

# 一株具木聚糖酶活链霉菌的鉴定 及其木聚糖降解酶系分析

彭汀汀, 董宏平, 彭惠, 裴建军, 邵蔚蓝

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

**[摘要]** 分离得到一株具木聚糖酶活性的放线菌菌株 pp2, 该菌株具有典型链霉菌属的形态学特征. 通过对其进行形态学、生理生化特性以及 16S rRNA 基因序列等方面的分类学研究, 菌株 pp2 初步鉴定为链霉菌属的一个潜在新种. 通过对菌株 pp2 的酶系研究发现该菌株胞外发酵液具木聚糖酶活性, 细胞破碎液中具  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶活性和  $\beta$ -D-木糖苷酶活性. 其中木聚糖酶活力为 30.3 U/mg, 酶反应最适温度为 65  $^{\circ}\text{C}$ , 最适 pH 为 5.4; 37  $^{\circ}\text{C}$  下稳定性很好, 60  $^{\circ}\text{C}$  下酶活性衰减很快.  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶活力为 1.81 U/mg, 酶反应最适温度为 55  $^{\circ}\text{C}$ , 最适 pH 为 6.0, 55  $^{\circ}\text{C}$  下稳定性很好.  $\beta$ -D-木糖苷酶活力为 0.04 U/mg.

**[关键词]** 链霉菌, 16S rRNA 基因, 木聚糖降解酶系

**[中图分类号]** Q 939.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)04-0073-06

## Identification of a Strain of Streptomyces and its Xylanolytic Enzyme System

Peng Tingting, Dong Hongping, Peng Hui, Pei Jianjun, Shao Weilan

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** A new actinomycete strain with the activity of xylanases, designated pp2, is isolated from Nanjing soil. Cultural characteristic studies strongly suggest that this strain belongs to the genus Streptomyces. The nucleotide sequence of the 16S rRNA gene (1 545 bp) of Streptomyces sp. strain pp2 exhibits close similarity (97% - 99%) with other Streptomyces 16S rRNA genes. The study shows that this strain also produces  $\alpha$ -L-arabinosidase and  $\beta$ -D-xylosidase. Xylanase activity is found in the extra-cellular proteins, and  $\alpha$ -L-arabinosidase and  $\beta$ -D-xylosidase activities are detected in the cell-free extract, while no acetyl xylan esterase,  $\alpha$ -glucuronidase activities or phytase is detected in both solutions. The activity of xylanase is 30.3 U/mg,  $\alpha$ -L-arabinosidase is 1.81 U/mg, and  $\beta$ -D-Xylosidase is 0.04 U/mg. The xylanase has optimal activity at 65  $^{\circ}\text{C}$ , pH 5.2, and in the buffer (pH 5.4) conserves most of its activity after incubated for 2 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ , but loses its activity sharply at 60  $^{\circ}\text{C}$ . The  $\alpha$ -L-arabinosidase has optimal activity of 1.81 U/m at 55  $^{\circ}\text{C}$ , pH 6.0, and in the buffer (pH 6.0) retains more than 85% of activity after 2 h at 55  $^{\circ}\text{C}$ .  $\beta$ -D-xylosidase activity is 0.04 U/mg.

**Key words:** Streptomyces, 16S rRNA gene, xylanolytic enzyme system

## 0 引言

微生物是极其丰富的自然资源, 它的种类繁多, 广泛分布于土壤、河流、海洋、湖泊等环境. 放线菌是微生物中重要的一类, 其中绝大部分是腐生、好气、革兰氏阳性菌. 放线菌有多种代谢产物, 当前世界上报道的抗生素约 80% 都是由放线菌产生的, 其它的如维生素、氨基酸、蛋白质、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶等, 很多已应用于工业、农业、医疗、食品以及国防等领域, 并产生了巨大的经济效益. 链霉菌是一类主要来源于土壤的革兰氏阳性菌, 约占土壤可培养微生物的 1% ~ 20%. 在系统生物学上它归于原核生物界厚壁菌门

收稿日期: 2006-03-02.

作者简介: 彭汀汀, 女, 1979—, 硕士研究生, 主要从事分子生物学的学习与研究. E-mail: pipi\_717@hotmail.com

通讯联系人: 邵蔚蓝, 女, 1958—, 教授, 博士生导师, 主要从事分子生物学的教学与研究. E-mail: wshao@jssmail.com.cn

放线菌纲放线菌目链霉菌属(*Streptomyces*),迄今有约 500 个种.它与其它原核生物相比重要特点之一是具有丰富的次级代谢多样性,在已知的放线菌所产生的抗生素中有 80% 来源于链霉菌,可见链霉菌在医药上的重要性.链霉菌因它与我们人类健康的密切关系及商业上的重要价值而成为当代生命科学中的研究热点.

半纤维素是植物细胞壁的主要组成成分,是广泛存在于自然界的一大类可再生资源,主要由木聚糖组成.在植物的光合产物中,半纤维素是仅次于淀粉和纤维素的一大类碳水化合物,如植物秸秆中半纤维素的含量占其干重的 25%~50%<sup>[1]</sup>.除了其数量之大,半纤维素成为可再生资源的另一个因素是它相对于植物中的其它组分更易于提取和水解<sup>[2,3]</sup>.木聚糖酶是一类能降解木聚糖的复合酶,主要由  $\beta$ -1, 4-D-内切木聚糖酶和  $\beta$ -1, 4-D-外切木糖苷酶及一些脱支链酶组成,能将木聚糖降解为低聚木糖和少量木糖、阿拉伯糖等,正是由于这些性能,近年来木聚糖酶在食品、纺织、饲料、能源、造纸工业中具有广阔的应用前景,已成为研究的热点.木聚糖酶可由细菌、放线菌、真菌等多种微生物产生.本实验室筛选到了一株具木聚糖酶活链霉菌,对其分类地位及酶学性质进行了研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

本实验室从土壤中筛选得到一株具木聚糖酶活性的放线菌菌株 pp2.

### 1.2 菌种鉴定

#### 1.2.1 形态观察

用酵母浸汁-麦芽浸汁琼脂和甘油天门冬酰胺琼脂 28℃ 埋片培养,分别于 1, 3, 5, 7, 14 d 取埋片.用光学显微镜和电镜观察形态.

#### 1.2.2 培养特征和生理生化特性

参照文献[4~6].

#### 1.2.3 细胞壁化学组分分析

采用 Hasegawa T<sup>[7]</sup>与王平<sup>[8]</sup>改进的快速薄层层析法(Thin layer chromatography, TLC)进行细胞壁氨基酸组成及全细胞水解液糖型的分析.

#### 1.2.4 16S rRNA 基因序列分析

基因组 DNA 提取参考姜成林等<sup>[9]</sup>的方法. PCR 扩增使用引物 P<sub>1</sub>:5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3', P<sub>2</sub>:5' - AAGGAGGTGATCCAGCCGCA - 3'. 反应条件:95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 40 s, 65℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物由上海生工有限公司测序.序列已在 Genebank 注册,登录号为 DQ223783.

#### 1.2.5 系统发育分析

获得菌株 16S rDNA 序列通过 Blast 程序从 Genbank 中调出相应的核酸数据(<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>),用 Clustalx 1.8<sup>[10]</sup>进行多序列比对分析,利用 Mega 2.0<sup>[11]</sup>构建系统发育树.

### 1.3 发酵产酶

#### 1.3.1 培养基

稻草木聚糖 15 g/L, 酵母提取物 3 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g/L, pH 7.0~7.4.

#### 1.3.2 摇瓶培养条件

250 mL 三角瓶装液量 50 mL,接入 0.5 cm<sup>2</sup> 平板培养基上生长 5~6 d 的孢子,旋转式摇床 180 r/min 37℃ 培养 7 d, 10 000 × g 离心 10 min,取上清液备用.

#### 1.3.3 粗酶液的制备

发酵液上清中缓慢加入(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 使其终浓度达 80%, 4℃ 下沉淀 4 h. 10 000 × g 15 min 得沉淀.用相当于沉淀体积 2~3 倍的磷酸钠缓冲(pH 7.0)重悬沉淀, 10 000 × g 5 min 收集上清,得胞外粗酶液.

收集的细胞用冷的 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)洗 3 次, 2~3 倍体积的缓冲液重悬后 4℃ 下超

声波破碎 25 min,10 000 r/min 离心 20 min 取上清,得胞内粗酶液.

1.4 pp2 菌株木聚糖降解酶系分析

1.4.1 木聚糖酶活的测定

木聚糖酶活的测定参照文献[12].以 100  $\mu$ L 0.5% 的燕麦木聚糖(Sigma)为底物,95  $\mu$ L 50 mmol/L 邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液(pH 5.3)中加入适当稀释酶液 5  $\mu$ L,60  $^{\circ}$ C 反应 10 min 后,加 600  $\mu$ L NaOH/对羟基苯甲酸酞肼终止反应.混合液在沸水中煮 10 min,冷却后  $A_{410}$ 测吸光值.

1.4.2  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶活性测定

阿拉伯糖苷酶活性测定采用分光光度法<sup>[13]</sup>,测定酶从底物对硝基苯- $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷(pNPAF)释放对硝基苯酚(pNP)的量.反应体系 200  $\mu$ L,内含 20  $\mu$ L 10 mmol/L 底物 pNPAF,175  $\mu$ L 50 mmol/L 的磷酸钠缓冲液,5  $\mu$ L 的粗酶液.反应 10 min 后加入 600  $\mu$ L 1 mol/L 在  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应并显色, $A_{405}$ 处测量光吸收值.

1.4.3  $\beta$ -D-木糖苷酶活性测定

参照文献[14].20  $\mu$ L 10 mmol/L pNPX 中加入 20  $\mu$ L 粗酶液,160  $\mu$ L 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液在 50  $^{\circ}$ C 下反应 10 min.加入 600  $\mu$ L 1 mol/L 在  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应并显色, $A_{405}$ 处测量光吸收值.

1.4.4 乙酰木聚糖脂酶活性测定

参照文献[15].20  $\mu$ L 粗酶液与 5  $\mu$ L 底物 4-甲基伞形酮乙酯酞(4-Methylumbelliferyl acetate),50  $\mu$ L 磷酸钠缓冲液和 75  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}$  在 50  $^{\circ}$ C 下反应 10 min 后,600  $\mu$ L 50 mM 柠檬酸终止反应. $A_{354}$ 处测量光吸收值.

1.4.5  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶活性测定

参照文献[16,17].以 4-甲基葡糖醛酸基木寡糖为反应底物.20  $\mu$ L 粗酶液与 20  $\mu$ L 底物及 60  $\mu$ L 邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液(pH 6.0)于 50  $^{\circ}$ C 下反应 10 min,加入 300  $\mu$ L 铜试剂(copper reagent)终止反应.将混合物在沸水中煮 10 min 后,冰水浴冷却,然后添加砷钼酸钠(Arwenomolybdate)试剂显色,混匀后加入 600  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}$   $A_{620}$ 处测量光吸收值.

底物处理:在 2% ( $w/v$ ) 4-甲基葡糖醛酸基-D-木聚糖加入  $\beta$ -1,4-内切木聚糖酶(来自 *Thermotoga maritima*)至酶反应浓度达到每克底物 3U 的酶用量,置于 80 $^{\circ}$ C (pH 6.0)反应 16 h.

以上酶活单位定义为:上述酶在其反应条件下,1 min 内催化产生 1  $\mu$ mol 底物所需的酶量.

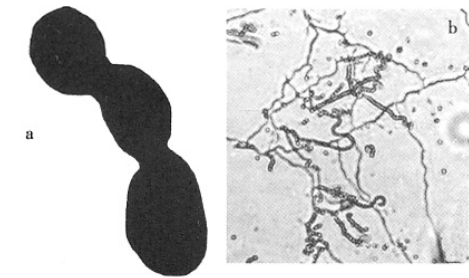
2 结果

2.1 菌体形态

pp2 菌株在大多数培养基上生长良好,气生菌丝灰白色,基丝浅褐色不断裂.孢子丝波曲,孢子表面平滑(图 1).

2.2 生理生化特性

生理生化特性见表 1.该菌株明胶液化、牛奶凝固、牛奶酪化反应阴性,淀粉水解、硝酸盐还原、纤维素上生长、黑色素的产生反应阳性,不产生  $\text{H}_2\text{S}$ .能利用葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、木糖为碳源,不能利用甘露醇、肌醇、阿拉伯糖、棉子糖、蔗糖,果糖微量利用.



(a) pp2 菌株孢子电镜(10 000 $\times$ ); (b) pp2 菌株外形(400 $\times$ )

图 1 菌株形态和孢子形态

表 1 菌株的生理生化特征

特征	结果	碳源利用	结果
明胶液化	-	D-葡萄糖	+
牛奶凝固	-	D-甘露醇	-
牛奶酪化	-	L-鼠李糖	+
淀粉水解	+	D-果糖	$\pm$
$\text{H}_2\text{S}$ 产生	-	L-肌醇	-
硝酸盐还原	+	D-半乳糖	+
纤维素上生长	+	L-阿拉伯糖	-
黑色素的产生	+	D-木糖	+
最适生长温度	42 $^{\circ}$ C	蔗糖	-
最适生长 pH	7.4	棉子糖	-

2.3 细胞壁化学成分分析

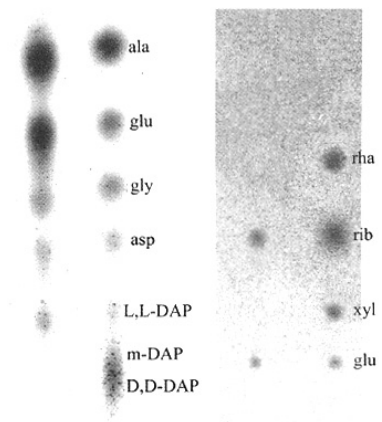
该菌株的细胞壁含 L, L - 二氨基庚二酸 (L, L - DAP, Diaminopimelic acid), 细胞壁属于 I 型. 全细胞糖含核糖和葡萄糖, 糖类型属于 C 型 (图 2). 根据形态特征与细胞壁氨基酸组成、细胞全糖成分分析定属的原则, pp2 菌株属于链霉菌属 (*Streptomyces*).

2.4 16S rRNA 基因序列分析

该菌株 16S rRNA 基因核苷酸序列全长为 1 545 bp, 与从 GenBank 等数据库调出的链霉菌属相关菌株的 16S rRNA 基因序列进行比较. 采用 Clustalx 1.8 软件进行多序列匹配排列, 通过 Mega version 2.1 软件包中的 Kimura 2-Parameter Distance 模型计算进行距离, Neighbor-Joining 法构建系统进化树, 1 000 次随机抽样, 计算 bootstrap 值. 所构建的系统进化树见图 3.

2.5 木聚糖降酶系的研究

胞外粗酶液中测到了  $\beta$  - D - 内切木聚糖酶的活性;  $\alpha$  - L - 阿拉伯糖苷酶和  $\beta$  - D - 木糖苷酶存在于胞内粗酶液中; 而胞内胞外都未测到乙酰酯酶及  $\alpha$  - 葡萄糖醛酸酶的活性. 其中  $\beta$  tDt 内切木聚糖酶、 $\alpha$  - L - 阿拉伯糖苷酶、 $\beta$  - D - 木糖苷酶的酶活力分别为 30.3 U/mg、1.81 U/mg、0.04 U/mg.



a 1 M b 1 M  
(a)细胞壁氨基酸 TLC 图谱( ala-丙氨酸、glu-谷氨酸、gly-甘氨酸、asp-天冬氨酸、DAP-二氨基庚二酸 (含有 L,L-DAP、meso-DAP、D,D-DAP)  
(b) 全细胞水解液糖组分的 TLC 图谱 (rha-鼠李糖、rib-核糖、xyl-木糖和 glu-葡萄糖)

图 2 TLC 图谱

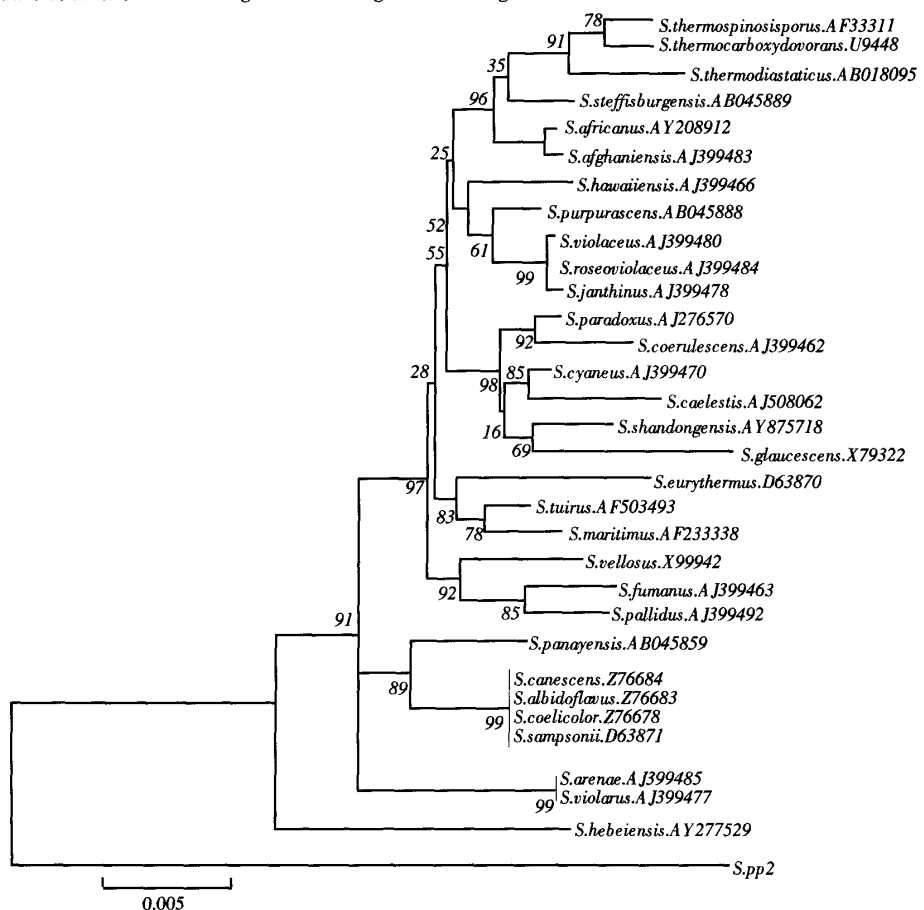


图 3 基于 16SrDNA 构建的进化树

βtDt 内切木聚糖酶的最适反应条件为 65 ℃, pH 5.2. 在 37 ℃ pH 5.4 的条件下保温 2 h 酶非常稳定, 但 60 ℃ 下酶活性衰减很快. 37 ℃ 下在 pH 4.7~8.0 范围内, 30 min 后木聚糖酶还保持 90% 的活性. 阿拉伯糖苷酶的最适反应条件为 55 ℃, pH 6.0. 55 ℃ pH 6.0 下温浴 2 h, 保留 85% 以上的酶活; 在 pH 6.1~7.1 范围内保温 30 min, 75% 的酶活保留, 但在此范围外, 酶活丧失很快(图 4).

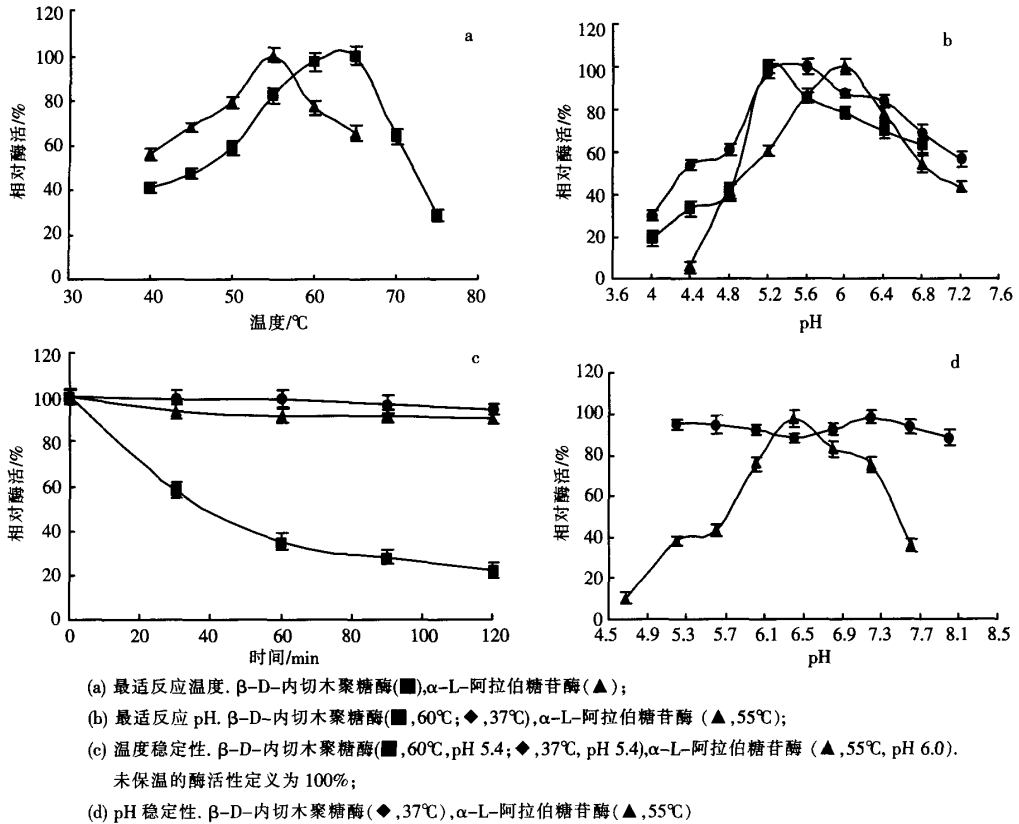


图 4 温度、pH 对酶的影响

### 3 讨论

根据对此菌株进行的形态特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因全序列分析比对结果来看, pp2 菌株具有放线菌链霉菌属的典型特征, 应属于链霉菌属. 但从构建的进化树及 pp2 菌株在生理生化性质方面发现 pp2 菌株与目前已发现的链霉菌属各菌株都有明显的差异, 故 pp2 菌株应为链霉菌属的又一潜在新种, 有关该菌株进一步的鉴定本实验室还在研究中.

近年来为解决能源危机、环境污染等问题, 有关纤维素降解酶系和木聚糖降解酶系的研究已经越来越受到各国科学家的关注. 迄今为止, 国内外关于木聚糖酶的相关报道较多, 但有关链霉菌所产生的木聚糖酶研究较少. 细菌、真菌来源的木聚糖酶常含较高的纤维素酶活, 不适于纸浆生物漂白和低聚木糖的生产, 而放线菌来源的木聚糖酶纤维素酶活较低, 故工业应用领域更为广泛<sup>[18,19]</sup>. 木聚糖酶也被广泛用于低聚木糖的生产, 酶法制备由于水解条件温和、无毒性副产物产生、产物均一等优点已成为低聚木糖的理想制备方法<sup>[20,21]</sup>. 本实验所研究的 pp2 菌株系链霉菌属的一潜在新种, 这无疑丰富了木聚糖酶的产生来源, 为木聚糖酶基因家族增添了新的成员. 而且该菌株产生的木聚糖酶在 37 ℃ 下稳定性能很好, 故而在饲料添加剂方面有一定的生产应用价值.

### 【参考文献】

- [1] Glazer A N, Nikaido H. Microbial Biotechnology[M]. New York: Freeman Company, 1995:329-330.

- [2] Blaze J A, Biel Y P. Wood and Cellulosics[M]. Chichester: Willis Horwood Limited, 1987: 254 - 256.
- [3] Thompson N S. Wood and Agricultural Residues[M]. New York: Academic Press, 1983: 101 - 147.
- [4] Shirling E B, Gottlieb B D. Methods for characterization of *Streptomyces* species [J]. Int J Syst Bacteriol, 1966, 16: 313 - 340.
- [5] 瓦克斯曼 S A. 放线菌属和种的分类、鉴定和描述. 第二卷[M]. 阎逊初, 译. 北京: 科学出版社, 1974: 342 - 369.
- [6] 中国科学院生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975: 13 - 259.
- [7] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes [J]. J Gen Appl Microbiol, 1983, 29: 319 - 322.
- [8] 王平. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法——薄层层析法[J]. 微生物学通报, 1986, 13: 228 - 230.
- [9] 姜成林, 徐丽华, 许宗雄. 放线菌分类学[M]. 昆明: 云南大学出版社, 1995: 36 - 37.
- [10] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. Clustal W. improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22: 4 673 - 4 680.
- [11] Sudhir K, Koichiro T, Ingrid B. Jakobsen and Masatoshi Nei MEGA 2. 0: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software [CP]. Bioinformatics, 2001.
- [12] Lever M A. New reaction for colorimetric determination of carbohydrates[J]. Anal Biochem, 1972, 47: 27 - 34.
- [13] Shao W, Wiegel J. Purification and characterization of a thermostable  $\beta$  - xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* [J]. J Bacteriol, 1992, 174: 5 848 - 5 853.
- [14] Poutanen K, Puls J. Characteristics of *Trichoderma reesei*  $\beta$  - Xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1988, 28: 425 - 432.
- [15] Shao W, Wiegel J. Purification and characterization of two acetyl xylan esterases from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL - YS485[J]. Applied and Environment Microbiology, 1995, 61: 729 - 733.
- [16] Ruile P, Winterhalter C, Libel W. Isolation and analysis of a gene encoding  $\alpha$  - glucuronidase, an enzyme with a novel primary structure involved in the breakdown of xylan [J]. Mol Microbiol, 1997, 23: 267 - 279.
- [17] Milner Y, Avigad G. A copper reagent for the determination of hexuronic acid and certain ketohexoses[J]. Carbohydr Res 1967, 4: 359 - 361.
- [18] Kihli U, Nigam P, Singh D, et al. Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C[J]. Enzyme Microb Technol, 2001, 28: 606 - 610.
- [19] Kusakabe I, Kawaguchi M, Yasui T, et al. Purification and some properties of extracellular xylanase from *Streptomyces* sp E-86 [J]. J Agar Chem Soc Japan, 1977, 51: 429 - 437.
- [20] Subramanian S & Prema P. Biotechnology of microbial xylanase: enzymology, molecular biology and application[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2002, 22(1): 33 - 64.
- [21] Jeong K J, Park I Y, Kim M S, et al. High level expression of an endoxylanase gene from *Bacillus* sp. in *Bacillus subtilis* DB104 for the production of xylobiose from xylan[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 50(1): 113 - 118.

[责任编辑: 孙德泉]