

瘤胃解纤维素菌细胞密度与纤维素酶的合成

王璨, 东秀珠*

中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

摘要:瘤胃解纤维素菌 (*Cellulosilyticum ruminicola*) H1 是本实验室分离自青海牦牛瘤胃的一株新的纤维素降解细菌。前期研究发现, 菌株 H1 在滤纸纤维素上连续传代数次后无法生长, 只有在纤维素降解产物纤维二糖中培养后方能继续在纤维素中生长, 并恢复其纤维素降解活性。这与纤维素酶合成受“代谢产物抑制”的传统认识相悖。【目的】证明菌株 H1 的纤维素酶合成受细胞密度调控。【方法】检测菌株 H1 的纤维素酶活和转录水平在高和低密度细胞培养物中差异, 并检测高密度细胞培养物中的寡肽对低密度细胞纤维素酶活和转录水平的促进作用。【结果】菌株 H1 的高密度细胞培养物的纤维素酶活和转录水平比低密度细胞的高 3–10 倍; 并且高密度细胞培养液能显著提高低密度细胞纤维素酶活和转录水平。【结论】瘤胃解纤维素菌 (*Cellulosilyticum ruminicola*) H1 纤维素酶的合成受细胞密度调控。

关键词:纤维素降解细菌, 纤维素酶合成, 细胞密度

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 09-1069-06

细胞密度介导的群感效应 (Quorum sensing, QS) 是细菌根据种群密度大小, 通过种内或种间信息交流调节群体行为的基因调控机制。QS 系统调控细菌的多种生理生态功能, 包括抗生素产生、生物发光、致病基因的表达、色素产生、生物膜形成等^[1]。我们在对本实验室分离自牦牛瘤胃的纤维素降解细菌—瘤胃解纤维素菌 (*Cellulosilyticum ruminicola*) H1^[2] 的培养中, 发现该菌株在滤纸纤维素上连续传代数次后则无法生长, 而只有将其在纤维素降解产物纤维二糖中培养后方能继续在纤维素中生长, 并恢复纤维素降解活性。这与纤维素酶合成受“代谢产物抑制”的传统认识相悖。过去的研

究认为纤维素酶多属于诱导酶, 即在纤维素存在时大量表达, 但通常受产物的抑制, 尤其纤维素外切酶的表达受其产物纤维二糖的抑制^[3–7]。而瘤胃解纤维素菌的纤维素降解能力的保持与其需要在纤维二糖中培养的现象, 提示菌株 H1 的纤维素酶合成或受纤维二糖的诱导, 或受高细胞密度诱导, 因为菌株 H1 在纤维二糖培养物中的细胞量显著高于纤维素培养物。

本研究在已完成菌株 H1 基因组草图及其纤维素酶组成^[2]的基础上, 从酶活和转录水平证明高细胞密度可诱导菌株 H1 的主要两类纤维素酶——内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶的酶活及

基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目 (KSCX1-YW-11-B1)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807413; E-mail: dongxz@im.ac.cn

作者简介: 王璨 (1986–), 女, 四川人, 硕士研究生, 主要从事瘤胃细菌的研究。E-mail: world_cup1987@126.com

收稿日期: 2012-03-30; 修回日期: 2012-05-04

其基因转录的高表达,而非纤维二糖的底物诱导作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:纤维二糖、木糖、羧甲基纤维素、微晶态纤维素均购买于中国国药集团公司;反转录试剂购买于 Promega 公司;BCA 蛋白定量检测试剂盒购买于 Thermo Scientific 公司;Trizol 购买于 Invitrogen 公司;Real-time PCR 检测试剂 SYBR green SuperMix 购买于 Takara 公司;蛋白 Marker 购买于鼎国公司;CSP (competence stimulation peptide) 分子来自本实验室。

1.1.2 菌株:居瘤胃解纤维素菌 (*Cellulosilyticum ruminicola*) H1 为本实验室分离和保存。

1.2 菌株 H1 的培养

培养基及培养方法参见 Cai 等 (2010)^[2],以纤维二糖或木糖为碳源。

1.3 内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶的酶活测定方法

采用 Cai 等 (2010, 2011) 的方法^[8-9]。收集 50 mL 菌株 H1 的纤维二糖培养物,经 13000 × g 离心 10 min 去除菌体及残留物。培养液上清用 80% 饱和度的 (NH₄)₂SO₄ 沉淀以获得粗酶液。以羧甲基纤维素为底物检测内切葡聚糖酶活,以 pNP-cellobioside 为底物检测纤维二糖水解酶酶活。采用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定粗酶蛋白质的量。

1.4 菌株 H1 的 mRNA 提取及反转录

菌株 H1 的 mRNA 提取参见 Li 等 (2011)^[10] 的方法,包括液氮研磨裂解细胞、加 Trizol 为 mRNA 作保护剂、氯仿变性蛋白质纯化、异丙醇沉淀 mRNA,并用 Trizol 作保护剂,乙醇洗涤。取 2 μg mRNA 进行反转录反应。

1.5 转录表达水平检测

采用实时定量 PCR (所用定量检测试剂为 SYBR green SuperMix,检测仪器为 ABI Prism 7000) 检测纤维素酶基因的相对转录水平。qPCR 循环参数为:循环数 40, 95℃ 变性 10 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s。以菌株 H1 的 DNA 为模板绘制相对定量标准曲线,以 16S rRNA 基因为内参。采用的 qPCR 引物序列如表 1 所示。

表 1 本研究使用的定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for quantitative PCR

Primer	Sequence (5'→3')
16s-F	TACACACCGCCCGTCACAC
16s-R	CAGCCGCACCTTCGATAC
09989-F	TAGGAGATAGTTCACCAAT
09989-R	CTGTTGTTGTCATCATCA
04825-F	TCAACTTACCAATGTCATATAC
04825-R	CGTTACCATCACTACTT
04820-F	AAGAAGACAGCGGAATTCCA
04820-R	TCCAACITTTGCTGTTGCAG

1.6 高细胞密度培养物培养液的收集与处理

以 0.5% 纤维二糖培养菌株 H1 至对数生长后期,12000 × g 离心去细胞后收集培养液上清;培养液经 3 kDa 超滤管过滤,以 4000 × g 离心 40 min 后收集未截留部分溶液;超滤收集的溶液以 80% 饱和度硫酸铵沉淀,之后 14000 × g 离心 30 min 收集沉淀;将得到的沉淀重溶于透析缓冲液中,并用 100 Da 透析袋过夜透析;最后进行冻干处理。

1.7 高密度细胞培养液处理低细胞密度培养物的加法和加量

收集 5L 以 0.5% 纤维二糖培养的 H1 高细胞密度培养物,经如 1.6 所述方法处理后得到 10 mL 高密度细胞培养液,在向 25 mL 0.1% 纤维二糖培养基接种 H1 时,同时加入 1 mL 高密度细胞培养液。

2 结果和分析

2.1 菌株 H1 内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶酶活及其基因表达与细胞密度相关

2.1.1 不同细胞密度的菌株 H1 的生长速率相同:本实验分别以 0.5% 和 0.1% 两种纤维二糖浓度培养菌株 H1,以分别获得高和低细胞密度的培养物。结果如图 1 所示,尽管菌株 H1 以低浓度的纤维二糖 (0.1%) 为底物时的最终细胞密度 (OD_{600} 为 1.00) 低于高浓度纤维二糖 (0.5%) 的细胞密度 (OD_{600} 为 2.00),但生长速率相似,均约为 $OD_{600} = 0.32/h$ 。

2.1.2 内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶活力与细胞密度相关:为了检测菌株 H1 的纤维素酶活力与细胞密度的关系,我们选择了内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶为研究对象。为避免两种纤维素酶基因在不同生长时期的表达不同,选取处于对数生长末期的 0.5% 和 0.1% 纤维二糖的细胞用于酶活检测。

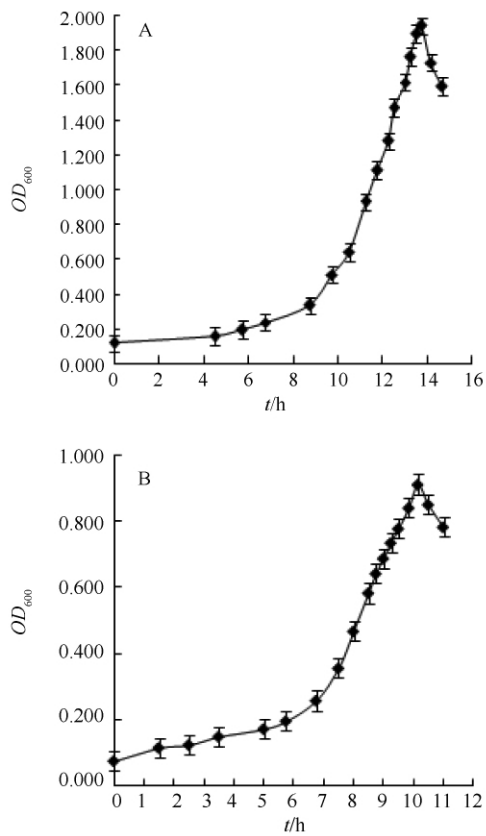


图1 菌株 H1 在 0.5% (A) 和 0.1% (B) 纤维二糖的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of strain H1 growing in 0.5% (A) and 0.1% (B) cellobiose.

结果显示,高密度细胞比低密度细胞的内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶的比活分别高 2.5 和 4.3 倍(表 2)。为了澄清纤维素酶活的差异是底物还是细胞密度所导致,我们检测了菌株 H1 在木糖培养物中

的两种酶活。结果同纤维二糖的培养物相同,两种酶活也是在高细胞密度培养物中显著高于低细胞密度培养物(表 2)。因此证明菌株 H1 的纤维素酶的合成受细胞密度调控,而非底物纤维二糖的诱导。

2.2 菌株 H1 的内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶基因表达与细胞密度相关

菌株 H1 基因组中含有多个内切葡聚糖酶基因,和一个纤维二糖水解酶(orf4820)。前期研究发现内切葡聚糖酶基因 orf9989 和 orf4825 编码的蛋白具有高的内切葡聚糖酶酶活^[8]。本实验中,我们通过实时定量 PCR 检测这 3 个基因分别在 0.5% 和 0.1% 纤维二糖为底物时的转录水平。同时也比较了 3 个基因在 0.5% 和 0.1% 木糖培养物中的转录水平差异。结果如表 2 所示,无论以纤维二糖或木糖为底物,菌株 H1 的内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶基因均在高密度细胞中高表达。在两种糖的高细胞密度培养物中,内切葡聚糖酶基因(orf9989 和 orf4825)的转录水平均提高 3 倍左右;纤维二糖水解酶基因(orf4820)在高浓度的纤维二糖中提高转录 6 倍左右,在高浓度的木糖中提高转录水平 10 倍左右。由此,在基因转录水平上证明菌株 H1 纤维素酶的表达与细胞密度相关。

2.3 菌株 H1 的纤维素酶活及其基因表达在对数生长末期最高

为了进一步证明纤维素酶合成受细胞密度调控,我们检测了菌株 H1 的 0.5% 纤维二糖培养物在不同生长时期(延滞期,培养 4 h, OD_{600} 为 0.26;对数早期,培养 8h, OD_{600} 为 0.34;对数中期,培养 12 h, OD_{600} 为 1.1;对数末期,培养 14h, OD_{600} 为 1.84)的

表 2 菌株 H1 在两种底物中高和低细胞密度培养液的纤维素酶活

Table 2 Fibrolytic activities in the spent cultures of strain H1 grown in different concentrations of cellobiose and xylose

Enzyme	Mean specific activity (mU/mg of protein) ± SD			
	Cellobiose		Xylose	
	0.5%	0.1%	0.5%	0.1%
Endoglucanase	566.5 ± 28.3	226.1 ± 11.3	547.89 ± 27.4	96.1 ± 4.8
Cellobiohydrolase	990.9 ± 49.5	229.9 ± 11.5	1708.5 ± 85.4	435.9 ± 21.8

表 3 菌株 H1 在两种浓度的纤维二糖和木糖培养物中的纤维酶基因转录水平

Table 3 Transcript levels of the three fibrolytic genes in the cultures of strain H1 grown in cellobiose and xylose

orf	annotation	Gene transcript copies ± SD			
		Cellobiose		Xylose	
		0.5%	0.1%	0.5%	0.1%
9989	Endoglucanase	3.3 ± 0.3	0.8 ± 0.1	3.4 ± 0.7	0.9 ± 0.1
4825	Endoglucanase	7.3 ± 1.0	3.3 ± 0.2	2.4 ± 0.3	0.8 ± 0.1
4820	Cellobiohydrolase	1.8 ± 0.2	0.3 ± 0.0	5.4 ± 1.0	0.5 ± 0.1

* values are given as means ± standard deviations; the transcript copies are given as specific gene copy numbers/1000 16S rRNA copies.

纤维素酶及其基因表达水平。图 2 显示, 菌株 H1 的纤维素酶活及其基因表达水平均在数末期达到峰值。对数末期比对数早期的内切葡聚糖酶活高 3 倍左右, 纤维二糖水解酶活高 4 倍左右; 内切葡聚糖酶基因 9989 的转录在对数末期比对数早期高 10 倍左右, 内切葡聚糖酶基因 4825 及其与之共转录的纤维二糖水解酶基因 4820 的转录在对数末期比对数早期高 14 倍左右。该实验结果验证了菌株 H1 的纤维素酶合成受细胞密度调控。

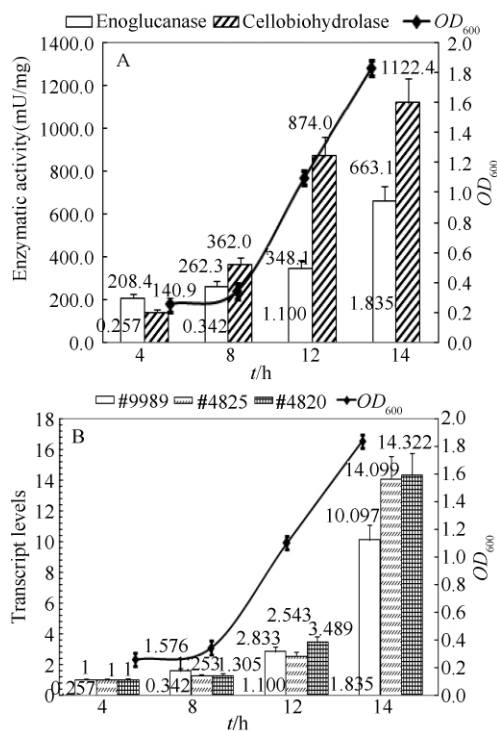


图 2 不同生长时期的菌株 H1 在 0.5% 纤维二糖培养物的纤维素酶酶活 (A) 及其基因转录水平 (B)

Fig.2 Fibrolytic activities (A) and transcript levels (B) of strain H1 during the growth in cellobiose (0.5%).

2.4 菌株 H1 的高密度细胞培养液促进低密度细胞培养物的纤维素酶合成

已知群感效应通过细胞产生并分泌到胞外的信号分子实现其调控作用。我们收集了菌株 H1 的 0.5% 纤维二糖对数生长末期的培养物, 经离心去除细胞及过滤除去大分子蛋白质制得高密度细胞培养液。然后将此处理的培养液加入 0.1% 纤维二糖的 H1 培养物中, 培养至对数末期时, 检测该低密度细胞培养物的内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶活的变化, 从而证明高密度细胞培养液对纤维素酶合成的

促进作用。结果 (图 3) 显示: 加入高细胞密度的菌株 H1 培养液, 使低细胞密度培养物的内切葡聚糖酶活提高 3 倍左右、纤维二糖水解酶活提高 8 倍左右。而制备的高细胞密度培养液不含有纤维素酶活。通常认为革兰氏阳性细菌的群感效应信号分子多属于寡肽类物质^[1]。因此我们用蛋白酶 K 处理高细胞密度培养液以分解可能的信号肽。结果显示经蛋白酶 K 处理的培养液对低细胞密度培养物的内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶活没有促进作用 (图 3)。同样, 菌株 H1 的木糖培养物的高细胞密度培养液也具有同样的促进作用。本实验结果表明菌株 H1 的高细胞密度培养液有促进纤维素酶合成的作用, 且发挥这种促进作用的物质可能是寡肽, 即常见的革兰氏阳性细菌群感效应信号分子。

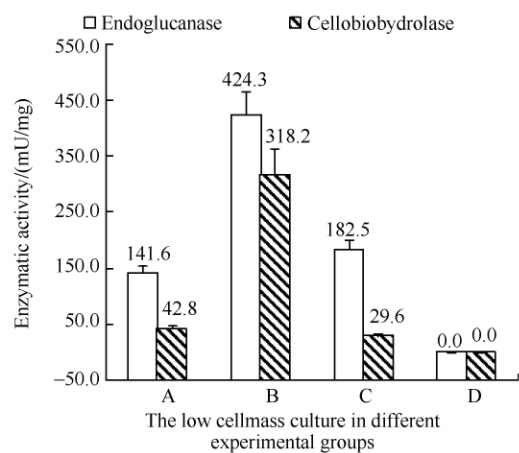


图 3 菌株 H1 高细胞密度培养液促进其低细胞密度培养物纤维素酶活

Fig.3 Cellulase activities of strain H1 in low cell density added by the spent culture of the higher cell mass. A, cellulase activity of the low cellmass culture upon addition with its own culture medium; B, cellulase activity of the low cellmass culture upon addition of the higher cell mass-spent culture; C, cellulase activity of the low cellmass culture upon addition of Protease K-treated high cellmass-spent culture of H1; D, cellulase activity of the high-cellmass culture.

3 讨论

纤维素酶高效合成是其应用的重要前提。目前的研究表明, 微生物的纤维素酶主要受其底物纤维素的诱导, 而受其产物的反馈抑制^[3-7]。然而, 自 20 世纪 90 年代发现细菌中普遍存在群感效应调控的基因表达机制后, 人们看到一些植物病原革兰氏

阴性细菌的胞外多糖合成及其降解也受群感效应调控^[12-16], 但是对主要的纤维素降解菌——革兰氏阳性细菌的纤维素酶合成调控研究较少。本研究的结果证明, 革兰氏阳性纤维素降解细菌纤维素酶的合成也与细胞密度的调控即群感效应有关, 提供了新的纤维素降解调控机制, 同时为纤维素酶的工业化应用提供理论指导。

本研究的初步结果显示瘤胃解纤维素菌 H1 的群感效应信号分子可能是寡肽类物质, 我们在其基因组中也看到几个可能的寡肽编码基因, 及多个双组分信号系统的基因。但获得寡肽是分析其对细胞密度及纤维素酶合成的调控功能的前提。同时, 确定信号寡肽的合成基因及其调控的靶基因, 以及调控网络和调控机制是提高纤维素酶合成的重要基础。

参考文献

- [1] Camilli A, Bassler BL. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 2006, 311 (5764): 1113-1116.
- [2] Cai SC, Dong XZ. *Cellulosilyticum ruminicola* gen. nov., sp nov., isolated from the rumen of yak, and reclassification of *Clostridium lentocellum* as *Cellulosilyticum lentocellum* comb. nov.. *International Journal of Systematic Environmental Microbiology*, 2010, 60:845-849.
- [3] Mandels M, Parrish FW, Reese ET. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *Journal of Bacteriology*, 1962, 83 (2): 400-408.
- [4] Carle-Urioste JC, Escobar-Vera J, Ei-Gogary S, Henrique-Silva F, Torigoi E, Crivellaro O, Herrera-Estrella A, EI-Dorry H. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (15): 10169-10174.
- [5] Newcomb M, Chen CY, Wu JH. Induction of the celC operon of *Clostridium thermocellum* by laminaribiose. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 2006, 104 (10): 3747-3752.
- [6] Bailey MJ, Tähtiharju J. Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62 (2): 156-162.
- [7] Han SO, Yukawa H, Doi RH, Masayuki I. Regulation of expression of cellulosomal cellulase and hemicellulase genes in *Clostridium cellulovorans*. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (20): 6067-6075.
- [8] Cai SC, Li JB, Dong XZ. *Cellulosilyticum ruminicola*, a newly described rumen bacterium that possesses redundant fibrolytic-protein-encoding genes and degrades lignocellulose with multiple carbohydrate-borne fibrolytic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 76 (12): 3818-3824.
- [9] Cai SC, Zheng X, Dong XZ. CBM3d, a novel subfamily of family 3 carbohydrate-binding modules identified in Cel48A exoglucanase of *cellulosilyticum ruminicola*. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (19): 5199-5206.
- [10] Li JB, Cai SC, Luo YM, Dong XZ. Three feruloyl esterases in *Cellulosilyticum ruminicola* H1 act synergistically to hydrolyze esterified polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 77 (17): 6141-6147.
- [11] Kleerebezem M, Quadri LEN, Kuipers OP, Willem M. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 1997, 24 (5): 895-904.
- [12] Farrand SK, Bodman SB. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Journal of Bacteriology*. 1995, 177 (17): 5000-5008.
- [13] Kong KF, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *International Journal Medical Microbiology*, 2006, 296 (2-3): 133-139.
- [14] Chernin LS, Winson MK, Thompson JM, Haran S, Bycroft BW, Chet I, Williams P, Stewart G. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (17): 4435-4441.
- [15] Marketon MM, Glenn SA, Eberhard A, et al. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (1): 325-331.
- [16] Quinones B, Dulla G, Lindow SE. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18 (7): 682-693.

Cell density mediated cellulases synthesis in *Cellulosilyticum ruminicola*

Can Wang, Xiuzhu Dong*

State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: *Cellulosilyticum ruminicola* H1 is an anaerobic cellulolytic bacterium isolated from the rumen content of yak. Previously, we found that strain H1 lost growth on filter paper cellulose after several subcultures. The growth on cellulose cannot be restored until a few transfers in the cellobiose-containing medium. This is contrary to the knowledge that microbial cellulases synthesis is induced by the substrate while repressed by the metabolites, e. g. cellobiose, but provides a hint of cell-density mediated cellulase synthesis. **[Objective]** The study aimed to test if cell density regulation mechanism involved in the cellulase synthesis by *Cellulosilyticum ruminicola* H1. **[Methods]** By using enzyme assays and real-time PCR quantification, we investigated cellulase activities and the gene transcript levels in the high- and low-cellmass cultures of strain H1. We also determined the elevation of endoglucanase and cellobiohydrolase activities and the gene expression in the low-cellmass culture upon addition of the high-cellmass spent culture. **[Results]** Both endoglucanase and cellobiohydrolase of strain H1 were detected 3 to 10 times higher in the high cellmass culture than in the lower cellmass culture either in enzymatic activity or the gene transcript abundance, thus confirming the cell density-mediated cellulase synthesis. **[Conclusion]** This study demonstrates that cell density regulation is involved in cellulases synthesis by *Cellulosilyticum ruminicola* H1.

Keywords: fibrolytic bacterium, cellulase synthesis, cell density

(本文责编:王晋芳)

Supported by the CAS Knowledge Innovation Key Project (KSCX1-YW-41-B1)

* Correspondence author. Tel/Fax: +86-10-64807413; E-mail: dongxz@im.ac.cn

Received: 30 March 2012/Revised: 4 May 2012

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。