

阿牙克库木湖嗜盐菌的分离及功能酶的筛选

孟凡旭¹, 吴 敏^{1*}, 张会斌², 童浩萱¹, 殷佳慧¹

(1. 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310027; 2. 阿尔金山国家级自然保护区管理处, 新疆 库尔勒 841000)

摘 要:从新疆阿尔金山国家自然保护区阿牙克库木湖采集的泥样和水样中,分离培养了 90 株嗜盐菌,其中多数为中度和极端嗜盐菌,颜色以红色和白色为主,细胞形态多为杆状、球状,97 %呈革兰氏阴性,研究结果表明该湖有着丰富的嗜盐微生物资源.对分离菌株进行了几种重要工业用酶的筛选,发现其中淀粉酶产生菌有 4 株,菌株 AJ225 和 AJ243 淀粉酶活性较高;蛋白酶产生菌有 7 株;脂肪酶产生菌有 13 株,菌株 AJ238 和 AJ265 具有较高的酶产量;在分离菌株中未检测到纤维素酶和木聚糖酶活性.

关 键 词:嗜盐菌;阿牙克库木湖;功能酶

中图分类号:Q939

文献标识码:A

文章编号:1008-9497(2006)06-671-05

MENG Fan-xu¹, WU Min¹, ZHANG Hui-bin², TONG Hao-xuan¹, YIN Jia-hui¹ (1. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Altun Mountain National Nature Reserve, Kuerle 841000, China)

Isolation and enzyme screening of halophiles from Ayakekum Lake. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2006, 33 (6): 671~675

Abstract: Mud and water samples were obtained from Ayakekum Lake located in Altun Mountain National Reserve of Xinjiang Uygur Autonomous Region, and ninety halophilic strains were isolated. Most of isolates were moderately or extremely Halophilic. The number of red and white colonies is greater than that of colonies with other colours. The cells of the isolates were mostly rod or cocci shaped, and approximately 97 % percent of the strains was Gram-negative. It was indicated that there are abundant resource of halophilic microorganism in Ayakekum Lake. Industrially important enzymes from these strains were screened subsequently. The result showed that four strains produce amylase, among which the strain AJ225 and strain AJ243 posses high enzyme productivity. Seven strains produced proteinase. Lipase is produced by thirteen strains, and two of them, strain AJ238 and AJ265, are high productive strains. Neither cellulase nor xylanase enzyme activity was detected among these strains.

Key words: Halophiles; Ayakekum Lake; enzyme

嗜盐菌是一类生长在高盐环境下的微生物.由于独特的生理性质,嗜盐菌在生物进化和遗传研究方面具有较高的研究价值,其功能酶具有极高的盐耐受性、较高的热耐受性和对有机溶剂的抗性.因此,嗜盐菌在工业生产中有着广泛的应用前景,也成为近几年研究的热点^[1~4].

盐湖和海洋是嗜盐菌的主要栖息环境.美国犹他州大盐湖、死海以及世界各海域都曾分离到大量嗜盐菌菌株和菌群,对其性质也做了深入的研

究^[5~7].我国是世界上盐湖数量最多、分布最广的国家之一,面积大于 1 km² 的现代内陆盐湖有 813 个^[8].尽管已对其中一些盐湖的微生物进行了研究^[9~12],但到目前为止,从我国盐湖分离并研究的嗜盐菌数量和种类还非常有限.新疆地区地域广袤,气候和地理环境独特,物种资源丰富.盐湖是新疆湖泊的主要类型,对其生物资源的研究和利用具有重要的意义.

从新疆阿尔金山国家自然保护区阿牙克库木湖

收稿日期:2005-09-09.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370029),国家重点基础研究发展规划资助项目(973 计划)子项目(2004CB719604-3).

作者简介:孟凡旭(1978-),男,硕士研究生,主要从事高盐环境中微生物的研究.

*通讯作者:吴敏,教授,wumin@zju.edu.cn.

分离纯化到 90 株嗜盐菌,在对其性质进行分析的基础上,针对工业生产中较重要的功能酶类,进行了产酶菌筛选.结果表明阿牙克库木湖具有丰富的嗜盐菌物种资源.

1 材料和方法

1.1 样 品

阿牙克库木湖位于新疆巴音郭楞蒙古自治州若

羌县祈漫塔格乡境内,是在中 - 新生代由于山间构造断陷而形成的盐湖.地理坐标东经 89°01'05"~89°40'30",北纬 37°22'30"~37°30'40",湖长 47 km,宽 7~8 km,面积 870 km²,湖面海拔 3 870 m,由于交通不便,该盐湖资源尚未得到开发利用.根据中国科学院盐湖研究所 1997 年 7 月取样,湖水矿化度 157.386 g/L,相对密度 1.105,水化学成分见表 1^[8].

2004 年 3 月,从阿牙克库木湖采集水样和土样各 15 个,样品放于 4 °C 冰箱保存并及时进行菌株分离.

表 1 阿牙克库木湖湖水化学成分分析

Table 1 Chemical analysis of the water from Ayakekum Lake								mg/L
Na	K	Ca	Mg	Cl	SO ₄	CO ₃	HCO ₃	Li
47 156.67	720.06	392.38	8 261.67	93 211.32	5 511.32	684.11	666.54	2.97
B ₂ O ₃	Fe	Zn	Ni	Cr	Cu	Sr	Rb	Cs
772.8	0.937	0.200	2.038	1.050	0.243	1.127	0.144	0.154

1.2 培养基

培养基 B(DSMZ Medium 97, /L): 7.50 g Casamino acids (Bacto), 10.00 g Yeast extract (Bacto), 3.00 g 柠檬酸三钠, 2.00 g KCl, 20.00 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0.05 g FeSO₄ · 7 H₂O, 0.20 mg MnSO₄ · H₂O, 250.00 g NaCl, pH 7.4.

培养基 C(DSMZ Medium 823, /L): 125.0 g NaCl, 160.0 g MgCl₂ · 6 H₂O, 5.0 g K₂SO₄, 0.1 g CaCl₂ · 2 H₂O, 1.0 g Yeast extract (Bacto), 1.0 g Casamino acids (Bacto), 2.0 g Starch, pH 7.0.

培养基 D(/L)^[13]: 10.00 g Yeast extract (Bacto), 7.50 g Casamino acids (Bacto), 2.00 g KCl, 3.00 g 柠檬酸三钠, 0.2 g MgSO₄ · 7 H₂O, 200.00 g NaCl, 36.00 mg FeCl₂ · 4 H₂O, 0.36 mg MnCl₂ · 4 H₂O, pH 7.0.

培养基 E(/L)^[14]: 250.00g NaCl, 20.00 g MgSO₄ · 7 H₂O, 3.00 g 柠檬酸三钠, 2.00 g KCl, 0.20 g 无水 CaCl₂, 10.00 g L37 (Oxoid), pH 7.0.

培养基 Y(/L): 88.0 g NaCl, 52.0 g MgCl₂ · 6H₂O, 1.0 g CaCl₂ (无水), 2.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 2.0 g K₂SO₄, 3.0 g 柠檬酸三钠, 100ul Trace Metals, 1.0g Glucose, 10 g Yeast extract (Bacto), 1.0g Casamino acid (Bacto), pH 7.8.

Trace Metals: 1.3 g ZnSO₄ · 7 H₂O, 0.3 g MnSO₄ · H₂O, 0.8 g Fe(NH₄)₂ (SO₄)₂ · 6H₂O, 0.15 g CuSO₄ · 5H₂O, 溶解于 200 ml 0.1 M HCl 溶液.

培养基 HM (Ventosa et al., 1982, /L): 100.0 g NaCl, 2.0 g KCl, 1.0 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0.36 g CaCl₂ · 2H₂O, 0.23 g NaBr, 0.06 g NaHCO₃, Tr FeCl₃, 5.0 g Protease-peptone (Difco), 10.0 g Yeast

extract (Bacto), 1.0 g Glucose, PH 7.2~7.4.

培养基 Y是根据阿牙克库木湖水样化学成分设计的.固体培养基加琼脂 20 g · L⁻¹.

1.3 分离培养

水样取 100 mL 经 0.22 μm 滤膜过滤,将滤膜投入 2 mL 不同液体培养基中生长 12 h,取菌液 100~200 μL 涂布平板,37 °C 光照培养.待菌落长出后,挑取单菌落反复划线纯化直至获得纯菌.土样则先经盐溶液悬浮,再取悬浮液进行培养.挑取纯化好的单菌接入试管划斜面,液蜡保存.

1.4 酶的筛选

用平板划线法得到单一菌落的纯种,采用平板透明圈法进行筛选,即在分离培养基上添加有酶作用的底物制成筛酶平板,倒置培养至形成明显菌落,观察底物作用状况以定性地确定菌种产酶能力.具体筛选方法如下:

淀粉酶 培养基中加入 1 %可溶性淀粉,制成平板,点上菌液培养,待菌落长成后用 Lugol's 碘液均匀铺于平板上染色检查透明圈的产生情况,有则为阳性,为淀粉酶产生菌.Lugol's 碘液配制方法为 1 g 碘和 2 g 碘化钾溶于 300 mL 去离子水中.

纤维素酶 培养基中加入 0.4 %微晶纤维素钠制成平板,接种菌液培养,待菌落长成后用 0.1 %刚果红染液均匀铺于平板上染色,菌落周围有透明圈出现的为阳性,为纤维素酶产生菌.

木聚糖酶 培养基中添加 1 %甘蔗渣制成平板,接种菌液培养,待菌落长成后用 0.1 %的刚果红染液均匀铺于平板上染色,菌落周围有透明圈出现的为阳性,为木聚糖酶产生菌.

蛋白酶 培养基中添加 1 %脱脂牛奶制成平

板,接种菌液培养,菌落周围有透明圈出现的为阳性,为蛋白酶产生菌.

脂肪酶 培养基中分别添加 1 % Tween 20、40、60、80 制成平板,接种菌液培养,若菌株是脂肪酶产生菌,则至少在一种添加 Tween 的平板上,菌落周围有白色晕圈出现.

2 结 果

2.1 菌株生长情况

从 6 种培养基中共分离到 90 株嗜盐菌,其中 B 培养基分离到 6 株,C 培养基分离到 39 株,D 培养基分离到 18 株,E 培养基分离到 17 株,Y 培养基分离到 2 株,HM 培养基分离到 8 株.如图 1 所示.

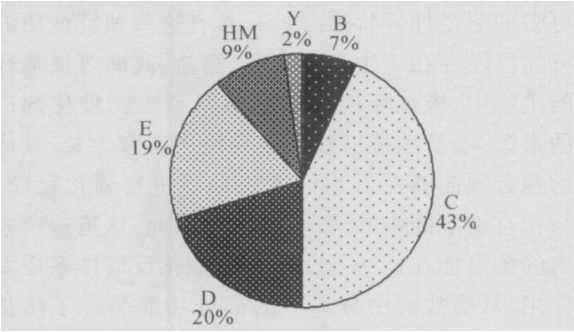


图 1 不同培养基分离菌株数比例

g. 1 Distribution of strains isolated from different media

2.2 菌落形态

菌落呈现出红、浅红、黄、白等不同颜色,其中红色和白色菌落居多,分别占菌株总数的 45 %和 41 % (见图 2). 菌落形状以圆形为主,占总数的 89 %,其余为长形,椭圆和不规则形. 在平板上生长一周后,菌落直径为 0. 5 ~ 3 mm,表面光滑,绝大多数不透明.

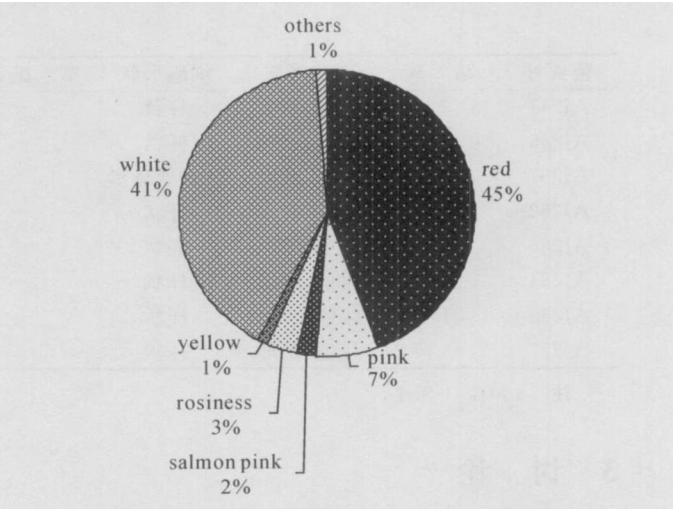


图 2 平板生长的不同颜色菌株间比例

Fig. 2 Distribution of strains with different pigmentations grown on agar plates

2.3 细胞形态

细胞形状为杆状的菌株最多,占菌株总数的 73 %,其次为球状,占菌株总数的 22 %,其余为不规则形或具有多种形态. 革兰氏染色多为阴性,约占总数的 97 %,表明分离菌株中大部分可能为古生菌,呈阳性的菌株全部集中于 HM 培养基分离的菌.

2.4 功能酶的筛选

在分离到的 90 株嗜盐菌中,淀粉酶生产菌有 4 株,其中 AJ 225 和 AJ 243 淀粉酶产量较高,菌株在平板生长一周后,透明圈与菌落直径之比在 3 : 1 以上. 蛋白酶产生菌有 7 株. 脂肪酶生产菌有 13 株,其中 AJ 238 和 AJ 265 具有较高的酶产量,菌株 AJ 265 在生长一周后透明圈的直径为菌株直径的 5 倍左右. 在分离到的菌株中未检测到纤维素酶和木聚糖酶活性. 表 2 显示了筛选到的 5 种功能酶生产菌株的形态特征和产酶情况.

表 2 菌株的形态特征和功能酶筛选

Table 2 Characteristics of isolated strains and enzyme screening

菌株号	培养基	菌落形态	细胞形状	革兰氏染色	淀粉酶	蛋白酶	纤维素酶	木聚糖酶	脂肪酶
AJ 206	C	红色,圆形	短杆状	-	-	-	-	-	+
AJ 207	C	浅红,圆形	杆状或球形	-	-	+	-	-	+
AJ 209	C	浅红,圆形	短杆状	-	-	-	-	-	+
AJ 218	C	粉红,长形	球形	-	-	-	-	-	+
AJ 219	C	粉红,圆形	杆状	-	-	+	-	-	+
AJ 223	C	白色,长形	杆状	-	-	-	-	-	+
AJ 224	C	粉红,圆形	球形	-	-	+	-	-	+
AJ 225	E	红色,圆形	球形	-	++	-	-	-	-
AJ 229	E	红色,圆形	杆状	-	+	-	-	-	-
AJ 233	B	白色,圆形	杆状	-	-	+	-	-	-
AJ 234	B	白色,圆形	杆状	-	-	+	-	-	-
AJ 236	C	红色,长形	球形	-	-	-	-	-	+
AJ 238	C	白色,圆形	杆状	-	-	-	-	-	++
AJ 243	E	红色,圆形	杆状	-	++	-	-	-	-

续表 2

菌株号	培养基	菌落形态	细胞形状	革兰氏染色	淀粉酶	蛋白酶	纤维素酶	木聚糖酶	脂肪酶
AJ247	E	红色,圆形	杆状	-	+	-	-	-	-
AJ255	D	白色,圆形	杆状	-	-	-	-	-	+
AJ257	C	白色,圆形	杆状或球形	-	-	+	-	-	-
AJ262	C	红色,圆形	杆状	-	-	+	-	-	-
AJ265	C	白色,圆形	杆状	-	-	-	-	-	++
AJ284	D	白色,圆形	杆状	-	-	-	-	-	+
AJ286	C	红色,圆形	杆状	-	-	+	-	-	-
AJ287	C	红色,圆形	杆状	-	-	-	-	-	+

注 + 阳性; - 阴性

3 讨 论

不同盐浓度环境下,嗜盐微生物的种类和分布均有所不同^[15]。低盐环境下,古菌所占的比例很小,真核生物生长最为繁盛,生物多样性较高,从中分离出的嗜盐菌通常在海洋里也很常见;随着盐浓度的提高,生活在其中的微生物种类急剧减少,嗜盐古菌逐渐占据明显优势,也具有一定的微生物多样性^[16]。嗜盐菌按照生存环境的盐浓度可分为轻度嗜盐菌、中度嗜盐菌和极端嗜盐菌。在盐浓度为 3 %~15 %的培养基中生长最好的嗜盐菌属于中度嗜盐菌,在盐浓度大于 15 %的培养基中生长最好的属于极端嗜盐菌(Kushner,1985),阿牙克库木湖盐浓度为 16 %左右,较为适合于中度和极端嗜盐菌生长。从实验结果来看,分离菌株在中等盐浓度的 C 培养基中生长最多,高盐的 D 培养基和 E 培养基次之,革兰氏染色大多为阴性,菌株大量为红色,也说明从该湖分离的菌株多为中度或极端嗜盐古菌。阿牙克库木湖昼夜温差大,太阳辐射强烈,自然条件独特,对该盐湖嗜盐菌的进一步研究将丰富人们对嗜盐菌的认识。

一般来说,从盐湖分离的嗜盐菌特别是极端嗜盐菌中产工业用酶的菌株的比例较低,这与盐湖通常位于高温、干旱、缺少相应有机营养物质的地理区域是密切联系的。阿牙克库木湖湖区植被稀疏,种类非常少,湖水缺少纤维素类的有机物,在分离到的菌株中未检测到纤维素酶和木聚糖酶的活性。阿牙克库木湖动物资源则较为丰富,湖周有藏野驴、野牛等有蹄类动物,湖内有棕头鸥、灰天鹅等鸟类。这些动物的排泄物等给湖水带来营养物质,这使湖中产蛋白酶和脂肪酶的微生物比例相对高些。在分离的 90 株嗜盐菌中,蛋白酶生产菌占 7.8 %,脂肪酶生产菌占 14.4 %,有 3 株菌同时检测到蛋白酶和脂肪酶活性。

目前,大多数生物工艺所用的酶都来源于非极端环境的微生物,为了得到在苛刻工业条件下具有最佳催化作用的酶,往往通过蛋白质工程对这些酶进行改造,使之具有更好的热稳定性,对有机溶剂具有更强的耐受性等特性。然而,具有这些独特性质的酶可能已经存在于生活在高温、高盐、高碱等极端环境的生物中,极端环境微生物是新型生物催化剂广阔来源。嗜盐菌能够在高盐环境中正常生长,其体内的酶必须能够在低水活度条件下进行催化反应,这与在有机溶剂中的情况相类似,因此,从嗜盐菌中分离的酶可能在高盐及非水介质催化反应体系中发挥作用。从嗜盐菌中分离出的部分功能酶除了嗜盐外,还表现出嗜(耐)热性,甚至在沸水中煮数分钟后仍可恢复活性^[17]。目前已有一些主要的酶类从嗜盐菌中分离出来并进行了性质研究^[18~21],但此类研究尚不能满足工业生产对菌株和酶性质的广泛要求。从阿牙克库木湖分离的菌株中,有多株嗜盐菌生产胞外功能酶,而且其中一些菌株产酶活性很高,对这些菌株的产酶条件以及酶的性质继续进行深入的研究将具有重要的研究意义和应用前景。

参考文献(References) :

[1] MARHUENDA-EGEA F C, BONETE M J. Extreme halophilic enzymes in organic solvents[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(4): 385-389.

[2] JAVOR B J. Industrial microbiology of solar salt production[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, 28: 42-47.

[3] BİRİRBİR M, SESAL C. Extremely halophilic bacterial communities in fiireflikiöchisar Salt Lake in Turkey [J]. *Turkish Journal of Biology*, 2003, 27: 7-22.

[4] OREB A. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 39:1-7.

[5] WAINO M, TINDALL B J, INGVORSEN K.

- Halorhabdus utahensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the archaea from Great Salt Lake, Utah [J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2000, 50: 183-190.
- [6] OREN A, GUREVICH P, GEMMELL R T, et al. *Halobaculum gomorrense* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon from the Dead Sea [J]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1995, 45 (4): 747-54.
- [7] OREN A, GINZBURG M, GINZBURG B Z, et al. *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov., nom. rev., an extremely halophilic bacterium from the Dead Sea [J]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1990, 40 (2): 209-218.
- [8] 郑玉喜, 张明刚, 徐昶, 等. 中国盐湖志 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 4-6, 242-245.
- ZHENG Yu-xi, ZHANG Ming-gang, XU Chang, et al. **China Salt Lake Log** [M]. Beijing: Science Press, 2002: 4-6, 242-245.
- [9] XIN H, L TOH T, ZHOU P, et al. *Natrinema versiforme* sp. Nov., an extremely halophilic archaeon from Aibi salt lake, Xinjiang, China [J]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 2000, 50: 1297-1303.
- [10] XU Y, WANG Z, XUE Y, et al. *Natrialba Hulubeiensis* sp. Nov., and *Natrialba chahannaoensis* sp. Nov., novel haloalkaliphilic archaea from soda lakes in Inner Mongolia Autonomous Region, China [J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2001, 51: 1693-1698.
- [11] 许学伟, 吴敏, 阮红, 等. 嗜盐古生菌 AJ4 中 BR 蛋白基因部分片段和 16S rRNA 基因序列研究 [J]. **中国生物化学与分子生物学报**, 2004, 20 (1): 55-60.
- XU Xue-wei, WU Min, RUAN Hong, et al. Partial sequence of the gene for a new BR protein, and nucleotide sequence of 16S rRNA encoding gene from a halophilic archaeum AJ4 [J]. **Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 2004, 20 (1): 55-60.
- [12] 徐晓红, 吴敏, 曹轶, 等. 嗜盐古生菌 AJ6 的分离及系统发育分析 [J]. **浙江大学学报: 理学版**, 2005, 32 (1): 83-88.
- XU Xiao-hong, WU Min, CAO Yi, et al. Isolation and phylogenetic analysis of halophilic archaea AJ6 [J]. **Journal of Zhejiang University: Science Edition**, 2005, 32 (1): 83-88.
- [13] XIN H, L TOH T, ZHOU P, et al. *Natronobacterium nitratireducens* sp. nov., a haloalkaliphilic archaeon isolated from a soda lake in China [J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2001, 51: 1825-1829.
- [14] OESTERHEL T D, STOECKENIUS W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane [J]. **Methods Enzymol**, 1974, 31: 667-678.
- [15] BENLLOCH S, LÓPEZ-LÓPEZ A. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern [J]. **Environmental Microbiology**, 2002, 4 (6): 349-360.
- [16] CASAMA YOR E O, MASSANA R. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern [J]. **Environmental Microbiology**, 2002, 4 (6): 338-348.
- [17] TOKUNAGA H, ISHIBASHI M, ARAKAWA T, et al. Highly efficient renaturation of beta-lactamase isolated from moderately halophilic bacteria [J]. **FEBS Letters**, 2004, 558: 7-12.
- [18] AMOOZEGAR M A, MALEKZADEH F, MALIK K A. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2 [J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2003, 52: 353-359.
- [19] WAINO M, INGVOSEN K. Production of beta-xylanase and beta-xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis* [J]. **Extremophiles**, 2003, 7 (2): 87-93.
- [20] HIRAGA K, NISHIKATA Y, NAMWONG S, et al. Purification and characterization of serine proteinase from a halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5 [J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2005, 69 (1): 38-44.
- [21] SANCHEZ-PORRO C, MELLADO E, BERTOLDO C, et al. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76 [J]. **Extremophiles**, 2003, 7 (3): 221-228.

(责任编辑 涂红)