

文章编号:1673-1689(2006)03-0015-04

纤维素分解菌 BSX5 的分离、鉴定及产酶条件

朱军莉, 韩剑众, 励建荣

(浙江工商大学 食品生物与环境工程学院, 浙江 杭州, 310035)

摘要: 利用透明圈法从袋装降解的笋干中分离到一株分解纤维素的细菌菌株。该菌株呈长杆状、革兰氏染色为阳性、产芽孢, 命名为 BSX5。其生理生化特征和 16S rDNA 序列同源性分析, 发现该菌株与 *Bacillus subtilis* 的同源性为 99%, 系统发育树分析与 *Bacillus subtilis* 遗传关系最近, 确定该菌株为 *Bacillus subtilis*。采用以 3,5-二硝基水杨酸(DNS)为显色剂、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为底物, 测定不同培养条件下 BSX5 菌株的酶活力, 结果最适产酶时间为 8-12 h, 最适产酶温度为 50 ℃, 最适产酶 pH 值为 5.5~6.5。

关键词: 纤维素酶; 分离; 鉴定; 16S rDNA; 酶活

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Study on Isolation, Identification of a Cellulose-Decomposing BSX5 Strain and Conditions for Cellulase Production

ZHU Jun-li, HAN Jian-zhong, LI Jian-rong

(College of Food Science and Biotechnology and Environmental Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

Abstract: A bacterium, which could decompose cellulose efficiently, was isolated from a kind of hydrolytic dry bamboo food on transparent ring. The strain, named BSX5, was Gram-positive *Bacillus* with spore-forming. The BSX5 strain was identified as *Bacillus subtilis*, based on the results of physio-biochemical characteristics and the homological analysis of 16S rDNA sequence. The phylogenetic tree built on the 16S rDNA sequence indicated BSX5 strain was the nearest to one of *Bacillus subtilis*. With 3,5-dinitrosalicylic acid as developer and CMC-Na as substrate, conditions for cellulase production by BSX5 strain was studied. The result showed that the suitable temperature was 50 ℃, the suitable culture time was about 8~12 h, and the suitable pH was about 5.5~6.5 for cellulase production.

Key words: cellulase; isolation; identification; 16S rDNA; enzyme activity

纤维素主要是由 D-葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接形成的线状多聚物, 它是自然界含量最丰富的碳水化合物。但是纤维素很难被分解利用, 如何将纤维素转化为能直接利用的资源 and 能源是摆在人

们面前的一个难题。利用微生物产生的纤维素酶将其转化为人类所需的能源、食品和化工原料具有重要的现实意义。纤维素酶是降解纤维素生成葡萄糖的一组酶的总称^[1]。目前纤维素酶广泛应用于食

收稿日期: 2005-07-09; 修回日期: 2005-09-26.

基金项目: 国家重点技术创新项目(02CJ-13-01-51).

作者简介: 朱军莉(1979-), 女, 浙江武义人, 食品生物技术博士研究生.

品、动物饲料、洗涤等工业^[2],其中在食品工业中的果蔬加工、发酵食品制备、活性物质提取等方面均具有十分重要的应用价值^[3]。

纤维素酶的来源非常广泛,但其中多数以丝状真菌 *Trichoderma* 为产纤维素酶最高的菌种^[4-5]。但近几十年来,对细菌、放线菌所产生的纤维素酶也引起人们的高度重视^[6-7]。

作者从袋装降解的笋干中分离、筛选出一株具有分解纤维素的菌株,研究了该菌株的形态、生理生化特性和 16S rDNA 序列,分析了遗传进化关系,并探讨了该菌株产酶的最适条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌来源 实验所用的样品为从袋装降解的笋干中分离,菌株命名为 BSX5。

1.1.2 主要试剂 酶活力测定试剂:0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液体(pH 4.8),1%CMC-Na,1%DNS,0.1 mg/mL-0.6 mg/mL 葡萄糖标准溶液;聚合酶链式反应(PCR)试剂:Taq 酶,dNTP;DNA 引物合成及序列测定在上海博亚生物公司完成;PCR Product Purification kit 购自博彩生物工程公司;DL2000 Marker 购自大连宝生物工程公司(Takara);刚果红,蛋白酶 K,RNAase 酶,琼脂糖 Agarose 购自上海生物工程公司;其它试剂均为中国产分析纯。

1.1.3 培养基 以 LB 培养基作为基础培养基。筛选培养基:CMC-Na 10 g,酵母膏 1 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.0~7.5。发酵培养基:CMC-Na 10 g,蛋白胨 5 g,酵母膏 1 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.0~7.5。

1.2 方法

1.2.1 纤维素分解菌的分离和筛选 样品采自袋装降解的笋干食品。无菌打开笋干袋口,取少量竹笋内容物接种于 10 mL LB 液体培养基中进行富集,37 ℃ 125 r/min 振荡培养 48 h。而后划线到 LB 固体平板上,37 ℃ 培养 48 h。再将增殖后的菌株接种于以 CMC-Na 为惟一碳源的固体平板(筛选培养基)上进行筛选。菌落长出后用 1 mg/mL 的刚果红对平板染色 15 min,然后用 1 mol/mL NaCl 脱色 15 min,挑选周围有明显溶解圈的菌落纯化,保存菌种备用。

1.2.2 纤维素分解菌的形态观察和生理生化特征 对细菌进行革兰氏染色,显微镜观察培养不同时间的细菌形态。将纯化培养的细菌分别接种于葡

萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、棉子糖、木糖、阿拉伯糖,并进行明胶液化、淀粉水解、V-P 测定、吲哚试验、H₂O₂ 酶试验、硝酸盐的微量发酵管,37 ℃ 培养 24-48 h 后观察结果。根据《伯杰氏系统细菌学鉴定手册》进行鉴定。

1.2.3 16S rDNA 的 PCR 扩增 细菌 DNA 提取参照文献[8]进行。以抽提的 BSX5 细菌 DNA 作为 PCR 扩增的模板,用于 16S rDNA PCR 扩增的引物为一对通用引物,正向引物:5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3';反向引物:5'-AAGGAGGT-GATCCAG CCGCA-3'。PCR 反应体系(50 μL)为:10×Taq buffer 5 μL,模板 DNA 1 μL,引物浓度为 10 μmol/L 各 1 μL,10 μmol/L dNTP 1 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,超纯水 40.5 μL,混匀。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 44 s,52 ℃ 60 s,72 ℃ 2 min,进行 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min。取 PCR 产物 7 μL,1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。PCR 产物用 PCR Product Purification kit 进行纯化。

1.2.4 PCR 产物序列测定及序列分析 将已纯化的 PCR 产物用 Megabase 1000 自动测序仪进行测序(博亚生物工程公司产品),测序引物为 PCR 正向引物。所得序列运用 NCBI 的 BALST 程序进行同源序列比对,选取与该菌株同源性较高的菌株用于系统发育树的构建,应用 DNA Star 软件包中的 MegAlign 软件建立系统发育树。

1.2.5 BSX5 菌株产纤维素酶的条件

1) 粗酶液的制备:将 BSX5 接种到 200 mL 发酵培养基,经一定条件的培养,取液体培养物于 4 ℃,8 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液。

2) 纤维素酶活力测定及定义:酶活力的测定以 CMC-Na 作为底物,经纤维素酶水解生成还原糖,然后用 DNS 法测定还原糖的含量,由还原糖的量求得酶活力的大小。取 1 mL 粗酶液与 1 mL 1% CMC-Na 溶液混合,在 50 ℃ 水浴中加热 10 min,取出加入 3 mL DNS 显色剂,煮沸 5 min,冰冷 10 min,在分光光度计 540 nm 处测定 OD 值(酶空白试验中除酶液事先灭活外,其余条件不变)。

一个酶活单位定义为 1 min 内分解底物生成 1 μg 葡萄糖所需酶量。

3) 培养时间对产酶影响:将接种后的发酵培养基于 37 ℃ 恒温振荡(125 r/min)培养,在 6、8、10、12、16、20、26、32、48 h 分别取样,测定 CMC 酶活。

4) 培养温度对产酶影响:将接种后的发酵培养基于 37、42、50、55 ℃ 分别振荡(125 r/min)培养 10

h,分别取样测定 CMC 酶活。

5) pH 值对产酶影响:用 HCl 和 NaOH 将培养基分别配制成 pH 值为 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5,分别接种 BSX5 菌株于 37℃ 恒温振荡(125 r/min)培养 10 h,分别取样测定 CMC 酶活。

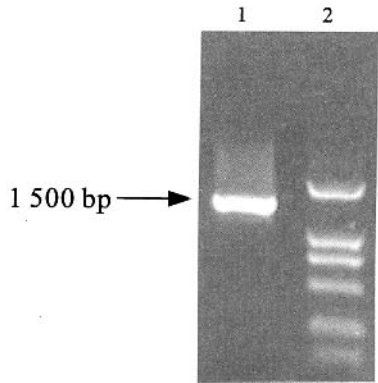
2 结 果

2.1 纤维素分解菌的形态观察及生理生化特征

通过富集培养、分离筛选,从降解的笋干食品中获得一株较纯的细菌,命名为 BSX5。该菌株能在以 CMC 作为惟一碳源的平板上分泌胞外纤维素酶,产生较明显的溶解圈。该菌株的菌落呈乳白色,圆形,隆起,表面湿润,质地皱折,边缘波浪形,不产色素;革兰氏染色为紫色,菌体呈长杆状,固体培养 12 h 后可观察到芽孢。菌株的生理生化特征为能较好地利用葡萄糖、蔗糖,不能利用阿拉伯糖、棉子糖、麦芽糖、乳糖、木糖,能液化明胶,水解淀粉,能使硝酸盐还原成亚硝酸盐,不产吡啶和 H₂O₂ 酶,V-P 测定为阳性。根据菌株的生理生化特征,并结合个体形态和群体形态特征,参照《伯杰氏细菌鉴定手册》细菌可初步归属为芽孢杆菌属。

2.2 BSX5 菌株 16S rDNA PCR 扩增和序列分析

以抽提的 BSX5 细菌 DNA 为模板,以 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,在退火温度为 52℃ 时获得了一条特异的、大小约为 1.5 kb 的预期条带,结果见图 1。



1. 目的条带;2. Marker DL2000

图 1 BSX5 菌株 16S rDNA PCR 扩增片段

Fig. 1 The PCR fragment of 16S rDNA of BSX5 strain

获得的特异片段经 PCR Product Purification kit 纯化后,以正向引物进行测序,获得 1111 bp 片段,16S rDNA 序列 GenBank 登录号为: DQ112340。将得到的序列通过 BLAST 程序与 GenBank 核酸序列库中的序列进行局部同源性比较(BLASTn),结果表明 BSX5 菌株与 *Bacillus subtilis* 的 16S rDNA 序列有较高的同源性,其中与 *Bacillus subtilis* strain STB29 有 99% 的同源性。参考 BSX5 细菌 16S rDNA 在 GenBank 的比较结果,利用 MegAlign 软件构建系统发育树,结果见图 2。发现该菌株与 *Bacillus* 中各菌株系统发育关系很相近,尤其 *Bacillus subtilis* strain SIB29 关系最近,说明 BSX5 菌株为 *Bacillus subtilis*。

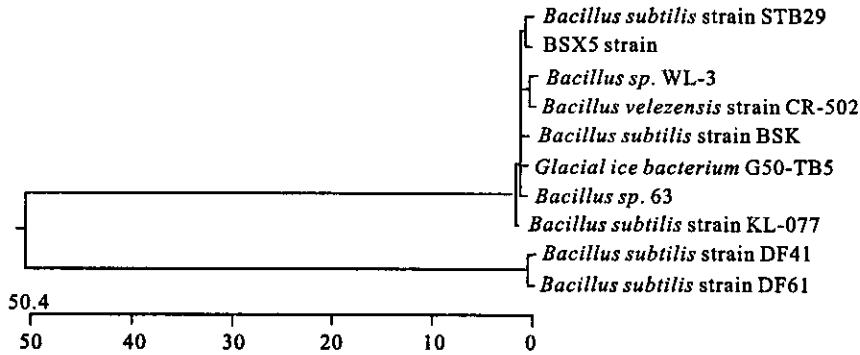


图 2 BSX5 菌株 16S rDNA 系统发育树

Fig. 2 16S rDNA phylogenetic tree of BSX5 strain

2.3 BSX5 菌株产纤维素酶的条件

2.3.1 培养时间对产酶的影响 图 3 为 BSX5 菌株在 37℃ 培养不同时间的酶活力变化曲线图。可以看出,该菌株培养 8~12 h 为酶活力高峰时期,其中 10 h 时是产酶活力最大值,达到 41.1 U/mL。随后酶活力逐渐下降。

2.3.2 培养温度对产酶的影响 图 4 为 BSX5 菌

株在 37、42、50、55℃ 培养 10 h 的酶活力变化的曲线图。可以看出,该菌株产酶的最适温度在 50℃ 左右,酶活力达到 54.5 U/mL。

2.3.3 pH 值对产酶的影响 图 6 为 BSX5 菌株在 pH 值为 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5 的培养基培养 10 h 的酶活力变化的曲线图。可以看出,该菌株产酶的最适 pH 值在偏酸性的条件(5.5~6.5)时,酶

活力达到 46 U/mL。

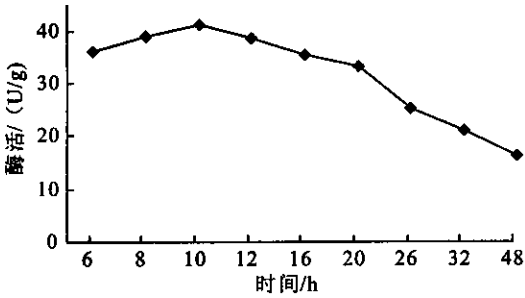


图 3 培养时间对产酶的影响

Fig. 3 The effect of culture time on the enzyme activity

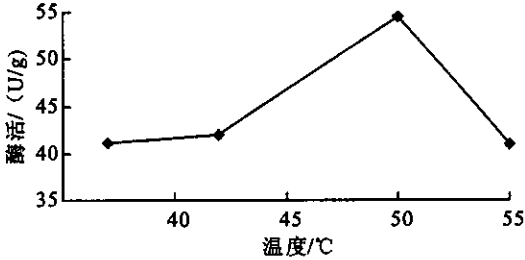


图 4 培养温度对产酶的影响

Fig. 4 The effect of culture temperature on the enzyme activity

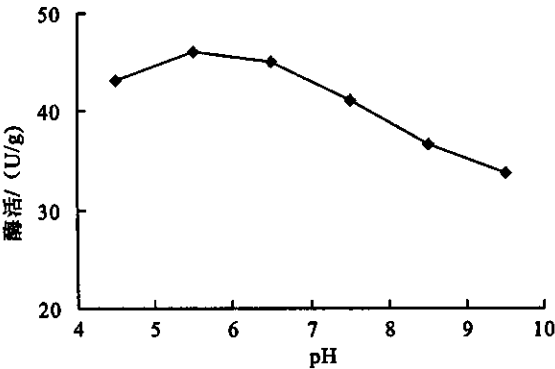


图 5 pH 值对产酶的影响

Fig. 5 Effect of culture pH on the enzyme activity

参考文献：

[1] Ghose T K, Ghosh P. Bioconversion of cellulosic substances[J]. *Appl Biotech*, 1978,(28):309—320.

[2] 刘春芬, 贺稚非, 蒲海燕, 等. 纤维素酶及应用现状[J]. *粮食与油脂*, 2004,(1):15—17.

[3] 罗晓妙, 王英. 纤维素酶的生产及其在食品工业中的应用[J]. *中国食品添加剂*, 2003, 6:90—92.

[4] Montencourt B S. Over-production of cellulose-screening and selection[J]. *Trends Biotechnol*, 1983, (1):156—161.

[5] Beguin P. Molecular biology of cellulose degradation[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1990, (44):219—248.

[6] 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.

[7] 熊鹏钧, 文建军. 交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas 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.

[8] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. New York: Clod Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[9] 黎海彬, 黄日波, 韦小黄. 褐色高温单孢菌 PE-211 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.

3 结 论

近年来,细菌产纤维素酶的研究报道较多,齐云等^[6]从堆肥中筛选到耐高温单孢菌和芽孢杆菌,熊鹏钧等^[7]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^[9]筛选及诱变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提供较为广泛的应用前景。

作者从袋装降解的笋干食品中分离出一株具有分解纤维素的菌株 BSX5。通过形态学观察 BSX5 菌株为革兰氏阳性、杆状,在幼龄时不见芽孢,经固体培养 12 h 后形成芽孢,生理生化特征 BSX5 菌株基本符合芽孢杆菌属。进一步应用了 16S rDNA 的 PCR 鉴定,获得的序列经同源性比较发现与 *Bacillus subtilis* 的同源性高达 99%。16S rDNA PCR 结果与形态学、生理生物特征基本吻合,确定 BSX5 菌株为 *Bacillus subtilis*。

从 BSX5 菌株产酶的条件分析,该菌株最适产酶时间为 8~12 h,最适产酶温度为 50 ℃,最适产酶 pH 值为 5.5~6.5,产酶具有时间较短、有一定的耐热性、偏酸性环境的特点。由于 BSX5 菌株从食品中分离,具有一定的天然性,该菌株在食品工业及作为动物饲料的新型添加剂来提高饲料利用率等方面具有应用潜力。