微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(4):537-541; 4 April 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

角蛋白酶生产菌株的分离筛选与鉴定

谢菲[2],李从虎[2],郑佳[2],陈欣[2],黄钧[2],周荣清[1,2*]
([1] 四川大学制革清洁技术国家工程实验室,成都 610065)
([2] 四川大学轻纺与食品学院,成都 610065)

摘要:【目的】分离筛选具有高效脱毛能力的野生角蛋白酶生产菌株,开发无硫制革生物脱毛剂。【方法】以贮备原料皮的特定环境中的污水样品为菌株源、在含诱导物脱脂羊毛粉的培养基中的富集、筛选与评估其发酵液脱毛能力的多相筛选方法分离选育高产角蛋白酶野生菌株。通过形态学、生理生化特征,Biolog 全自动分析以及 16S rDNA 基因序列分析等方法多尺度地鉴定目的菌株。【结果】定向筛选得到了一株高活力,无硫脱毛效率高的菌株。鉴定结果表明,该菌株为地衣芽孢杆菌属,故命名为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)X-47。【结论】应用多相定位选育技术筛选出的菌株地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)X-47,产角蛋白酶活力高,脱毛效率高,对胶原作用力弱的特点,具有开发无硫脱毛生物助剂的潜力。

关键词: 角蛋白酶; 脱毛; 筛选; 鉴定
中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0537-05

角蛋白是高等动物的毛发(羽毛)、表皮及指甲等附件的结构组成部分,难以被胰酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶以及市售的微生物蛋白酶制剂降解。在制革工业的脱毛工序中,常常是在碱性的环境中,通过添加适量的硫化碱,水解角蛋白的二硫键、改变其结构而达到有效的脱毛。该过程中所产生的硫化氢及角蛋白水解物是制革过程的主要污染源。在过去的 20 年间,虽然采用碱性或中性蛋白酶代替了部分硫化碱[1-2],但是所产生的废液依然是制革过程的主要污染物之一。同时蛋白酶可能水解胶原蛋白,导致粒面损伤、松面[3-4]等,使成品革质量下降,降低经济效益。因此,寻求更为高效、专一的生物脱毛剂是实现制革清洁技术广泛应用的重要途径。

角蛋白酶(EC3.4.21/24/99.11)是一类由真菌[5],放线菌[6]和细菌[7]等微生物分泌的特殊蛋白酶,这类蛋白酶在环保、饲料、医药、制革等诸多领域均有广泛的应用前景[8-9]。目前,应用发酵技术生产角蛋白酶的研究已成蛋白酶研究的热门方向之一[10],具有高效脱毛效率的角蛋白酶微生物菌株的筛选[11-12]也颇受关注。本文报道了应用定向选育技术筛选高活力产角蛋白酶野生菌株,并对其在制革应用中的可行性进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:琼脂糖:AMRESCO;Wide Range DNA Marker(500-15000,TaKaRa);Bacterial DNA Kit:OMEGA;其他试剂均为分析纯。全自动微生物鉴定仪:Biolog 全自动微生物鉴定仪(Biolog 公司,美国);水平槽电泳仪:DYC P-31BN(六一仪器厂,北京);凝胶成像仪:Gel Doc XR(Bio-Rad 公司,美国);Spectrumlab22PC 可见分光光度计(Perkin

基金项目:国家科技支撑计划(2006BAC02A097)
* 通信作者。Tel: +86-28-85406149;Fax: +86-28-85405237;E-mail: rqzhou@163.com
作者简介:谢菲(1986-),女,山西临汾人,硕士研究生,研究方向为现代发酵技术及酶工程。E-mail: 601498691@qq.com
收稿日期:2009-10-10;**修回日期:**2009-12-02

Elmer™,美国);高速冷冻离心机:TGL16M(湘南离心机,长沙);超净工作台:SW-CJ-2FD 型(苏州净化设备有限公司,苏州);电热恒温培养箱:DHP-9162(上海一恒实验仪器有限公司,上海);恒温振动培养器:QYC-2112 型(上海福玛实验设备有限公司,上海);超级水浴恒温锅:CS501(上海浦东荣科学仪器有限公司,上海);光学显微镜:CX31RTSF(Olympas 日本)。

1.1.2 培养基:① 分离培养基:添加酪素水解物营养琼脂培养基;② 种子培养基:葡萄糖、天冬氨酸培养基;③ 发酵培养基:添加 0.2% 脱脂羊毛粉的改良高氏培养基,即以脱脂羊毛粉作为培养基中有机氮源;④ 保藏培养基:营养培养基;⑤LB 培养基。

1.2 菌种定向分离与筛选

从本地制革企业牛皮原料贮备场周围的污水中取样品混合,于改良高氏培养基中,37 ± 1℃,180 r/min振荡培养 24 h,连续富集 5 – 7 次,适当稀释后涂布于分离培养基上,37 ± 1℃培养 24 h 后,根据透明圈直径(CZ)与菌落直径(CS)的比值,挑选菌落连续划线分离 3 次,镜检为单菌落后,4℃保藏备用。挑取定向筛选所得菌种适量到装有 50 mL 灭菌种子培养基的 250 mL 三角瓶中,32 ± 1℃,180 r/min培养 12 h 后,接种到装有 45 mL 灭菌发酵培养基的250 mL 三角瓶中,相同条件,培养 72 h,分析离心上清液活力。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 菌体形态观察,生理生化实验及 Biolog 分析鉴定:选取复筛所获的高活力菌株,参考文献[13]方法观察菌体形态并进行生理生化实验,同时,根据 Biolog 全自动鉴定仪说明书的规定程序,采用革兰氏染色阳性的细菌鉴定板对目的菌株进行鉴定。

1.3.2 菌株 16SrDNA 序列测定:细菌总 DNA 提取按 Bacterial DNA Kit 试剂盒操作步骤进行,并使用 1% 琼脂糖电泳检测其纯度及大小。以纯化后经适当稀释的总 DNA 为模板,采用细菌 16SrDNA 通用引物 Eu27F(5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', positions 7 – 27 of *E. coli* 16SrDNA)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL):模板 1 μL,PCR Premix 25 μL,Forward primer 与 Reverse primer2(浓度均 20 pmol/μL)各 0.5 μL,16s-free H_2O 23 μL。反应条件:94℃ 预热 5 min,94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1.5 min,30 个循环。取 PCR 扩增产物5 μL进行 3% 琼脂糖凝胶电泳。使用测序引物 Seq forward (5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'), Seq reverse (5'-CGCCAGGGTTTTCCCA GTC ACGAC-3')和 Seq internal (5'-CAGCAGGC CGCG GTAATAC-3'),参考 Ole A. Økstad 等[14]所述方法,用 ABI PRISM™ 3730 DNA 测序仪测定其序列。

1.3.3 系统发育树的构建:将目的菌株 16SrDNA 测序结果在 NCBI 上进行 BLAST,并与 GenBank 数据库做相似性分析,通过 Clustal X1.83 程序进行多重对比后,利用 MEGA4.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining Method)构建系统发育树图。

1.4 脱毛实验[15]

山羊皮经常规浸水脱脂后,被切割为相同大小(10 cm × 20 cm),放入装有适当稀释粗酶液(120 U/mL,pH 调至 10.0)的有机转鼓中,28 ± 2℃,转动 30 min 后停鼓,其后每隔 50 min 转动 10 min,观察其脱毛状况和作用特点。待样品的毛基本完全脱落后(以脱毛最快的酶处理样为准),进行常规的浸灰和复灰,观察其脱毛效果及对作用对象的影响。

1.5 活力测定

据参考文献[16]所述的方法测定发酵离心上清液的角蛋白酶活力(以脱脂羊毛为底物(20 mg)进行酶活力测定,以牛血清蛋白质(BSA)为标准物绘制蛋白质含量随吸光度变化的标准曲线)。其活力定义为 1 mL 酶液在 60℃,pH10.0 条件下,30 min 释放蛋白质相当于 1 μg BSA 的量为一个酶活力单位(U)。

2 结果和讨论

2.1 具备脱毛潜力菌株的筛选(表 1)

2.1.1 初筛:根据菌落是否有透明圈形成及 CZ/CS 值,获得 200 待筛选菌株,摇瓶发酵检测其角蛋白活力,结果表明,虽然 CZ/CS 比值与角蛋白酶活力之间不存在正比关系,但有助进一步通过摇瓶筛选获得高活力的角蛋白酶生产菌株,其中有 15 株酶活在 100 U 以上。因角蛋白酶是可诱导的[10],所以分离样品前,采用含有细绵羊毛的培养基诱导培养,提高了定向分离的效率。

2.1.2 复筛:将上述摇瓶筛选所获 15 株产角蛋白酶菌株,再次摇瓶发酵,测定其发酵活力,并通过山羊皮的脱毛试验筛选高效脱毛的菌株。试验结果显示,菌株产角蛋白酶活力与其脱毛效果存在一定的相关性,酶活力高于 130 U 以上的菌株的发酵液,未添加硫化物具有良好脱毛效果。但高于 130 U/mL 菌株的脱毛速率和效率与活力未见其正相关性,且

脱毛的速率也存在一定的差异。这可能与样品的部位有关,需通过按制革工艺操作的脱毛试验证实。比较初筛与复筛结果,部分菌株其稳定性较差。虽然 X-26 号菌株发酵活力最高,但其脱毛速率缓慢,X-47 号菌株,发酵活力较高且稳定,其脱毛作用效果明显,脱毛速率快,经后续工序处理,裸皮粒面清晰,未见残留毛根等不利现象出现。根据多相筛选方法的结果,X-47 菌株作为目的菌株进一步实验研究。

表 1　复筛与粗酶液脱毛效果

Table 1　Variation of depilation for prescreening strains

Number	Enzyme activity/(U/mL)	Action of keratinase in depilation*				Depilation ratio after deliming**
X-14	122.0 ± 8.8	1	1	2	2	15%
X-26	181.7 ± 16.2	3	3	4	3	99%
X-29	130.7 ± 14.7	1	3	5	5	100%
X-31	67.6 ± 10.0	2	4	2	2	5%
X-34	75.9 ± 1.8	1	1	2	1	10%
X-47	169.5 ± 2.8	3	5	5	5	100%
X-56	84.1 ± 19.7	2	4	4	3	20%
X-58	122.2 ± 14.6	2	3	3	2	99%
X-59	139.0 ± 5.3	3	5	5	5	99%
X-88	63.2 ± 11.6	2	3	2	2	5%
X-97	63.9 ± 3.6	2	3	3	2	2%
X-99	90.7 ± 6.3	3	3	3	3	2%
X-142	101.8 ± 6.9	2	2	2	1	95%
X-154	60.7 ± 9.7	0	1	1	1	60%
X-175	62.3 ± 16.9	3	3	3	2	40%

*: The different values represent the different affections of the enzymes in the process of depilation as the time goes by. With the figure rising, the affections of the enzymes are getting more obviously. **: The data refers to the cases of removing hair root of different strains after deliming. The larger value is obtained, the less hair root remains.

2.2　菌株鉴定

2.2.1　形态观察:在营养培养基上 37℃培养 18 h 后即可见菌落形成,菌落形态呈圆形,白色,凸透镜状,稍透明,直径约 1 mm,表面粘稠、湿润,有光泽,边缘完整,正反面颜色一致,培养 30 h 后菌落直径 3 mm 左右,形态呈不规则形状,颜色稍变黄色,不透明,突起变为脐突状,边缘波状;菌体细胞呈杆状,单生,两端钝圆,革兰氏染色呈阳性,有芽孢,芽孢呈椭圆形、近中生。

2.2.2　生理生化特征:菌株 X-47 的生理生化特征主要有:产酸,不产气,甲基红、柠檬酸盐及苯丙氨酸利用实验均为阴性,V. P、吲哚、硫化氢及硝酸还原实验均为阳性。

2.2.3　Biolog 鉴定:对 Biolog 反应结果(菌株 X-47 对 95 种碳源的利用情况)进行计算机软件分析表明:X-47 菌株为地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)的可能性为 99%,其他属均为 0%,且最高的相似率为 0.686(最大相似度为 1.000)。在该鉴定系统中,相似度大于 0.5,结果较为可靠。综合 Biolog 全自动分析结果及生理生化实验和群体形态观察的结果,检索 Bergey's 手册(第八版),初步确定该菌株为地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

2.2.4　16S rDNA 分子生物学鉴定:X-47 菌株 16S rDNA 核苷酸序列全长为 1464 bp,在 GenBank 中登录号为 CTC739,经多序列同源性分析,得到 21 个有 99% 同源性的菌株,以菌株 X-47 的 16SrDNA 序列为基础在 MEGA4.0 软件中构建系统发育树(Nj 树),如图 1 所示。X-47 与 *Bacillus licheniformis* (DQ082995)位于同一分枝,同源性最高,亲缘关系最近。其鉴定结果与 Biolog 测定结果完全吻合,属 *Bacillus licheniformis*,并将其命名为 *Bacillus licheniformis* X-47。

本研究采用多相定向诱导选育技术,从原料皮贮存的特定环境寻求适合制革脱毛酶的微生物源,通过在含有脱脂羊毛为诱导物的培养中的富集与分离,基于脱毛实验的筛选方法,是筛选脱毛专一性角蛋白酶生产菌株的有效途径。与以往酶活测定中选用酪素或牛血清蛋白质为底物相比,本实验以脱脂羊毛粉为酶活测定的反应底物,更加具有目的性,且筛选效率及质量都有明显提高。将筛选所得高活力角蛋白酶分泌菌株 X-47 的粗酶液用于山羊皮脱毛的初步实验结果表明,该分离株的发酵液其活力在 130 U/mL 左右时,可完全取代硫化碱,达到有效的脱毛目的,且未观察到对胶原降解,具有可开发为生物酶脱毛制剂的潜力。鉴定结果显示,菌株 X-47 属地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*),并命名为

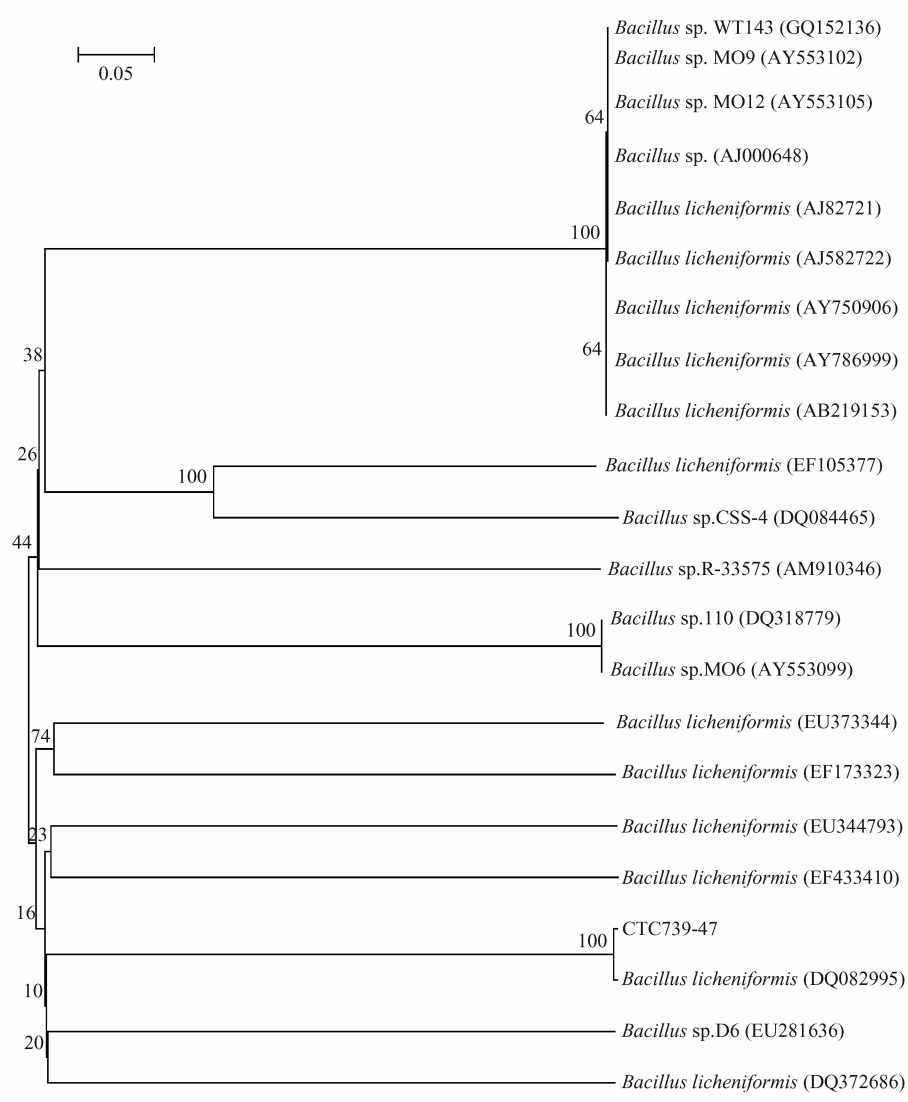

图 1 菌株 X-47 基于 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on partial 16S rDNA sequences of strain X-47. Number in parentheses represents the sequences accession number in Genbank. The numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap based on 1000 resampled data sets. Bar,5% sequence divergence.

Bacillus licheniformis X-47。由于角蛋白的特殊结构与性质,筛选具有角蛋白酶活力的菌株并对其产酶情况及酶的作用机制的研究将是今后工作的重点。

参考文献

[1] Taylor MM, Bailey DG, Feairheller SH. A review of the uses of enzymes in the tannery. *Journal of the American Leather Chemists Assoclation*, 1987, 82: 153-165.

[2] Thanikaivelan P, Rao JR, Nair BU, et al. Recent trends in leather making: processes, problems, and pathways. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2005, 35(1): 37-79.

[3] Pal S, Banerjee R, Bhattacharyya BC. Application of a proteolytic enzyme in tanneries as a depilating agent. *Journal of the American Leather Chemists Assoclation*, 1996, 91(3): 59-63.

[4] Schraeder CE, Ervin RT, Eberspacher JL. Economic analysis of the feasibility of using enzymes in the unhairing process. *Journal of the American Leather Chemists Assoclation*, 1998, 93(9): 265-271.

[5] Muhsin TM, Aubaid AH. Partial purification and some biochemical characteristics of exocellular keratinase from *Trichophyton mentagroophytes var. erinacei*. *Mycopathologia*, 2001, 150(3): 121-125.

[6] Tatinenia R, Doddapanenia KK, Potumarthib RC, et al. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp.. *Bioresource Technology*, 2008, 99(6): 1596-1602.

[7] Kim JM, Lim WJ, Suh HJ. Feather-degrading Bacillus species from poultry waste. *Process Biochemistry*, 2001, 37(3): 287-291.

[8] Gushterova A, Vasileva-Tonkova E, Dimova E, et al. Keratinase production by newly isolated Antarctic actinomycete strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 21(6-7): 831-834.

[9] Suntornsuk W, Tongjun J, Onnim P, et al. Purification and characterization of keratinase from a thernotolerant feather-degrading bacterium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 21(6-7): 1111-1117.

[10] Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(1): 21-33.

[11] Anbu P, Gopinath SCB, Hildaa A, et al. Annadurai. Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36(5-6): 639-647.

[12] Macedo AJ, da Silva WO, Gava R, et al. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Applied and Environmental Microbiolog*, 2005, 71(1): 594-596.

[13] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海：上海科学技术出版社, 1986: 137-166.

[14] Økstad OA, Gominet M, Purnelle B, et al. Sequence analysis of three *Bacillus cereus* loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin. *Microbiology*, 1999, 145(11): 3129-3138.

[15] 石碧, 陆忠兵. 制革清洁生产技术. 北京：化学工业出版社, 2004: 33-44.

[16] Gessesse A, Hatti-Kaul R, Gashe BA, et al. Novel alkaline protease from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(5): 519-524.

Screening and identification of a new Bacillus strain producing keratinase

Fei Xie[2], Conghu Li [2], Jia Zheng [2], Xin Chen [2], Jun Huang [2], Rongqing Zhou[1,2*]

([1]National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

([2]College of Light Industry, Textile&Food, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: [**Objective**] New wild strains, which were endowed with an effective depilation as their abilities to produce keratinase, were isolated to develop the bio-deliplatory agent in the sulfur-free tanning. [**Methods**] A polyphase screening method was used to obtain the high-yielding wild strains. In this method, the sewage sample was obtained from the specific circumstance where the raw hides were stored, and then enriched by adding the defatted wool power as an inducer in the medium. Furthermore, the strains were screened via assessing the ability of the depilation of their fermentation broth. Finally, the isolated strain was identified according to their morphological features, physiological and biochemical characteristics, automatic identification by Biolog system as well as phylogenetic analysis of 16SrDNA sequences. [**Results**] A higher activity and remarkable dehairing capability with sulfur-free was obtained. The results of identification indicated that the strain X-47 was the most closely related to *Bacillus licheniformis*, so it was named *Bacillus licheniformis* X-47. [**Conclusion**] The wild strain *Bacillus licheniformis* X-47 was isolated successfully by the method of polyphase screening. It had a high keratinase-producing activity, high efficient of depilation and weak effect on collagen, which suggested that it has a considerable potential of developing the sulfur-free bio-depilation product.

Keywords: keratinase; dehairing; screening; identification

(本文责编：王晋芳)

Supported by the National Key Technology R&D Program (2006BAC02A097)

* Corresponding author. Tel: +86-28-85406149; Fax: +86-28-85405237; E-mail: rqzhou@163.com

Received: 10 October 2009/ Revised: 2 December 2009