

一株分解鸡毛角蛋白的放线菌

丁正民 冯缵平 刘达先 马永辉*

(上海师范大学生物系, 上海 200234)

焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

自土壤中分离到放线菌 SS-1 菌株。该菌株能分解鸡毛角蛋白; 生长最适温度为 35 °C, 最适 pH7.5; 分解人发及羊毛的活性不显著。

关键词 放线菌; 鸡毛; 角蛋白; 角蛋白酶

鸡毛是有待开发利用的资源, 一些地区至今仍视之为废弃物。我们筛选到一株能分解鸡毛角蛋白的放线菌, 其角蛋白酶活力较强, 在开发利用鸡毛等方面有进一步研究的价值。

材料与 方法

(一) 菌种分离及生长条件测定

1. 菌种分离: 自上海市松江含鸡毛堆肥中采土样, 无菌水中振荡后逐级稀释, 涂布于鸡毛粉琼脂平板上, 35 °C 下培养 1—2 周, 观察结果并将所得菌种分离纯化。

鸡毛粉琼脂培养基配方: 鸡毛粉 0.6g, 尿素 0.1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g, K_2HPO_4 0.1g, 琼脂 0.8g, 蒸馏水 100 ml, 自然 pH, 1 kg/cm² 20 分钟灭菌。鸡毛粉的制备: 白鸡毛 (下同) 洗净, 蒸馏水煮沸两次并浸泡过夜, 烘干, 二甲苯脱脂后风干并粉碎。

2. 最适生长温度测定: 取高氏 1 号斜面上的 3 日龄产孢培养物一环, 以无菌水逐级稀释至 10^{-29} , 取孢子悬液 1 ml 至皿底, 加 10ml 高氏 1 号培养基制成平板后分 6 组 (每组 5 皿), 置于不同温度 (28、32、35、37、40、45 °C) 的恒温箱内培养 72 小时后统计产孢菌落数。该试验不同温度重复 2—5 次。

3. 最适生长 pH 的测定: 培养基内加入 NaOH 或 HCl, 用 87-3 型酸度计 (上海华侨仪表厂) 测定其 pH。共分 8 组, 即 pH5、5.5、6、6.5、7、7.5、8 和 9。平板配方及接种材料、方法同上。每组 5 皿, 重复 4 次。35 °C 下培养 72 小时后统计产孢菌落数。

(二) 鸡毛分解的形态观察

将 35 °C 下培养 3 天的斜面培养物用无菌生理盐水洗下孢子, 每瓶鸡毛发酵培养液接孢子悬液 1ml (约含孢子 1.8×10^{17} 个), 对照组不接种, 35 °C 下旋转式摇床上振荡 (80r/min) 培养 1—9 天, 观察结果。

本文于 1991 年 11 月 7 日收到。

* 现工作单位为上海大江复合氨基酸厂; 学生李岚、杨芸、姚雪玮、吴炜红等参加此项工作; 汪淼、黄志巍同志协助摄影, 特此致谢。

鸡毛发酵培养液配方: 鸡毛 0.3g, 尿素 0.1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g, K_2HPO_4 0.1g, 蒸馏水 100ml, 自然 pH(7.2)。250ml 锥形瓶内装量 100ml, 1 kg/cm^2 20 分钟灭菌。

(三) 鸡毛角蛋白水解测定

上述振荡培养的鸡毛发酵液每隔 48 小时取样, 新华 1 号滤纸过滤, Folin 酚法测定滤液内酪氨酸含量。未经接种的对照组的取样、测定方法同上。

(四) 发酵液内角蛋白酶活力测定

100 ml 锥形瓶内各加上上述发酵 1—5 天的培养物滤液 50 ml 及未经发酵的鸡毛 0.2g, 35°C 下 80r/min 振荡 24 小时后, 用 Folin 法测定溶液内酪氨酸量。对照组所加发酵液滤液先经 100°C 30 分钟沸水浴预处理, 测得的酪氨酸毫克数作为本底于处理组数据中扣除。

(五) 菌对人发和羊毛的分解

上述培养液内的鸡毛被人发或羊毛 (等重, 先经甲醇-氯仿处理过夜) 所取代。接种 1 ml 孢子悬浮液 (内含孢子 1.8×10^{17} 个), 35°C 下 80 r/min 振荡培养 1—6 天后测定其滤液内酪氨酸的含量。

结 果

(一) 菌株形态

1. 该菌株于鸡毛粉琼脂平板上培养一周后可见菌落的周围有透明圈, 两周后透明圈更大更显著 (图 1)。



图 1 鸡毛粉琼脂平板上的菌落

Fig. 1 The colonies on agar plate mixed with fowl feather powder

2. 经分离、纯化后, 该菌株编号为 SS-1。培养结果表明, 该菌株好气, 菌丝具有分枝, 在高氏 1 号培养基上菌丝发育良好, 气丝顶端盘曲呈螺旋状并出现假孢囊, 基质菌丝紫红, 可溶性色素呈淡紫灰 (图 2)。

(二) 最适生长温度

培养 72 小时后, 35°C 组平板的产孢菌落数最大 (71.88), 与 37°C 组 (产孢菌落数为 65.32) 相比, $t=3.86$, $t_{0.001}^{24}=3.745$, $t > t_{0.001}^{24}$, 差异极显著 (图 3)。

(三) 最适生长 pH

35°C 下培养 72 小时后, pH6 组平板产孢菌落数达到 1; pH7.5 组的产孢菌落数最大 (75.4), 与 pH7 组 (35.7) 比, $t=21.58$, $t_{0.001}=3.883$, $t > t_{0.001}$, 差异极显著; 与 pH8 组 (平均菌落数 38.1) 比, $t=21.21$, $t_{0.001}=3.883$, 差异也极显著 (图 4)。

(四) 发酵液内鸡毛的分解

1. 摇瓶发酵 1 天后, 显微观察可见有的羽小枝已脱落, 并可见羽干及羽枝外表的鳞片。发酵 3 天后鸡毛明显溶解, 羽枝已基本不带有羽小枝, 并可见羽枝上有大量菌丝体。发酵 5 天后不再见成形的鸡毛, 显微镜下只见一条条游离的羽干, 这时培养物内的菌丝体出现了空泡 (图 5)。

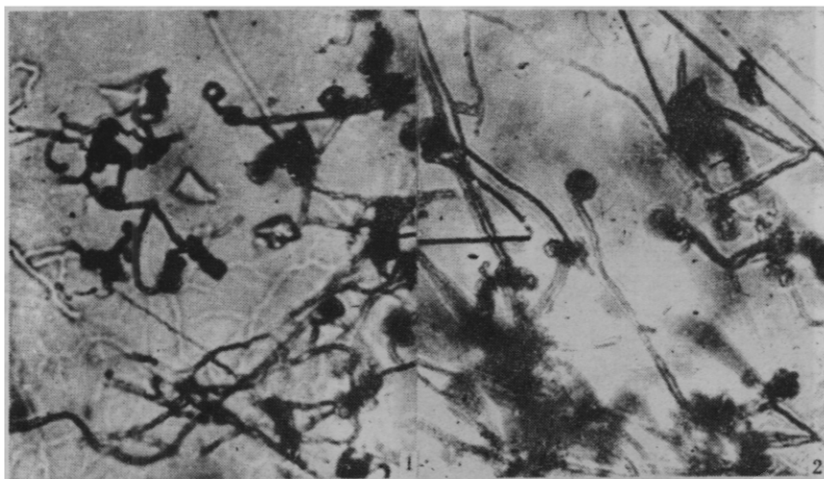


图 2 放线菌 SS-1 菌株的菌丝体

1. 气丝顶端呈螺旋状；2. 气丝顶端的假胞囊 (1680 \times)

Fig. 2 Mycelia of SS-1

1. Tip of aerial mycelia in a spiral form;
2. The pseudo-cytoplasts at the tip aerial mycelia

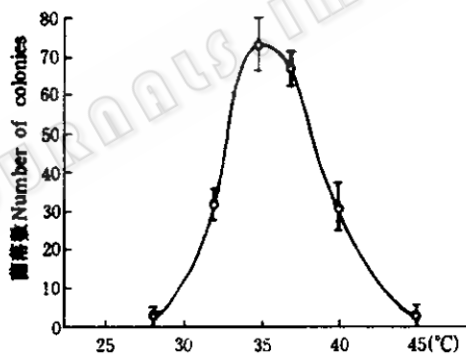


图 3 温度对放线菌 SS-1 菌株生长的影响

Fig. 3 The effect of the temperature on the growth of SS-1

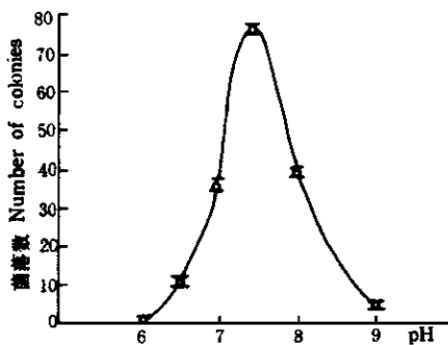


图 4 pH 对放线菌 SS-1 菌株生长的影响

Fig. 4 The effect of pH on the growth of SS-1

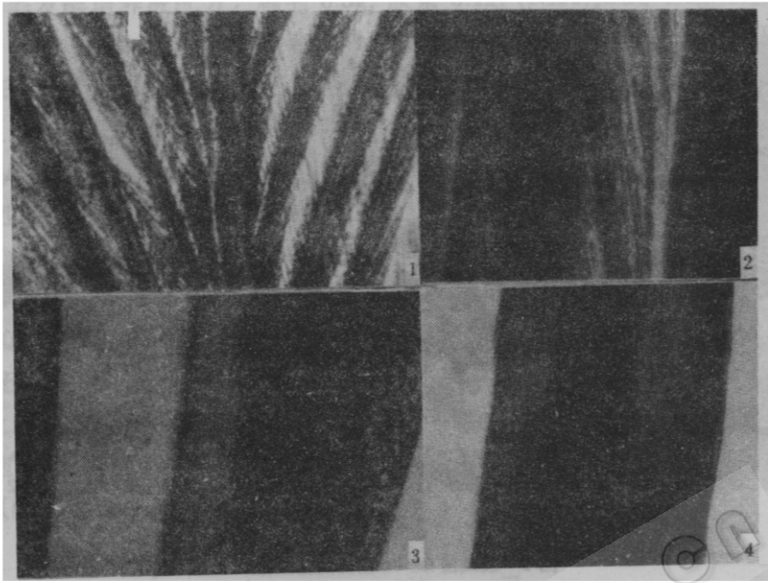


图5 发酵液内的鸡毛

1. 对照, 羽毛结构完整; 2. 发酵1天;
3. 发酵3天; 4. 发酵5天(400×)

Fig. 5 The fowl feather in fermentation liquor

1. The whole feather; 2. To ferment for a day;
3. To ferment for 3 days; 4. To ferment for 5 days.

2. Folin 酚法测定结果显示, 鸡毛发酵液内酪氨酸的含量6天内持续地上升, 上升幅度以第2—3天的为最大。发酵至第6天, 酪氨酸的增长显然已接近于终了(图6,7)。

(五) 对人发和羊毛的作用

振荡培养6天后用Folin 酚法测定的结果表明, 该菌对人发及羊毛角蛋白的水解作用不显著(表1)。

表1 放线菌 SS-1 菌株对不同角蛋白的水解作用(酪氨酸,mg/ml)

Table 1 Hydrolysis of SS-1 on the different kinds of keratin (Tyrosine, mg/ml)

鸡毛 Fowl feather		羊毛 Wool		人发 Human hair	
对照 Contrast	处理 Treatment	对照 Contrast	处理 Treatment	对照 Contrast	处理 Treatment
0.0249	0.119	0.0213	0.0230	0.0211	0.0228
0.0266	0.118	0.0229	0.0260	0.0255	0.0263
0.0238	0.119	0.0238	0.0230	0.0225	0.0240
0.0251	0.092	0.0207	0.0234	0.0211	0.0241
$t=13.08 > t_{0.001}^3$ 极显著 very obvious		$t=2.10 < t_{0.1}^3$ 不显著 not obvious		$t=1.20 < t_{0.1}^3$ 不显著 not obvious	

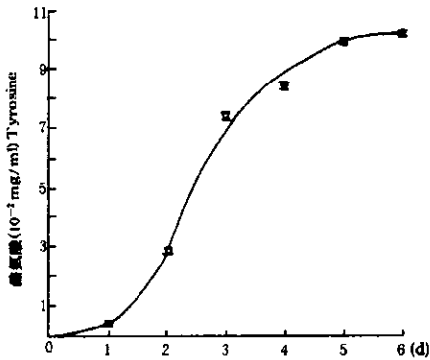


图 6 鸡毛发酵液内的酪氨酸

Fig. 6 Tyrosine in the fermentation liquor of fowl feather

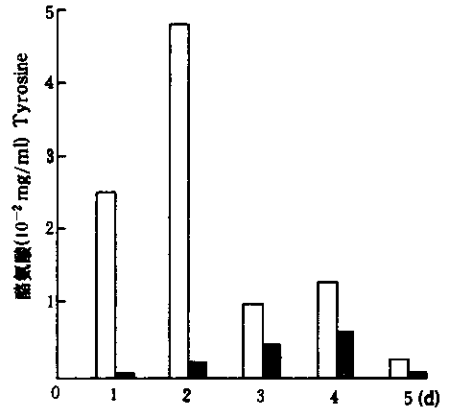
讨 论

1. 早在 1899 年 Ward 就报道了真菌马爪甲团囊菌 (*Onygena equina*) 能分解角蛋白, 1963 年 Nickerson 等将具有该活性的酶称为角蛋白酶 (Keratinase) [1]。现知角蛋白酶不仅有助于伤口去痂和上皮再生 [2], 皮革脱毛鞣制 [3], 配制润肤露、浴皂、洗发膏和脱毛膏等美容品 [4], 且能使禽羽和猪毛等转化为富含营养的饲料 [5], 故国际上研究角蛋白酶较活跃。我国禽羽、畜毛资源极为丰富, 但目前利用率相当低, 研究和开发微生物产生的角蛋白酶对我国饲料加工和环境保护均有着积极的意义。

2. 能产生角蛋白酶的微生物现已知逾 30 种 [3,6], 其中包括约 10 种链霉菌 (*Streptomyces*)。放线菌 SS-1 的形态有异于链霉菌, 按其能形成假孢囊等特点, 有可能属于马杜拉放线菌 (*Actinomadura*) [7]。菌种正在进一步鉴定。

3. 许多微生物产生的角蛋白酶已被分离纯化并研究了它们的性质, 一些角蛋白酶被认为是丝氨酸蛋白酶或二硫化物裂解酶 [1,8,9]。其中除假丝酵母 (*Candida albicans*) 所产角蛋白酶的最适 pH 为 4.0 外, 其它角蛋白酶的最适 pH 多半大于 7.5 甚至高达 10 [5,10,11]。酶活性最适温度差异也大, 既有 30 °C、38 °C 的 [12,13], 也有 60 °C 的 [5]。在我们的实验中, 鸡毛发酵培养基的原始 pH 和培养温度系借鉴上述平板产孢菌落的生长, SS-1 菌株分解鸡毛角蛋白的最适 pH 和最适温度等还有待进一步研究。

4. 同其它一些类群的微生物一样, 放线菌通常在对数生长期分泌其蛋白酶 [14]。但是如前所述, SS-1 菌株培养物滤液内酶活以第 4 天的为最高, 这时显然早已过对数期。另一方面, Wawrzekiewicz 等藉含有鸡毛角蛋白的琼脂扩散法发现, 鸡发癣菌 (*Trichophyton gallinae*) 菌丝体匀浆与培养物滤液内角蛋白酶活力有显著差异, 认为鸡发癣菌的角蛋白酶是胞内酶 [3]。放线菌 SS-1 菌株的角蛋白酶是不是胞内酶目前还不清楚。

图 7 发酵物与发酵物滤液内角蛋白酶活力比较
■ 滤液内角蛋白酶活力

□ 24 小时内发酵物内酪氨酸含量的递增

图中 1 指发酵 24 小时后滤液内酶活力, 或发酵第 24—48 小时发酵物内酪氨酸递增量; 余类推

Fig. 7 The comparison of keratinase activity between fermentation substance and its filtrate

■ Keratinase activity in filtrate;

□ The gradual increase of the tyrosine contents in fermentation substance in 24 hours.

No.1 refers to the enzyme activity in filtrate after 24 hours of fermentation; or the gradual increase of tyrosine contents in the fermentation substance in 24—48 hours; and so on.

5. 据报道, 磷酸、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、巯基乙醇和维生素 C 等能加强角蛋白酶的活性, Zn^{2+} 对酶活影响不大, 而 Ba^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、EDTA、碘乙酰胺、葡萄糖、N-乙基马来酰胺等则能强烈抑制酶活^[15]; 也有报道 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 是该酶抑制剂的^[16]。上述因子对 SS-1 菌株角蛋白酶的影响也值得研究。

参 考 文 献

- [1] Nickerson, W. J. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **77**:87-99, 1963.
 [2] Yu, R. J. et al.: *J. Invest. Dermatol.*, **52**(4):372, 1969.
 [3] Wawrzkiwicz, K. et al.: *J. Med. Vet. Mycol.*, **25**(4):261-268, 1987.
 [4] Page, W. T. et al.: *J. Bacteriol.*, **117**(2):422-431, 1974.
 [5] Meevootisom, V. et al.: *Sabouraudia*, **17**(2):91-106, 1979.
 [6] Masahiko, T. et al.: Jpn. Patent 87164611, 1987.
 [7] 阮继生等: 放线菌研究及应用, 科学出版社, 北京, 1990 年。
 [8] Mukhopadhyay, R. P. et al.: *Indian. J. Exp. Biol.*, **28**(6):275-577, 1990.
 [9] Hibino, T.: *Anal. Biochem.*, **147**(2):342-352, 1985.
 [10] Cino, P. M. et al.: *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, **75**:88, 1975.
 [11] Matsuda, K.: CA. Vol. **101**, Ref. No. 19534c, 1984.
 [12] Nakazawa, K.: CA. Vol. **102**, Ref. No. 92540b, 1985.
 [13] Makoto, N. et al.: *J. Invest. Dermatol.*, **83**(1):32-36, 1984.
 [14] Peczymaska-czoch, W. et al.: *Actinomycetes in Biotechnology*, (ed. Goodfellow, M. et al.), pp. 246-250, Academic Press, London, 1988.
 [15] Barabanova, V. V. et al.: CA. Vol. **103**, Ref. No. 138970t, 1985.
 [16] Blank, F. et al.: US Patent 3674645, 1972.

AN ISOLATE OF ACTINOMYCETE CAPABLE OF UTILIZING FOWL FEATHER KERATIN

Ding Zhengmin Feng Zanping Liu Daxian Ma Yonghui

(Department of Biology, Shanghai Normal University, Shanghai 200234)

Jiao Ruishen

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Shanghai 200032)

An isolate of actinomycete SS-1 capable of utilizing fowl feather keratin was isolated by enrichment culture. Its optimum temperature of growth was found to be 35 °C, and optimum pH 7.5. This isolate had no noticeable effect on human hair and wool.

Key words Actinomycete; Fowl feather; Keratin; Keratinase