

产木聚糖酶但无纤维素酶活性菌株的 筛选及初步鉴定

陈娜, 生吉萍, 申琳*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 为获得产木聚糖酶但无纤维素酶活性的菌株, 本实验以造纸污水为分离材料, 使用底物筛选法得到一株目标菌株, 命名为 26T。通过生理生化及分子生物学鉴定, 初步判定其为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。该菌株在 50℃、pH10.0 的环境中生长良好, 有较好的耐热、耐碱性, 其产生的木聚糖酶主要分布在细胞外, 并且 37℃、200r/min 摇瓶发酵 12h 后酶活力可达 14.58U/mL, 该菌株在食品工业中具有很好的应用潜力。

关键词: 芽孢杆菌; 木聚糖酶; 纤维素酶; 耐热性; 耐碱性

Isolation and Preliminary Identification of Cellulase-free Xylanase-producing Strain

CHEN Na, SHENG Ji-ping, SHEN Lin*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to obtain a strain with cellulase-free xylanase activity, a bacterium named as 26T was isolated from paper mill wastewater by substrate screening. The strain 26T was preliminarily identified as *Bacillus subtilis* by analyzing its physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA gene sequence. This strain could grow under the conditions of 50℃ and pH 10, and revealed high heat and alkali resistance. The xylanase from it as an extracellular enzyme had an activity of 14.58 U/mL under the optimal fermentation conditions of 37℃, 200 r/min and 12 h. Therefore, this strain might have a prosperous application in food industry.

Key words: *Bacillus subtilis*; xylanase; cellulase; heat resistance; alkali resistance

中图分类号: Q93.331

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0273-05

木聚糖酶是一组可降解植物半纤维素成分的水解酶系, 在自然界中分布于各种微生物、植物、动物瘤胃等环境^[1-3]。木聚糖酶大多为单亚基蛋白, 分子质量 8~145kD; 不同来源的酶, 氨基酸组成差异较大, 酶学性质也有所不同, 酶的最适反应 pH 值多为偏酸性, 最适反应温度 40~75℃^[4]。随着生物技术在工业中的发展, 木聚糖酶被广泛应用于食品加工、饲料生产、制浆造纸、能源工业等行业, 具有很大的经济价值和应用前景^[5-6]。

在食品工业中, 木聚糖酶可以提高植物材料的提取率, 提高酿造产品的发酵率, 改善焙烤食品的面筋弹性等^[7-9]。并且, 其降解产物低聚木糖可作为增稠剂、

低热量甜味剂应用于食品加工^[10]。筛选分泌木聚糖酶但不产纤维素酶的菌株, 将利于木聚糖酶的纯化, 便于工业使用。目前, 研究者已经筛选得到多种产无纤维素酶活性木聚糖酶的微生物, 包括细菌、真菌、放线菌, 其中曲霉属和芽孢杆菌属种类最多^[11]。本实验以造纸污水为材料, 筛选产无纤维素酶活性木聚糖酶的菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

使用灭菌后玻璃瓶接取冲洗纸浆的污水, 于 4℃ 保存。

1.1.2 试剂及工具酶

收稿日期: 2011-02-14

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200803033)

作者简介: 陈娜(1985—), 女, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: chenna0419@126.com

* 通信作者: 申琳(1964—), 男, 副教授, 博士, 主要从事果蔬采后病理与农副产品资源综合利用研究。

E-mail: shen5000@cau.edu.cn

EasyTaq DNA 聚合酶、核酸分子量标准、细菌 DNA 提取试剂盒 北京全式金公司; 扩增引物 27F 和 1492R 由上海生工生物工程技术有限公司合成; 酵母提取物、胰蛋白胨等培养基成分 北京蓝弋试剂公司; 桦木木聚糖酶 美国 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器与设备

超净工作台 北京赛伯乐实验仪器有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂; 生化培养箱 上海森信实验仪器有限公司; 全温振荡培养箱 太仓市实验设备厂; 酸度计 德国 Sartorius 公司; 高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; PCR 仪 美国 Bio-Rad 公司。

1.1.4 培养基

LB 培养基: 10g/L 胰蛋白胨、5g/L 酵母膏、10g/L NaCl, pH7.0; 固体培养基加入 1.5%~2.0% 琼脂粉。木聚糖酶筛选培养基: 固体 LB 中加入 1% 桦木木聚糖。营养肉汤培养基: 将 18g 营养肉汤培养基(10g 蛋白胨、5g NaCl、3g 牛肉粉)溶解于 1L 蒸馏水中。碱性营养肉汤培养基: 将 18g 营养肉汤培养基(10g 蛋白胨、5g NaCl、3g 牛肉粉)溶解, 调 pH8.0、9.0、10.0、11.0、12.0, 定容至 1L。

1.2 方法

1.2.1 产木聚糖酶芽孢杆菌的分离纯化和初筛

吸取污水原液 1mL, 放入 9mL 无菌生理盐水中制成 10^{-1} 稀释液, 再按 10 倍梯度稀释分别制备菌悬液 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} , 取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 菌悬液 100 μ L 涂布于 LB 固体培养基上, 37℃ 培养 12~24h。划线纯化出单菌落, 分别将单菌落编号保存。将筛选出的菌株点接于木聚糖酶筛选培养基中, 37℃ 培养 12~24h, 观察水解圈。

1.2.2 产木聚糖酶但无纤维素酶活性菌株的筛选

在 15mL 试管中加入 5mL LB 液体培养基, 将初筛得到菌株接种于培养基中, 37℃、200r/min 过夜摇菌, 培养至 OD_{600nm} 为 1.6~1.8, 制备成发酵种子液。将种子液按体积分数 5% 接种于含有 1% 木聚糖的 LB 液体培养基中, 37℃、200r/min 培养 12h 后, 4℃、4000r/min 离心 5min, 收集上清液, 即为粗酶液, 分别测定木聚糖酶和纤维素酶活力。

1.2.3 木聚糖酶活力测定

参考 Bailey 等^[12]的方法测定木聚糖酶活力。取 100 μ L 酶液加入 900 μ L 0.5mol/L pH6.8 的 Tris-HCl 缓冲液配成质量浓度为 0.2g/L 木聚糖溶液, 50℃ 水浴酶解 15min。取

250 μ L 酶解液, 加入 750 μ L 3,5-二硝基水杨酸(DNS), 沸水浴反应 10min, 立即放入冰中冷却。加入 5mL 蒸馏水, 混匀, 在波长 540nm 处测吸光度。以沸水浴 15min 灭活的酶液为对照。酶活力单位(U): 每毫升酶液每分钟水解木聚糖产生 1 μ mol 木糖的量。

1.2.4 纤维素酶活力测定

参考丁长河^[13]的方法, 取 100 μ L 酶液加入 900 μ L 0.5mol/L pH6.8 的 Tris-HCl 缓冲液配成的质量浓度 0.2g/L 羧甲基纤维素钠溶液, 50℃ 水浴酶解 15min。取 250 μ L 酶解液, 加入 750 μ L DNS, 沸水浴反应 10min, 立即放入冰中冷却。加入 5mL 蒸馏水, 混匀, 在波长 540nm 处测吸光度。以沸水浴 15min 灭活的酶液为对照。酶活力单位(U): 每毫升酶液每分钟水解羧甲基纤维素钠产生 1 μ mol 葡萄糖的量。

1.2.5 菌株胞内物质提取

将发酵液于 4℃、12000r/min 离心 5min, 收集菌体沉淀。用 0.5mol/L pH6.8 的 Tris-HCl 缓冲液重悬菌体, 反复冲洗。超声波冰浴破碎, 4℃、12000r/min 离心 5min 后, 上清液即为菌体胞内物质提取物, 测定木聚糖酶活力。

1.2.6 生理生化实验鉴定

形态观察和部分理化性质参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[14]和《常见细菌鉴定手册》^[15]进行实验。生化鉴定使用生物梅里埃公司的 API50CHB 试剂盒。

1.2.7 细菌总 DNA 提取及 16S rDNA 鉴定

使用细菌总 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 以总 DNA 为模板, 以 27F 和 1492R 为引物 PCR 扩增细菌 16S rDNA^[16]。27F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGA ACG AAC GCT -3'; 1492R: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC C-3'。

PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 90s, 共进行 30 个循环; 72℃ 延伸 10min, 4℃ 保温。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。PCR 产物由北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

使用 GenBank 数据库的 Blastn 软件进行序列同源性分析, 使用 ClustalW 软件进行聚类分析, 使用 MEGA4.1 构建系统发育进化树。

1.2.8 芽孢杆菌耐热耐碱能力测定

耐碱能力: 将 37℃、200r/min 过夜培养的种子液按体积分数 5% 接种于不同 pH 值(7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0)的碱性营养肉汤培养基中, 37℃、200r/min 培养 24h, 测定 OD_{600nm}。

耐热能力: 将 37℃ 200r/min 过夜培养的种子液按体积分数 5% 接种于营养肉汤培养中, 在不同温度条件下 (35、40、45、50、55、60℃) 静置培养 48h, 测定 OD_{600nm}。

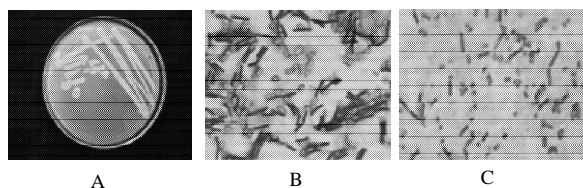
2 结果与分析

2.1 产木聚糖酶但无纤维素酶活性菌株的筛选

本实验从造纸污水中分离得到 8 株优势菌株, 通过木聚糖酶水解圈实验验证 2 株有木聚糖酶活性, 分别为菌株 26T 和 26Q。其中菌株 26T 无纤维素酶活性, 以 1% 木聚糖为底物, 37℃、200r/min 发酵 12h, 木聚糖酶活力达 14.58U/mL。

2.2 菌株染色鉴定

菌株 26T 在 LB 培养基上生长良好, 37℃ 培养 12h 就可形成明显的菌落。该菌落呈圆形, 边缘不规则、平整、较干、白色。革兰氏染色呈紫色, 为革兰氏阳性菌。芽孢染色显示出具有芽孢, 芽孢分布在营养体外部。



A. 菌株 26T 的菌落形态; B. 革兰氏染色; C. 芽孢染色(深灰色为营养体细胞, 浅灰色为芽孢)。

图 1 菌株 26T 菌落形态及染色结果

Fig.1 Colony morphology and staining of strain 26T

2.3 菌株 26T 的生理生化特性

对菌株 26T 进行生理特性鉴定, 结果如表 1 所示。生化特性鉴定结果如表 2 所示, 其中标号 1~49 号代表 49 种碳水化合物(糖及其衍生物), 0 号为阴性对照。

表 1 菌株 26T 部分生理特性鉴定结果
Table 1 Physiological identification of strain 26T

实验项目	结果	实验项目	结果
革兰氏染色	阳性	2%NaCl 生长	+
细胞形状	杆状	5%NaCl 生长	+
形成芽孢	+	7%NaCl 生长	+
芽孢膨大	—	10%NaCl 生长	+
芽孢圆形	—	pH5.7 生长	+
厌氧生长	—	淀粉水解	+
50℃ 生长	+	酪素水解	+
产生吡啶	—	接触酶	+

注: +. 阳性(可生长利用或反应); —. 阴性(不可生长利用或无反应)。下同。

表 2 菌株 26T 的 API50CHB 结果
Table 2 API50CHB fermentation results of strain 26T

管号	底物	反应结果	管号	底物	反应结果
0	阴性对照	—	25	七叶灵柠檬酸铁	+
1	甘露醇	+	26	水杨苷	+
2	赤藻糖醇	—	27	D-纤维二糖	+
3	D-阿拉伯糖	—	28	D-麦芽糖	+
4	L-阿拉伯糖	+	29	D-乳糖	—
5	D-核糖	+	30	D-蜜二糖	—
6	D-木糖	—	31	D-蔗糖	+
7	L-木糖	—	32	D-海藻糖	+
8	D-侧金盏花醇 I	—	33	菊粉	—
9	甲基-βD-吡喃木糖苷	—	34	D-松三糖	—
10	D-半乳糖	—	35	D-棉子糖	—
11	D-葡萄糖	+	36	淀粉	+
12	D-果糖	+	37	糖原	+
13	D-甘露糖	+	38	木糖醇	—
14	L-山梨糖	—	39	D-龙胆二糖	+
15	L-鼠李糖	—	40	D-土伦糖	—
16	卫茅醇	—	41	D-来苏糖	—
17	肌醇	+	42	D-塔格糖	—
18	甘露醇	+	43	D-岩藻糖	—
19	山梨醇	+	44	L-岩藻糖	—
20	甲基-αD-吡喃甘露糖苷	—	45	D-阿拉伯醇	—
21	甲基-αD-吡喃葡萄糖苷	+	46	L-阿拉伯醇	—
22	N-乙酰葡萄糖胺	—	47	葡萄糖酸钾	—
23	杏仁苷	—	48	2酮基葡萄糖酸钾	—
24	ARBULIN	+	49	5酮基葡萄糖酸钾	—

从表 1 可见, 菌株 26T 在 10%NaCl、pH 5.7 培养条件下可生长, 且不产生吡啶, 能水解淀粉、酪素。从表 2 可见, 菌株 26T 可利用甘露醇、L-阿拉伯糖等碳源, 不能利用赤藻糖醇、D-阿拉伯糖等。将表 1、2 中菌株 26T 的生理生化结果与《伯杰细菌鉴定手册》^[14]和《常见细菌系统鉴定手册》^[15]数据比较显示, 菌株 26T 属于芽孢杆菌属 *Bacillus*。

2.4 16S rDNA 鉴定及系统发育树

提取菌株 26T 总 DNA, 以总 DNA 为模板, 使用引物 27F 和 1492R 扩增细菌 16S rDNA, 结果如图 2 所示。

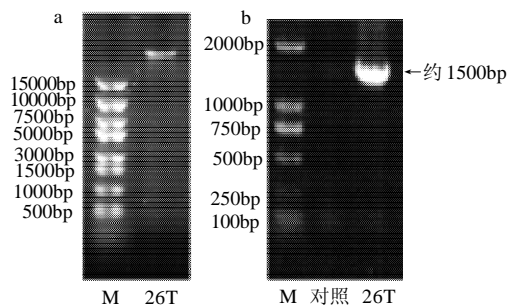


图 a: M.15000bp 核酸分子质量标准; 26T. 菌株 26T 的细菌总 DNA。图 b: M.2000bp 核酸分子质量标准; 对照.PCR 空白对照; 26T. 菌株 26T 的 16S rDNA。

图 2 26T 总 DNA(a)及 16S rDNA 扩增(b)

Fig.2 PCR amplification of total DNA and 16S rDNA from strain 26T

从图2可看出,菌株26T的基因组提取完整、未降解,无RNA及蛋白污染,可用做PCR扩增的模板。且PCR扩增得到大小约1500bp的产物,与细菌16S rDNA大小相符,进一步测序验证,确定其为菌株26T的16S rDNA序列,且无杂菌污染。将菌株26T的16S rDNA序列与GenBank数据库中已有数据在线比对,结果显示26T菌株的16S rDNA与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 同源性达99%。使用MEGA4.1构建的系统发育树如图3所示。

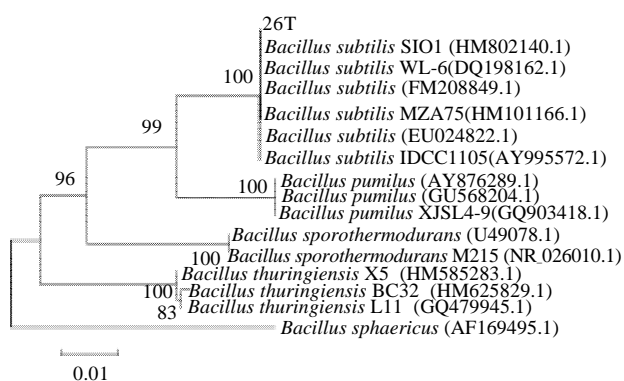


图3 菌株26T基于16S rDNA基因的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA gene sequence of strain 26T

从图3可以看出,菌株26T的遗传进化距离与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 属于同一分支。结合菌株26T的形态特征及生理生化指标鉴定结果,初步鉴定菌株26T为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。

2.5 菌株胞内外物质的酶活性

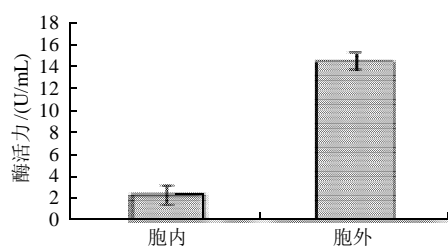


图4 菌株26T胞内和胞外物质的木聚糖酶活力

Fig.4 Intracellular and extracellular xylanase activities from strain 26T

由图4可以看出,细菌26T的胞外发酵液酶活力可达到14.58U/mL,是胞内提取物酶活力的7倍,说明该菌株所产的木聚糖酶主要分泌于胞外。

2.6 菌株耐热、耐碱性

从图5可以得出,菌株26T在50℃、pH10.0的环境中依然生长良好,属于耐热、耐碱微生物。

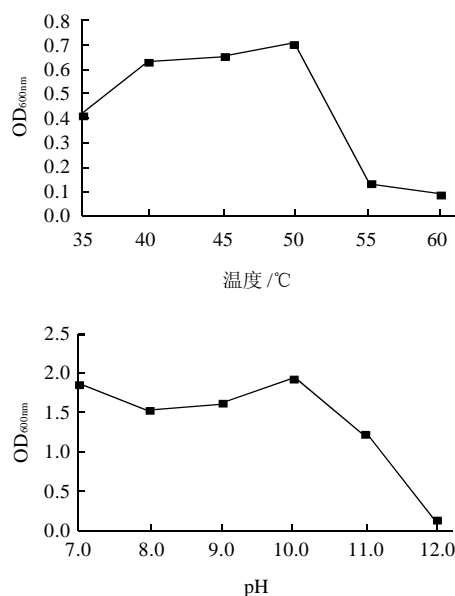


图5 菌株26T在不同温度和不同pH值条件下生长状况

Fig.5 Growth curves of strain 26T under different conditions of temperatures and pH

3 结论与讨论

本实验从造纸污水中筛选出一株具有木聚糖酶活性,但无纤维素酶活性的优势菌株26T,通过生理生化及分子生物学鉴定其为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。并且从生理鉴定可以看出菌株26T在50℃和高盐(10%NaCl)条件下均可以生长,这与模式枯草芽孢杆菌的生理特点不同^[14],进一步研究其耐碱性证明26T在pH10.0条件下生长良好,属于耐热、耐碱微生物。

同时,该菌产生的木聚糖酶主要分泌在细胞外,酶活力为14.58U/mL,比Biely等^[7]从温泉中筛选的产木聚糖酶不产纤维素酶的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 酶活力高20%。Azeri等^[17]研究发现,不同的培养基成分和培养条件对木聚糖酶的产量有一定的影响,芽孢杆菌在添加了木聚糖或秸秆的培养基中产量最高。Sanghi等^[18]通过在培养基中加入麦麸和优化培养条件,使枯草芽孢杆菌的木聚糖酶产量提高了1.5倍。因此可通过优化菌株发酵条件来提高菌株26T的酶产量,利用木聚糖酶开发秸秆、玉米芯等植物纤维素资源,将其降解产物应用于食品行业,对于农业资源的综合利用具有重要意义。

参考文献:

- [1] 江正强.微生物木聚糖酶的生产及其在食品工业中应用的研究进展[J].中国食品学报,2005,5(1):1-9.
- [2] HENRISSAT B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. Biochemical Journal, 1991, 280(2): 309-316.

- [3] KAMBLE R D, JADHAV A R. Isolation, production and characterization of cellulase free-xylanase from *Rhizopus* sp.[J]. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences, 2010, 12 (2): 385-390.
- [4] KULKARNI N, SHENDYE A, RAO M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1999, 23(4): 411-456.
- [5] POLIZELI M L T M, RIZZATTI A C S, MONTI R, et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(5): 577-591.
- [6] BEG Q K, KAPOOR M, MAHAJAN L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(3/4): 326-338.
- [7] BIELY P. Microbial xylanolytic systems[J]. Trends in Biotechnology, 1985, 3(11): 286-290.
- [8] 田永, 侯运华, 于同立. 酸性木聚糖酶的应用研究进展[J]. 粮油加工, 2008(5): 111-113.
- [9] 岳晓, 禹蔡青, 牛天贵. 食用菌 *Pleurotus ostreatus* SYJ042 产木聚糖酶的影响因素研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(6): 49-51.
- [10] 陆健, 曹钰, 陈坚. 木聚糖酶的产生、性质和应用[J]. 酿酒, 2001, 28(6): 30-34.
- [11] 翟倩. 链霉菌 Z18 木聚糖酶 XYN-1 的纯化和性质[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [12] BAILEY M J, BIELY P, POUTANEN K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. Journal of Biotechnology, 1992, 23(3): 257-270.
- [13] 丁长河. 链霉菌高产木聚糖酶及其酶学性质的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [14] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [16] 辜运富, 张云飞, 张小平, 等. 一株抗玉米纹枯病内生细菌的分离鉴定及其抗病促生作用[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1240-1245.
- [17] AZERI C, TAMER A U, OSKAY M. Thermoactive cellulase-free xylanase production from alkaliphilic *Bacillus* strains using various agro-residues and their potential in biobleaching of kraft pulp[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(1): 63-72.
- [18] SANGHI A, GARG N, KUHAR K, et al. Enhanced production of cellulase-free xylanase by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH and its application in biobleaching of kraft pulp[J]. BioResources, 2009, 4(3): 1109-1129.