



高效降解羽毛角蛋白菌株的筛选与鉴定

李金婷, 路福平, 李 玉, 王建玲

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 以羽毛角蛋白作为唯一碳源和氮源, 从长期堆积腐烂羽毛的土壤中分离出一株高效降解羽毛角蛋白的菌株. 通过对该菌株形态特征观察、生理生化实验测定、16S rDNA 序列分析和 Biolog 系统鉴定, 初步鉴定为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), 且命名为地衣芽孢杆菌 F4. F4 在 50 °C 条件下摇瓶发酵 48 h, 角蛋白酶活达到 23 U/mL. 该菌能够降解完整的天然羽毛, 具有开发应用前景.

关键词: 角蛋白酶; 地衣芽孢杆菌; 筛选; 鉴定

中图分类号: Q816 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2010)06-0014-04

Screening and Identification of a High Efficient Keratin-Degrading Strain

LI Jin-ting, LU Fu-ping, LI Yu, WANG Jian-ling

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The strain F4 from environment soil was isolated by feather meal as its sole source of carbon and nitrogen. The strain F4 was identified as *Bacillus licheniformis* based on morphology observation, physicochemical characteristics, 16S rDNA sequence analysis and Biolog analysis. The keratinase activity reached 23 U/mL after 48 h of fermentation at 50 °C. The keratinases produced by this bacteria degraded natural feather without any treatment, and it had potential industrial application.

Keywords: keratinase; *Bacillus licheniformis*; screening; identification

近年来,随着我国畜牧业的迅速发展,如何开发新的蛋白质饲料资源替代鱼粉资源的不足是目前研究的热点^[1]. 羽毛中粗蛋白含量在 80%以上,氨基酸含量在 70%以上,含多种动物所需要的必需氨基酸^[2]. 生物转化羽毛粉可以替代豆粕、鱼粉添加到饲料中去,是一种新型优质的蛋白源. 但是,羽毛蛋白是一种高度交联的二硫键构成的角蛋白,不容易被胃蛋白酶、胰蛋白酶等一般蛋白酶降解^[3],因此难以被动物直接消化利用. 高温高压蒸煮和酸碱水解羽毛可以提高羽毛角蛋白消化吸收率,但是这两种方法会引起营养物质损失,还会造成环境污染. 微生物降解法能提高羽毛饲料的营养价值、节省能源、保护环境,还可得到优质的饲料产品^[2-3].

现在已分离到 30 多种可降解角蛋白的微生物^[4],

主要有细菌^[5-7]、真菌^[8-9]和放线菌^[10-11]. 但是,目前分离到的多数羽毛降解菌降解羽毛效果不理想,且大部分微生物降解羽毛尚需要一定的前处理,筛选能够快速、直接利用天然羽毛的微生物菌株更具有应用性^[12]. 本研究以羽毛角蛋白作为唯一碳源和氮源,从长期堆积腐烂羽毛的土壤中筛选分离出高效降解羽毛角蛋白的菌株,通过菌株形态特征观察、生理生化实验测定、16S rDNA 分析和 Biolog 系统对所分离菌株进行鉴定,并分析其对天然羽毛的降解程度.

1 材料与方法

1.1 土壤样品与羽毛来源

以长期堆积腐烂羽毛的土壤为土壤样品.

收稿日期: 2010-07-31; 修回日期: 2010-09-17

基金项目: 国家科技基础条件平台课题(2005DKA21204-10)

作者简介: 李金婷(1984—),女,内蒙古兴安盟人,硕士研究生; 通信作者: 路福平,教授, lfp@tust.edu.cn.

天然羽毛来源于天津市津南区屠宰场,清水洗净烘干.培养基用羽毛粉,天然羽毛用洗涤剂洗净,清水煮沸 1 h, 60 °C 烘干,粉碎机粉碎.测酶活用羽毛粉,培养基用羽毛粉过 20 目筛.

1.2 培养基

初筛培养基(g/L):羽毛粉 20,琼脂粉 20.

富集培养基(g/L):羽毛粉 20, K₂HPO₄ 1, KH₂PO₄ 0.4, NaCl 0.4, 蛋白胨 10, 酵母粉 5.

分离培养基为 LA 培养基(g/L):蛋白胨 10, 酵母浸出粉 5, NaCl 10, 琼脂粉 20.

筛选培养基:在富集培养基中加入完整的天然羽毛.

种子培养基为 LB 液体培养基:参见文献[13].

发酵培养基为羽毛粉培养基^[14](g/L):羽毛粉 20, K₂HPO₄ 1, KH₂PO₄ 0.4, NaCl 0.4, pH 自然.

1.3 主要仪器

HYG-II 型回转式恒温调速摇瓶柜,上海欣蕊自动化设备有限公司;DYY-III 型电泳槽、DYY-III-6B 型稳压稳流电泳仪,北京六一仪器厂;SP-2012UV 型紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;WFJ 2000 型紫外可见分光光度计,尤尼柯上海仪器有限公司;HH-B11-420 型电热恒温培养箱,天津市实验室仪器厂;PTC-200 型 PCR 基因扩增仪, MJ Research 公司;全自动凝胶成像仪,美国 Syngene 公司;CHB 型普通光学显微镜,日本 Olympus 公司;Microstaton 自动微生物分析系统,美国 Biolog 公司;Nova NanoSEM 230 扫描电镜,美国 FEI 公司.

1.4 筛选方法

1.4.1 初筛及富集培养

将 5 g 土壤样品分散于 50 mL 的蒸馏水中,涂布于初筛培养基,分别在 37、50 °C 培养 24 h. 用 5 mL 无菌水冲洗长出的菌落,接入富集培养基进行富集培养 48 h. 涂布分离,挑取单个菌落平板划线分离.

1.4.2 复筛

羽毛分解的定性测定:将菌接种到含完整羽毛的三角瓶中摇瓶发酵,观察 5 d 内培养液中全羽毛的降解程度.

羽毛发酵的定量测定:将振荡培养 48 h 的发酵液过滤,甲醛滴定法测定滤液内氨基氮含量,未经接种的培养基作为对照组取样,测定方法同上,比较滤液内氨基氮含量是否增加.

1.5 鉴定方法

1.5.1 菌落与菌体形态观察

将菌株在 LA 平板上进行划线分离,培养 12 h,

观察菌落形状、颜色、表面质地和菌落边缘.

菌体进行革兰氏染色后,在光学显微镜下观察菌体的形状、大小及特征.

1.5.2 生理生化特征测定

参照《常见细菌系统鉴定手册》^[15]和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[16]中的有关方法进行生理生化特征的测定.

1.5.3 16S rDNA 序列分析

扩增细菌 16S rDNA 的通用引物^[17]为 P1:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTAG-3', P2:5'-TACGGCTACCTTGTACGACT-3'. PCR 条件为 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 5 min.

1.5.4 Biolog 系统鉴定

参考文献[18]的方法.

1.6 酶活力的测定方法

酶活力测定参考 Gradisar 的方法^[19],并稍作修改:取发酵液过滤离心后的上清液 1 mL,加 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.8) 2 mL,然后加入 10 mg 羽毛粉,置于 50 °C 水浴保温反应 1 h(不断振摇),而后加入 2 mL TCA 终止反应. 30 min 后离心取上清液,于 280 nm 处比色测定吸光度. 对照同上,只是先加 TCA 终止液.

酶活力定义:在上述反应条件下,吸光度每增加 0.01 为 1 U. 重复 3 次,取平均值.

1.7 扫描电镜观察

在含有完整天然羽毛的培养基中,F4 摇瓶发酵培养 48 h,取出羽毛,进行清洗和干燥.将羽毛样品送到天津师范大学扫描电镜中心进行制样和扫描电镜拍摄.未处理羽毛为未接菌的培养基中的天然羽毛,其他条件与处理的羽毛样品相同.

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

经过以羽毛角蛋白作为唯一碳源和氮源的初筛后,共筛选出 18 株菌.将初筛获得的 18 株菌富集培养、划线分离和复筛,共筛选获得 3 株降解羽毛效果好的菌株(见表 1),且 3 株菌的生长温度都是 50 °C.

表 1 菌株的筛选结果

Tab.1 Screening results of stains

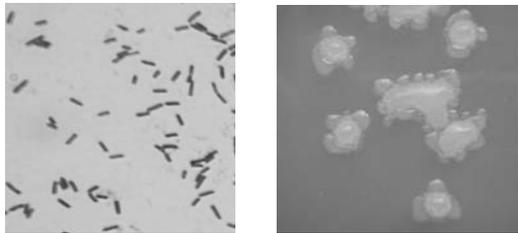
菌株	脱毛时间/d	氨基氮增加量/(mg·mL ⁻¹)
F2	5	0.688 2
F3	5	0.619 8
F4	2	0.886 2

如表 1 所示,在筛选获得的 3 株菌中,F4 降解羽毛效果最好. 该菌在 50 ℃条件下发酵培养 1 d,即可见培养基中天然羽毛的羽枝开始脱落;发酵 2 d 天然羽毛的羽枝完全脱落,羽梗和羽枝被部分降解. 发酵 48 h,发酵液中氨基氮增加 0.886 2 mg/mL.

2.2 菌体、菌落形态特征

将筛选获得的羽毛降解菌 F4 在 LA 平板上培养 12 h,进行菌落形态观察. 然后挑取单菌落进行革兰氏染色,进行菌体形态观察.

F4 菌体形态如图 1(a)所示,菌体呈直杆状,约(1.3 ~ 1.8) μm × (3.0 ~ 5.0) μm,芽孢中生,少有两端生. 菌落形态如图 1(b)所示,在 LA 平板上,50 ℃恒温培养 12 h,菌落呈乳白色,圆盘状,边缘突起,表面光滑,凸起,不透明.



(a) 菌体形态 (b) 菌落形态

图 1 菌株 F4 的菌体与菌落形态

Fig.1 Thalli and colony morphology of the strain F4

2.3 菌株的生理生化特征

芽孢杆菌个体微小,形态特征简单,在分类鉴定中需要借助许多生理生化特征来加以鉴别. 菌株 F4 生理生化实验结果见表 2.

表 2 菌株 F4 的生理生化实验结果

Tab.2 Physiological and biochemical characteristics of the strain F4

项目	结果	项目	结果
葡萄糖	+	三糖铁产 H ₂ S	+
乳糖	-	三糖铁扩散生长	-
糊精	+	明胶液化实验	-
MR	-	精氨酸双水解酶	+
V-P	+	接触酶反应	+
西蒙氏柠檬酸盐	-	淀粉水解酶	+
硝酸盐还原	+	卵磷脂酶	-
吡啉实验	-	多肽抗菌素	+
三糖铁产酸产气	+		

注:“+”代表结果呈阳性,“-”代表结果呈阴性.

2.4 16S rDNA 序列分析

提取菌株 F4 的基因组,进行 16S rDNA 基因扩增,切胶回收. 将回收产物送到英骏生物技术有限公司进行测序.

如图 2 所示,该菌 16S rDNA 基因约为 1 500 bp,GenBank 的登录号:HM006903. 使用NCBI 的Blast 进

行 16S rDNA 的相似性比对,结果显示 F4 与 *Bacillus licheniformis* MML2501 等地衣芽孢杆菌菌株的相似性为 99%.

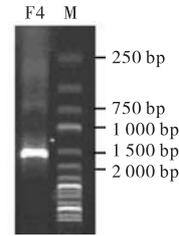


图 2 16S rDNA 的 PCR 扩增图

Fig.2 PCR analysis of 16S rDNA of the strain F4

2.5 Biolog 系统鉴定

不同种类的微生物利用碳源具有特异性,微生物在利用碳源进行新陈代谢时,产生的酶能使四唑类物质发生颜色反应,Biolog 基于以上原理建立了每种微生物的特征指纹图谱,即与微生物种类相对应的数据库.

将培养 24 h 后的 F4 利用不同碳源的图谱与数据库比对,结果为 PROB 95%,SIM 为 0.548 ≥ 0.5, DIST 为 7.00 = 7.00. Biolog 系统鉴定结果给出,F4 属于地衣芽孢杆菌.

2.6 羽毛角蛋白降解效果

2.6.1 扫描电镜观察

将长约 0.1 cm 的羽毛样品固定在样品架上,喷金 3 min,制得扫描电镜样品,进行扫描电镜观察.

如图 3 所示,未处理的天然羽毛表面光滑,结构坚硬致密,羽枝与羽轴连接处完好无破损;如图 4 所示,天然羽毛经过 F4 发酵降解 48 h 后,羽枝与羽轴连接处断裂,羽枝脱落并被降解,留下的羽梗表面分层破损,结构被破坏.

2.6.2 角蛋白的酶活力

将 1%的种子液接入发酵培养基中,50 ℃条件下 120 r/min 摇瓶发酵 48 h,发酵液中角蛋白酶活力达到 23 U/mL.

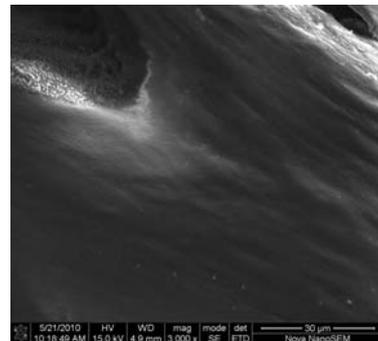


图 3 未处理的天然羽毛

Fig.3 Natural feather without any treatment

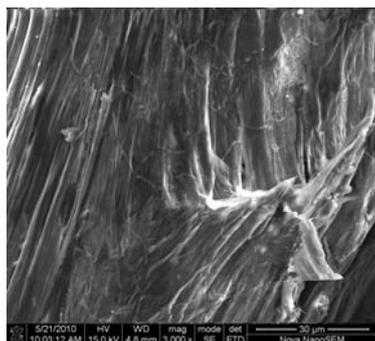


图4 发酵处理 48 h 的天然羽毛

Fig.4 Natural feather after 48 h of fermentation

3 结 语

近几年,筛选出的羽毛角蛋白降解菌主要集中在真菌和放线菌,本研究从长期堆积腐烂羽毛的土壤中分离到一株能够高效降解羽毛角蛋白的细菌 F4,丰富了角蛋白降解菌的资源. F4 能以羽毛角蛋白作为唯一碳源和氮源生长. 结合 16S rDNA 序列分析结果和 Biolog 系统鉴定结果,初步鉴定 F4 为地衣芽孢杆菌,并保藏于天津科技大学微生物菌种保藏管理中心,菌种号为 TCCC11558. 该菌在 50 °C 条件下摇瓶发酵 48 h,角蛋白酶活达到 23 U/mL.

大部分微生物降解羽毛尚需要一定的前处理,如地衣芽孢杆菌 PWD-1,其他芽孢杆菌 *Bacillus pseudofirmus*、*Bacillus* sp. FK46、短小芽孢杆菌 FH9 等只能降解高压蒸煮过的羽毛^[20]. Zedani 等^[21]报道的分离自摩洛哥土壤中的 8 株细菌,都对处理过的羽毛有不同程度的降解作用. 因此,筛选能够快速、直接利用天然羽毛的微生物菌株更具有应用性. 本研究中菌株 F4 不仅能以羽毛角蛋白作为唯一碳源和氮源,还能够降解未处理的天然羽毛,仅发酵 1 d 即可见天然羽毛的羽枝有明显脱落,发酵 2 d 羽枝完全脱落,羽枝和羽梗大部分被降解. 该菌能够高效降解天然羽毛的特性,使得该菌具有开发应用的良好前景.

本研究的后续工作将克隆菌株 F4 的降解羽毛的角蛋白酶基因,构建高效降解羽毛的基因工程菌株,为工业化生产奠定基础.

参考文献:

- [1] 王政,郭士兵,姚大伟,等. 高效降解角蛋白菌株的分离筛选与鉴定[J]. 中国农学通报,2009,25(18):22-24.
- [2] 杨建强,汤国营. 角蛋白酶研究发展[J]. 生物技术通讯,2005,16(2):201-203.
- [3] Marshall R C,Orwin D F,Gillespie J M. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin[J]. Electron

Microsc Rev,1991,4(1):47-83.

- [4] Onifade A A, Al-Sane N A, Al-Musallam A A, et al. A Review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources[J]. Bioresource Technology, 1998,66(1):1-11.
- [5] Kim J M, Lim W J, Suh H J. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste[J]. Process Biochem, 2001, 37(3):287-291.
- [6] Riffel A, Lucas F, Heeb P, et al. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin[J]. Arch Microbiol, 2003, 179(4):258-265.
- [7] Nam G W, Lee D W, Lee H S, et al. Native feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase producing thermophilic anaerobe[J]. Arch Microbiol, 2002, 178(6):538-547.
- [8] Gradisar H, Kern S, Friedrich J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 53(2):196-200.
- [9] Tsuboi R, Ko I J, Takamori K, et al. Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophyte* with enzymatic activity at acidic pH[J]. Infection and Immunity, 1989, 57(11):3479-3483.
- [10] Ignatova Z, Gousterov A, Spassov G, et al. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*[J]. Can J Microbiol, 1999, 45(3):217-222.
- [11] Letourneau F, Soussotte V, Bressollier P, et al. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K1-02: A new isolated strain[J]. Lett Appl Microbiol, 1998, 26(1):77-80.
- [12] 蔡成岗,郑晓冬. 角蛋白酶的来源、理化性质与生物工程研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(4):111-114.
- [13] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed. New York: Gold Spring Harbour Laboratory Press, 2001:1595.
- [14] Giongo J L, Lucas F S, Casarin F, et al. Keratinolytic protease of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity[J]. Microbiol Biotechnol, 2007, 23(3):375-382.
- [15] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001:62-65, 349-398.

(下转第 29 页)