

云南松毛虫肠道产纤维素酶菌株的 筛选鉴定及酶学性质

孙佑赫,周开艳,熊智

(西南林业大学林学院,云南昆明 650224)

摘要:从云南松毛虫肠道中分离筛选得到28株产纤维素酶的菌株。经生理生化试验观察和16S rRNA序列比对分析,初步鉴定这些产酶菌株属于肠杆菌属、芽孢杆菌属、克雷伯氏杆菌属和约克氏菌属。同时筛选出一株产酶能力较高的菌株DK4,鉴定为蜡状芽孢杆菌,并构建系统发育树。对该菌株产酶特性进行了初步研究,其酶反应的最适温度是35℃,最适pH值7.0,连续发酵70 h左右时纤维素酶活达到最高值19.24 U/mL。

关键词:肠道细菌;云南松毛虫;纤维素酶;鉴定;酶学性质

中图分类号:S432.4 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)增刊-0254-05

Screening and Identification of Cellulase-producing Strains from Intestinal Canal of *Dendrolimu houi* and Research on Cellulase Characterization

SUN You-he, ZHOU Kai-yan, XIONG Zhi

(Faculty of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: Twenty-eight Cellulase-producing strains were isolated from intestinal canal of *Dendrolimu houi*. Based on biochemical, physiological characterization and 16S rRNA sequences blasting, these strains were classified into *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp. and *Yokenella* sp.. Strain DK4 was found as a higher-yield strain for cellulase in these strains. A phylogenetic tree was constructed with the published 16S rRNA sequences of relative bacteria species. In the phylogenetic tree, the strain DK4 was in the branch with the *Bacillus cereus* strain NAV-10 (GU056811.1). The highest cellulase activity of DK4 strain was 19.24 U/mL when grown at 35℃, pH 7.0 for 70 h.

Key words: Intestinal bacteria; *Dendrolimu houi*; Cellulase; Identification; Enzyme characterization

昆虫肠道内栖息着数量庞大的微生物,它们是肠道的重要组成部分,对寄主昆虫产生重要的影响。昆虫肠道系统是伴随取食、消化、排泄等活动而多变的环境^[1],其中寄居的微生物与昆虫的消化吸收^[2]、营养生理活动有着密切关系,它们含有多种酶系统,在维生素合成、脂肪和碳水化合物的吸收与利用等方面起着重要作用,并参与多重营养关系^[3]。并且肠道微生物在抵御外来微生物的侵染与定殖,激起寄主昆虫的免疫系统功能中也起着重要作用^[4]。昆虫肠道内的微生物从形态学或生活史上大致可分为三大类:细菌、真菌和原生动物。细菌的数量较其他2种微生物多,存在于蜚蠊目、等翅

目、半翅目、双翅目、鞘翅目、鳞翅目、膜翅目等多种昆虫肠道内,是肠道微生物的重要组成部分;在飞虱、甲虫、蚜虫等鞘翅目和同翅目昆虫肠道内存在多种酵母菌^[5-6];许多低等白蚁和蟑螂肠道中发现鞭毛虫、纤毛虫和变形虫等一些原生动物。

对于昆虫和肠道微生物的研究,较多侧重于昆虫病原微生物及其应用,而以近年来逐渐渗入的微生物学理论为指导,围绕昆虫营养生理开展的肠道微生物研究较少。本试验以云南地区猖獗取食松针的云南松毛虫为试验材料,研究其肠道内细菌的纤维素酶活性,以期对松毛虫肠道微生物的营养研究提供一些理论依据。

收稿日期:2012-08-15

基金项目:国家“十一五”重大科技支撑计划课题基金项目(No. 2008BAD95B09)

作者简介:孙佑赫(1984-),男,河北保定人,在读硕士研究生,主要从事森林保护学研究。

通讯作者:熊智(1965-),男,重庆人,博士,教授,主要从事微生物研究。

1 材料和方法

1.1 培养基

分离培养基(LB): 蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, NaCl 10 g, 琼脂 16 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 中性。

产纤维素酶筛选培养基: CMC-Na 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 蛋白胨 1 g, 琼脂 16 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 自然。

种子培养基: 同分离培养基, 不加琼脂。

产酶发酵培养基^[7]: CMC-Na 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 自然。

1.2 主要试剂和仪器

羧甲基纤维素钠、3,5-二硝基水杨酸(DNS)、细菌 DNA 提取试剂盒(天根公司)、2 × Power Taq PCR MasterMix(BIOTEKE 公司)、通用引物、限制性内切酶 *Hae* III、*Hind* III 和 *Taq* I (TaKaRa 公司)、100 bp Ladder DNA Marker(博迈德生物), 其余试剂均为分析纯。PCR 仪(Biometra 公司, TGRADIENT), 高速离心机(Eppendorf 公司)、凝胶成像分析仪(Bio-Rad 公司, Gel-Doc XR+); 电泳仪、灭菌锅、超净工作台、摇床、培养箱、紫外分光光度计等均为国产仪器。

1.3 菌株分离

采自云南省文山市 10 年生云南松纯林的健康松毛虫幼虫, 仅用无菌水饲养 24 h, 排尽其肠道食物。将虫体于 0.1% 升汞溶液中浸泡 5 min 后, 用无菌水清洗虫体, 然后在蜡盘中进行无菌解剖。取其肠道, 在无菌研钵中研磨, 将研磨液用无菌水稀释至 10^{-8} 。分别取原液、 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 和 10^{-8} 这 5 个稀释度的混悬液各 0.2 mL, 在 LB 培养基上进行涂布分离, 各稀释度重复 3 次, 于 37℃ 培养箱中黑暗培养 48 h。挑取表征形态各异的单菌落划线纯化, 镜检至纯菌株后斜面 4℃ 保存。

1.4 产纤维素酶菌株筛选

将纯化菌株使用点接法接种于筛选培养基, 37℃ 培养 48 h。采用刚果红染色鉴定产酶能力, 5 mL 0.1% 刚果红溶液倒入筛选培养基平板中, 染色 30 min 后倒出染料, 加入 5 mL 1 mol/L 的 NaCl 溶液脱色 20 min, 观察菌落周围清晰、未染色的区域, 测量透明圈直径 *D* 和菌落直径 *d*, 记录 *D/d*, 挑选 *D/d* 大于 3 的作为初筛菌株。

菌株复筛, 初筛菌株活化后接种于 30/250 mL 种子培养基中, 37℃、180 r/min 摇床培养过夜。以 2% 的接种量转接于 30/250 mL 产酶培养基中, 37℃、180 r/min 培养 2~3 d, 10 000 r/min 离心 10 min, 上

清液作为粗酶液测定酶活, 筛选产酶活力最高的菌株。

1.5 酶活力测定及产酶条件分析

酶活力测定方法参照文献[8]稍加修改。0.5 mL 粗酶液, 加入 1.5 mL 1% 羧甲基纤维素钠溶液, 50℃ 恒温水浴反应 30 min, 加入 1 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液终止反应。后加入 2 mL DNS 于沸水浴中反应 5 min, 冷却终止反应后在 540 nm 下测其吸光值, 并对照标准曲线测算酶活力。在上述反应条件下, 酶活力按照国际单位规定定义为: 1 min 催化纤维素水解生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活力单位 U。通过连续液体发酵, 分析菌株产纤维素酶条件, 得到酶活最适温度和 pH 值。

1.6 产酶菌株鉴定

1.6.1 革兰氏染色和生理生化特征 产酶菌株的革兰氏染色和生理生化分析参考文献[9-11]进行。

1.6.2 16S rRNA 序列分析 DNA 用试剂盒提取产酶菌株基因组 DNA, 作为反应模板进行 PCR 基因扩增。体系: 2 × Power Taq PCR MasterMix 25 μL, 通用引物(正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTACGA CTT-3') 各 2 μL, DNA 模板 1 μL, 无菌水补足 50 μL; 条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 56℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 3 min, 30 个循环; 72℃ 最终延伸 5 min; 最后经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像分析仪观察 PCR 扩增产物并保存图像。

用 *Hae* III、*Hind* III 和 *Taq* I 3 种限制性内切酶对 10 μL PCR 扩增产物进行酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像系统进行拍照和记录。使用软件 TotalLabTL100 对酶切的 DNA 片段进行分析, 用 MVSP 软件的平均连锁聚类法(UPGMA) 构建聚类树^[12]。

根据聚类结果, 选择典型代表菌株, 各取 50 μL PCR 扩增产物, 送华大基因公司测序。得到测序结果后登陆 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对分析^[13], 寻找最相似的已知分类地位的序列。使用 MEGA4.1 软件的 Neighbor-Joining 法^[14] 生成系统发育树, 以确定菌株的分类地位。将序列提交到 GenBank 数据库中, 获得序列登录号。

2 结果与分析

2.1 产酶菌株的筛选

从健康的云南松毛虫幼虫肠道内分离得到 60 株菌株, 革兰氏染色表明, 革兰氏阳性菌 23 株, 革兰

氏阴性菌 37 株。其中产纤维素酶菌株有 28 株,占 46.67% (图 1)。比较产酶菌株的 D/d 值(表 1)筛选 15 株菌进行复筛。酶活力测定结果:菌株 DK4 的酶活最高。

2.2 菌株 DK4 产酶能力分析

2.2.1 酶反应最适温度 在酶反应体系中改变温度条件,测定酶活力,以最高值为 100%,相对酶活力对温度作图。由图 2 可知,菌株 DK4 产纤维素酶在 30~50℃ 下,相对酶活力较高,85% 以上。其中最适反应温度是 35℃。

表 1 菌株的透明圈直径与菌落直径的比值

Tab.1 Ratios of transparent circle diameter to colony diameter (D/d)

菌株 Strain	D/d	菌株 Strain	D/d	菌株 Strain	D/d	菌株 Strain	D/d
DK1	1.67 ± 0.15	DK11	2.33 ± 0.10	DK32	3.67 ± 0.13	DK47	2.80 ± 0.18
DK2	2.33 ± 0.08	DK14	2.75 ± 0.10	DK33	3.35 ± 0.11	DK48	2.35 ± 0.12
DK4	3.11 ± 0.12	DK15	4.50 ± 0.05	DK36	2.73 ± 0.08	DK49	3.75 ± 0.16
DK6	2.43 ± 0.07	DK20	3.67 ± 0.08	DK40	2.73 ± 0.06	DK55	3.50 ± 0.08
DK7	1.35 ± 0.11	DK23	3.67 ± 0.13	DK41	4.50 ± 0.10	DK57	5.33 ± 0.13
DK9	3.67 ± 0.13	DK27	4.25 ± 0.09	DK43	4.67 ± 0.04	DK58	2.67 ± 0.15
DK10	2.50 ± 0.12	DK31	4.25 ± 0.12	DK46	3.33 ± 0.15	DK59	2.67 ± 0.11

2.2.2 酶反应最适 pH 值 改变酶反应体系的 pH 条件,测定酶活力,以最高值为 100%,相对酶活力对 pH 作图。由图 3 可知,菌株 DK4 所产纤维素酶在 pH 值 6.0~8.0 范围内,相对酶活力较高,80% 以上。最适反应 pH 值 7.0。

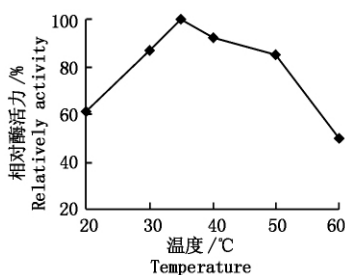


图 2 温度对酶活力的影响

Fig.2 Effect of temperature on the activity of cellulase

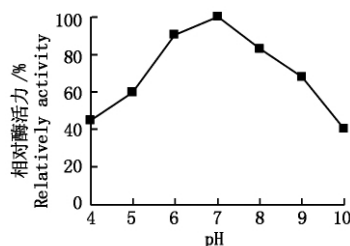


图 3 pH 对酶活力的影响

Fig.3 Effect of pH on the activity of cellulase

2.2.3 不同发酵时间酶活力分析 菌株 DK4 于 35℃、pH 值 7.0 条件下,180 r/min 摇床连续培养,间隔一段时间测定酶活力。以时间为横坐标,酶活

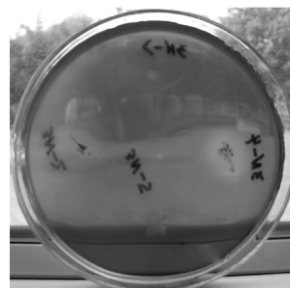


图 1 产纤维素酶菌株

Fig.1 Cellulase-producing strains

力为纵坐标作图,得出菌株 DK4 的产酶活力随时间变化的曲线(图 4)。由图 4 可知,随着培养时间的推进,酶活力呈先上升后下降的走势。开始增长缓慢,培养 36 h 左右时酶活力以指数形式快速增长,并在 70 h 左右时出现产酶高峰,此时酶活力达到 19.24 U/mL,90 h 以后酶活力迅速下降。

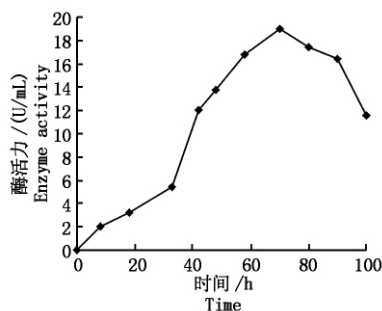


图 4 菌株 DK4 产酶活力变化曲线

Fig.4 Cellulase-producing activity of strain DK4

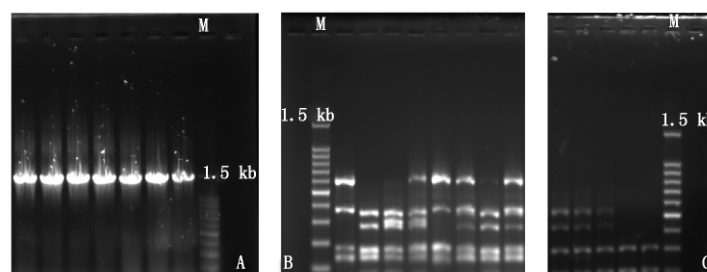
2.3 产酶菌株的鉴定

利用 PCR 技术,以基因组 DNA 为模板,扩增出菌株的 16S rRNA,得到重复性好、稳定清晰的特异性扩增片段,长度约 1.5 kb,经 3 种限制性内切酶酶切后,得到谱带丰富的酶切图谱(图 5)。UPGMA 聚类分析得到关于这 28 株菌株的聚类树(图 6),由聚类树得出这 28 株菌株在 80% 的相似水平上聚为 7 个类群。结合表 1 和图 3 选择这 7 类中的代表菌株(DK2、DK4、DK6、DK14、DK20、DK41、DK47)测序,通过和最相似序列比对分析,并结合生理生化指标确定菌株的分类地位(表 2)。分类结果显示:云南

松毛虫幼虫肠道产纤维素酶菌株基本属于四类: 类群 I 属约克氏菌属 (*Yokenella* sp.) , 类群 II 属克雷伯氏杆菌属 (*Klebsiella* sp.) , 类群 III、IV、V 属芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) , 类群 IV、VII 属肠杆菌属 (*Enterobacter* sp.) , 芽孢杆菌是优势种属, 占产酶细菌的 46.43%。

产酶能力较强的菌株 DK4 为革兰氏阳性菌, 氧化酶反应阳性, 接触酶反应阳性, 厌氧条件下不生

长, 能利用多种碳源生长, 这些特征与芽孢杆菌属细菌较为相似。通过测序, 菌株 DK4 的 16S rRNA 序列长度 1 025 bp, 以 16S rRNA 序列同源性为基础构建的系统发育树 (图 7), 显示 DK4 的 16S rRNA 序列与 *Bacillus cereus* strain NAV-10 (GU056811.1) 相似性达到 99%。所以结合生理生化特征和比对分析, 初步确定菌株 DK4 是蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) , GenBank 中的序列登录号为 JQ271797。



M. 100 bp Ladder DNA Marker

图 5 部分菌株 16S rRNA PCR 扩展图谱 (A) 和部分酶切图谱 (B、C)

Fig. 5 Partial PCR production (A) and partial maps of enzyme digestion (B, C)

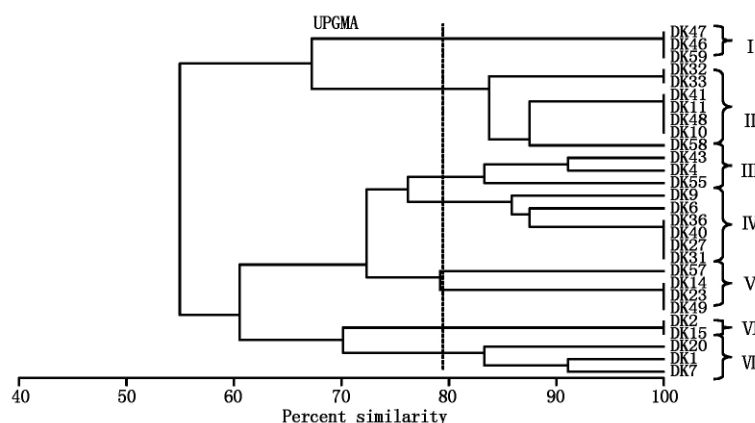


图 6 产酶菌株的聚类树状图

Fig. 6 Clustering tree of cellulose-producing strains

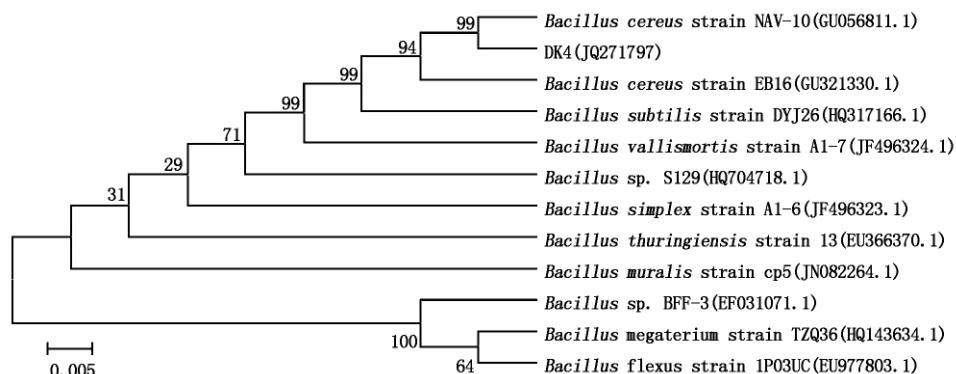


图 7 菌株 DK4 的 16S rRNA 基因序列系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequence of strain DK4

表 2 代表菌株的分类鉴定结果

Tab. 2 The results of classification about typical strains

菌株 Strain	登录号 Accession number	最相似种属(相似度) Most similar species (Similarity)
DK2	JQ271814	<i>Enterobacter mori</i> (98%)
DK4	JQ271797	<i>Bacillus cereus</i> (99%)
DK6	JQ271796	<i>Bacillus aryabhattai</i> (97%)
DK14	JQ271809	<i>Bacillus anthracis</i> (99%)
DK20	JQ271799	<i>Enterobacter asburia</i> (96%)
DK41	JQ271807	<i>Klebsiella oxytoca</i> (95%)
DK47	JQ271806	<i>Yokenella</i> sp. (100%)

3 讨论

本试验从健康云南松毛虫幼虫肠道内分离并获得 60 株细菌的纯培养,革兰氏阳性菌 23 株,革兰氏阴性菌 37 株,在肠道微生态环境中生存的细菌大多是不可培养的^[15],所以分离到的只是部分细菌。产酶菌株广泛存在于昆虫肠道内,产酶类别和产酶能力随寄主种类和取食习性的不同而各异^[16]。松毛虫主要取食松针,而且食量很大,松针中纤维素的含量很高,所以松毛虫消化松针获取营养时需要大量的纤维素酶。而本试验分离到的肠道细菌中产纤维素酶菌株有 28 株,占分离总数的 46.67%,比重较大,并且这些产酶菌株很可能为消化过程提供了所需的大量纤维素酶,进而参与松毛虫的消化吸收生命活动。现阶段试验筛选了产纤维素酶菌株,后续还要进行其他种类酶的产酶菌株的筛选鉴定,以期进一步研究肠道微生物对松毛虫的营养生理作用。

对产酶菌株聚类 and 序列比对分析结果显示,28 株菌株属于芽孢杆菌属、肠杆菌属、克雷伯氏杆菌属和约克氏菌属。本试验获得的一株产纤维素酶活性较高的菌株 DK4,经鉴定为蜡状芽孢杆菌^[17],其产酶最适反应温度是 35℃,最适反应 pH 值 7.0,并且在连续发酵 70 h 左右时所产纤维素酶活力最强,达到 19.24 U/mL。与已报道的高产酶菌株的酶活力还有一定的差距^[18],分析原因可能是未对粗酶液进行纯化便进行了测定,影响了测定结果。可以通过优化培养条件,或诱变育种等基因工程手段进行处理以获得高产优质菌株。

参考文献:

- [1] 相辉,黄勇平. 肠道微生物与昆虫的共生关系[J]. 昆虫知识, 2008, 45(5): 687-693.
- [2] Dillon R J, Dillon V W. The gut bacteria of insects: non-pathogenic interactions[J]. Annual Review of Entomology, 2004, 49: 71-92.
- [3] Tanada Y, Kaya H K. Insect Pathology[M]. New York: Academic Press, 1993: 12-51.

- [4] Anselme C, Vallier A, Balmand S, et al. Identification of the weevil immune genes and their expression in the bacteriome tissue[J]. Applied and Environment Microbiology, 2006, 72(10): 6766-6772.
- [5] Noda H, Kodama K. Phylogenetic position of yeast-like endosymbionts of anobiid beetles[J]. Applied and Environment Microbiology, 1996, 62(1): 162-167.
- [6] 严健, 邓可京, 曹清玉, 等. 灰飞虱类酵母型共生菌 18SrDNA 序列变异及系统发生[J]. 遗传学报, 2000, 27(3): 219-226.
- [7] 齐云, 陈飞, 袁月祥, 等. 一株能分解纤维素的高温耐碱放线菌[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(3): 322-325.
- [8] Gao J, Weng H, Zhu D. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(16): 7623-7629.
- [9] 周德庆. 微生物实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 65-70.
- [10] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [11] 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.
- [12] 董鑫, 刘晓云, 张斌, 等. 云南省田菁根瘤菌及根瘤内生菌遗传多样性研究[J]. 热带作物学报, 2010, 31(1): 88-92.
- [13] Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 215: 403-410.
- [14] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 4876-4882.
- [15] 黄云, 詹先进, 蓝家祥, 等. 昆虫肠道微生物的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(1): 2888-2890.
- [16] 高权新, 吴天星, 王进波. 肠道微生物与寄主的共生关系研究进展[J]. 动物营养学报, 2010, 22(3): 519-526.
- [17] 钱林, 郑巧利, 付瑾, 等. 一株高效纤维素降解菌株的分离鉴定及其酶学性质[J]. 微生物学通报, 2010, 37(4): 524-528.
- [18] Jang H D, Chen K S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-4[J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2003, 19: 263-268.