

一株耐冷菌所产降解酶的特性及应用

诸葛斌^{1*} 徐巧² 堵国成¹ 张濛³ 方慧英¹ 诸葛健¹

(¹江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 生物工程学院, 工业微生物研究中心 无锡 214122)

(²江南大学环境与土木工程学院 无锡 214122)

(³Department of Biotechnology, Durban University of Technology, Durban 4000 P.O. Box 1334, South Africa)

摘要 从我国寒冷地区筛选到一株能产低温降解酶的菌株. 细菌学形态及16S rDNA鉴定表明, 该菌株属希瓦氏菌属 (*Shewanella*), 最适生长温度为5~15 °C, 属耐冷菌, 并暂命名为*Shewanella* sp. J5. 菌株J5分泌的降解酶中蛋白酶和淀粉酶所表现的活力较高, 在0 °C下分别仍能保持20%和40%的酶活性, 最适温度分别为40 °C和30 °C, 最适pH分别为8.0和7.0~10.0, 且对热敏感, 属于碱性低温酶; 金属离子中Mn²⁺、Fe²⁺对蛋白酶有明显的促进作用, 而淀粉酶对金属依赖性较小; HPSEC结果表明, 低温蛋白酶在水解酪蛋白过程中, 对相对分子质量>10 000的大分子肽水解能力很强. 脱氢酶酶活测定结果表明, 低温下菌株活性显著高于常温活性污泥, 5 °C下, 添加菌株J5到活性污泥中可使废水COD去除率提高33%. 因此, 该菌株在低温污水处理上具有一定的应用前景. 图6 表2 参17

关键词 耐冷菌; *Shewanella*; 碱性低温酶; 蛋白酶; 淀粉酶; 生物降解; 污水处理

CLC X172 : Q939.9

Properties and Application of Cold-adapted Enzymes Produced by a Psychrotrophic Bacterium

ZHUGE Bin^{1*}, XU Qiao², DU Guocheng¹, ZHANG Meng³, FANG Huiying¹ & ZHUGE Jian¹

(¹Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

(²School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

(³Department of Biotechnology, Durban University of Technology, Durban 4000 P.O. Box 1334, South Africa)

Abstract A strain producing cold-adapted degradation enzyme was isolated from cold northern China. The strain was identified as the genus *Shewanella* by the morphological identification and 16S rDNA sequence analysis, and named *Shewanella* sp. J5. The optimal growth temperature of strain J5 was 5~15 °C, indicating that it was a psychrotrophic bacterium. The activities of protease and amylase were the strongest among those enzymes produced by strain J5, and sensitive to high temperature. Property test showed the protease had 20% residual activity at 0 °C, and the optimal temperature and pH were 40 °C and 8.0, respectively, while the amylase could keep 40% residual activity at 0 °C, and the optimal temperature and pH range were 30 °C and 7.0~10.0, respectively. The protease activity could be obviously stimulated by Mn²⁺ and Fe²⁺. HPSEC results showed that in the process of hydrolysis of casein protein the macromolecular peptides were easily degraded into small peptides by the protease. Compared with activated sludge, strain J5 possessed higher dehydrogenase activity at low temperatures. At 5 °C, the removal rate of COD could increase by about 33% in activated sludge after adding this strain. It suggests that this strain may have broad application in cryogenic wastewater treatment. Fig 6, Tab 2, Ref 17

Keywords psychrotrophic bacterium; *Shewanella*; alkaline cold-adapted enzyme; protease; amylase; biodegradation; wastewater treatment

CLC X172 : Q939.9

低温菌是生活在低温环境下的微生物, 耐冷菌是低温菌中的一类, 在0~5 °C可生长繁殖, 最高生长温度可达20 °C以上. 低温菌的冷适应机制之一是其体内参与代谢的酶在低温下仍具有高效催化活性^[1]. 污水生物处理是一系列酶促反应过程, 水中的污染物在微生物酶的催化下进行氧化分解, 冬季低温往往使常温酶失活, 处理效果严重下降. 低温酶的低温催化特性在寒冷地区低温污水处理及工业上具有重要应用价值, 因此受到广泛的关注^[2]. 目前, 同时产低温蛋白酶和低温淀粉酶等多种低温酶细菌的研究还鲜见报道.

本研究室从我国北方寒冷地区水土样中筛选分离得到一株能产低温复合酶的菌株J5. 该菌株所产生的低温酶中含

有蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等, 其中以蛋白酶和淀粉酶的活性最高. 本研究通过形态及16S rDNA对该菌株进行了鉴定, 并考察了其酶学性质及在低温废水处理上的应用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 冬季从我国寒冷地区采集水土样, 筛选得到菌株J5.

1.1.2 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基: 胰蛋白胨1%, NaCl 1%, 酵母粉0.5%, 琼脂粉1.5%, 蒸馏水配制, pH 7.0. 蛋白酶产生菌筛选培养基: 酪蛋白2%, 琼脂1.5%, 蒸馏水配制, pH 7.0. 淀粉酶产生菌筛选培养基: 可溶性淀粉2%, 琼脂粉1.5%, 蒸馏水配制pH 7.0. 脂肪酶产生菌筛选培养基: 蛋白胨1%, NaCl

收稿日期: 2010-01-19 接受日期: 2010-02-10

*通讯作者 Corresponding author (E-mail: Bzhuge@yahoo.com.cn)

0.5%, CaCl₂·7H₂O 0.01%, Tween 80 1%, 琼脂1.5%, 蒸馏水配制, pH 7.0. 以上培养基0.12 MPa灭菌20~25 min.

1.1.3 废水来源 模拟蛋白废水、淀粉废水及油脂废水, 分别以酪蛋白、可溶性淀粉及花生油为碳源, 氯化铵为氮源, KH₂PO₄为磷源, 添加适量微量元素C:N:P=100:5:1^[3], 进水COD控制在600 mg/L左右, 水温约5℃.

生活污水采自江南大学杏园生活区, 添加适量碳/氮源, COD约为600 mg/L左右.

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定 依据形态特征与生理生化反应特性, 参照《常见细菌鉴定手册》^[4]鉴定. 菌株分子生物学鉴定方法参照文献^[5], 将获得的序列登陆Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 应用BLAST程序与数据库中的已有细菌16S rDNA序列进行相似性比较分析.

1.2.2 温度对菌株生长的影响 将菌株接入LB液体培养基中, 分别于不同温度下的摇床中150 r/min振荡培养, 隔一定时间取样, 测600 nm下的光吸收值, 绘制菌株不同温度下的生长曲线.

1.2.3 粗酶液制备及酶活测定 将菌株于5℃下培养72 h, 培养产物经冷冻离心去除细菌细胞, 取上清即得粗酶液. 蛋白酶活性测定: 参考张树政的方法 (Folin-酚试剂显色法)^[6]测定, 酶活力定义为: 在40℃下, 每分钟催化酪蛋白水解生成1 μg酪氨酸的酶量为一个单位 (U). 淀粉酶活性测定: 参照文献^[7]. 淀粉酶活性定义: 100 mL粗酶液中的酶在30℃与底物淀粉作用10 min, 水解10 mg淀粉产生的酶活为1个淀粉酶活性单位. 低温蛋白酶水解酪蛋白过程的色谱分析^[8]: 配制质量浓度为2%的酪蛋白溶液, 升温至40℃, 调pH至8.0, 按酶与酪蛋白溶液的体积比为1:1加入制备好的粗酶液, 在恒温、恒pH、恒搅拌速率条件下分别水解2 h、4 h、6 h. 取相应时刻酶解液5 mL, 沸水浴加热灭酶15 min, 再经0.45 μm微孔滤膜过滤后, 进行HPSEC分析. HPSEC操作条件为: 流动相—45%乙醇+0.1%三氟乙酸+水; 流速—0.5 mL min⁻¹; 进样量40 μL; 检测波长220 nm; 检测时间30 min; 柱温30℃.

1.2.4 酶学性质研究 最适反应温度及温度稳定性: 取粗

酶液分别在0℃、8℃、16℃、24℃、32℃、40℃、48℃、54℃下, 一组直接与底物反应10 min后分别测定酶活, 另一组分别各个温度下保温2 h后测定. 最适反应pH及pH稳定性: 在pH 5.0~11.0范围内, 缓冲液是0.1 mol L⁻¹磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 一组直接与底物反应10 min分别测定酶活, 另一组在15℃下保温2 h后测定以未保温 (4℃保存) 的酶活力为100%. 金属离子对酶活性的影响: 在不同体系中分别加入终浓度为0.2 mol L⁻¹的各种金属盐离子K⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Fe³⁺、Ni²⁺、Na⁺和Cu²⁺, 以未加金属离子的酶的活性为100%, 测定相对酶活力.

1.2.5 废水降解及测定方法 分别取低温菌株活化培养的培养液, 以6 000 r/min的转速离心5 min后弃掉上清液, 将沉淀物用磷酸缓冲液清洗两遍, 用蒸馏水稀释至原OD值, 以一定的接种量接种于250 mL试验用水中, 置于5℃下曝气培养24 h后取样, 将样品以3 000 r/min离心10 min, 取上清液测定COD去除效果. COD测定: 重铬酸钾法^[9], 平行样3个取其平均值.

2 结果与讨论

2.1 菌株鉴定

由图1-a可以看出, 菌株J5在中温37℃时几乎不生长, 在低温 (5℃, 15℃) 环境中生长情况良好, 而一般常温微生物在37℃时生长情况最好, 在5℃时生长很缓慢^[10]. 该菌株适应低温环境能力较强, 5℃培养时在蛋白酶及淀粉筛选培养基上呈现出明显的透明圈, 在脂肪酶筛选培养基上呈现微弱晕圈, 说明该菌具有较强的水解酪蛋白及淀粉能力并具有一定的产脂肪酶能力. 按照Morita的定义^[1], 该菌被归类为耐冷菌.

该菌电镜扫描结果如图1-b, 菌落呈肉红色, 圆形, 湿润, 边缘整齐, 不透明, 革兰氏染色为阴性. 将菌株J5的16S rDNA序列与BLAST数据库中的序列进行同源性比较, 发现与其同源性较高 (98%~99%) 的菌株均为希瓦氏菌属 (*Shewanella* sp.), 因此, 根据鉴定方法^[11, 12], J5菌株属于希瓦氏菌属, 将其命名为*Shewanella* sp. J5.

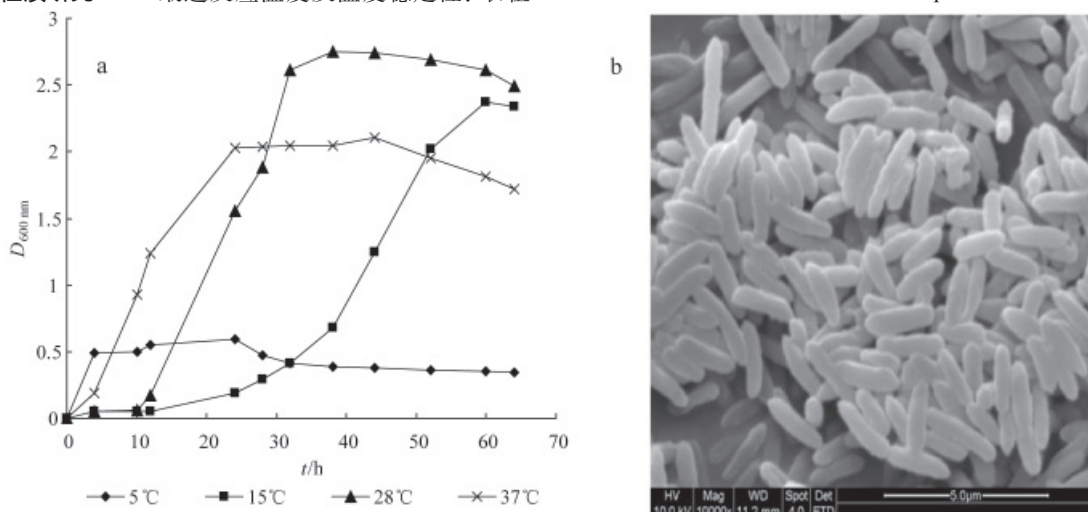


图1 菌株J5在不同温度下的生长曲线(a)及扫描电镜照片(b)
Fig. 1 Growth curve of strain J5 at different temperatures (a) and its electron micrograph (b)

2.2 菌株J5所产蛋白酶和淀粉酶性质

2.2.1 温度对酶活性的影响 耐冷蛋白酶的最适酶活一般都在30~40℃,同时温度适应性不是很广,一般在低于13℃时酶活急剧下降,在0℃附近活性很小^[13].菌株J5所产蛋白酶的最适温度为40℃(图2-a),在0℃时仍有最高酶活的20%,与目前发现的大部分低温蛋白酶最适催化温度相似.从酶对温度的稳定性来看,该蛋白酶在低温和室温条件下能维持较高的活性,同时对热具有不稳定性(图2-b),48℃下保温2h后残余酶活只有最大酶活的8.3%,这是由于高温条件下低温酶的柔韧性遭到破坏极易失活^[14].

从图2-a可以看出,菌株J5所产淀粉酶最适催化温度为30℃,是一种较典型的耐冷性低温酶.与目前大部分低温淀粉酶的最大不同之处是该酶在0~30℃环境下具有较高的催化活性,这样的温度适应性在已经发现的低温淀粉酶中是很少见的;而且,该淀粉酶在16℃下的酶活为最高酶活的65.7%,而在0℃下,仍具有高达40.0%的活性,这不同于绝大部分低温淀粉酶.从酶对温度的稳定性(图2-b)来看,该淀粉酶在0~32℃下相当稳定,在32℃保温2h后仍有近100%的酶活,其在低温或常温下都能够发挥催化性能的特性可应用于工业中.

2.2.2 pH对酶活性的影响 菌株J5所产蛋白酶活性在pH 8.0时达到最高(图3-a),当pH为7.0~9.0时具有80%以上活性,属于碱性蛋白酶.该蛋白酶具有较宽的稳定性,pH 6.0~9.0时相对酶活全部在70%以上(图3-b),说明其对碱性环境具有更强的耐受性.

菌株所产淀粉酶酶活在酸性条件下受到一定的抑制,而在碱性环境中能维持在较高水平(图3-a),在pH为7.0~10.0时均在90%以上,为碱性淀粉酶.从该淀粉酶对pH稳定性(图3-b)来看,反应2h后,在酸性条件下剩余酶活在50%左右,而在碱性条件下至少在80%以上,特别是在pH 11.0时仍有75.9%的剩余酶活,可见该淀粉酶在碱性条件下具有较好的稳定性,且在pH 9.0的时候稳定性最好.

2.2.3 金属离子对酶活性的影响 从图4-a可以看出, Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 对菌株J5所产蛋白酶有明显的促进作用, Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 则无明显作用, Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 有一定的抑制作用但不是十分显著.几乎1/3的酶均需要金属离子作为辅基,根据金属离子-蛋白质相互作用强度一般将需要金属的酶分为两类:金属酶和金属-激活酶^[6],从这点来看,菌株所产蛋白酶为金属酶,在 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 作为辅基时酶活明显升高.除 K^+ 对菌株J5所产淀粉酶活性有一定促进作用外,没有发现能够

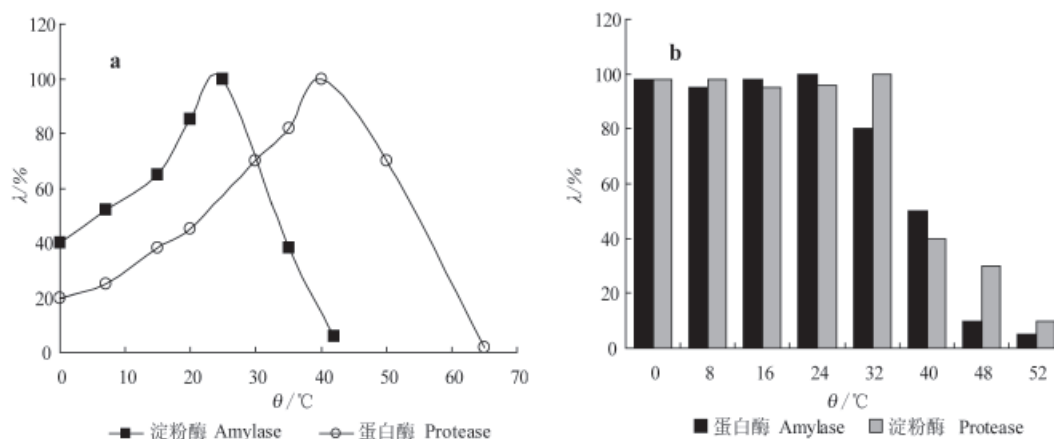


图2 温度对酶活性(a)及热稳定性(b)的影响
Fig. 2 Effect of temperature on the activities (a) and thermostabilities (b) of enzymes

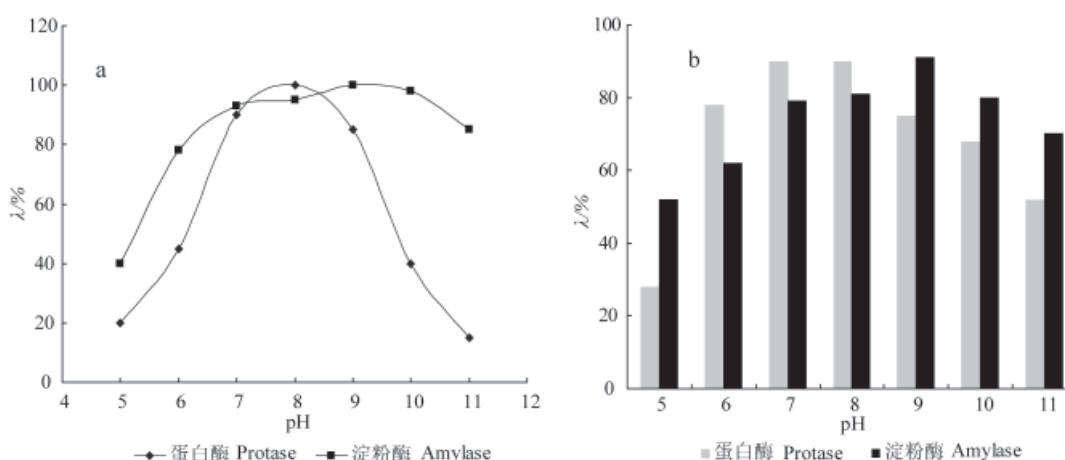


图3 pH对酶活性(a)及pH稳定性(b)的影响
Fig. 3 Effect of pH on the activities (a) and stabilities (b) of enzymes

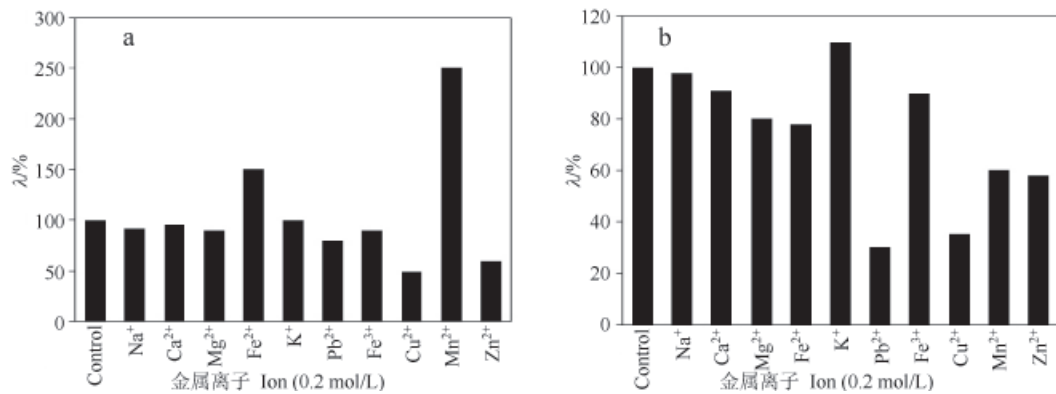


图4 金属离子对蛋白酶(a)和淀粉酶(b)活性的影响
Fig. 4 Effect of various inorganic ions on the activities of protease (a) and amylase (b)

明显提高酶活的金属离子, Pb^{2+} 和 Cu^{2+} 能明显抑制酶活(图4-b)。

综合蛋白酶和淀粉酶酶活受金属离子影响的结果来看, 菌株J5所产的低温酶对金属离子有较好的耐受性, 而且涉及的绝大部分金属离子是城市或工业污水中的主要污染金属离子, 因此, 菌株J5可在治理含金属离子的污水处理中得到应用。

2.2.4 蛋白酶低温酶解性能分析 利用相对分子质量差异进行分离的高效凝胶排阻色谱(HPSEC)技术分析酶解过程, 结果如图5, 对比a、b、c、d发现, 酶解过程中, 主要发生变化的是大分子峰I和峰II, 随着酶解时间的延长, 大分子峰I和峰II所占的比例逐渐下降。通过以蛋白质标准品溶液的细胞色素C (M_r 12 500)、杆菌酶 (M_r 1 450)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (M_r 451)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (M_r 189) 为对照进行HPSEC定量测定, 结果表明随着水解时间的增加, 酪蛋白分子量分布情况有明显改变, 大分子肽 (>10 000) 所占比例逐渐减少、小分子肽 (<1 000) 比例则逐渐增大, 表明该蛋白酶在低温条件下具有很好的蛋白分解性能。

2.3 菌株J5所产脱氢酶的低温特性

在污水处理过程中, 脱氢酶活性水平的高低直接关系到有机物降解速度, 以及生物处理设施的运行效果, 已成为评价污水处理能力的重要指标^[16]。需氧生物处理反应器中的微生物活性、去除有机物的效能与水温有关。为考察菌株J5活性受温度的影响情况, 以相同VSS的活性污泥中的中温菌群为对照测定脱氢酶活性, 结果见表1。从表1可以看出, 在常、低温条件下菌株J5均有较高的活性, 而取自好氧池的常温活性污泥在4℃时的脱氢酶活性不到耐冷菌菌株J5脱氢酶活性的10%, 表明耐冷菌在低温条件下仍能保持相对较高的

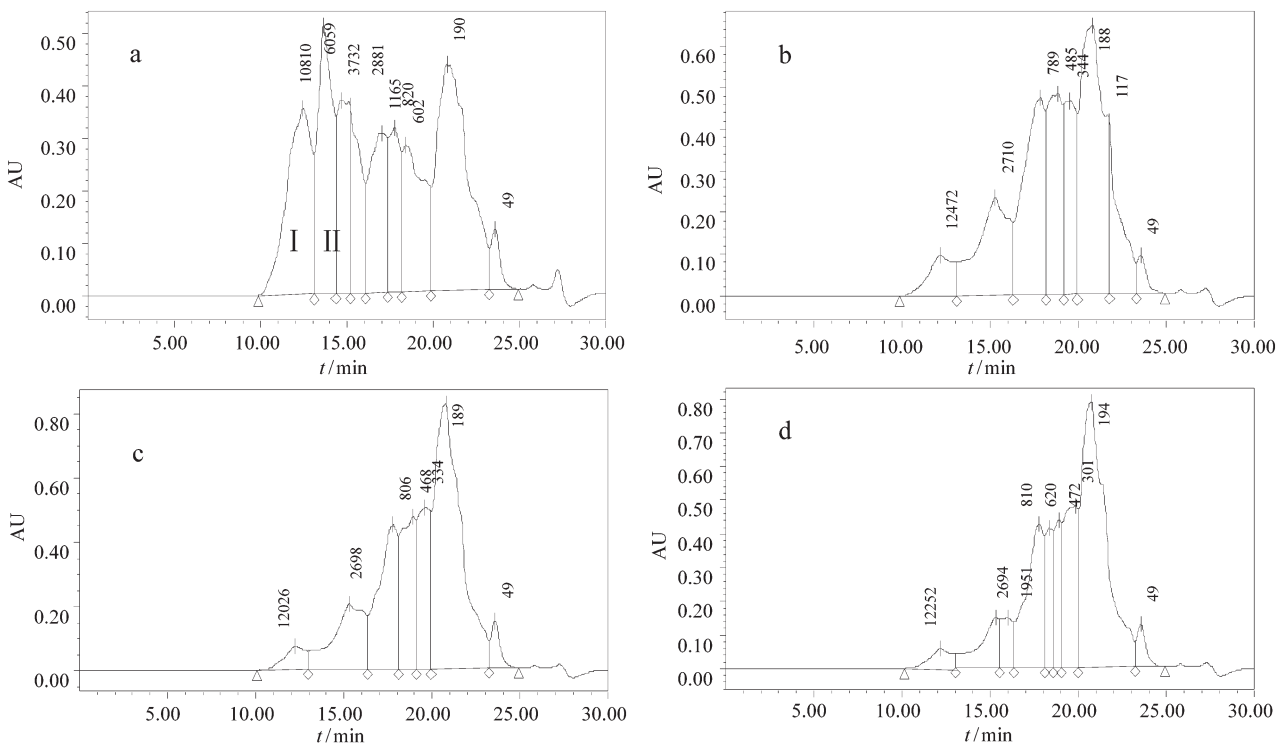


图5 0 h (a), 2 h (b), 4 h (c) 和 6 h (d) 时酪蛋白-低温蛋白酶水解体系的HPSEC图
Fig. 5 HPSEC results of hydrolysis of casein at 0 h (a), 2 h (b), 4 h (c) and 6 h (d)

脱氢酶活性,有利于有机物降解。

表1 耐冷菌在不同温度时的脱氢酶活性 ($A/\mu\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

Table 1 TTC-dehydrogenase activity ($A/\mu\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) of strain J5 at different temperatures

$\theta/^\circ\text{C}$	4	8	16	24	30	35	40
J5	9.42	23.48	42.47	45.77	39.17	16.34	5.66
活性污泥 Sludge	0.90	10.47	18.46	28.56	36.01	46.38	48.78

2.4 菌株J5在低温废水处理上的运用

2.4.1 菌株J5对不同低温生活污水处理 从不同类型典型生活废水的处理效果(图6)可以看出,该菌株对有机废水具有较广泛的适应性,对实际生活污水、蛋白质废水、淀粉废水和油脂废水均有较好的降解能力,5℃下曝气24 h时其COD去除率分别可达68.2%、75.6%、80.1%和58.3%。在降解过程中蛋白废水及淀粉废水的去除效果要优于油脂废水,这与该菌具有较高蛋白酶和淀粉酶活性有关。

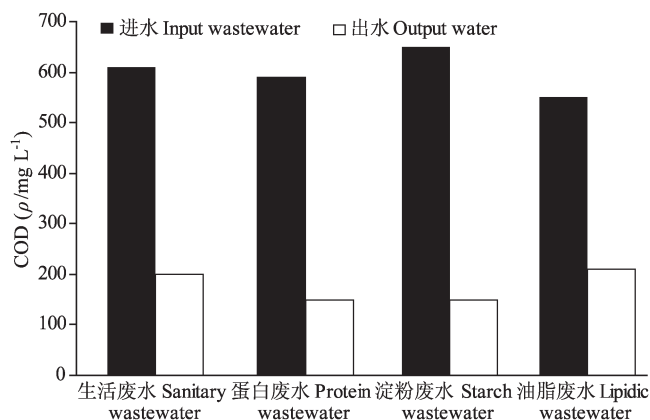


图6 菌株J5对不同低温有机废水的处理效能

Fig. 6 Removal rates of different organic wastewaters treated by strain J5

2.4.2 菌株J5在活性污泥法中的运用 在自制的装置中装入生活污水,加入活性污泥使其沉降比约为30%,再将J5菌按 $V_{\text{菌液}}/V_{\text{污水}}=1\%$ 的接种量投加至体系中,以活性污泥为对照,分别放置在5℃下进行两组曝气试验。8 h后,取上清液测定水中有机物浓度,投加耐冷菌后去除率较对照高出33%。结果(表2)表明该耐冷菌对活性污泥的适应性较好,与活性污泥中的菌群存在协同作用,在常规活性污泥法中投加耐冷菌可明显提高污水去除率,姜安玺等也得到了类似的结论^[17]。

表2 活性污泥中投加低温菌后COD去除效果

Table 2 Effect of adding strain J5 in activated sludge on removal rate of COD

COD ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	活性污泥 Activated sludge	J5+活性污泥 J5+activated sludge
进水 Input	580	580
出水 Output	334	142
去除率 Removal rate ($r/\%$)	42.4	75.6

3 结论

1) 采用低温富集法筛选得到一株产低温降解酶的菌株J5,其适宜生长温度为5~15℃,属耐冷菌,分子生物学鉴定表明该菌株属于希瓦氏菌属(*Shewanella*)。

2) 菌株J5可产蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等,其中蛋白酶、淀粉酶活性最高。0℃下其蛋白酶、淀粉酶分别能保持20%和40%的酶活性,对热敏感,是典型的碱性低温复合酶。该产复合酶菌株在低温有机废水处理上具有广阔的应用前景。

3) 菌株J5在低温下对不同类型的生活污水均有一定降解能力;其脱氢酶活性明显较常温活性污泥高。水温5℃时,将菌株J5投加至活性污泥中可使COD去除率提高33%以上。通过在常温活性污泥中投加耐冷菌来提高污水中污染物的去除率是可行的。

References

- Morita RY. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev*, 1975, **39** (2): 144~167
- Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: Molecular basis of cold adaptation. *Cell Mol Life Sci*, 1997, **53** (10): 830~841
- Sundaresan N, Philip L. Performance evaluation of various aerobic biological systems for the treatment of domestic wastewater at low temperatures. *Water Sci Tech*, 2008, **58** (4): 819~830
- 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. 66~127
- Cui XL, Mao PH, Zeng M. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardioaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51** (2): 357~363
- 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1984. 387~449
- Bai Y (白玉), Yang DQ (杨大群), Wang JH (王建辉), Zhang GS (章高森), Xu SJ (徐世健), Liu GX (刘光琇), An LZ (安黎哲). Isolation and screening of cold-active enzymes-producing psychrotrophic bacteria from permafrost in the tianshan mountains. *J Glaciol Gecoryol* (冰川冻土), 2005, **27** (4): 615~618
- Qi W (齐崑), He XM (何明霞), HeZM (何志敏), Shi DQ (史德青). Chromatographic analysis on tryptic hydrolysis of whole casein. *Chin J Chromatography* (色谱), 2002, **1** (20): 1~5
- 国家环境保护局. 水和废水检测分析方法. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002
- Knoop S, Kunst S. Influence of temperature and sludge loading on activated sludge setting, especially on *Microthrix parvicella*. *Water Sci Tech*, 1998, **37** (4~5): 27~35
- Devereux R, He SH, Doyle CL, Orkland S, Stahl DA, LeGall J, Whitman WB. Diversity and origin of desulfovibrio species: Phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol*, 1990, **172** (7): 3609~3619
- Fry NK, Warwick S, Saunders NA. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylo-geny of the family Legionellaceae. *J Gen Microbiol*, 1991, **137** (5): 1215~1222
- Russell NJ. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles*, 2000, **4**: 83~90
- Zeng Y, Yu Y, Chen B, Li H. Extracellular enzymatic activities of cold-adapted bacteria from polar oceans and effect of temperature and salinity on cell growth. *Chin J Polar Sci*, 2004, **15**: 118~128
- Shen T (沈同), Wang JY (王镜岩). Biochemistry. Beijing, China: Higher Education Press (北京: 高等教育出版社), 1990
- 陈翔. 脱氢酶在环境监测中的应用概况. 解放军预防医学杂志, 1997, **15** (6): 459~462
- Jiang AX (姜安玺), Han XY (韩晓云), He LR (何丽荣). Study on domestic sewage treatment by seeding combined psychrotrophs bacterium. *J Nat Sci Heilongjiang Univ* (黑龙江大学自然科学学报), 2005, **22** (1): 2~8