定义为 1 个酶活力单位,以 U 表示。蛋白质浓度的测定采用 Lowry 法(Yang *et al.* 1987)。

1.2.2 菌株常规分类学测试及 16S rDNA 序列测定与分析

主要参考《伯杰氏细菌鉴定手册(第九版)》(沈萍等 1999), 鉴定程序按照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等 2001)及《微生物学实验》(John *et al.* 1994)进行。

DNA 序列比较分析及系统树的生成:将校正后的序列在国际核酸数据库中进行同源序列的搜索。根据同源序列搜索结果,下载相关菌种 16S rDNA 基因序列,与菌株 MP-2 一起用 Clustal X 软件进行匹配(Alignment)(Saitou *et al.* 1987),用 Neighbor-Joining 分析方法进行分子系统学分析,用 MEGA3.1 软件生成系统树(Thompson *et al.* 1994)。

1.2.3 菌株 MP-2 酯酶的理化性质的研究

发酵液经 4 000 r/min, 4 °C 离心 30 min 去除菌体及培养基中的不溶物,在上清液中加入冷的无水乙醇(1:1, 体积比),充分搅拌后在 4 °C 下 4 000 r/min 离心 20 min 除去杂蛋白,将上清液冻干,得到粗制酶粉。并对其进行以下理化性质研究。

- (1) 酯酶最适作用温度 在 4~100 °C 下进行酯酶水解活力的测定。
- (2) 酯酶最适作用 pH 在 2.5~12 [0.1 mol/L Na₂HPO₄-柠檬酸(pH 2.5~8), 0.1 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 8~12)] 中测定酯酶活性。
- (3) 酯酶的热稳定性 酯酶溶于 0.1 mol/L pH10 的 NaOH-甘氨酸的缓冲液中, 置于不同温度(4~70 °C) 下, 恒温水浴处理 2 h, 每隔 20 min 取样, 迅速冷却, 测定其残余酶活。
- (4) 酯酶的 pH 稳定性 酯酶溶于 0.1 mol/L 不同 pH (2~12) 的缓冲液中, 置于 4 °C 下, 保温 48 h 后, 再将酶液调回到最适 pH10, 以最适反应 pH10 下保温所得的酶活力为 100%, 其余折合成剩余酶活力的百分数。
- (5) 金属离子、化学试剂及对酯酶活性的影响 在酯酶测活体系中加入各种金属离子和不同浓度的化学试剂, 以 0.1 mol/L pH10 的 NaOH-甘氨酸的缓冲液作对照常温下静置 30 min, 于 60 °C 测定酯酶活性。
- (6) 酯酶在有机溶剂中的稳定性 酯酶溶于有机溶剂, 在常温下反应 4 h, 经过滤后挥发除去有机溶剂测其酶活, 以 0.1 mol/L pH10 的 NaOH-甘氨酸的缓冲液为对照。
- (7) 酯酶对底物选择性的研究 将酯酶作用于具有不同的碳链长度、不同的饱和度及不同的分支程度的甘油三酯, 以 *p*-NPP 为底物的酶活为 100%, 其余折合成剩余酶活力的百分数。

2 结果与讨论

2.1 形态特征

海洋菌株 MP-2 的菌落表面光滑, 红褐色, 半透明, 边缘整齐, 有树根状隆起; 细胞杆状, 二分裂法繁殖, 无荚膜。

2.2 培养特征

在营养琼脂平板上中度生长, 菌落平、光滑、黄灰色和无可溶性色素; 假若表面潮湿可以活跃扩展, 边缘不整齐。在葡萄糖琼脂平板上生长较厚, 可变成皱褶。

2.3 温度、耐盐度和耐酸碱性试验

菌株 MP-2 能在 10~50 °C 生长, 最适生长温度 30 °C; 能在 0~9% NaCl 培养基中生长, 最适生长盐度为 4; 能在 pH5~10 的条件下生长, 并随着菌体生长, 营养肉汤培养基 pH 值发生改变, 趋向 pH7.0, 该菌最适生长 pH 值为 7.0。

2.4 生理生化特性

菌株 MP-2 的生理生化特性结果见表 1。

2.5 核酸序列测定

MP-2 的 16S rDNA 序列全长为 1 417 bp, 在 GenBank 的注册号为 EF513255。

将其与从 GenBank 等数据库调集的芽孢杆菌属相关菌株的 16 S rDNA 序列进行比较。并以 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 为外群, 所构建的系统进化树见图 1。通过 1 000 次置换式取样计算其 Bootstrap 值 (图 1)。

从图 1 构建的系统发育树可以明显看出, 菌株 MP-2 与本属一个有效发表种地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* 形成一个单独的分支, 16 S rDNA 序列同源性最高, 达 97%。该分支与其他几种芽孢杆菌聚成一群, 其中菌株 MP-2 与 *B. licheniformis*, *B. subtilis* 的同源性分别为 96.3% 和 95.0%, 发育关系较近。细菌分类学家普遍认为当 16S rRNA 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)。并且该菌株与地衣芽孢杆菌的形态特征、培养特征、生理生化特征没有较大差异且与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别做阴阳性对照。因此, 我们将菌株 MP-2 定为地衣芽孢杆菌。

表1 菌株 MP-2 与地衣芽孢杆菌表型特征的比较

Table 1 Comparison of phenotypic characteristics between strains MP-2 and *Bacillus licheniformis*

特征 Characteristics	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	MP-2
菌体大小(μm) Thalline size (mm)	(0.5~0.9) × (2~3)	(0.3~0.8) × (2~3)
革兰氏染色 Gram staining	v	+
孢囊膨大 Sporangium intumescence	—	—
芽孢主要位置 Spore arch-localization	中生 Mesogenous	中生 Mesogenous
芽孢形状 Spore shape	椭圆或柱状 Ellipse or styloitic	椭圆 Ellipse
伴孢晶体 Crystalline Inclusion	—	—
鞭毛 Flagellum	周生 Peritrichous	周生 Peritrichous
运动性 Motility	+	+
厌氧生长 Anaerobic growth	+	—
接触酶 Catalase	+	+
氧化酶 Oxidase	d	+
V-P	+	+
硝酸盐还原 Nitrate recovery	+	+
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+	+
H ₂ S 产生 Production of H ₂ S	—	—
吲哚产生 Production of indole	—	—
水解: 淀粉 Hydrolysis; starch	+	S ^o
明胶 Gelatin	+	+
产酸: D-葡萄糖 Production of acid; D-glucose	+	+
D-阿拉伯糖 D-arabinose	+	—
D-甘露醇 D-mannitol	+	+
D-木糖 D-xylose	+	+
葡萄糖产气 Gas of glucose	(—)	—
生长: 5℃ Gowth; 5℃	—	—
50℃	—	+
2% NaCl	+	+
5% NaCl	+	+
7% NaCl	+	+
pH5.5	—	+
pH7.0	+	+
pH10.0	ND	+

注: + 为 90%~100% 的菌株为阳性; — 为 90%~100% 的菌株为阴性; d 为 11%~89% 的菌株为阳性; v 为在一个菌株内性质不稳定; ND 为未测定

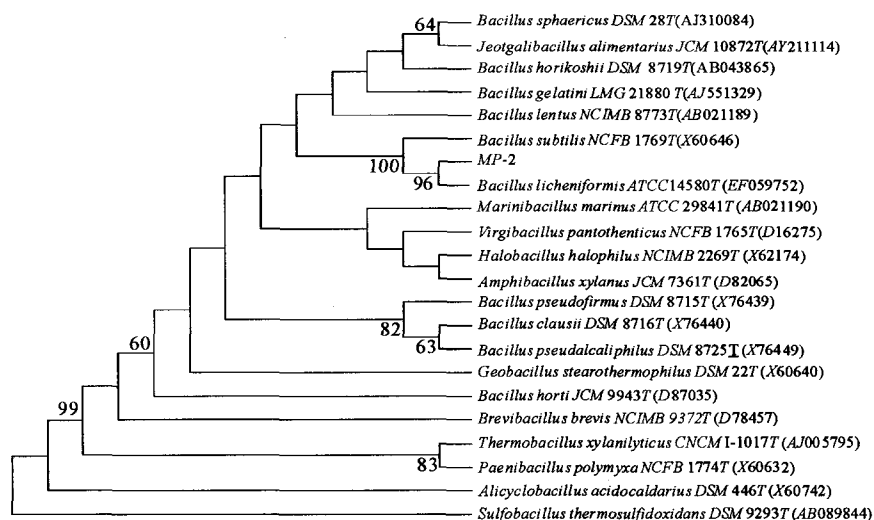


图1 菌株 MP-2 及其从 GenBank 等数据库中调集的相关属种构建的以 16 S rDNA 序列为基础的系统发育树状关系

Fig. 1 Phylogenetic dendrogram constructed showing the phylogenetic relationships among strain

MP-2 and other related strains downloaded from GenBank and EMBL etc

2.6 菌株 MP-2 酯酶的初步纯化

菌株 MP-2 酯酶的初步纯化后得到的粗酶粉活性为 17 794.4 U/g, 蛋白含量为 0.858 3 g/g, 比活为 20 732.14 U/g, 纯度提高了 6.28 倍。

2.7 菌株 MP-2 酯酶的理化性质研究

2.7.1 酯酶最适作用温度

该酯酶在 60 °C 时酶活性最高, 在 50~70 °C 之间相对酶活保持在 80% 之间, 高于 70 °C 或低于 50 °C 时则酶活呈下降趋势, 在 4 °C 和 100 °C 时相对酶活只能维持在 25%。由此可知, 酯酶最适作用温度范围 50~70 °C, 在 60 °C 表现出了最高活性, 属于耐热酶。

2.7.2 酯酶最适作用 pH

当 pH 为 10 时的酶相对活性最高, 为酯酶的最适作用 pH, 但当 pH 为 2.5~9 时酶活只能维持在 70% 以下, 认为主要原因是由于 pH 值引起的酸碱度变化对酶-底物或酶-底物的中间物的电离情况发生变化, 使酶蛋白质出现不可逆变性。就此酶而言, 反应介质的 pH 变化影响到酯酶与底物对硝基苯磷酸酯的结合, 说明介质的 pH 变化对该酯酶酶活有很强的作用(李光伟 2001)。

2.7.3 酯酶的热稳定性

由图 2 可知, 在经恒温水浴处理 1 h 时, 酯酶在 4~40 °C 酶活能保持 70% 以上, 50~60 °C 酶活仍能接近 60%, 恒温水浴处理 2 h, 酯酶在 4~60 °C 活性仍能维持 40% 以上表明该酶具有良好的热稳定性。

2.7.4 酯酶的 pH 稳定性

酯酶置于 4 °C 下, 保温 48 h 后, 在 pH 2~9 酶活只能保持 30% 以下, 而在 pH10 酶活性维持在 70% 以上, 表明在 pH10 该酶较稳定属于碱性酶。

2.7.5 金属离子对酯酶活性的影响

由图 3 可知 Co^{2+} 、 Li^{+} 对酶具有激活作用, Ca^{2+} 对酯酶的活力没有显著影响, 而 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^{+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ba^{2+} 和 Mg^{2+} 对酯酶的活性有抑制作用。碱性磷酸酯酶 *Thermotoga neaplitan* 在 Co^{2+} 离子存在下的酶活, 比在 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 存在下高两倍, Co^{2+} 同时也能提高该酶的热稳定性(龚宁萍等 2004)。

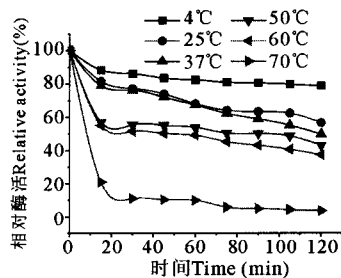


图 2 酯酶的热稳定性

Fig. 2 Thermal stability of esterase

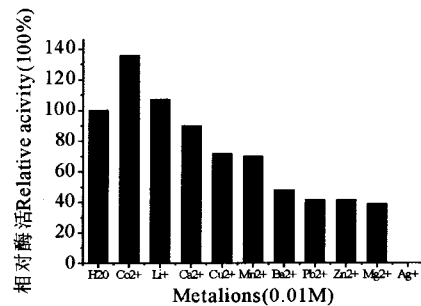


图 3 金属离子对酯酶活力的影响

Fig. 3 Effect of metal ions on esterase activity

2.7.6 化学试剂对酯酶的影响

由图 4 可知, SDS, EDTA, 非离子表面活性剂 Tween_20 对酯酶的抑制效果显著。此外, 当酯酶溶液中加入 10 mmol/L 的 EDTA 时, 酯酶的活性被抑制到 4.91%, 由此可推测该酯酶的活性中心可能含有金属离子。金属整合剂 EDTA 对耐热碱性磷酸酯酶有抑制作用。EDTA 对 *Pyrococcus abyssi* 耐热碱性磷酸酯酶有较强的抑制作用; 碱性磷酸酯酶是一种金属酶, 在金属整合剂 EDTA 的作用下, 酶活几乎降为零; 地衣芽孢杆菌碱性磷酸酯酶在 EDTA 作用后, 失去酶活, 即使再补充金属离子也不能恢复活力(Spencer *et al.* 1981)。

2.7.7 酯酶在有机溶剂中的稳定性

由图 5 可知, 常见有机溶剂中除了二甲基亚砜对海洋微生物酯酶 MP-2 的酶活的抑制作用显著外, 其他有机溶剂对酶活几乎无影响, 其中正己烷对酶活影响最小。说明此酶对常见有机溶剂的具有良好的耐受力。

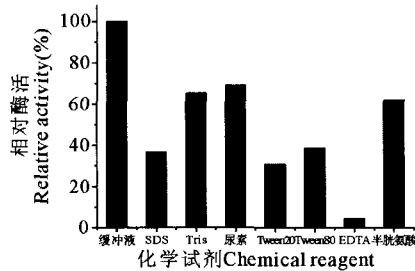


图4 化学试剂对酯酶活力的影响

Fig. 4 Effect of chemical reagents on esterase activity

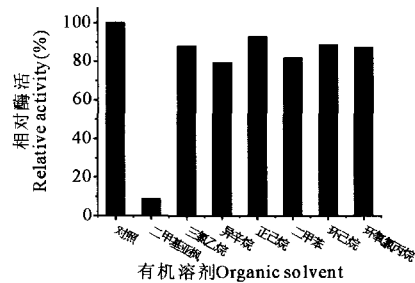


图5 酯酶在有机溶剂中的稳定性

Fig. 5 Effect of organic solvents on esterase activity

2.7.8 酯酶对底物选择性的研究

对底物的选择性是酯酶的一个重要的酶学性质(Chen *et al.* 1997; Plow *et al.* 1996)。对不同碳原子数的各种甘油酯水解时发现,该酯酶的水解活力随底物中脂肪酸链长的增长而活力下降。短碳链的甘油酯如三醋酸甘油酯、三丁酸甘油酯及乙酸乙酯的相对酶活较高,分别为66.5%、45.8%和56.9%,但对长碳链的高级脂肪酸脂如18碳三油酸甘油酯不水解。众所周知,橄榄油是判断酯酶酶活的最佳底物之一,该酯酶对橄榄油催化活力最低,不表现出酶活,说明脂肪酶和酯酶存在底物的差异性(表2)。

综上所述,产海洋细菌 MP-2 酯酶的菌株经鉴定为地衣芽孢杆菌,它是一种耐热碱性酯酶,可能为碱性磷酸甘油酯。它具有的耐热、碱性等特性使其具有良好的产业化和应用前景,进一步开拓了海洋微生物资源的利用领域。

表2 酯酶对底物的选择性

Table 2 Substrate specificity of esterase towards various simple triglycerides

底物 Substrate	相对活性 Relative activity (%)
p-NPP	100
三醋酸甘油酯 Triacetin C ₂	66.5
三丁酸甘油酯 Triolein	45.8
乙酸乙酯 Ethyl acetate	56.9
Tributylin C ₄	41.2
三油酸甘油酯 Triolein C _{18:1}	0
橄榄油 Olive oil	0

参 考 文 献

- 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
- 白逢彦,贾建华,梁慧燕. 2002. 假丝酵母疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义. 菌物系统, 21(1):27~32
- 李光伟. 2001. 微生物酯酶产生菌的选育、菌株 Bacillus sp. EB-87 产酶特性及酶学性质的研究. 见:浙江工业大学硕士论文
- 张树政. 1984. 酶制剂工业. 北京:科学技术出版社, 665~670
- 沈萍,范秀容,李广武. 1999. 微生物学实验(3版). 北京:高等教育出版社, 15~123
- 龚宇萍,陈朝银. 2004. 耐热碱性磷酸酯酶的研究进展. 药物生物技术, 11(3):207~210
- Chen, L. C., *et al.* 1997. Extracellular proteins of *Cryptococcus neoformans* and host antibody response, *Infect Immun.* 65: 2 599~2 605
- Gloria, S., *et al.* 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: A comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*, 2: 495~517
- John, G. H. *et al.* 1994. *Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Williams and Wilkins Press
- Kurtzman, C. P. *et al.* 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clinical microbiology*, 35(5):1 216~1 223
- Lowry, O. H. *et al.* 1951. Protein measurement with the phenol folin reagent, *J. Biol. Chem.* 193:265~275
- Mentlien, R. *et al.* 1984. Hydrolysis of ester and amide-type drugs by purified isoenzymes of non-specific carboxylseterase from rat, sheep and horse liver, *Biochemical. Pharmacol.* 33:124~1248
- Plow, F. J. *et al.* 1996. High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalysed hydrolysis of triolein, *Enzyme Microb. Technol.* 18: 66~71
- Saitou, N. *et al.* 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406~425
- Spencer, D. B. *et al.* 1981. Effect of cobalt on synthesis and acting of *Bacillus licheniformis* alkaline phosphatase. *J. Bacteriol.* 145 :926~930
- Thompson, J. D. *et al.* 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.* 22(22): 4 673~4 680
- Vandamme, P. *et al.* 1996. Polyphasic Taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60(2): 407~438
- Yang, C. M. *et al.* 1987. Thylakoid acid phosphatase and protein phosphatase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.* 48 : 17~22