第 30卷第 2期 南京师大学报 (自然科学版) Vol 30 No. 2
2007年 6月 JOURNAL OF NANJING NORMAL UNIVERSITY (Natural Science Edition) Jun, 2007

产结晶纤维素酶的嗜热菌鉴定及其酶学性质

吴窈画 ,邵蔚蓝

(南京师范大学微生物工程重点实验室 ,江苏 南京 210097)

[摘要] 从云南腾冲热海温泉采集的样品中 ,分离出一株产结晶纤维素酶的嗜热菌 TC - 1. 该菌株呈杆状 ,革兰氏阴性 ,生理生化特征分析和 16S rDNA序列同源性比对表明它属于亚栖热菌属 *Meiothermus*. 结晶纤维素、木聚糖和葡萄糖可以诱导该菌产生结晶纤维素酶 ,其中结晶纤维素诱导的酶活力最高. 对其产生的结晶纤维素酶进行了初步纯化与酶学性质研究 ,该酶的最适反应温度为 70℃,最适 pH为 6. 0,在 50℃～70℃和 pH5. 5～6. 5之间酶活力相对稳定.

[关键词] 亚栖热菌 , 16S rDNA,结晶纤维素酶 ,酶活 ,酶纯化和性质

[中图分类号] Q939. 9 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616 (2007) 02-0084-05

Identification of Crystalline Cellulose-Degrading Thermophilic Bacterium and the Characterization of Avicelase

Wu Yaohua, Shao Weilan

(The Key Laboratory of Microbiology Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: A rosy-pigmented Gram-negative, thermophilic bacterium which could produce avicelase efficiently, was isolated from Tengchong hot springs in Yunnan province. The strain named TC - 1, was identified as the genus of *Meiothermus*, based on the results of morphological, physio-biochemical characteristics, and the homological analysis of 16S rDNA sequence. The TC - 1 strain could utilize crystalline cellulose, carboxymethylcellulose, xylan and glucose. Experimental investigations revealed that crystalline cellulose could induce plenty of enzyme production. The enzyme was partially purified, its maximal activity with the substrate of crystalline cellulose was at pH6. 0 and 70℃, respectively. The studies on pH and temperature stability showed that it was stable enough between pH5. 5～6. 5 at 70℃ for 1 h, and more than 80% of the activity still remained when incubation was prolonged to 1 h at 70℃.

Key words: *Meiothermus*, 16S rDNA, Avicelase, enzyme activity, purification and characterization

0 引言

纤维素是地球上年产量巨大的可再生性的一种自然资源 ,利用其进行生物转化提供有益物质 ,对于当前人类解决能源危机、粮食短缺、环境污染等现实问题具有极其重要的意义 [1]. 微生物及其产生的纤维素酶能够降解纤维素 ,一直是纤维素酶及其应用研究领域的主要热点 [2]. 在自然界中许多真菌和细菌都能产生纤维素酶 ,而利用嗜热菌和极端嗜热菌高温转化纤维素具有潜在的技术优势 [3,4].

纤维素是以纤维二糖为基本单位 ,由许多葡萄糖残基以 β - 1, 4糖苷键连接而成的高分子聚合物. 由于天然纤维素链倾向于缠绕在一起 ,形成结晶状不溶性的刚性结构 ,导致生物降解的天然抗性 [5]. 目前大部分纤维素酶的研究常用底物是高水溶性的羧甲基纤维素钠 (CMC - Na) ,这在一定程度上削弱了纤维素

收稿日期: 2006-09-12.
基金项目:江苏省高技术研究项目 (BG20050326)资助.
作者简介:吴窈画 (1981—) ,女 ,硕士研究生 ,主要从事微生物分子生物学的学习与研究. E-mail: wyhsilence2000@126. com
通讯联系人:邵蔚蓝 (1958—) ,女 ,特聘教授 ,博士生导师 ,主要从事微生物分子生物学的教学与研究. E-mail: wlshao404@hotmail. com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

酶“分解纤维素”的意义.毕竟用纤维素酶来处理不溶于水的天然纤维素具有更大的应用价值.

本实验从云南腾冲热海温泉采集的样品中,分离出一株产结晶纤维素酶(Avicelase)的嗜热菌TC-1,从菌株形态、部分生理生化特征和16S rDNA序列对该菌进行了鉴定,初步探讨了该菌株的产酶条件,并对部分纯化的结晶纤维素酶进行了酶学性质研究.

1 材料与方法

1.1 菌种来源

云南腾冲热海温泉.

1.2 培养基和筛选方法

1.2.1 培养基

基本培养基:NH_4Cl 0.05%,$(NH_4)_2SO_4$ 0.05%,$NaCO_3$ 0.2%,KH_2PO_4 0.4%,1 000×Wolfs微量元素1 mL/L,2 000×Vitamin溶液0.5 mL/L,酵母粉0.05%,pH为7.0.富集培养基:含0.5% CMC-Na的基本培养基.平板筛选培养基:上层,加1.5%琼脂的基本培养基;下层,加3%结晶纤维素(Avicel)的上层培养基.以LB培养基为种子培养基.含2%结晶纤维素的基本培养基为液体发酵培养基.

1.2.2 筛选方法

少量采集样品接种于50 mL富集培养基中,60 ℃振荡培养3 d后,取5 mL转至新鲜富集培养基中继续培养.取适量稀释的培养液涂布于筛选平板上60 ℃培养,筛选生长旺盛、刚果红染色出现明显透明水解圈的菌株.并用于液体发酵,复筛出产酶量高的菌株.

1.3 菌株鉴定方法

1.3.1 菌的形态观察和部分生理生化特征

在结晶纤维素平板上划线接种,60 ℃培养,连续几天观察菌落形态变化.取菌样涂片,用显微镜观察菌体和细胞形态.菌种接于不同pH(4.5～11.0)的LB培养基中,置于不同温度(35～70 ℃)下培养,观察以上不同生长环境中菌的生长情况.

1.3.2 16S rDNA序列分析

菌株液体培养后离心收集菌体,参照文献[6]提取细菌DNA.以抽提的DNA作为PCR扩增摸板,用于16S rDNA扩增的引物为一对通用引物,正向引物:5′-GAGAGTTTGATCCTGGCCAG-3′;反向引物:5′-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3′.PCR产物经纯化后测序,测序由上海基康生物技术有限公司完成.

1.4 产酶条件试验

1.4.1 粗酶制备及酶活测定方法

60 ℃过夜培养的种子液,按2%接种量转接于100 mL发酵培养液中继续培养2 d.4 ℃,12 000 r/min离心30 min.取上清作60%的硫酸铵沉淀,沉淀溶于少量磷酸盐(30 mol/L,pH6.5)缓冲液中,用同样的缓冲液透析后即为粗酶液.

酶活测定采用PAHBAH法[7]:100 μL稀释酶液加至100 μL含0.5%结晶纤维素的邻苯咪唑缓冲液(100 mol/L,pH6.5)中,70 ℃反应1 h后,加600 μL终止剂/显色剂PAHBAH终止反应,沸水浴10 min,冷却至室温,测定410 nm处的吸光值.

一个酶活单位(U)定义为pH6.5,70 ℃反应条件下,以1 μmol/min的速率催化生成还原糖的酶量.用葡萄糖作标准曲线.

1.4.2 不同碳源和接种量对酶活的影响

以CMC-Na为碳源培养的发酵液作为种子,接种于分别含有结晶纤维素、木聚糖和葡萄糖3种不同碳源的基本培养基中,60 ℃培养2 d后测定粗酶液的酶活.

选定结晶纤维素作为碳源,改变接种量,比较不同接种量对产酶量和酶活性的影响.

1.5 酶的纯化与性质研究

1.5.1 酶的分离纯化

分离步骤在4 ℃下进行,缓冲液为30 mol/L pH6.5的磷酸盐缓冲液.

发酵液离心后上DEAE-Sephrose Fast Flow阴离子交换柱(1.5 cm×15 cm),用10倍柱体积的0～

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

0.5 mol/L NaCl(pH8.0)梯度洗脱(4 mL/min),收集有活性的洗脱液.活性组分作 60%的硫酸铵沉淀.沉淀的蛋白重悬于 1.5 mL缓冲液中,然后进样于预先用缓冲液平衡好的 HW-55F-Toyopearl分子筛柱(2.5 cm ×90 cm)中,以 0.5 mL/min的流速洗脱,收集洗脱液测定酶活. Bradford法[8]测定蛋白含量, SDS-PAGE凝胶电泳检测纯度. PAGE凝胶电泳采用刚果红染色法检测酶活性[9].

1.5.2　酶学性质分析

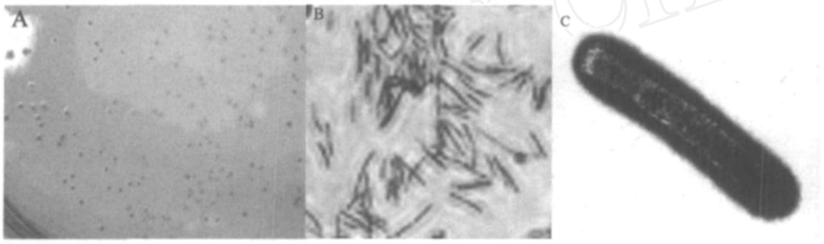
在不同温度(50℃～80℃)和不同 pH(4.5～8.0)条件下测定酶的最适反应温度和 pH.热稳定性的测定:适量稀释酶液于不同温度下保温 1 h后测定残留活力,定义冰浴保存的酶活力为 100%作温度稳定性曲线,找到酶活半衰期为 1h的温度. pH稳定性的测定:适量稀释酶液于不同 pH的缓冲液中, 70℃保温 1 h后测定残留活力,定义冰浴保存的酶在对应 pH条件下的活力为 100%作 pH稳定性曲线.

2　结果与分析

2.1　产结晶纤维素酶的嗜热菌的鉴定

2.1.1　嗜热菌的形态观察和部分生理生化特征

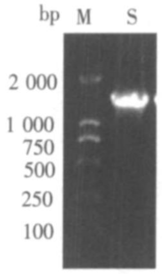
通过富集培养从采集样品中分离出一株细菌,命名为 TC-1.该菌生长的 pH范围是 4.5～10.5,最适 pH为 7.0;温度范围为 40℃～70℃,最适温度为 55℃～60℃,属于中性嗜高温菌.该菌株能在以结晶纤维素为碳源的平板上产生可见的溶解圈.菌落红色,圆形,略突起,边缘整齐,表面湿润;革兰氏阴性;菌体杆状,两端钝圆,大小 0.5～0.8 ×2～6 μm,无鞭毛,不形成芽孢(见图 1).好氧,随溶氧量增加生长越好,能发酵利用结晶纤维素、CMC-Na、木聚糖和葡萄糖.根据菌株形态和生理生化特征,参照伯杰氏鉴定手册[10],该菌与亚栖热菌属 *Meiothermus*分类特征相似.



(A:菌落照片; B:细胞群体形态×1 000; C:电镜扫描照片×20 000)

图 1　TC-1 菌的形态学

Fig.1　Morphology of TC-1 strain



(M:DNA maker; S:TC-1 菌株的 16S rDNA)

图 2　TC-1 菌 16S rDNA PCR 扩增结果

Fig.2　The PCR fragment of 16S rDNA of TC-1 strain

2.1.2　16S rDNA PCR鉴定

16S rDNA PCR扩增得到一条 1.5 kb的特异性条带,结果见图 2. 16S rDNA全序列与 GeneBank核酸序列库中的相关菌株序列比较,结果表明该菌与 *Meiothermus ruber*有 99.93%的同源性.

2.2　嗜热菌产结晶纤维素酶的条件

不同碳源对菌体生长和产酶活力的影响,结果见表 1.菌体在 LB中生长速度最快,产酶量最多,但比活力低.结晶纤维素、木聚糖和葡萄糖都能不同程度诱导结晶纤维素酶的产生,其中结晶纤维素诱导的酶比活力最高.因此发酵培养过程中结晶纤维素是诱导酶产生的最佳碳源.此外,接种量对产酶量和酶活性的影响也很大,结果见表 2.随着接种量的扩大,蛋白总量在增加,酶的比活力也大幅度提升.

表 1　碳源对产酶的影响

Table 1　The effect of carbon sources on TC-1 strain growth and enzyme activity

碳源	菌体浓度(OD_{600})	总酶活/U	总蛋白/mg	比活/(U/mg)
LB	1.96	0.090 ±0.023	4.38 ±0.015	0.021 ±0.007 5
木聚糖	1.92	0.040 ±0.008	1.24 ±0.04	0.032 ±0.009
葡萄糖	1.63	0.064 ±0.011	1.05 ±0.04	0.061 ±0.014
结晶纤维素	N_D	0.027 ±0.007	0.28 ±0.043	0.096 ±0.015

注:ND由于底物性质未能测定生长.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 接种量对产酶的影响

Table 2 The effect of incubation on TC - 1 strain enzyme formation and activity

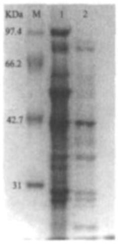
接种量 /%	总蛋白量 /mg	总酶活 /U	酶比活力 / (U /mg)
2	0.20 ±0.04	0.018 ±0.0035	0.09 ±0.012
10	0.29 ±0.06	0.032 ±0.0033	0.11 ±0.020
100*	0.38 ±0.03	0.064 ±0.0050	0.17 ±0.015

注: *培养的菌体转接于等体积的发酵培养基中.

2.3 部分纯化酶的酶学特性

2.3.1 结晶纤维素酶的分离纯化

在 DEAE-Sephrose Fast Flow和 HW-55F-Toyopearl两步层析中,酶活性检测和蛋白浓度测定的结果表明蛋白峰和酶活性峰不相吻合,目的蛋白未形成单独的峰. SDS-PAGE电泳检测证明有不少杂蛋白存在(见图 3). PAGE电泳活性检测到很明显的透明带(见图 4),这证实了发酵液中有较高活性的结晶纤维素酶,而且是细菌分泌到胞外的.



(M:变性蛋白质 maker;1:过 DEAE-Sephrose Fast Flow 柱后;2:过 HW-55F-Toyopearl 后)

图 3 结晶纤维素酶纯化过程的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE analysis of purified Avicelase

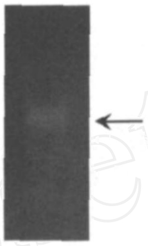
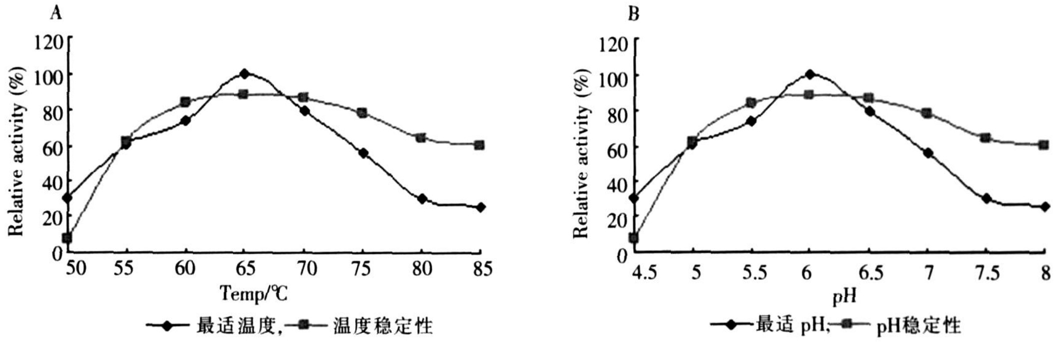


图 4 结晶纤维素酶的凝胶活性检测

Fig.4 Gel diffusion assay of Avicelase

2.3.2 结晶纤维素酶酶学性质

温度和 pH对酶活性影响结果见图 5. 最适反应温度为 70℃,低于 70℃时酶活随温度升高而迅速上升,高于 70℃时酶活性急剧下降;在 50℃～70℃范围内,酶活性保持在 80%以上,酶活半衰期 1 h的温度约为 75℃. 最适反应 pH为 6.0,在 pH5.5～7.0之间酶活相对稳定,残留活性都在 70%以上,pH超过这一范围后酶活下降较快. 结果表明该酶热稳定性好,适宜在中性条件下保存或进行催化反应.



A:pH6.5 时酶反应 1 h 时最适温度曲线和对应温度下的稳定性;B:70℃反应 1 h 时最佳 pH 曲线和对应 pH 值条件下酶的稳定性

图 5 温度和 pH 对酶活性和稳定性的影响

Fig.5 Effects of temperature and pH on the enzyme activity and stability

3 讨论

天然纤维素不溶于水,结晶区难以被降解是其难以被充分利用的最主要原因. 微生物降解纤维素,尤其是利用极端微生物降解纤维素的研究给这一难关带来突破性的进展[11,12]. 目前结晶纤维素的降解主要集中在嗜热厌氧细菌的研究(如 *Clostridium thermocellum*),这类细菌的产酶特点是:主要产胞内酶或酶以多酶复合体——纤维小体的形式吸附在细胞表面,直接从其分泌物中提取纤维素酶基本上是不可行的[13];此外厌氧菌的生长速度低,需要严格的厌氧生长条件,因此很少被用作酶的生产菌种,更多的是侧

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

重于基因工程方面的研究.本实验获得的嗜热菌 TC - 1经鉴定属于亚栖热菌属 ,是好氧菌 ,最适生长温度可达 60℃,代谢过程中向胞外分泌游离的结晶纤维素酶 ,相对于厌氧菌而言适合于大批量发酵培养.

从 TC - 1菌株产酶条件表明该菌产生的结晶纤维素酶为诱导酶.该菌在 LB中生长速度比较快 ,结晶纤维素作为碳源可以诱导产生较高比活力的酶.因此发酵过程中采用了两步培养法: (1) LB作为种子培养液获得大量旺盛代谢活力的细胞; (2) 菌体转接于诱导培养基中 ,诱导目标酶产生.由于产生酶的总酶活较低 ,导致酶的纯化受到量上的限制 ,进一步实验必须在分离纯化技术上取得突破.这部分工作还在研究之中.

菌株 TC - 1产生的胞外结晶纤维素酶的酶学性质与嗜热厌氧菌 *C. thermocellum* 的性质相似 ,均属热稳定性好的中性酶. TC - 1所产酶的酶最适反应 pH为 6.0;最适反应温度高达 70℃,酶活半衰期 1h的温度约为 75℃,体现出很好的热稳定性.因此 TC - 1菌株在生长条件 (60℃、pH7.0)下所产酶的活性和稳定性较好 ,具有作为工业发酵工程菌的可行性 ,而且这种热稳定性的酶基因在分子生物学上具有潜在的研究价值.

[参考文献]

[1] Bhat M K, Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications[J]. Biotechnology Advances, 1997, 15(3/4): 583-620.

[2] Lee R L, Paul J. Microbiol cellulase utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2002, (Sept): 506-577.

[3] Taya M, Hinoki H, Yagi T, Kobayashi T. Isolation and characterization of an extremely thermophilic cellulolytic, anaerobic bacterium[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1988, 29: 474-479.

[4] Deng Y, Zhang H, Hu G Q, Lin S P. Effect of peel off crude oil by high - temperature anaerobic cellulolytic bacterium[J]. Sichuan Univ, 2002, 39(1): 167-169.

[5] 汪天虹 ,王春卉 ,高培基.纤维素酶纤维吸附区的结构与功能 [J].生物工程进展 , 2000, 20(20): 37-40.

[6] Sambook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[7] Lever M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates[J]. Anal Biochem, 1972, 47: 273.

[8] 汪家政 ,范明.蛋白技术 [M].北京 :科学出版社 , 2000.

[9] Kluepfel D. Screening of prokaryotes for cellulose-and hemicellulose-degrading enzymes[J]. Methods Enzymol, 1988, 160: 180-186.

[10] R E布坎南 ,N E吉本斯.伯杰细菌鉴定手册 [M].中国科学院微生物研究所翻译组 ,译. 8版.北京 :科学出版社 , 1984.

[11] Gilad R, Rabinovich L, Yaron S, et al. CelI, a noncellulosomal family 9 enzyme from closeridium thermocellum, is a processive endoglucanase that degrades crystalline cellulose[J]. Bacteriology, 2003, 185(2): 391-398.

[12] Niehaus F, Bertoldo C, Kahler M, Antranikian G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51: 711-729.

[13] Anatole A, Klyosov. Trends in biochemistry and enzymology of cellulase degradation[J]. Biochemistry, 1990, 29(27): 10 577-10 585.

[责任编辑 :孙德泉]

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net