

一株嗜热纤维素分解菌的分离及其酶学性质的初探

曲小爽^{1,2}, 顿宝庆¹, 郭明鸣^{1,2}, 宋立立^{1,3}, 许修宏²,
张保明¹, 路明¹, 李桂英¹

(1. 中国农业科学院作物科学研究所, 国家农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 中国农业科学院生物质能源研究中心, 北京 100081; 2. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; 3. 西北农林科技大学, 陕西 杨凌 712100)

摘要:利用海南热泉附近腐烂朽木及土壤, 筛选分离到一株具有较高纤维素酶活性的纤维素分解菌 WQ-50, 经生理生化特性及遗传分析初步鉴定其为环状芽孢杆菌属菌株。当以复筛培养基发酵培养时, 该菌株在 55℃、pH 6 条件下生长较好。在该条件下, 以经碱预处理的玉米秸秆粉为唯一碳源发酵培养 5 d 时产酶达到最大值, 羧甲基纤维素酶活性为 6.8 IU/mL, 滤纸酶活性为 3.5 IU/mL。

关键词:嗜热纤维素分解菌; 筛选; 纤维素酶; 鉴定

中图分类号: S216.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-0864(2009)01-0124-05

Initial Studies on Isolation of a Thermophilic Cellulose-degrading Bacteria and its Enzymology Characteristics

QU Xiao-shuang^{1,2}, DUN Bao-qing¹, GUO Ming-ming^{1,2}, SONG Li-li^{1,3}, XU Xiu-hong²,
Zhang Bao-ming¹, LU Ming¹, Li Gui-ying¹

(1. National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Institute of Crop Sciences, Biomass Energy Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 2. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 3. Northwest A & F University, Shanxi Yangling 712100, China)

Abstract: WQ-50 was isolated from decayed wood and soil near hot spring in Hainan. It was identified as *Bacillus circulans* by preliminary physiological and biochemical characteristics and genetic analysis. When fermented by CMC-Na culture medium, strain WQ-50 strain could grow well under PH 6 and 55℃. Under this condition, when fermented by zymolytic culture medium with alkalinized pretreated corn stalk powder as the sole carbon source, enzyme production reached maximum after 5 days, the CMCase activity of WQ-50 is 6.8 IU/mL and FPA activity of WQ-50 is 3.5 IU/mL.

Key words: thermophilic cellulose-degrading bacteria; screen; cellulose enzyme; identification

纤维素是地球上数量最大的可再生能源物质, 每年全球光合作用的产物高达 $1.5 \times 10^{11} \sim 2.0 \times 10^{11}$ t, 是人类社会赖以生存的基本物质来源。微生物对它的降解、转化是自然界碳素循环的重要环节, 对这个过程的有效利用可望在能源、饲料和食物的持续供应上发挥巨大的作用^[1]。对纤维素酶产生菌的研究过去多集中于真菌的研究和应用, 鉴于细菌繁殖和产酶速度快、发酵周期

短, 有利于工业生产, 故近年来对细菌产纤维素酶日益引起重视。纤维素酶的比活力一般都很低, 因而产酶成本高。据估计, 纤维素水解成葡萄糖所需的酶蛋白要比淀粉相应水解所需的酶蛋白多 100 倍, 这是影响纤维素酶实际应用的重要原因之一。因而, 筛选纤维素酶比活力高的菌株无疑具有重要的意义。

由嗜热菌产生的酶被称为嗜热酶, 这些酶具

收稿日期: 2008-10-30; 修回日期: 2008-11-12

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目 (2006BAD07A04); 农业部农村能源综合建设项目 (2130138-0-08); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2060302-13) 资助。

作者简介: 曲小爽, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail: xiaoshuang78611@163.com。通讯作者: 李桂英, 研究员, 从事生物质能源研究。E-mail: liguiying@caas.net.cn。顿宝庆, 助理研究员, 从事能源和环境微生物研究。E-mail: baoqingdun9@hotmail.com

有典型的热稳定性^[2]。将嗜热酶应用于工业催化具有明显的优势,如:易纯化、对化学变性剂具有强抗性、反应速率和效率高和对环境更加绿色环保。因此,嗜热酶具有很高的商业应用价值,并有可能带来巨大的经济效益^[3~5]。另外,嗜热酶作为研究热稳定性和热活性的蛋白模型,为蛋白工程设计更加稳定的酶蛋白提供了有用的信息^[2]。

本研究自海南某热泉附近腐烂朽木及土壤中分离、筛选出一株具有较高纤维素分解能力的嗜热菌株,对该菌株的形态、生理生化特性和 16S rRNA 序列进行了分析测定,初步鉴定其为环状芽孢杆菌属菌株,并探讨研究了该菌株培养的最适条件和产酶的最适条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 嗜热纤维素分解菌,供试材料采自海南某温泉附近腐烂朽木及土壤。

1.1.2 试剂 化学试剂均为分析纯,购自北京化学试剂公司;分子生物学试剂购自 Takara 公司和 NEB 公司,引物合成及测序由上海生物工程公司完成。

1.1.3 培养基 富集培养基(液体):CMC-Na 1%, K_2HPO_4 0.1%, Na_2CO_3 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.015%, $MnSO_4$ 0.00005%;蛋白胨 1.0%;酵母膏 1.0%。

分离培养基(固体):CMC-Na 1%, K_2HPO_4 0.1%, Na_2CO_3 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.015%, $MnSO_4$ 0.00005%,蛋白胨 1.0%,酵母膏 1.0%,琼脂粉 1.6%。

复筛培养基(固体):CMC-Na 1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%,蛋白胨 0.1%,酵母膏 1.0%,琼脂粉 1.5%。

发酵产酶培养基(液体):玉米秸秆粉 2.3%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.25%, KH_2PO_4 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $CaCO_3$ 0.06%。

1.2 方法

1.2.1 分离和纯化 样品置于无菌三角瓶中,加入 10 倍体积无菌水打散均匀后,取 5 mL 悬液加入盛有 50 mL 富集培养基的三角瓶,28℃、150

rpm 振荡培养后 3~5 d,移取 5 mL 培养液至另一盛有新鲜培养基的三角瓶中继续培养。取富集后的培养液做 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 梯度稀释,分别涂布筛选平板,恒温 28℃ 倒置培养,分离能够旺盛生长、并在刚果红染色 NaCl 脱色后可以观察到菌落周围有明显透明水解圈的菌株。

1.2.2 形态特征、生理生化特性以及化学组成分析^[6~9] 由中国农业微生物菌种保藏中心协助完成。

1.2.3 WQ-50 16S rRNA 分析 采用通用引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 1492R:5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3' 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。反应体系(25 μ L):10 \times buffer 2.5 μ L, $MgCl_2$ 2 μ L, dNTP 0.5 μ L,引物 1 μ L, *Taq* 酶 0.2 μ L, DNA 模板 1 μ L,无菌去离子水补足 25 μ L。PCR 扩增条件:94℃ 10 min;94℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 90 s,30 个循环;72℃ 5 min。扩增产物经纯化后,连入 pMD18-T 载体进行测序,将测序结果在 NCBI 网站进行 BLAST 分析。

1.2.4 羧甲基纤维素酶(CMCase)活性测定^[10,11] 采用 DNS 法。在容积为 25 mL 的血糖管中,加入 1 mL 适当稀释的酶液于 50℃ 恒温水浴中预热 2 min 后,加入 0.5% CMC-Na 溶液 3 mL,50℃ 恒温水浴准确反应 30 min,加入 1 mL 浓度为 1 mol/L NaOH 液,摇匀,终止反应,加入 3 mL DNS 试剂,同时于沸水浴中准确反应 5 min,用流动的冷水终止反应,用离子水定容至 25 mL,于 540 nm 处测定光吸收值,对照标准曲线后测算酶活力。在上述条件下,酶活力按国际单位规定定义为:每 min 催化纤维素水解生成 1 μ mol 葡萄糖的酶量为一个酶活力单位 U。

1.2.5 滤纸酶活(FPA)的测定^[12] 采用 DNS 法。在容积为 25 mL 的血糖管中,加入 1 cm \times 6 cm 的 whatman 滤纸条和 1 mL 0.05 mol/L pH4.8 柠檬酸缓冲液,加入 0.5 mL 稀释的酶液,50℃ 恒温水浴摇床中反应 1 h,加入 3 mL DNS 试剂,同时于沸水浴中准确反应 5 min,用流动的冷水终止反应,用离子水定容至 25 mL,于 540 nm 处测定光吸收值,对照标准曲线后测算酶活力。酶活力国际单位定义同前。以上酶活力均扣除发酵液中的糖含量,以葡萄糖作标准溶液。

1.2.6 β -葡萄糖苷酶活性测定^[13] 在容积为 5 mL 的血糖管中,加入 800 μ L pH 4.5 的

Na_2HPO_4 - 柠檬酸缓冲液和 200 μL 原酶液, 50 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴摇床中反应 10 min, 加入已经预热 10 min 的 5 mmol/L PNPG 溶液, 50 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴摇床中反应 10 min, 各加入 1 mL 1mol/L Na_2NO_3 溶液终止反应, 于 410 nm 处测定光吸收值, 对照标准曲线后测算酶活力。

1.2.7 玉米秸秆的超声波碱法预处理^[14,15] 使用 0.5% NaOH 溶液, 基质浓度为 45 g/L, 超声波功率 480 W, 处理 30 min, 用蒸馏水清洗除糖, 过滤后, 98 $^\circ\text{C}$ 烘干备用。

2 结果与分析

2.1 WQ-50 的分离和初步鉴定

2.1.1 刚果红染色定性 实验分离得到一株具有较高纤维素分解能力的嗜热细菌菌株 WQ-50。WQ-50 在复筛培养基(液体)中发酵培养 48 h 后, 取发酵液上清。在固体复筛培养基上打孔, 每个孔中加入 30 μL 发酵液上清, 30 $^\circ\text{C}$ 反应 24 h。用 0.1% 刚果红水溶液浸染 15 min, 再用 1 mol/L NaCl 水溶液脱色, 刚果红可将未被降解的 CMC 染成红色, 而接种有 WQ-50 菌落处形成了透明的水解圈(图 1), 初步表明 WQ-50 具有较好的纤维素分解能力。



图 1 刚果红染色后呈现的酶水解纤维素透明圈

Fig.1 Transparent hydrolysis circle by Congo Red.

2.1.2 形态、生理生化及化学成分分析 WQ-50 在 LB 培养基上为白色菌落, 55 $^\circ\text{C}$ 培养下生长较快。菌落粗糙, 不透明, 粘着, 扩展。显微镜下观察, 细胞呈杆状, 大小为 1.0 ~ 1.4 μm \times 1.5 ~ 3.0 μm , 无荚膜, 不成链, 能运动。革兰氏阳性。芽孢呈椭圆形至柱状, 中生或次端生, 0.9 ~ 1.2 μm \times 1.2 ~ 1.6 μm 。

该菌能够利用 D - 葡萄糖、L - 阿拉伯糖、D - 木糖、D - 甘露醇, 接触酶、淀粉水解阳性, V-P

试验、丙酸盐、柠檬酸盐利用阴性。

采用美国 MIDI 公司 MIS 系统进行脂肪酸组成分析, 在 TSBA 培养基上, 55 $^\circ\text{C}$ 培养 48 h, 主要脂肪酸组成为: $\text{C}_{14:0}$ iso (4.76%), $\text{C}_{14:0}$ (3.26%), $\text{C}_{15:0}$ iso (27.46%), $\text{C}_{15:0}$ anteiso (17.92%), $\text{C}_{16:1}$ ω 7c alcohol (1.20%), $\text{C}_{16:0}$ iso (8.67%), $\text{C}_{16:0}$ (10.58%), $\text{C}_{17:0}$ iso (6.78%), $\text{C}_{17:0}$ anteiso (5.04%), $\text{C}_{18:1}$ ω 9c (1.92%), $\text{C}_{18:0}$ (4.78%), $\text{C}_{17:1}$ anteiso B/iso I (1.29%), $\text{C}_{18:1}$ ω 7c (1.48%)。

2.1.3 16SrRNA 序列分析及其系统发育分析

以 WQ-50 总 DNA 为模板, 用引物 27F 和 1492R 进行 PCR, 扩增其 16S rDNA 序列, 得到片段大小约 1.5 kb 的 PCR 产物, 连入 pGEM-T 载体进行测序。将得到的 WQ-50 菌株的 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行同源性检索比较, BLAST 分析结果表明, 该菌株核糖体 16S rDNA 序列与 *Bacillus circulans* (菌株 WSBC 20060) 16S rDNA 碱基序列完全一致, 相似性达到 100%。

基于以上的形态、生理生化及化学成分分析和 16S rRNA 序列进化比对研究, 初步鉴定该菌株为环状芽孢杆菌属菌株。

2.2 WQ-50 菌株的最适生长温度和 pH 测定

嗜热菌是指最适生长温度在 45 ~ 80 $^\circ\text{C}$ 之间的一类微生物^[16]。除温度外, pH 是热环境中另一个重要因素, 嗜热微生物所适应的 pH 条件通常集中在两个不同的范围: pH 1.5 ~ 4.0 和 pH 5.8 ~ 8.5^[17]。为明确 WQ-50 菌株的最适生长温度和 pH, 在以 CMC-Na 为唯一碳源的复筛液体培养基上培养该菌株, 设置不同温度、不同 pH 条件下摇瓶培养 48 h 比较其生长状况, 结果见图 2 和图 3。结果表明, WQ-50 的适宜生长温度为 55 $^\circ\text{C}$, 适宜生长 pH 范围为 pH 6 ~ 7。

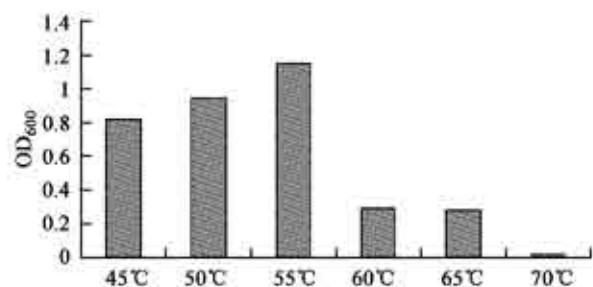


图 2 不同温度时 WQ-50 的生长状况

Fig.2 Growth status of strain WQ-50 at different temperature.

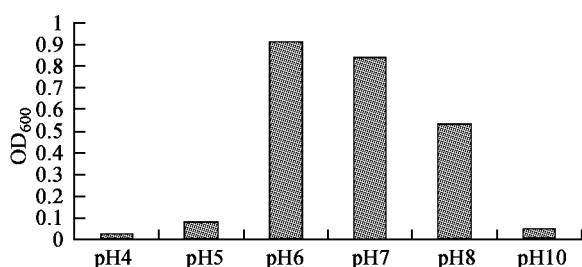


图3 不同 pH 时 WQ-50 的生长状况

Fig. 3 Growth status of strain WQ-50 at different pH.

2.3 WQ-50 的 CMCase 酶活分析

为明确 WQ-50 利用天然纤维素底物的状况,将该菌株接入以经碱预处理的玉米秸秆粉为唯一碳源的发酵产酶培养基中培养,55℃ 培养 7 d,按照 DNS 法测定菌株的 CMCase 酶活,如图 4。菌液接入前期,CMCase 酶活上升比较平稳,在第 2~3 d 时明显增加,到第 5 d 时达到最高值 6.8 IU/mL,5 d 之后开始缓慢下降。

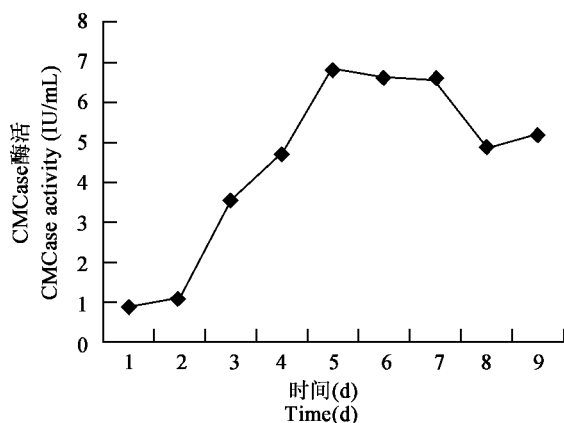


图4 WQ-50 中 CMCase 活性变化

Fig. 4 The CMCase-producing activity in strain WQ-50.

2.4 滤纸酶活分析

将 WQ-50 菌株接入经碱预处理的玉米秸秆粉为唯一碳源的发酵产酶培养基中,55℃ 培养 7 d,测定菌株的滤纸酶活,如图 5。接入菌液的前期,滤纸酶活上升平稳,在第 5 d 达到最高值(3.5 IU/mL),保持 1 d,之后迅速下降。

2.5 β-葡萄糖苷酶活分析

将 WQ-50 菌株接入经碱预处理的玉米秸秆粉为唯一碳源的发酵产酶培养基中,55℃ 培养 7 d,测定菌株的 β-葡萄糖苷酶活,如图 6。在菌液接入前期,β-葡萄糖苷酶活上升较快,在 4 d 时达到最高值 0.7 IU/mL,之后缓慢下降,但 β-

葡萄糖苷酶活性整体较低。

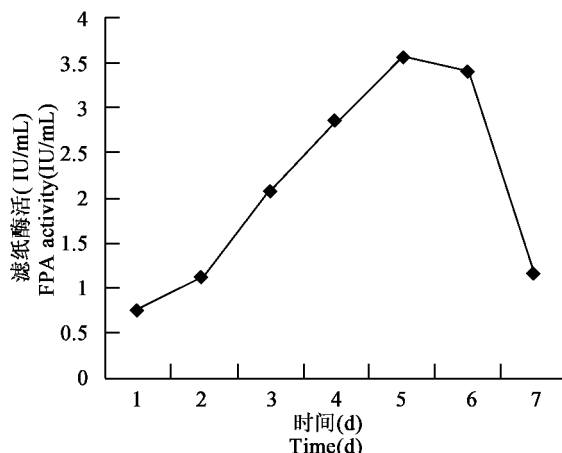


图5 WQ-50 中滤纸酶活性变化

Fig. 5 The FPA activity in strain WQ-50.

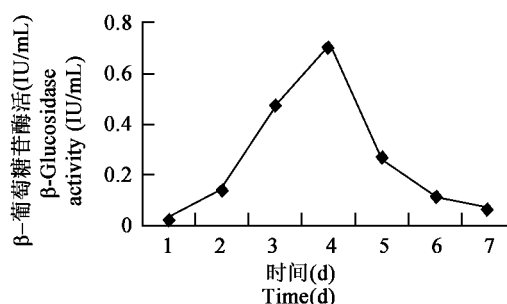


图6 WQ-50 中 β-葡萄糖苷酶活性变化

Fig. 6 The β-glucosidase activity in strain WQ-50.

3 讨论

目前,对嗜热菌及其产的嗜热酶的研究主要集中在资源研究、耐热机制研究和工业应用研究等几个方面。陆地热泉作为典型的地热生境之一,为嗜热微生物的生长提供了理想的条件,对其进行微生态研究对于认识高温环境中的微生物遗传多样性与功能多样性具有十分重大的意义^[18]。近年来,细菌产纤维素酶的研究报道较多,齐云等^[19]从堆肥中筛选到耐高温单孢菌和芽孢杆菌,熊鹏钧等^[20]从深海样品中分离到一株具有内切葡聚糖酶活力的细菌 DY3,黎海彬等^[21]筛选及诱变得得到一株高产纤维素酶的褐色高温单孢菌。目前,这些菌株在垃圾处理、洗涤工业等生产中都具有较为广泛的应用前景。

从 WQ-50 菌株产酶的条件分析,该菌株能够

利用天然纤维素材料做底物,其最适产酶时间为4~5 d,最适产酶温度为55℃,最适产酶pH为6,产酶具有时间较短、有很强的耐热性等特点。该菌在55℃能够迅速生长,属于典型的嗜热菌,为深入研究嗜热菌所产的中高温纤维素酶性质提供了良好的实验材料。本研究所筛选得到的WQ-50菌株可以产生包括CMCase在内的多种纤维素酶,而且具有较好的热稳定性,使其成为纤维素酶基因克隆的理想材料,对于构建纤维素分解工程菌株以及探索纤维素酶作用机制有着潜在的理论和实践意义。

参 考 文 献

- [1] 熊世勤,彭 谦. 耐热纤维素酶产生菌及产酶条件[J]. 云南大学学报(自然科学版),1998,20(2):91-94.
- [2] Li W F, Zhou X X, Lu P. Structural features of thermozymes [J]. *Biotechnol. Adv.*,2005,23:271-281.
- [3] Atomi H. Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes [J]. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2005,9:166-173.
- [4] Atomi H, Imanaka T. Thermostable carboxylesterases from hyperthermophiles [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*,2004,15(18):2729-2735.
- [5] Haki G D, Rakshit S K. Developments in industrially important thermostable enzymes;a review [J]. *Bioresour. Technol.*, 2003,89(1):17-34.
- [6] 东秀珠、蔡妙英. 常见细菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001,1-419.
- [7] Garrity G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Volume 2) [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, 965-1599.
- [8] Holt J G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [M]. 9th edn. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins,1994, 1-787.
- [9] Reva O N, Sorokuliva I B, Smirnov V V. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype [J]. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*,2001,51(4):1361-1371.
- [10] Hardin M T, Mitchell D A, Howes T. Approach to designing rotating drum bioreactors for solid-state fermentation on the basis of dimensionless design factors [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2006,67(3):274-282.
- [11] Ghose T K. Measurement of cellulose activities [J]. *Pure and Appl. Chem.*,1987,59(2):257-268.
- [12] Taillisz P, Girard H, Millet J, et al. Enhanced cellulose fermentation by an asprogenous and ethanol-tolerant mutant of *Clostridium thermocellum* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989,55:207-211.
- [13] Kubicek C P. β -glucosidase excretion by *Trichoderma pseudokoningii* correlation with cell wall bound β -1,3-glucanase activities [J]. *Arch. Microbiol.*, 1982,132:349-354.
- [14] Mahinpour R, Sarbolouki M N. Enhancing enzymatic hydrolysis of cellulose by ultrasonic pretreatment [J]. *Iranian J. Chem. Chem. Engin. Inter. Engl. Ed.*, 1998,17(1):8-13.
- [15] 宋安东,任天宝,谢 慧. 化学预处理对玉米秸秆酶解糖化效果的影响 [J]. *化学与生物工程*,2006,23(8):31-33.
- [16] Madigan M T, Oren A. Thermophilic and halophilic extremophiles [J]. *Curr. Opin. Microbiol.*,1999,2:265-269.
- [17] 曹卫军,沈 平,李朝阳. 嗜极微生物 [M]. 武汉:武汉大学出版社,2004,73-84.
- [18] 和致中,彭 谦,陈俊因. 高温菌生物学 [M]. 北京:科学出版社,2000,32-35.
- [19] 齐 云,袁月祥,陈 飞,等. 一组纤维素分解菌的分离、筛选及其产酶条件的研究 [J]. *天然产物研究与开发*,2003,15(6):510-512.
- [20] 熊鹏钧,文建军. 交替假单胞菌 (*Pseudoal teromonas* sp.) DY3 菌株产内切葡聚糖酶的性质研究及基因克隆 [J]. *生物工程学报*,2004,20(2):233-237.
- [21] 黎海彬,黄日波,韦小黄. 褐色高温单胞菌 PE2211 产纤维素酶的酶血特性研究 [J]. *广西大学学报(自然科学版)*,2004,29(3):207-210.