

# 产角蛋白酶植物内生菌的筛选与鉴定

杜永新, 生吉萍, 程凡升, 王正荣, 申琳\*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘要:** 以不同植物的内生菌为出发菌株进行产角蛋白酶菌株的筛选, 通过脱脂牛奶平板、高压蒸煮后的羽毛摇瓶实验及未经处理鸡毛摇瓶实验筛选到一株能够在 48h 内降解未经高压蒸煮的鸡毛的内生菌, 该菌株来源于樟树叶片。通过形态学观察、生理生化实验结合 16S rDNA 基因序列分析的方法确定该菌株为蜡样芽孢杆菌, 命名为 *Bacillus cereus* Z-3。以不同的角蛋白为底物进行发酵培养, 酶活力测定结果显示该酶降解角蛋白能力由强到弱的顺序为鸡毛、羊毛、头发。

**关键词:** 植物内生菌; 角蛋白酶; 蜡样芽孢杆菌; 筛选; 鉴定

## Screening and Identification of Keratinase-producing Endophyte

DU Yong-xin, SHENG Ji-ping, CHENG Fan-sheng, WANG Zheng-rong, SHEN Lin\*

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

**Abstract:** A strain that can degrade native feather in 48 h was isolated from camphor endophytes through primary screening on skim milk plates and secondary screening based on degradation of steamed chicken feather and native chicken feather after liquid shake flask cultivation. The isolated strain was identified as *Bacillus cereus* Z-3 based on morphological observation, biochemical experiments and 16S rDNA sequence analysis. Keratinase from *Bacillus cereus* Z-3 had the most powerful ability to degrade chicken feather, followed by wool and hair.

**Key words:** endophyte; keratinase; *Bacillus cereus*; screening; identification

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0230-04

角蛋白(keratin)是一类结构纤维硬蛋白, 广泛存在于动物皮肤、毛发、鳞片、羽毛、蹄、角、爪和指甲等部位, 富含半胱氨酸残基和大量的二硫键, 具有不溶于水和抗分解的性质, 其结构稳定, 不被多数蛋白酶如木瓜蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶等降解<sup>[1]</sup>。角蛋白虽然不能被大多数酶所降解, 但角蛋白富含各种氨基酸, 营养丰富。如羽毛中含粗蛋白达 85%~90%, 各种氨基酸总量达 70% 以上, 并且富含多种动物所需的必需氨基酸, 若能将其有效处理, 将会是一种良好的饲料蛋白来源。而且随着现代家禽养殖规模化生产, 产生了大量角蛋白废弃物, 如不能及时处理, 将会造成严重的环境污染。

角蛋白酶(keratinase)是指一类由某些微生物分泌的, 具有专一的降解天然角蛋白功能的酶类, 能有效地将羽毛等角蛋白废弃物转化为可消化蛋白<sup>[2]</sup>。角蛋白水解得到的氨基酸和多肽可用来生产营养学药物、肉肽等高级营养品。由于羽毛蛋白中富含谷氨酸、天冬氨酸等鲜味氨基酸, 所以角蛋白水解液经精制提纯后可作为食

品添加剂, 用于改善风味和强化营养<sup>[3]</sup>。角蛋白酶在饲料、环境保护和制革等工业中也有广泛应用。近年来还发现角蛋白酶具有抗虫<sup>[4]</sup>、降解导致疯牛病的 Prion 蛋白<sup>[5]</sup>的作用。因此, 研究和开发降解角蛋白的微生物资源及角蛋白酶具有重要意义。目前角蛋白酶的微生物来源主要包括细菌<sup>[6]</sup>、真菌<sup>[7]</sup>、放线菌<sup>[8]</sup>3 类。以往的研究主要是从家禽废弃物及土壤中分离筛选产蛋白酶的微生物<sup>[9-10]</sup>, 而本研究报道了从植物内生菌中筛选到产角蛋白酶的菌株, 可进一步丰富产角蛋白酶微生物的来源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种来源与试剂

通过表面消毒方法分离到的来自樟树、莲子、八千代红等植物的内生菌。

细菌基因组提取试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司; dNTP Mixture(10mmol/L) 博迈德科技发展有限公司

收稿日期: 2011-03-26

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200803033)

作者简介: 杜永新(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: dyx549@163.com

\* 通信作者: 申琳(1964—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为农副产品综合利用。E-mail: shen5000@gmail.com

司; DNA Marker、溶菌酶 北京全式金生物技术公司; 引物由上海生工生物工程技术有限公司定制合成; 其余试剂均为国产分析纯。

### 1.1.2 仪器与设备

YT-CJ-2ND 超净工作台 北京亚泰科隆实验科技开发中心; LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; SHP-450 生化培养箱 上海森信实验仪器有限公司; B204TR 显微镜 重庆奥特光学仪器有限公司; HZQ-F160 全温振荡培养箱 江苏太仓实验设备厂; DYY-6C 琼脂糖核酸电泳 北京六一仪器厂; GL212 成像系统 美国 Kodak 公司。

### 1.1.3 培养基

脱脂乳粉培养基(g/L): 脱脂奶粉 5、琼脂粉 20、分别灭菌, 脱脂奶粉灭菌条件为 115℃、20min, 琼脂粉灭菌条件为 121℃、20min, 倒平板时混合均匀。NA 培养基(g/L): 牛肉膏 3、蛋白胨 10、NaCl 5, pH7.2。液体摇瓶培养基(g/L): 鸡毛 10、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.4、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7、NaCl 0.5、MgSO<sub>4</sub> 0.1、CaCl<sub>2</sub> 0.06。

### 1.2 产角蛋白酶菌株的筛选

采用脱脂乳粉平板筛选具有蛋白酶活力的菌株<sup>[11]</sup>。将筛选到的菌株用液体培养基培养制成种子液后接种到含有经高压蒸煮鸡毛的摇瓶中, 选取能够快速降解鸡毛的菌株。将筛选到的菌株进一步接种到含有经紫外线照射而未经高压蒸煮处理的鸡毛的液体摇瓶中观察降解鸡毛的能力。

### 1.3 菌株鉴定

#### 1.3.1 形态观察、生理生化实验鉴定

将筛选到的能够降解未经高压蒸煮鸡毛的菌株接种于 NA 平板培养基上观察菌落形态并进行生理生化实验、革兰氏染色法对菌种进行鉴定<sup>[12]</sup>。

#### 1.3.2 菌株分子生物学鉴定

细菌总 DNA 提取使用细菌基因组提取试剂盒提取。提取产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量及片段大小。以总 DNA 为模板, 采用 16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR。PCR 反应体系: DNA 模板 2L、dNTP Mixture(10mmol/L) 25L、Forward primer 与 Reverse primer 各 1L、ddH<sub>2</sub>O 21L。反应条件: 94℃ 预热 5min; 94℃ 变性 30s, 56℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 90s, 33 个循环; 72℃ 终延伸 10min。取 PCR 产物 5L 用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物由北京华大基因完成切胶回收测序。

#### 1.3.3 系统进化树构建

将目的菌株的 16S rDNA 基因序列输入到 GenBank 基因数据库中使用 Blast 软件进行序列同源性比较分析。选取同源性高的序列先通过 ClustalW 软件进行聚类分析, 然后利用 MEGA 4.1 软件以 Neighbor-Joining 计算方式生

成系统发育进化树。

### 1.4 最适底物实验

以鸡毛、羊毛、头发 3 种富含角蛋白的物质作为发酵底物, 底物质量浓度为 10g/L, 接种量为 1%, 37℃、200r/min 发酵培养 24h 后, 1000r/min 离心 10min, 取上清液进行酶活力测定。

### 1.5 酶活力测定

依据参考文献[13]所述方法测定角蛋白酶活力。酶活力单位定义为 1mL 酶液在 50℃ 条件下反应 10min 后, 280nm 波长处吸光度增加 0.01 为一个酶活力单位(U)。实验数据采用 Excel 2007 软件进行统计分析。

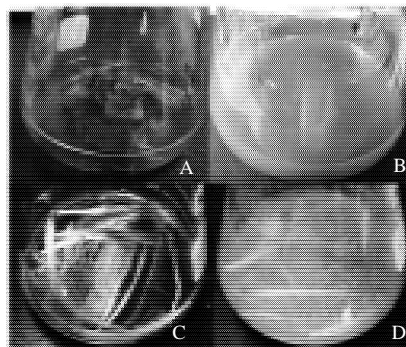
## 2 结果与分析

### 2.1 初筛结果

利用脱脂乳粉培养基, 通过观察透明圈的方法从 100 株内生细菌中筛选出 20 株分解蛋白质能力较强的菌株, 初步认定这些菌能够产蛋白酶。

### 2.2 复筛

将初筛得到的菌株用 NA 液体培养基制成种子液, 以高压蒸煮后的鸡毛为唯一碳源和氮源进行摇瓶发酵, 24h 后观察到 29-Y-2、Z-3 菌株能够使鸡毛完全降解。之后再以未经高压蒸煮鸡毛为底物进行液体摇瓶实验, 48h 后只有 Z-3 能够使鸡毛完全降解(图 1)。最终确定 Z-3 为本实验筛选到的目的菌株。



A. 经高压蒸煮后的鸡毛; B. 接种 24h 后鸡毛降解情况; C. 紫外线照射杀菌后的鸡毛; D. 接种 48h 后鸡毛降解情况。

图 1 菌株对鸡毛的降解情况

Fig.1 Degradation of steamed chicken feather and native chicken feather by strain Z-3

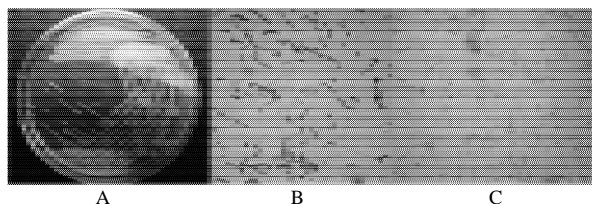
从图 1 可以看出, Z-3 菌株能够在 24h 内将经高压蒸煮的鸡毛完全降解, 而未经高压蒸煮的鸡毛接种 2d 后除了羽柄外, 羽枝也已经被完全降解掉。可能是经高压蒸煮后改变了鸡毛的结构使得鸡毛更容易降解, 而只经过紫外线照射杀菌的鸡毛由于结构稳定, 接种 48h 后才能将羽枝降解。

### 2.3 菌株的鉴定

#### 2.3.1 Z-3 菌株的菌落特征及个体形态特征

菌株 Z-3 在 NA 固体培养基上 37℃ 培养 24h 后即形

成明显的单菌落。菌落呈圆形微黄色,光滑,湿润,表面突起,边缘不整齐,单菌落直径约3mm。革兰氏染色结果为阳性杆菌(图2)。



A. Z-3 菌落形态; B. Z-3 革兰氏染色; C. Z-3 芽孢染色。

图2 Z-3 菌落形态、革兰氏染色及芽孢染色结果

Fig.2 Morphological characteristics of strain Z-3

### 2.3.2 菌株的生理生化实验鉴定结果

将菌株 Z-3 生理生化实验结果(表1)结合 API50CHB 试剂条结果(表2)与《常见细菌鉴定手册》<sup>[14]</sup>对比,初步确定为蜡样芽孢杆菌。

表1 菌株 Z-3 部分生理生化实验鉴定结果

Table 1 Physiological identification of strain Z-3

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	+
产生明胶	+	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)。

表2 菌株 Z-3 的生化特性鉴定结果

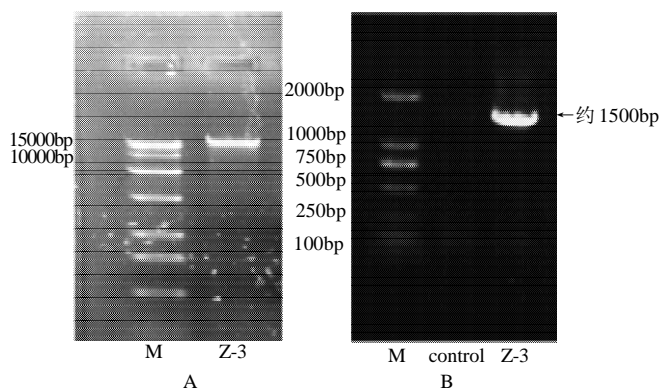
Table 2 Biochemical identification of strain Z-3

管号	底物	反应结果	管号	底物	反应结果
0	控制	—	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-β-D-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	D-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-α-D-甘露糖苷	—	45	D-阿拉伯醇	—
21	甲基-α-D-甘露糖苷	—	46	L-阿拉伯醇	—
22	N-乙酰葡萄糖胺	+	7	葡萄糖酸钾	+
23	苦杏仁苷	—	48	2 酮基葡萄糖酸钾	—
24	ARBULIN	+	49	5 酮基葡萄糖酸钾	—

注: +. 发酵; —. 不发酵。

### 2.3.3 分子生物学鉴定

以细菌基因组为模板,通过 PCR 扩增后 Z-3 的 16S rDNA 片段长度为 1452bp(图3),在 NCBI 数据库中经 Blast 比较后发现该菌株与蜡样芽孢杆菌进化分支的菌株同源性较高。选取同源性相近的菌株构建系统发育树,见图4。



A. 菌株基因组 DNA; M.15kb 核酸分子质量标准; Z-3.菌株 Z-3 的细菌总 DNA。B. 菌株 Z-3 16S rDNA 基因 PCR 扩增产物; M.2000bp 核酸分子质量标准; control.PCR 空白对照; Z-3.菌株 Z-3 的 16S rDNA。

图3 Z-3 菌株基因组 DNA 和 16S rDNA PCR 扩增结果

Fig.3 PCR amplification of total DNA and 16S rDNA gene from strain Z-3

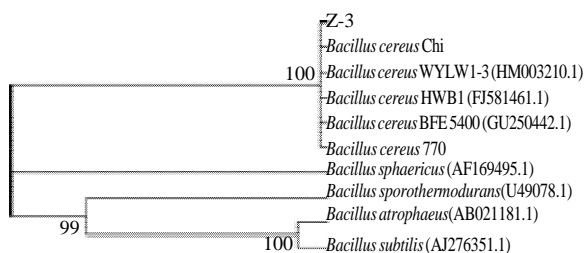


图4 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of strain Z-3 and its relative species

从图4可以看出,菌株 Z-3 的遗传进化距离与蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)同属于一个分支,与已知菌株 *Bacillus cereus* BFE 5400 的同源性达到 100%。结合 Z-3 菌株的形态特征、培养特征及生理生化指标测定结果等表型鉴定结果,初步鉴定 Z-3 为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。

### 2.4 菌株产酶最适底物的确定

鸡毛、头发、羊毛 3 种角蛋白被用作菌株 *Bacillus cereus* Z-3 的发酵底物进行产酶实验,考察不同角蛋白底物对菌株产酶的影响。如图5所示,菌株在用鸡毛做底物时酶活力最高(27.6U/mL),羊毛为底物时也会产生一定的酶活力(13.6U/mL),而头发为底物时酶活力最低(3.2U/mL)。可见菌株 *Bacillus cereus* Z-3 在以鸡毛为底物作为培养基时,酶活力较高。

角蛋白酶是一种诱导酶,在培养基中存在角蛋白时,菌株才会分泌角蛋白酶降解多肽和氨基酸,为菌株生长提

供碳源和氮源<sup>[15]</sup>。对于含角蛋白的底物而言,人发和羊毛含有 $\alpha$ 角蛋白,而鸡毛含有 $\beta$ 角蛋白, $\beta$ 结构的蛋白相对于 $\alpha$ 结构更容易发生降解,因此,比较而言,羊毛和头发不容易被降解,酶活力也相对较低。

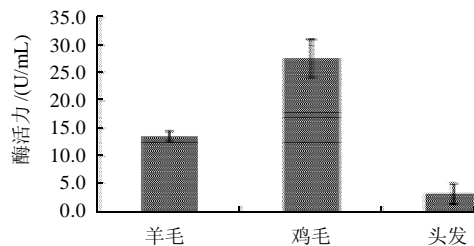


图5 不同角蛋白底物对菌株 *Bacillus cereus* Z-3 产角蛋白酶的影响  
Fig.5 Comparison of degradation activity of keratinase from *Bacillus cereus* Z-3 towards different keratin substrates

### 3 讨 论

以往的研究中,产角蛋白酶微生物的来源主要是土壤、家禽堆积废弃物及消化系统这些与角蛋白直接接触的地方,菌种主要属于地衣芽孢杆菌<sup>[9]</sup>和枯草芽孢杆菌<sup>[16]</sup>。本实验从植物内生菌中筛选到一株产角蛋白酶的菌株,通过观察菌落特征、生理生化实验鉴定及16S rDNA分析,初步鉴定该菌株为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。目前,国内外关于植物内生菌能够产角蛋白酶的研究仅见有El-Bondkly等<sup>[17]</sup>报道了从植物内生菌中筛选到两株能够产角蛋白酶的共生真菌,并通过原生质体融合的方法提高了角蛋白酶活力。而本实验则报道了内生细菌能够产生角蛋白酶。植物中分离到产角蛋白酶菌株表明了产角蛋白酶微生物存在的广泛性,将会进一步丰富筛选产角蛋白酶菌种的来源,在一定程度上显示了植物内生菌资源潜在的应用价值。此外,也表明了在长期的进化过程中微生物与植物宿主之间存在着密切联系。

Wawrzekiewicz等<sup>[13]</sup>首先采用了可溶性角蛋白为底物进行角蛋白酶活力的测定,之后该方法被广泛应用。Nam等<sup>[18]</sup>测定了海岛闪光杆菌AW-1所产角蛋白酶活力,结果显示该菌株在60h时酶活力达到最大值约13U/mL,Jeong等<sup>[16]</sup>测得一株芽孢杆菌在发酵96h时酶活力达到最大值53.3U/mL,而*Bacillus cereus* Z-3在发酵24h后可达到最大酶活力27.6U/mL,酶活力介于前两者之间,但产酶速度更快,今后需进一步优化发酵条件以提高产酶能力。

本实验筛选得到的菌株能够降解未经高压蒸煮的鸡毛,而已经商业化应用的地衣芽孢杆菌PWD-1所产生的角蛋白酶则不能降解未经蒸煮处理的羽毛<sup>[19]</sup>,不用经过蒸煮处理将会简化角蛋白废弃物处理过程并降低能源

消耗,这表明该菌株具有良好的应用前景。

### 参考文献:

- [1] GUPTA R, RAMNANI P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 70: 21-33.
- [2] NICKERSON W J, NOVAL J J, ROBISON R S. Keratinase: I. properties of the enzyme conjugate elaborated by *Streptomyces fradiae*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1963, 77(1): 73-86.
- [3] 蔺春兰. 利用家禽羽毛生产食用浓缩调味液及胱氨酸[J]. 山东食品发酵, 1997(4): 22-25.
- [4] GRAMKOW A W, PERECMANIS S, SOUSA R, et al. Insecticidal activity of two proteases against *Spodoptera frugiperda* larvae infected with recombinant baculoviruses[J]. Virology Journal, 2010, 143(7): 1-10.
- [5] 蔡成岗, 郑晓冬. 角蛋白酶的来源、理化性质与生物工程研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(4): 111-114.
- [6] LIN Xiang, LEE C G, CASALE E S, et al. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(10): 3271-3275.
- [7] GRADISAR H, KERN S, FRIEDRICH J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(2): 196-200.
- [8] 涂国全, 于静. 一株分解羽毛角蛋白的弗氏链霉菌变种的初步鉴定[J]. 江西农业大学学报, 1994, 16(4): 399-403.
- [9] 李小会, 何斌, 李雪影, 等. 地衣芽孢杆菌1411-1羽毛角蛋白固体发酵工艺的优化及角蛋白酶的初步研究[J]. 江苏农业科学, 2009(6): 334-336.
- [10] JEONG E J, RHEE M S, KIM G P, et al. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacterium*, *Bacillus* sp. SH-517[J]. Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2010, 53(1): 43-49.
- [11] 季金殿. 羽毛角蛋白降解菌的分离、鉴定与角蛋白酶基因的克隆、表达[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
- [12] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 385.
- [13] WAWRZKIEWICZ K, LOBARZEWSKI J, WOLSKI T. Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*[J]. J Med Vet Mycol, 1987, 25(4): 261-268.
- [14] 东秀珠, 蔡妙瑛. 常见细菌鉴定手册[M]. 北京: 北京科学出版社, 2001.
- [15] CHENG S W, HU H M, SHEN S W, et al. Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1995, 59(12): 2239-2243.
- [16] JEONG J H, JEON Y D, LEE O M, et al. Characterization of a multi-functional feather-degrading *Bacillus subtilis* isolated from forest soil[J]. Biodegradation, 2010, 21(6): 1029-1040.
- [17] EL-BONDKLY A M, EL-GENDY M. Keratinolytic activity from new recombinant fusant AYA2000, derived from endophytic *Micromonospora* strains[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2010, 56(9): 748-760.
- [18] NAM G W, LEE D W, LEE H S, et al. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe[J]. Arch Microbiol, 2002, 178(6): 538-547.
- [19] WILLIAMS C M, RICHTER C S, MACKENZIE J M, Jr, et al. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(6): 1509-1515.