

深海产低温碱性淀粉酶菌 *Halomonas* sp.W7 的筛选及发酵条件研究

戴世鲲¹, 郑天凌^{1,2}, 王晓颖¹, 郑伟¹

(1. 厦门大学 生命科学学院 应用与环境微生物研究所, 福建 厦门 361005; 2. 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 从 27 份深海沉积物中筛选到 30 株产淀粉酶细菌, 并对其中的 W7 菌株的产酶条件及酶学性质进行了研究。对 W7 菌株进行 16S rDNA 序列分析表明该菌株属于盐单胞菌属 (*Halomonas*)。其最适生长温度为 25 °C, 能适应 pH 值 7~13 和盐度 0~100 的环境条件。该菌株可利用多种碳源, 但只在淀粉存在的条件下产酶, 可利用有机氮源和无机氮源, 但有机氮源更能促进淀粉酶的产生。产酶的最适条件为: 25 °C, pH 10, 接种量 2%, 盐度 50, 150 r/min 摇床培养 36~48 h。粗酶液的最适作用温度为 40 °C, 最适 pH 值为 10。该菌具有反硝化和氨化活性。

关键词: 深海微生物; 淀粉酶; 发酵条件

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2007)11-0027-06

深海微生物处于极端的物理、化学和生态环境中, 经过长期的自然选择, 形成了极为特殊的生理结构和代谢机制^[1-3], 产生了许多具有特殊性质的生物活性物质, 极端酶类就是其中之一。淀粉酶是最早研究的酶类之一, 也是一种用途广泛的工业用酶, 应用于造纸、食品、医药工业等, 但随着工业发展, 不断要求具有新活性性质的酶类, 如低温、碱性淀粉酶, 目前对深海微生物产淀粉酶的研究却鲜有报道。由于深海微生物采样、分离培养的困难等多种因素的影响, 国内外对深海微生物的研究还处于起步阶段。本实验研究拟通过从分布于热带太平洋中部和东部的多金属结核区深海沉积物中分离筛选产胞外淀粉酶的菌株, 寻找能在低温、碱性条件下具有高酶活力的酶类, 为深海微生物资源的开发利用提供一定的工作基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

深海沉积物样品采集于中-法合作项目的 Marion Dufresne WEPAMA 航次期间 (2001 年 5 月到 2001 年 6 月), 采样站位分布于热带太平洋中部和东部的

多金属结核区, 使用多管采泥器和箱式采泥器采集。

1.2 培养基

2216E 培养基: 蛋白胨 5 g, 酵母浸膏 1 g, 磷酸高铁 0.01 g, 自然海水 1 000 mL, pH 10。

平板筛选培养基: 蛋白胨 5 g, 酵母浸膏 1 g, 磷酸高铁 0.01 g, 可溶性淀粉 1%, 琼脂 15 g, 自然海水 1 000 mL, pH 10。

摇瓶发酵培养基: 蛋白胨 5 g, 酵母浸膏 1 g, 磷酸高铁 0.01 g, 可溶性淀粉 1%, 自然海水 1 000 mL, pH 10。

1.3 菌种分离

依常规沉积物的菌种稀释分离方法进行分离纯化^[4]。

收稿日期: 2005-01-04; 修回日期: 2005-04-20

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (G2000078504); 国家教育部高校骨干教师资助项目

作者简介: 戴世鲲 (1977-), 男, 安徽合肥人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物学, E-mail: deepseabio@163.com; 郑天凌, 通讯作者, 教授, 博士生导师, 电话: 0592-2183217, E-mail: microzh@jingxian.xmu.edu.cn

1.4 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和序列分析

1.4.1 菌体总 DNA 的提取

细菌总 DNA 的提取参照《精编分子生物学实验指南》^[5]所介绍的从细菌中制备基因组 DNA 的方法。

1.4.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

实验中选用正向引物 Eubac27F (5' -AGAG-TTGATCCTGGCTCAG-3') 和负向引物 Eubac-1492R (5' -GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行扩增, 该对引物能够扩增出近乎全长的 16S rDNA 序列。

25 μ L 的 PCR 反应体系中, DNA 模板用量 < 100 ng, 正向和负向引物各 0.2 μ mol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, dNTP 0.3 mmol/L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, Taq 酶 1U, 补双蒸水至 25 μ L; PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 8 min, 4 $^{\circ}$ C 停止反应。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并将 PCR 产物送至上海博亚生物公司测序。

1.4.3 16S rDNA 序列分析

将得到的序列利用 Blast 软件提交 EMBL 等数据库, 与已有的细菌 16S rDNA 序列进行相似性比较分析。

1.5 淀粉酶活力测定

酶活性的测定采用 3, 5-二硝基水杨酸试剂显色法^[6]。以 1 mL 粗酶液在 30 $^{\circ}$ C, pH 10, 每分钟水解淀粉产生相当于 1 μ g 葡萄糖的还原糖所需的酶量定义为一个酶活单位(U)。

2 结果与分析

2.1 深海沉积物中微生物的分离和产淀粉酶菌株的初筛

将 27 个深海沉积物样品在无菌工作台内各称取 1 g 放入已装有无菌海水和玻璃珠的三角瓶内, 在低速摇床内打匀 30 min, 静置后取上清涂布在 4 种 pH 值梯度的 2216E 培养基平板上, pH 依次是 10, 11, 12, 13, 置于 15 $^{\circ}$ C 培养箱中恒温培养。挑取单个菌落划线于筛选培养基平板, 得到 30 株细菌具有淀粉透明圈。

2.2 产淀粉酶菌株的复筛

将初筛得到的 30 株菌接入摇瓶发酵培养基中, 25 $^{\circ}$ C, 150 r/min 摇床培养 48~72 h, 测定在 30 $^{\circ}$ C、pH 9 条件下的酶活力, 经反复比较后, 选用编号为 W7

菌株为进一步实验菌株。

W7 菌株分离自站位: MC4 station 7; 地理位置: 134 $^{\circ}$ 28.79'E, 0 $^{\circ}$ 48.31'S; 水深 1 193 m; 样品为硅质黏土, 颜色较黑, 质地较硬; 时间: 2001 年 5 月 9 日 11 时。

2.3 W7 菌株的细菌学鉴定

2.3.1 形态特征

油镜下观察细菌呈短杆状, 端圆, 单个排列。菌体大小为 1.0~1.2 μ m \times 0.2~0.3 μ m。电镜观察, 菌体着生有鞭毛, 菌体周围有粘液层, 如图 1。平板划线培养 3 d 后菌落呈圆形, 直径 0.2~0.3 cm, 表面光滑有光泽, 边缘整齐, 稍有隆起, 颜色为浅乳白色, 半透明, 在含淀粉筛选培养基平板上可产生直径 1 cm 左右的透明圈。

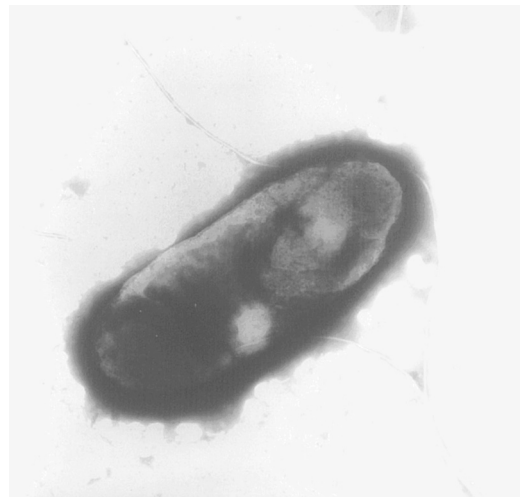


图 1 菌株 W7 在电子显微镜下的形态

Fig.1 The morphology of the strain W7 under electron microscope

2.3.2 生化特性

革兰氏染色为阴性, 可在培养平板盐度高达 100 及 pH 值为 11、温度 4 $^{\circ}$ C 条件下生长, 其生长随温度的变化见图 2。菌株在 35 和 30 $^{\circ}$ C 时生长很快达到稳定期, 但在稳定期维持时间短暂, 25 $^{\circ}$ C 时菌株在稳定期能维持较长的时间, 20 和 15 $^{\circ}$ C 时, 菌株生长缓慢, 生物量低于 25 $^{\circ}$ C 时。该菌株也可在 4 $^{\circ}$ C 缓慢生长, 说明 W7 菌株能适应较广的温度范围, 其最适生长温度应为 25 $^{\circ}$ C。

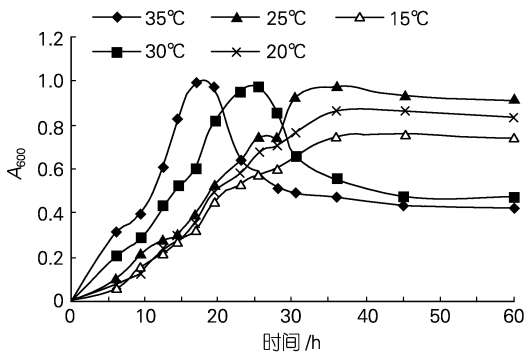


图2 W7 菌株在不同温度下的生长曲线
Fig.2 Growth curve of the strain W7

2.4 W7 菌株的 16S rDNA 鉴定

在 W7 菌株的 16S rRNA 基因的扩增过程中，作者选用的一对引物能够扩增出的 16S rDNA 序列的长度为 1 455 bp，符合进一步 16S rDNA 鉴定的要求。将该序列信息利用 Blast 软件在 EMBL 等数据库中进行同源性搜索，选取同源性高的典型菌株的 16S rDNA 序列作为参比对象。经同源性比较发现 W7 菌株与盐单胞菌属 (*Halomonas*) 的 16S rDNA 序列相似性为 98%，可认为 W7 菌株应属于盐单胞菌属。根据 W7 菌株已知的生理生化特性查阅伯杰细菌鉴定手册和盐单胞菌属的相关文献，均与该属特有的生理生化特性相符合。

2.5 W7 菌株产酶条件的试验

2.5.1 碳源试验

在发酵培养基中加入不同的碳源，质量分数为 1%，于 25 °C，150 r/min 培养 36 h，测酶活力，结果见表 1。菌株 W7 不利用木糖，虽然能利用葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、果糖、甘露糖、半乳糖生长，但均未能诱导胞外淀粉酶的产生，仅能在淀粉存在的条件下产胞外淀粉酶。

2.5.2 氮源试验

在发酵培养基中加入不同的氮源，质量分数为 0.5%，碳源为 1% 淀粉，于 25 °C，150 r/min 培养 36 h，测酶活力，结果见表 2。菌株 W7 对无机碳源和有机氮源均能利用，但有机氮源更能促进胞外淀粉酶的产生。

2.5.3 盐度对产酶的影响

在发酵培养基中加入不同质量分数的 NaCl，25 °C，150 r/min 培养 36 h，测酶活力。结果见图 3，NaCl

质量分数为 5% 时 W7 菌株产酶量最高，当 NaCl 质量分数为 20% 时菌株的生长受抑制。

表 1 各种碳源对产酶的影响

Tab.1 Effects of different carbon sources on the amylase production by the strain W7

碳源	菌体生长	酶活力(U/mL)
淀粉	++	250.98±33.59
葡萄糖	++	31.67±12.80
蔗糖	+	12.44±0.533
乳糖	+	24.01±9.65
麦芽糖	++	21.13±1.60
果糖	++	25.78±8.25
甘露糖	++	46.76±12.53
半乳糖	+	28.66±5.87
木糖	-	0

表 2 各种氮源对产酶的影响

Tab.2 Effects of different nitrogen sources on the amylase production by the strain W7

氮源	菌体生长	酶活力(U/mL)
牛肉膏	++	364.25±32.53
蛋白胨	++	329.56±22.93
胰蛋白胨	++	203.24±1.60
尿素	++	163.65±29.86
(NH ₄) ₂ SO ₄	++	229.26±20.26
NH ₄ NO ₃	++	216.06±7.98
NH ₄ Cl	++	237.56±23.46

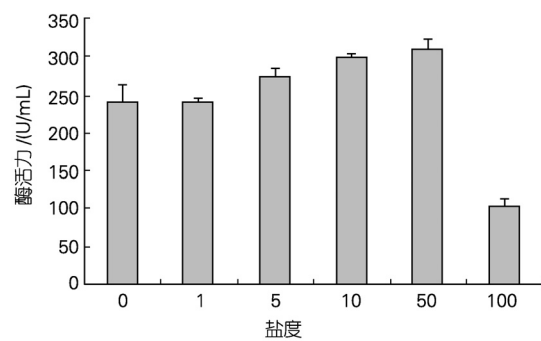


图3 盐度对产酶的影响
Fig.3 Effects of salinity on amylase production by the strain W7

2.5.4 金属离子对产酶的影响

在发酵培养基中加入 0.04% 的各种金属离子, 25 °C, 150 r/min 培养 36 h, 测酶活力, 见表 3。其中 Ba²⁺ 能明显促进菌体淀粉酶的产生, Zn²⁺ 则抑制淀粉酶的产生, 其余金属离子对淀粉酶的产生无太大的影响。

表 3 金属离子对产酶的影响

Tab.3 Effects of metal ion on amylase production by the strain W7

金属离子	菌体生长	酶活力(U/mL)
空 白	++	210.41 ± 2.67
MgSO ₄	++	225.87 ± 21.33
BaCl ₂	++	256.41 ± 6.58
CaCl ₂	++	193.82 ± 5.32
CaCO ₃	++	191.55 ± 14.93
LiCl	++	209.65 ± 21.86
CuSO ₄	+	165.91 ± 19.20
KCl	++	193.44 ± 13.86
MnCl ₂	++	201.36 ± 1.60
ZnSO ₄	+	55.81 ± 7.47
Fe ₂ (SO ₄) ₃	++	187.78 ± 17.60

2.5.5 表面活性剂对产酶的影响

淀粉酶是胞外酶, 考虑表面活性剂可能会有助于酶的释放, 在发酵培养基中加入常见的一些表面活性剂, 比较其对产酶的影响, 见表 4。结果表明 4 种表面活性剂对产酶并无明显促进作用。

表 4 表面活性剂对产酶的影响

Tab.4 Effects of surfactants on amylase production by the strain W7

表面活性剂	质量浓度 (g/L)	酶活力 (U/mL)
对 照	0	301.36 ± 22.93
洗衣粉	0.1	280.62 ± 9.56
Tween 80	0.1	260.26 ± 6.40
Triton x-100	0.1	321.34 ± 12.80
SDS	0.1	240.65 ± 5.87

2.5.6 培养时间和温度对产酶的影响

发酵培养基 pH 值调至 10.0, 分别在 15, 25, 35 °C 培养 60 h, 结果见图 4。菌株的产酶活性在 35 和

30 °C 时很快达到最高, 但不稳定, 25 °C 时, 菌株的产酶活性在其最高点能维持较长的时间, 20 和 15 °C 时, 菌株生长缓慢, 产酶活性明显较低, 说明 W7 菌株的最佳产酶温度是 25 °C。

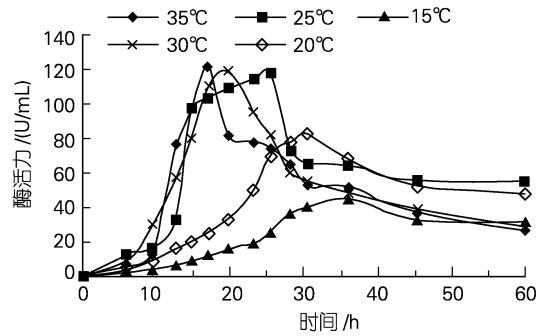


图 4 培养时间和温度对产酶的影响

Fig.4 Effects of cultural temperature and time on amylase production by the strain W7

2.5.7 起始 pH 值对产酶的影响

配制发酵培养基, 用 5% 的 NaOH 调至 7~13 的 pH 值范围, 于 25 °C, 150 r/min 培养 36 h, 测酶活力。发现 W7 菌株的最适产酶起始 pH 值为 10.0。在 pH 值为 12, 13 时均可生长, 但酶活力较低。

2.5.8 通气量对产酶的影响

在 250 mL 的三角摇瓶中装入不同量的发酵培养基, 25 °C, 150 r/min 培养 36 h, 测酶活力。结果表明, 当发酵培养基的装量在 20 mL 时 W7 菌株产酶量最高。

2.5.9 接种量对产酶的影响

将在液体培养基培养 18 h 的菌液按不同接种量接入摇瓶发酵培养基, 于 25 °C, 150 r/min 培养 36 h, 测酶活力, 实验结果表明, 接种量在 2% 时, 菌株 W7 产酶量最高。

2.6 淀粉酶粗酶液的性质

2.6.1 温度对酶活力的影响

分别在不同温度下进行酶反应, 测酶活力, 酶的最适温度为 40 °C, 在 35~45 °C 内酶活力较高(图 5)。

2.6.2 淀粉酶粗酶液酶活的最适 pH 值

用不同 pH 值的缓冲液配制淀粉底物溶液, 进行酶反应。结果表明, 此淀粉酶的最适 pH 为 10.0, 在 pH 9~11 的碱性范围内均有较高的酶活力(图 6)。

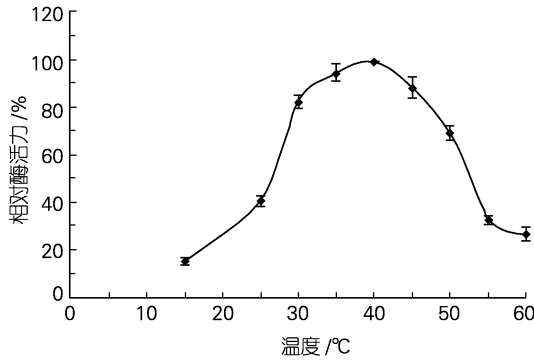


图5 酶的最适作用温度

Fig.5 Effect of temperature on amylase activity

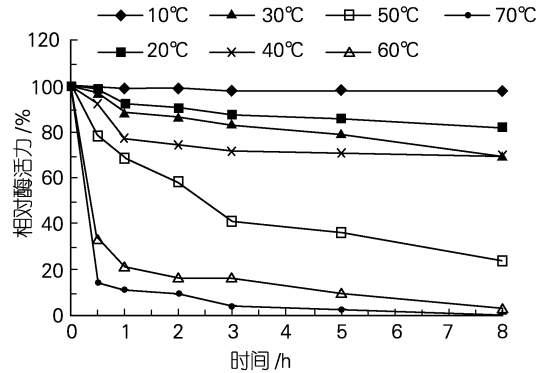


图7 酶的热稳定性

Fig.7 Effect of temperature on the stability of amylase

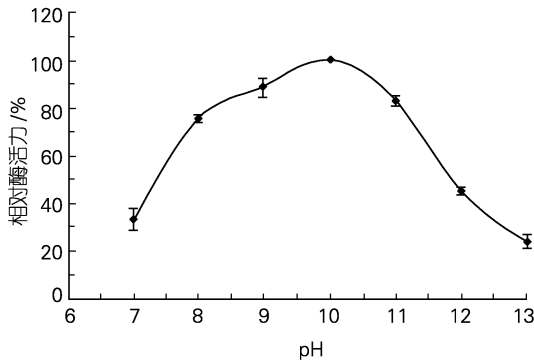


图6 酶的最适作用 pH 值

Fig.6 Effect of pH on amylase activity

表5 W7 菌株的其他生物活性

Tab.5 Other bioactivity of the strain W7

其他生物学活性	性状
纤维素选择性培养基	无活性
有机磷选择性培养基	无活性
无机磷选择性培养基	无活性
油脂选择性培养基	无活性
排硫选择性培养基	无活性
反硝化活性	有活性
亚硝化活性	无活性
硝化活性	无活性
氨化活性	有活性

2.6.3 淀粉酶粗酶液的热稳定性

将淀粉酶粗酶液分别在 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70°C 水浴中放置 0.5, 1, 2, 3, 5, 8 h, 测酶活力。粗酶液在 10 °C 和 20 °C 保温 8 h, 残余酶活力分别是 98 % 和 82 %, 粗酶液在 60 °C 和 70 °C 保温 0.5 h, 残余酶活力分别是 32 % 和 14 % (图 7), 说明酶蛋白对热敏感。

2.7 W7 菌株的其他生物学活性

将 W7 菌株划线于纤维素、有机磷、无机磷、油脂、排硫 5 种选择性培养基平板上, 3 d 后观察。并检测 W7 菌株的反硝化、亚硝化、硝化和氨化活性, 结果见表 5。W7 菌株具有反硝化和氨化活性。

3 讨论

作者从深海沉积物中筛选到具有胞外淀粉酶活

性的菌株 30 株, 国内外也有从深海环境中筛选到其他胞外酶如蛋白酶等的报道, 表明在深海环境中仍存在不少的有机物质^[7, 8]。经复筛比较, 选用编号为 W7 菌株为进一步实验菌株。W7 菌株能在盐度 100 和 pH7~13 的环境中生长, 盐度为 50 时产酶活性达到最高, 既能利用有机氮源也能利用无机氮源, 以及具有反硝化活性和氨化活性, 说明 W7 菌株具备多种营养类型和多种能量代谢类型, 能适应较广的生长条件, 能在深海低氧的条件下以硝酸盐和亚硝酸盐类作为呼吸链的最终电子受体, 进行无氧呼吸, 产生能量, 这些都与深海特殊复杂的自然环境有关。W7 菌株的淀粉酶最适作用温度是 40 °C, 最适作用 pH 值是 10, 参考有关淀粉酶的报道^[9~11], 是属于能在低温及碱性条件下具有较高活力的酶类。作者计划从 W7 菌株的反硝化和氨化活性及其所产淀粉酶出发, 利用分子生

物学手段,研究深海微生物在生理生化、活性物质的产生等方面与陆源微生物的差别。而且,通过生物工程手段,有希望将其应用于洗涤剂等工业生产中。

致谢: 本实验室的庄铁城教授在本研究中给予许多的指导工作,特此致谢。

参考文献:

- [1] 席峰,郑天凌,张瑶,等.深海微生物生态分布的若干特点[J].海洋科学,2004,28(2):64-68.
- [2] 席峰,郑天凌,焦念志,等.深海微生物多样性形成机制浅析[J].地球科学进展,2004,19(1):38-46.
- [3] Brown J R, Doolittle W F. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition[J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 1997,61(4):456-502.
- [4] 沈萍,范秀蓉,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999.
- [5] 奥斯伯 F, 金斯頓 RE, 塞德曼 JG, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [6] 林加涵, 魏文铃, 彭宣宪. 现代生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [7] Hideki K, Yoshihiro T, Kuniko K, *et al.* Characterization of α -maltotetraohydrolase produced by *Pseudomonas* sp. MS300 isolated from the deepest site of the Mariana Trench[J]. **Extremophiles**, 1998, 2: 401-407.
- [8] 张锐, 曾润颖. 极端微生物产碱性蛋白酶菌株的筛选及发酵条件研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28 (4): 5-9.
- [9] 张刚, 汪天虹, 张臻峰, 等. 产低温淀粉酶的海洋真菌筛选及研究[J]. 海洋科学, 2002, 26 (2): 3-5.
- [10] 贾士儒, 赵树欣, 郭波, 等. 耐碱性芽胞杆菌碱性淀粉酶研究 I. 菌种的分离与筛选[J]. 天津轻工业学院学报, 1994, 2: 1-6.
- [11] 阎浩林, 张惠莉, 梁丽莉, 等. 碱性淀粉酶产生菌的筛选和产酶条件的研究[J]. 微生物学杂志, 1996, 1: 26-30.

Isolation of a deep-sea strain *Halomonas* sp.W7 producing low-temperature alkaline amylase and studies on its fermentation condition

DAI Shi-kun¹, ZHENG Tian-ling^{1,2}, WANG Xiao-ying¹, ZHENG Wei¹

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. State Key Lab. of Marine Environmental Sciences, Xiamen 361005, China)

Received: Jan., 4, 2005

Key words: microbes in deep sea; amylase; fermentation condition

Abstract: 30 isolates producing extracellular amylase were screened from 27 deep-sea sediments. Phylogenetic analysis indicates that the strain W7 belongs to genus of *Halomonas* sp. It can grow at the range of pH 7~13 and salinity 0~10%. Its optimal growth temperature is 25 °C. The strain can utilize many types of carbon sources but produce amylase only in the presence of starch. It can utilize both inorganic nitrogen sources and organic nitrogen sources but the use of organic nitrogen sources increases amylase yield. The optimal fermentation conditions were as follows: 2% inoculation volume, 5% salinity and initial pH 10 with cultivating at 25 °C for 36~48 h on a shaker at a speed of 150 r/min. The optimal pH and temperature for the amylase activity are pH 10 and 40 °C respectively. This strain also shows the activity of denitrification and ammoniation.

(本文编辑:张培新)