

角蛋白高效降解菌 Fea-10 的筛选与鉴定

颜华¹, 柯欣¹, 吴佳¹, 杨文翰¹, 刘亚勇², 贾良辉^{1,*}, 马怡茗^{1,*}

(1 西北农林科技大学 生命科学学院 杨凌 712100; 2 中国科学院 微生物研究所 北京 100101)

摘要 采用透明圈和完整羽毛降解相结合的方法,从养鸡场长期堆积废羽毛中分离出了一株能高效降解羽毛角蛋白的菌株 Fea-10。经 16S rDNA 序列分析表明,Fea-10 属于链霉菌属,与微白黄链霉菌的相似性达 99.86%。经形态、生理生化 and 系统发育树综合鉴定,命名为微白黄链霉菌 Fea-10。Fea-10 全基因组大小约为 7.25 Mb,GC 含量为 73.36%,其含有丰富的次级代谢产物基因簇。菌株 Fea-10 发酵培养 36 h 后角蛋白酶活性达到最高值,最佳培养温度为 35 ℃。

关键词 角蛋白降解;微白黄链霉菌 Fea-10;角蛋白酶;菌株筛选

中图分类号 TQ920;Q93-331 **文献标识码** A **文章编号** 1672-4321(2017)02-0030-05

Isolation and Identification of a High Efficient Feather-Degrading Strain Fea-10

Yan Hua¹, Ke Xin¹, Wu Jia¹, Yang Wenhan¹, Liu Yayong², Jia Lianghui¹, Ma Yiming¹

(1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract A high efficient keratin-degrading strain (Fea-10) was isolated from decomposed feathers by combining the method of clearance zone diameter and complete feather degradation. 16S rDNA sequence similarity analysis showed that strain Fea-10 belonged to the genus *Streptomyces* with the highest sequence similarity to *Streptomyces albidoflavus*. Combined with morphological, physiological characteristics and phylogenetic tree analysis, the strain was then designated as *Streptomyces albidoflavus* Fea-10. Strain Fea-10 had one linear chromosome of 7.25 Mb with a G + C content of 73.36%. Analysis of the genome sequence of Fea-10 revealed that it contained abundant secondary biosynthesis gene cluster. The keratinase activity reached to the maximum value after fermenting for 36 hours with an optimum culture temperature of 35 ℃.

Keywords Keratin-degrading; *Streptomyces albidoflavus* Fea-10; keratinase; strain screening

角蛋白是一类在自然界中广泛存在的不可溶蛋白,是表皮、羽毛、羊毛、鱼鳞、头发、蹄以及指甲的主要组成部分。角蛋白相当稳定且难降解,主要是由于角蛋白紧密交联的氢键、疏水作用以及二硫键的存在,这也使得它们不易被木瓜蛋白酶、胶原酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶水解^[1-3]。但是,这些性质稳定的不可溶蛋白却可以被分泌角蛋白酶的特殊微生物降解^[1-4]。

目前已发现有许多微生物可以产生角蛋白酶,主要是细菌、真菌和放线菌^[5-7]。各种来源的角蛋白酶可广泛应用于医药、洗涤剂、化妆品、皮革和生物降解塑料制造等方面^[4,5]。有些角蛋白酶能够降解朊病毒,可以用来治疗朊病毒引起的疯牛病、羊瘙痒病以及人类克雅氏病^[6]。许多角蛋白酶可以将羽毛转变为氨基酸和可溶蛋白,并代替食品谷物作为更加便宜的动物饲料^[4,5,8]。鉴于其广泛应用潜力,越来越多的研究着重于筛选活性更好、降解效率更高

收稿日期 2017-03-28 * 通讯作者 马怡茗,研究方向:应用微生物学,E-mail: 1530821179@qq.com;贾良辉,研究方向:微生物天然产物,E-mail: jialianghui@nwsuaf.edu.cn

作者简介 颜华(1976-),女,副教授,博士,研究方向:微生物资源开发,E-mail: yanh99@gmail.com

基金项目 陕西省农业科技创新与攻关项目(2015NY066),中央高校基本科研业务费项目(Z109021426、Z109021432)

的角蛋白酶及其产生菌株。

本研究采用透明圈和完整羽毛降解相结合的方法,从养鸡场长期堆积废羽毛中分离出一株能高效降解羽毛角蛋白的菌株 Fea-10。通过对其进行分类鉴定,全基因组测序及其产酶特性的研究,为该菌株的进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及培养基

将鸡羽毛洗净,121 °C 高压灭菌 20 min,然后 80 °C 烘 24 h,冷却后粉碎过 100 目筛,用于培养基制备和微生物发酵。选择培养基:羽毛粉 10 g、NaCl 0.5 g、K₂HPO₄ 1 g、KH₂PO₄ 0.4 g、琼脂 20 g,补水至 1000 mL。发酵培养基:羽毛粉 10 g、NaCl 0.5 g、K₂HPO₄ 0.7 g、KH₂PO₄ 0.35 g,补水至 1000 mL。种子培养基:牛肉膏 5 g、蛋白胨 10 g、NaCl 0.5 g、K₂HPO₄ 1 g、KH₂PO₄ 0.4 g,补水至 1000 mL。牛奶琼脂培养基:脱脂奶粉 0.5%、琼脂粉 2%,补水至 1000 mL。

1.2 菌株的分离筛选

采集腐烂羽毛及其周围土壤,称取适当样品,梯度稀释后涂布于以羽毛粉为唯一碳氮源基础平板上,28 °C 倒置培养 3 d 左右,挑取有明显水解圈的菌落进行传代培养和驯化,将菌株富集培养,接种于仅含有完整羽毛的无菌生理盐水中摇瓶发酵,观察羽毛降解情况,筛选降解羽毛速度最快的菌株并命名为 Fea-10^[9-12]。

1.3 菌落形态观察

将菌株 Fea-10 接种在羽毛培养基平板上,于 28 °C 下恒温培养 24 ~ 96 h。肉眼观察菌落的形状、颜色、表面质地、透明度和菌落边缘。革兰氏染色后光学显微镜(LI00 JS-500)下观察菌体的形态。28 °C 插片培养 96 h 后,固定制片后使用扫描电子显微镜(日本日立公司)观察菌体形态。

1.4 生理生化特征测定

参照《微生物分类学》和《伯杰氏细菌鉴定手册》进行菌株 Fea-10 生理生化特性的测定。

1.5 16S rDNA 序列测定、系统发育分析及全基因组测序

提取总 DNA 作为 PCR 扩增的模板,以 16S rDNA 通用引物进行 16S rDNA 的扩增。引物和 PCR 程序见文献[13,14]。PCR 扩增产物胶回收后克隆至 pMD18-T 载体,转化 *E. coli* DH5 α ,阳性克隆委托

上海生工公司测序。结果在 GenBank 以及 EZbiocloud 网站进行 BLAST 分析,用 DNAMAN 6.0.3.99 进行序列相似性分析,并通过 Mega 5.0 以 Neighbour-Joining 方法构建系统发育树,用 Bootstrap (重复数为 1000) 进行检验。提取 Fea-10 总 DNA,对其进行全基因组测序(诺合致源公司)并用生物合成基因簇分析工具 antiSMASH 3.0 分析次级代谢产物基因簇。

1.6 菌株产角蛋白酶活性测定及产酶条件优化

1.6.1 粗酶液的制备

将角蛋白降解菌 Fea-10 种子液以 5% (v/v) 的接种量接入发酵培养基中,30 °C、200 r/min 下震荡培养 3 d,10000 r/min 离心 30 min,去除残余羽毛杂质,离心后上清经 0.22 μ m 滤膜真空抽滤去除菌体和杂质得到滤液,加入饱和 (NH₄)₂SO₄ 溶液至产生沉淀,4 °C 静置过夜,10000 r/min 离心 10 min,弃上清。将沉淀溶于蒸馏水,得到粗酶液。

1.6.2 酶活力单位测定

10 mg 羽毛粉与 2 mL Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.5) 混匀,加入 1 mL 粗酶液,30 °C 反应 1 h 后加入 10% 三氯乙酸(TCA) 终止反应;冰浴 10 min,10000 r/min 离心 10 min,取上清,紫外分光光度计测定 280 nm 处吸光值。对照组反映前即加入 2 mL 10% TCA。酶活定义:每 1 mL 酶液反应 1 h 后, A₂₈₀ 每增加 0.01 为一个酶活单位。

1.6.3 最适产角蛋白酶条件优化

底物 1% (w/v) 羽毛,接种量 5% (v/v),pH 7.5,30 °C,200 r/min 下震荡培养 6、12、18、24、30、36、42、48 和 60 h,取粗酶液,测定无菌上清的角蛋白酶活性。在此基础上,将培养温度分别设定为 25、30、35、40、45、50、55 和 60 °C,取培养 36 h 时的发酵液测定无菌上清的角蛋白酶活性。在最适培养时间和温度条件下,培养基初始 pH 分别设定为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 和 10.0,35 °C 培养 36 h 后,测定发酵液上清角蛋白酶活性。

2 结果与分析

2.1 Fea-10 角蛋白降解效果观察

Fea-10 有很强羽毛降解能力。接种一定量的 Fea-10 菌体到 100 mL 含有 1 g 完整羽毛的羽毛培养基中,28 °C 恒温培养 3 d 后 1 g 羽毛被完全降解(图 1)。

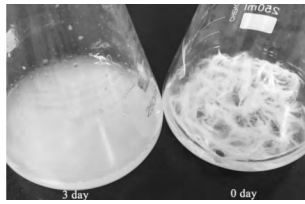


图1 Fea-10对整根羽毛的降解

Fig.1 Degradation of intact chicken feathers by Fea-10

2.2 菌体形态特征和菌落形态特征

菌株 Fea-10 在富集培养基上 28 °C 恒温培养 24 ~96 h,菌落呈圆形,表面平坦,有白色孢子气丝.幼龄菌落呈淡褐色,随着菌龄的增加菌落产生白色或淡黄色孢子.菌株 Fea-10 在富集培养基上 28 °C 恒温培养 48 h 扫描电镜观察表明(图 2):基丝呈暗黄色,直径约 0.5 ~0.6 μm,无隔不断裂;气丝蛛网灰色,直径约 0.6 ~0.7 μm,菌苔表面平坦;孢子丝钩状,顶端螺旋.孢子呈短杆状,两端整齐,大小 1.0 ~1.5 μm.

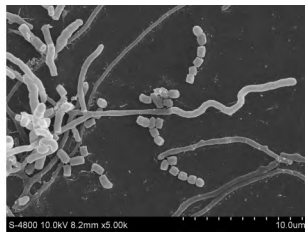


图2 Fea-10 电子显微镜下的菌体形态

Fig.2 Electron microscope photograph of Fea-10

2.3 菌株 Fea-10 生理生化特征

菌株 Fea-10 革兰氏呈阳性,能利用葡萄糖、阿拉伯糖、甘露醇及乳糖.菌株 Fea-10 在不含 NaCl 的培养基中生长良好,可在含有 7% NaCl 的培养基中生长.菌株 Fea-10 在 pH 5.0 ~9.0 范围内生长良好,说明菌株 Fea-10 的 pH 适应范围较广.菌株 Fea-10 的生理生化特征见表 1.

表1 菌株 Fea-10 的生理生化特征

Tab.1 Utilization of physiological and biochemical characters of strain Fea-10

| 试验项目 | 结果 | 试验项目 | 结果 |
|---------------------|---------|---------------|----|
| 石蕊牛奶 | 产蛋白酶不产酸 | 乳糖 | + |
| 革兰氏染色 | + | 蔗糖 | - |
| 甲基红 M. R | - | D-木糖 | + |
| V. P 试验 | - | 鼠李糖 | - |
| 淀粉水解 | + | 培养基中 NaCl 浓度% | |
| 纤维素水解 | - | 0 | + |
| 明胶水解 | + | 1 | + |
| 吲哚试验 | - | 3 | + |
| 硝酸盐利用 | - | 5 | + |
| 柠檬酸盐利用 | + | 7 | + |
| H ₂ S 实验 | - | 10 | - |
| 酪素水解 | + | 培养基 pH 值 | |
| 卵磷脂酶 | - | 5 | + |
| pH 5.7 营养肉汤 | + | 6 | + |
| 产酸:葡萄糖 | + | 7 | + |
| 接触酶反应 | + | 8 | + |
| D-甘露醇 | + | 9 | + |
| L-阿拉伯糖 | + | 10 | - |

注: "+" 表示阳性反应; "-" 表示阴性反应

2.4 16S rDNA PCR 克隆和系统发育树

Fea-10 的 16S rDNA PCR 扩增如图 3.

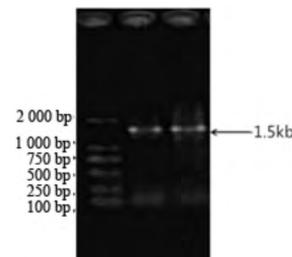


图3 菌株 Fea-10 16S rDNA PCR 扩增

Fig.3 16S rDNA PCR of Fea-10

根据 16S rDNA 测序结果,构建系统发育树(图 4).结果表明,该菌株与微白黄链霉菌(*Streptomyces albidoflavus*)的相似性最高,达到 99.86%,因此,综合形态学、生理生化鉴定结果,将菌株命名为微白黄链霉菌 Fea-10(*Streptomyces albidoflavus* Fea-10).

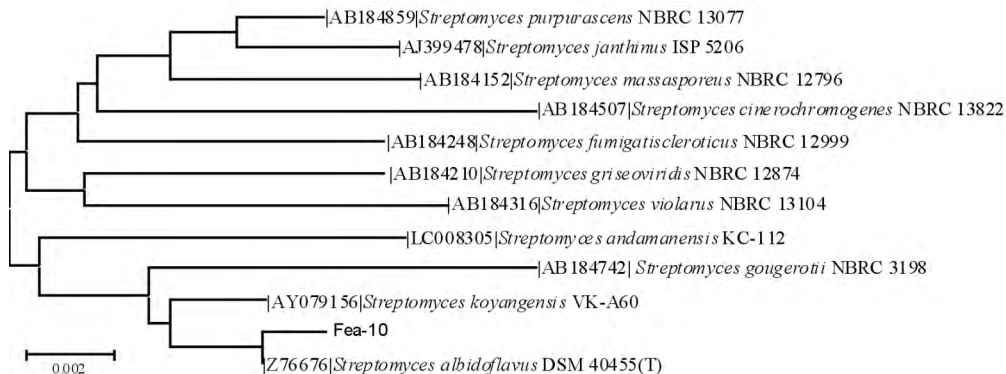


图4 邻接法构建的菌株 Fea-10 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic neighbour-joining tree based on the 16S rDNA gene sequences of strain Fea-10

2.5 Fea-10 全基因组草图测序与分析

采用 Illumina Miseq 高通量测序技术对菌株 Fea-10 全基因组草图进行测序. 测序数据使用 SOAPdenovo 软件进行组装. Fea-10 全基因组大小约为 7.25 Mb ,GC 含量为 73.36%. 将 Fea-10 全基

因组草图序列提交到 antiSMASH 网站 ,分析可能的次级代谢产物及抗生素生物合成基因簇 .结果见表 2. 该菌株具有产生较为丰富的次级代谢产物资源的潜力 ,有较高的开发利用价值.

表 2 Fea-10 全基因组序列 antiSMASH 分析结果

Tab. 2 The analysis of Fea-10 genome sequence by antiSMASH

| 基因簇类型 Type | 基因簇编号 Cluster number | 相似度最高的已知基因簇 Most similar known cluster | 相似度 / % Similarity |
|--------------------------|-------------------------|---|-----------------------|
| Nrps | 2 | Lividomycin_biosynthetic_gene_cluster | 10 |
| Nrps | 6 | | |
| Nrps | 8 | Mannopeptimycin_biosynthetic_gene_cluster | 48 |
| Nrps | 11 | Gobichelin_biosynthetic_gene_cluster | 33 |
| Nrps | 18 | Mannopeptimycin_biosynthetic_gene_cluster | 11 |
| T1-pks | 13 | Meridamycin_biosynthetic_gene_cluster | 60 |
| T1-pks | 20 | FR-008_biosynthetic_gene_cluster | 95 |
| T1-pks | 22 | | |
| T1-pks | 25 | | |
| T1-pks | 26 | | |
| T3-pks | 14 | Herboxidiene_biosynthetic_gene_cluster | 12 |
| Terpene | 1 | | |
| Terpene | 4 | Hopene_biosynthetic_gene_cluster | 76 |
| Terpene | 16 | Albaflavenone_biosynthetic_gene_cluster | 100 |
| Terpene | 24 | Kanamycin_biosynthetic_gene_cluster | 1 |
| Bacteriocin | 5 | | |
| Bacteriocin | 23 | | |
| Lasso peptide | 10 | Kanamycin_biosynthetic_gene_cluster | 7 |
| Siderophore | 7 | Desferrioxamine_B_biosynthetic_gene_cluster | 100 |
| Siderophore | 17 | | |
| Lantipeptide | 9 | SAL-2242_biosynthetic_gene_cluster | 100 |
| Ectoine | 12 | Ectoine_biosynthetic_gene_cluster | 100 |
| Nrps-T1 pks | 3 | SGR_PTMs_biosynthetic_gene_cluster | 100 |
| Terpene-Bacteriocin | 15 | Carotenoid_biosynthetic_gene_cluster | 54 |
| Thiopeptide-Lantipeptide | 19 | | |
| Nrps-T1 pks-Lantipeptide | 21 | Antimycin_biosynthetic_gene_cluster | 93 |

2.6 最适产角蛋白酶条件优化

发酵时间对角蛋白酶产量实验测定的结果表明 培养 36 h 后 ,该菌上清中酶活性达到最高值 ,其后趋于稳定(图 5) .

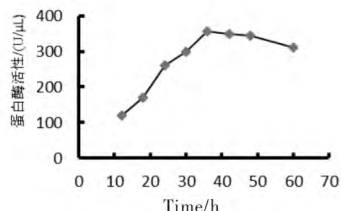


图 5 发酵时间对角蛋白酶产量的影响

Fig. 5 Effect of fermentation time on keratinase yield

在此基础上 ,取培养 36 h 温度分别设定为 25、30、35、40、45、50、55 和 60 °C 的发酵液测定无菌上

清的角蛋白酶活性. 发现温度为 35 °C 时 ,上清液中角蛋白酶活性最高(图 6) .

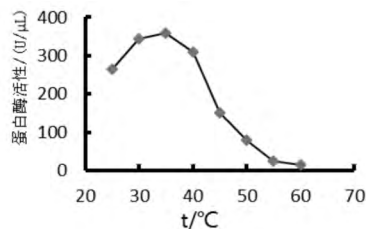


图 6 培养温度对角蛋白酶产量的影响

Fig. 6 Effect of temperature on keratinase yield

在最适培养时间和最适培养温度的条件下 ,测定培养基最适 pH 值结果表明 ,培养 36 h 后上清液中角蛋白酶活性显示 ,培养基初始 pH 为 7.5 时 ,角蛋白酶活性最高(图 7) .

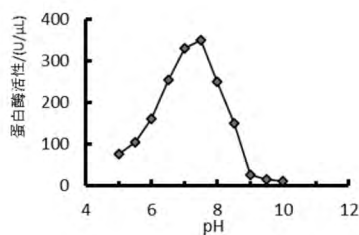


图7 培养基初始 pH 对角质蛋白酶产量的影响

Fig. 7 Effect of fermentation initial pH on keratinase yield

5 讨论

许多细菌、真菌和放线菌都可以降解角蛋白。其中放线菌越来越引起研究者的关注。主要是由于放线菌可以产生丰富的次级代谢产物,可以抑制病原菌。同时,放线菌的生活史有基质菌丝和气生菌丝阶段,这样的特点非常有助于侵入羽毛等硬质角蛋白,从而有助于角蛋白的完全降解。真菌虽然也有侵染能力强的特点,但是真菌往往具有致病性,从而限制了其工业应用。菌株 Fea-10 具有高效羽毛角蛋白降解能力,同时,对 Fea-10 的全基因组序列进行 antiSMASH 分析表明,该菌株具有 26 个潜在次级代谢产物生物合成基因簇。我们对 Fea-10 抑菌活性进行检测发现,该菌株对苹果腐烂菌、小麦根腐菌及小麦赤霉菌均具有拮抗作用(结果未展示)。这些都表明 Fea-10 有很好的应用前景,值得进一步研究。

Fea-10 的全基因组测序已经完成,这为设计引物,克隆角蛋白酶基因创造了有利条件。通过生物信息学软件和基因组注释分析,结合 ORF Finder、Blast、Multiple alignment 等在线分析工具发现该基因组中存在着多个可能的角蛋白酶编码基因,有较好的理论和应用研究价值。相关基因的异源表达工作将逐步展开。

参 考 文 献

[1] Kublanov I V, Perevalova A A, Slobodkina G B, et al. Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(1): 286-291.

[2] Son H J, Park H C, Kim H S, et al. Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis* [J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(3): 461-465.

[3] Suzuki Y, Tsujimoto Y, Matsui H, et al. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 102(2): 73-81.

[4] Macedo A J, da Silva W O, Gava R, et al. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(1): 594-596.

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

[6] Langeveld J P, Wang J J, Van de Wiel D F, et al. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2003, 188(11): 1782-1789.

[7] Verma A, Singh H, Anwar S, et al. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017, 37(4): 476-491.

[8] Gupta R, Rajput R, Sharma R, et al. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(23): 9931-9940.

[9] 齐志国, 张铁鹰, 董杰丽, 等. 角蛋白降解菌分离、鉴定及其降解机制研究[J]. 饲料工业, 2012, (17): 19-24.

[10] 聂康康. 一株高效羽毛角蛋白降解菌的分离鉴定、发酵试验及其角蛋白酶学性质研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.

[11] 王晶. 一株新的羽毛角蛋白降解菌的鉴定、研究与应用[D]. 上海: 东华大学, 2007.

[12] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004.

[13] 黄艳. 厌氧角蛋白降解菌 KD-1 的系统发育分析及其角蛋白酶研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.

[14] 陈亚楠, 黄涛, 唐中林, 等. 猪 *FOXO3* 基因的多态性和生长性状关联分析[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2016, 34(2): 154-157.