

网络出版时间:2018-01-10 16:16

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2018.04.016

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180110.1615.032.html>

基于基因组改组技术的角蛋白酶 高产菌株选育研究

舒伟学,马怡茗,李晓霞,张晋龙,柯 欣,颜 霞,颜 华,贾良辉

(西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】筛选具有高效角蛋白水解活性的微生物,为提高废弃羽毛中角蛋白资源的利用奠定基础。【方法】采用梯度稀释法,以羽毛作为惟一碳氮源对土样中的产角蛋白酶菌株进行筛选,筛选可高效降解羽毛的细菌。通过菌株的形态、生理生化特性以及 16S rDNA 序列分析,对菌株进行分类鉴定,并探讨其最适发酵条件。利用硫酸二乙酯(DES)和亚硝基胍(NTG)对目的菌株进行诱变,确定最适诱变条件,并进行原生质体融合,通过基因组改组选育角蛋白酶高产菌株。【结果】分离筛选到 1 株具有较强羽毛降解能力的菌株 ZJT01,该菌落圆形凸出,革兰氏染色呈阳性,酪素水解、硝酸盐利用、柠檬酸利用等生理生化试验均呈阳性。结合菌株 16S rDNA 同源序列比对分析,初步鉴定其为节杆菌(*Arthrobacter* sp.)。菌株 ZJT01 产角蛋白酶的最适发酵温度和时间分别为 32 ℃ 和 72 h。其 DES 最适用量为 9 μ L/mL,诱变时间为 20 min;NTG 的最适合质量浓度是 0.6 mg/mL,处理时间为 15 min。原生质体制备的最佳条件为:溶菌酶终质量浓度 10 mg/mL,酶解温度 37 ℃,酶解 0.5 h。经过硫酸二乙酯(DES)和亚硝基胍(NTG)分别诱变处理,获得角蛋白酶活性提高的菌株 DES-2 和 NTG-2;对其进行 3 轮基因组改组后,筛选到 2 株角蛋白酶活性比亲本菌株 ZJT01 提高了 5.48 倍的重组菌株,且其产酶活性可稳定遗传。【结论】通过基因组改组技术获得了 2 株角蛋白酶活性大幅提高的菌株 F3-5 和 F3-6,这 2 株菌对羽毛的降解效果较亲本菌株 ZJT01 明显提高,具有较好的应用前景。

【关键词】 角蛋白酶;节杆菌属;诱变;基因组改组

【中图分类号】 Q93-331

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2018)04-0137-10

Breeding of microorganisms with high keratinase production based on genome shuffling

SHU Weixue, MA Yiming, LI Xiaoxia, ZHANG Jinlong,
KE Xin, YAN Xia, YAN Hua, JIA Lianghui

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The aim of this study was to screen microorganisms with high keratinolytic activity for improving the utilization of keratin resources in poultry. 【Method】 By serially dilution method, microorganisms with high keratinolytic activity were isolated from soil sample using feather as the sole source of carbon and nitrogen. Through the morphological and physiological characteristics and 16S rDNA sequence analysis, the strain was identified and the optimum fermentation conditions were investigated. The target strain was subjected to diethyl sulfate (DES) and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) mu-

【收稿日期】 2017-02-20

【基金项目】 中央高校基本科研业务费专项(Z109021426, Z109021432);高校博士点基金项目(Z20120204120034, Z20120204120042);陕西省农业科技创新与攻关项目(2015NY066)

【作者简介】 舒伟学(1990—),女,安徽安庆人,硕士,主要从事微生物资源与利用研究。E-mail: 1101129339@qq.com

【通信作者】 贾良辉(1977—),男,浙江义乌人,副教授,博士,主要从事微生物代谢工程和化学生物学研究。

E-mail: jialianghui@nwsuaf.edu.cn

tagenesis firstly to determine optimal mutagenesis condition, and then strains with higher keratinase production were screened by genome shuffling after protoplast fusion. 【Result】 A bacterial strain ZJT01 with high feather degrading ability was isolated and the colony presented circular projection. Gram stain, casein hydrolysis, utilization of nitrate, and utilization of sodium all showed positive and 16S rDNA sequence analysis designated it as *Arthrobacter* sp. The optimum fermentation temperature and time were 32 °C and 72 h, respectively. The DES mutagenic optimal condition was 9 $\mu\text{L/mL}$ for 20 min and the NTG condition was 0.6 mg/mL for 15 min. The optimal condition for protoplast preparation was 10 mg/mL lysozyme for 30 min at 37 °C. Two mutant strains named DES-2 and NTG-2 with improved keratinase activity was obtained by treatment with diethyl sulfate (DES) or N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG). After three rounds of genome shuffling, two improved recombinants were obtained with genetic stable keratinase activity increased by 5.48 times. 【Conclusion】 Two strains with significantly increased keratinase activity and good application prospect (F3-5 and F3-6) were obtained.

Key words: keratinase; *Arthrobacter*; mutagenesis; genome shuffling

角蛋白是一类具有结缔和保护功能的纤维状蛋白质,主要存在于动物皮、毛、鳞、羽、甲、蹄、角、爪、喙、丝及其他表皮结构中^[1-2]。羽毛的主要成分是角蛋白,其蛋白质含量高达 90%,且富含丝氨酸、脯氨酸、赖氨酸、色氨酸、胱氨酸等多种氨基酸^[3]。由于角蛋白含有丰富的二硫键,不溶于水且极难降解,很难被一般的蛋白酶(如胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶等)分解,因此随着现代家禽养殖业的规模化发展,羽毛废弃物带来的环境污染问题日益突出,其资源化利用显得越发重要^[4-5]。

传统的羽毛降解方法极易造成二次环境污染且效率不高,因此寻找高效清洁的生物降解法迫在眉睫。目前,很多能够降解角蛋白的微生物已经被报道,包括芽孢杆菌^[6-7]、放线菌^[8-9]和真菌^[10-11],这些微生物通过分泌角蛋白酶来完成角蛋白的降解。由于野生型菌株的角蛋白酶产量比较低,随着国内外化妆品行业和饲料食品市场对角蛋白酶需求量的逐渐增加,传统的生产方法已不能满足市场要求,而利用基因组改组技术选育角蛋白酶高产菌株正可弥补这一短板。基因组改组技术是对菌株进行定向改造从而获得有价值表型的有效方法,其原理是通过多母本递进式融合随机重组,从而快速选育表型改进较大的杂交菌种^[12-13]。该技术已经成功地用于工业微生物多基因控制表型的改良,如通过基因组改组技术提高了阿维链霉菌 NEAU1069 (*Streptomyces avermitilis* NEAU1069) 产多拉菌素的产量^[14],提高了酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的酒精产量和对酒精的耐受性等^[15]。但利用基因组改组技术获得角蛋白酶高产菌株的研究尚未见报道。

本试验通过对养鸡场羽毛堆砌处土壤进行分离

筛选,获得可高效降解羽毛的细菌,对其进行鉴定分类,再利用基因组改组技术进行选育,以期获得高产角蛋白酶菌株,为高效清洁地生物降解羽毛角蛋白,完成其资源化利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样采集 供试土样采自陕西省杨陵区养鸡场长期堆积羽毛废弃物处的土壤。

1.1.2 培养基 (1)种子培养基。蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 1 g, KH_2PO_4 0.4 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.4~7.6。

(2)选择培养基。羽毛粉 10 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 1 g, KH_2PO_4 0.4 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.4~7.6。

(3)发酵培养基。羽毛粉 10 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 0.7 g, KH_2PO_4 0.35 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.4~7.6。

(4)LB 培养基。胰蛋白胨 10 g, 酵母浸粉 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0。

(5)再生培养基。蔗糖 103 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, 酵母提取物 3 g, 胰蛋白胨 4 g, 葡萄糖 15 g, K_2HPO_4 3 g, KH_2PO_4 1 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。

(6)牛奶培养基。脱脂奶粉 5 g, 溶于蒸馏水后定容至 500 mL, 115 °C 灭菌 25 min; 琼脂粉 20 g, 溶于蒸馏水后定容至 500 mL, 121 °C 灭菌 30 min。使用时将两者混合均匀。

1.1.3 试剂 (1)PFB 缓冲液。琥珀酸钠 40.5 g, 蔗糖 171.0 g, 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.1),

蒸馏水 1 000 mL,pH 值 7.0。

(2)营养盐缓冲液。NaCl 0.3 g, K_2HPO_4 0.09 g, KH_2PO_4 0.36 g, $MgSO_4$ 0.15 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.2 方法

1.2.1 微生物的分离筛选 称取 1 g 土样加入装有 10 mL 无菌生理盐水的锥形瓶中,30 ℃、150 r/min 振荡 30 min,再用无菌水梯度稀释成 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 。取不同稀释梯度溶液均匀涂布在以羽毛粉为惟一碳氮源的选择培养基上,筛选出能降解羽毛的单菌落。将其接入发酵培养基中扩大培养,观察羽毛降解情况,选取羽毛降解最彻底的菌株(命名为 ZJT01)划线分离纯化。

1.2.2 菌株 ZJT01 的生理生化特性测定 将菌株 ZJT01 接种到 LB 固体培养基上,37 ℃ 恒温培养 12 h,通过电镜扫描观察菌株的形态特征,并参考文献[16-17]进行菌株 ZJT01 生理生化特性的测定。

1.2.3 16S rDNA 序列测定与系统发育分析 挑取 1.2.1 节中获得的菌株 ZJT01 单菌落于 10 mL LB 液体培养基,于 37 ℃、180 r/min 振荡培养 24 h,提取总 DNA,PCR 扩增 16S rDNA,通用引物是 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。PCR 扩增反应体系 50 μ L: 10 $\times$ Buffer(含 Mg^{2+}) 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L,上下游引物(27F、1522R)各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, 2.5 U/ μ L Taq 酶 0.5 μ L, ddH₂O 37.5 μ L。PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 复性 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,33 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物胶回收后克隆至 pMD18-T 载体,转化 *E. coli* DH5 α ,阳性克隆委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序。获得其 16S rDNA 序列后,在 GenBank 数据库中运用 BLAST 进行比对分析,通过 Mega 5.0 以 Neighbour-Joining 方法构建系统进化树。

1.2.4 菌株 ZJT01 生长曲线的测定 挑取 ZJT01 单菌落接种于 LB 液态培养基中,37 ℃、150 r/min 振荡培养 12 h 后,按培养基体积 5% 的接种量再接种于 LB 液态培养基中,37 ℃、150 r/min 振荡培养,每隔 2 h 取 5 mL 菌液,以未接种的 LB 液态培养基作为空白对照,进行光密度($OD_{600\text{ nm}}$)测定,以时间为横坐标,OD 值为纵坐标,绘制生长曲线。

1.2.5 角蛋白酶活性的测定 (1)粗酶液的制备。挑取菌株 ZJT01 单菌落接种于种子培养基中,37 ℃、150 r/min 振荡培养 24 h。按培养基体积 5% 的

接种量接种于发酵培养基中,37 ℃、150 r/min 振荡培养 72 h,离心收集发酵液并用 0.22 μ m 滤膜过滤其上清液,除去全部菌体,得到上清液即粗酶液。

(2)角蛋白酶活性。取 1 mL 粗酶液,置于 40 ℃ 水浴锅中预热 2 min,加入 1 mL 酪蛋白(提前预热),水浴保温 10 min 后,加入 0.4 mol/mL 三氯乙酸 2 mL,终止反应,将试管置于水浴中继续保温 20 min,8 000 r/min 离心 10 min 收集上清液;取上清液 1 mL,加 0.4 mol/mL 碳酸钠 5 mL,福林试剂 1 mL,振荡 1 min,继续置于水浴中保温 20 min,然后进行光密度($OD_{660\text{ nm}}$)测定。以不加酶作为空白对照,在上述反应条件下,将每分钟产生 1 μ g 酪氨酸定义为 1 个酶活性单位。

1.3 菌株 ZJT01 发酵和反应条件的优化

1.3.1 降解羽毛的最适发酵温度和时间 挑取菌株 ZJT01 单菌落接种于种子培养液中,37 ℃、150 r/min 振荡培养 24 h。按培养基体积 5% 的接种量接种于发酵培养基中,分别于 28,30,32,37 ℃ 下,150 r/min 振荡培养,发酵过程中每间隔 12 h 取样 1 次,重复 3 次测定角蛋白酶活性,分析发酵温度和时间对菌株 ZJT01 降解羽毛的影响。

1.3.2 粗酶液的最适反应 pH 将 1.2.4 粗酶液与不同 pH(4,5,6,7,8,9,10,11)缓冲液混合,40 ℃ 保温 30 min 后,测定其剩余的角蛋白酶活性,分析粗酶液的最适反应 pH。不同 pH 缓冲液的配制方法为:用 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠配制 pH 4.0~6.0 的缓冲液,50 mmol/L Tris-HCl 配制 pH 7.0~8.0 的缓冲液,50 mmol/L 甘氨酸-NaOH 配制 pH 9.0~11.0 的缓冲液。

1.3.3 粗酶液的最适作用温度 将 1.2.4 粗酶液分别置于不同温度(30,35,40,45,50,55 ℃)下保温 30 min 后,测定其剩余的角蛋白酶活性,分析粗酶液的最适作用温度。

1.4 菌株 ZJT01 的诱变

1.4.1 菌悬液的制备 将菌株 ZJT01 接种于 LB 液体培养基中,培养至对数期,将菌液于 4 ℃ 放置 1 h,再于 37 ℃、150 r/min 振荡培养 30 min,使其同步生长。菌液离心弃上清,用营养盐洗 2 次,最后使菌体重新悬浮于营养盐中,将其加入盛有无菌玻璃珠的三角瓶,30 ℃、150 r/min 振荡培养 30 min,用营养盐将菌体配成约 10^8 CFU/mL。

1.4.2 硫酸二乙酯(DES)诱变 取菌悬液 5 mL,分别加入 15,30,45 μ L DES,使其用量分别为 3,6,9 μ L/mL,于 30 ℃、150 r/min 分别处理 5,10,20

min。诱变处理结束后,在每支试管中加入质量分数 2% 的硫代硫酸钠 0.5 mL 终止反应,离心弃上清,用营养盐洗 2 次,最后梯度稀释至 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ,取不同稀释梯度涂布在选择培养基上。于 37 ℃ 培养 7 d 后,对平板上的菌落进行计数。计算致死率,选择最佳诱变条件。将每个菌落接种到牛奶培养基上,于 37 ℃ 培养箱中培养,根据水解圈检测其角蛋白酶活性。

致死率=(对照组菌落数-诱变组菌落数)/对照组菌落数 $\times 100\%$ 。

1.4.3 亚硝基胍(NTG)诱变 取菌悬液 5 mL,加入一定量的 NTG,使其终质量浓度分别为 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL,于 30 ℃、150 r/min 分别处理 15, 20, 25 min。诱变处理结束后,加入 30 mL 营养盐,离心弃上清后用营养盐洗 2 次,最后梯度稀释至 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ,取不同稀释梯度涂布在选择培养基上。菌落处理及角蛋白酶活性测定方法与 1.4.2 同。

1.5 原生质体的制备与基因组改组

1.5.1 制备条件优化 将经过 DES 和 NTG 诱变筛选得到的优秀菌株作为出发菌株,按培养基体积 5% 的接种量分别接种到 LB 液体培养基中,30 ℃、150 r/min 培养至对数期,将菌液于 4 ℃ 放置 1 h,再于 37 ℃、150 r/min 振荡培养 30 min,使其同步生长。菌液离心弃上清,用 PFB 洗 2 次,最后使菌体重新悬浮于 PFB 中,将其加入装有无菌玻璃珠的三角瓶中,30 ℃、150 r/min 振荡培养 30 min,用 PFB 将菌体配成约 10^8 CFU/mL。取 5 mL 菌悬液加入溶菌酶,酶解后离心收集菌体除去酶,用 PFB 洗 2 次,最后梯度稀释至 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ,取不同稀释梯度涂布在再生培养基上。于 37 ℃ 培养 4 d 后对平板上的菌落进行计数,通过计算原生质体形成率,选择最合适的处理条件。

原生质体形成率=(酶解前菌落数-酶解后菌落数)/酶解前菌落数 $\times 100\%$ 。

(1)溶菌酶质量浓度。于 37 ℃、酶解 1 h 的条件下,对菌株在溶菌酶终质量浓度为 8, 10, 20, 30 mg/mL 的原生质体形成率进行分析。

(2)酶解温度。在溶菌酶终质量浓度为 10 mg/mL,酶解时间 1 h 条件下,对菌株在 23, 30, 33, 37 ℃ 时的原生质体形成率进行分析。

(3)酶解时间。于 37 ℃,溶菌酶终质量浓度为 10 mg/mL 的条件下,对菌株酶解到 0.5, 1.0, 1.5,

2.0 h 时的原生质体形成率进行分析。

1.5.2 原生质体的灭活和基因组改组 将 DES 和 NTG 突变株原生质体按照 1:1 混合,平均分成 2 份,一份在紫外下照射 30 min,另一份在 60 ℃ 水浴锅中处理 30 min 进行灭活,各取 2 种灭活的原生质体 500 μ L 混合,8 000 r/min 离心 10 min 富集原生质体,将菌体重新悬浮在 100 μ L PFB 中,加入 900 μ L 质量分数 40% 的 PEG 6000,37 ℃、150 r/min 振荡处理 10 min,加入 5 mL PFB,8 000 r/min 离心收集菌体,用 PFB 洗涤 2 次,最后梯度稀释至 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ,取不同稀释梯度涂布在再生培养基上,平板上长出的单菌落即为重组子。

1.5.3 突变株的筛选 将筛选到的突变株重组子接种于牛奶培养基上进行初筛,由于可以产生角蛋白酶的菌落会水解培养基中的酪蛋白,从而出现水解圈,而水解圈直径与酶活性呈正相关,因此水解圈直径比出发菌株大的即为正突变菌株。将筛选的正突变重组子和出发菌株分别接种于 LB 液体培养基中,37 ℃、150 r/min 振荡培养至对数生长期,按培养基体积 5% 的接种量将菌液接种于发酵培养基中,37 ℃、150 r/min 振荡培养 72 h,测定角蛋白酶活性,进行复筛。

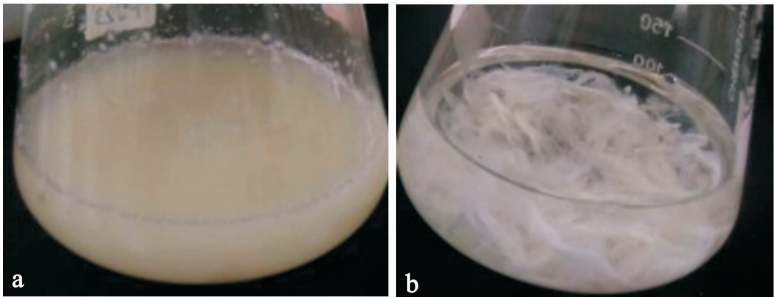
1.5.4 重组菌株遗传稳定性的检测 以出发菌株作为对照,将通过 3 轮基因组改组筛选得到的角蛋白酶活性增加的重组菌株,连续传代 5 次后发酵培养,检测角蛋白酶活力,确定其遗传稳定性。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选及鉴定

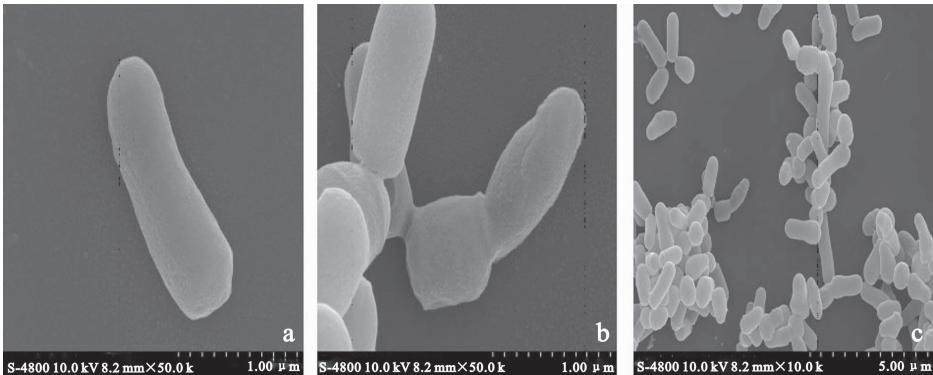
2.1.1 菌落形态特征 从羽毛废弃物处的土壤中分离得到 7 株可降解羽毛的菌株,通过发酵观察,发现 1 株能够将羽毛完全降解的菌株,其余 6 株只能降解羽毛小枝,而不能降解羽毛梗,因此选择该菌株进行后续研究,并将该菌株命名为 ZJT01。

将菌株 ZJT01 接种于发酵培养基中,32 ℃、150 r/min 下培养 7 d 左右,可观察到菌株基本能将羽毛完全降解(图 1)。菌株 ZJT01 在 LB 培养基平板上 37 ℃ 恒温培养 12 h,通过扫描电镜观察发现,细胞呈现不规则的杆状和棒状,棒状细胞呈现“V”字形态(图 2)。整个生命周期中出现球状和杆状型细胞。球状细胞直径为 0.6~0.8 μ m,杆状细胞宽为 0.5~0.8 μ m,长为 1.0~2.0 μ m。菌株在生命周期中未形成孢子,菌落为黄色,圆形凸出,不透明。



a. 接菌株 ZJT01;b. 未接菌对照
a. Culture ZJT01;b. Uncultured control

图 1 菌株 ZJT01 对 32 ℃下培养 7 d 羽毛的降解效果
Fig.1 Feather degradation by strain ZJT01 after 7 d at 32 ℃



a. 杆状细胞;b. “V”字形态;c. 球状细胞
a. Club cell;b. V-forms shape;c. Cocci cell

图 2 菌株 ZJT01 的扫描电镜观察
Fig.2 Scanning electron micrographs of strain ZJT01

2.1.2 菌株 ZJT01 的生理生化特征 菌株 ZJT01 20~37 ℃,能够在 pH 值为 6~9 的环境中生长,只生长不需要添加额外的生长因子,为革兰氏阳性好氧菌,菌株能在 4~37 ℃下生长,最佳生长温度为 能在质量分数小于 6%的 NaCl 中生长,耐盐能力较差,能利用葡萄糖、蔗糖、阿拉伯糖和甘露醇(表 1)。

表 1 菌株 ZJT01 的生理生化特性
Table 1 Physiological characteristics of strain ZJT01

试验项目 Test item	结果 Result	试验项目 Test item	结果 Result
D-甘露醇 D-Mannitol	+	吡啶 Indole	+
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	+	硝酸盐利用 Utilization of nitrate	+
乳糖 Lactose	—	柠檬酸盐利用 Utilization of sodium citrate	+
蔗糖 Sucrose	+	H ₂ S 试验 H ₂ S production	—
鼠李糖 L-Rhamnose	—	卵磷脂酶 Lecithinase	—
革兰氏染色 Gram stain	+	甲基红测试 M. R. test	—
石蕊牛奶 Litmus milk	还原 Reductive	V. P 测试 V. P test	—
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	NaCl 耐受性/% NaCl tolerance	0~6
纤维素水解 Cellulose hydrolysis	—	生长 pH Growth pH	6~9
酪素水解 Casein hydrolysis	+	生长温度 Growth temperature	20~37 ℃
明胶水解 Gelatin liquefactions	—		

注:“+”表示阳性反应;“—”表示阴性反应。
Note:“+” means positive;“—” means negative.

2.1.3 菌株 ZJT01 16S rRNA 序列分析及系统发育树构建 菌株 ZJT01 的 16S rDNA 序列全长为 1 515 bp,对 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对分析发现,菌株 ZJT01 与金黄色节杆菌 TC1 (*Arthrobacter aurescens* TC1)和节杆菌

Rue61a(*Arthrobacter* sp. Rue61a)的序列具有很高的相似性,达到 99.9%(图 3)。综合菌株 ZJT01 的形态特征和生理生化特性,初步鉴定菌株 ZJT01 为节杆菌(*Arthrobacter* sp.)。

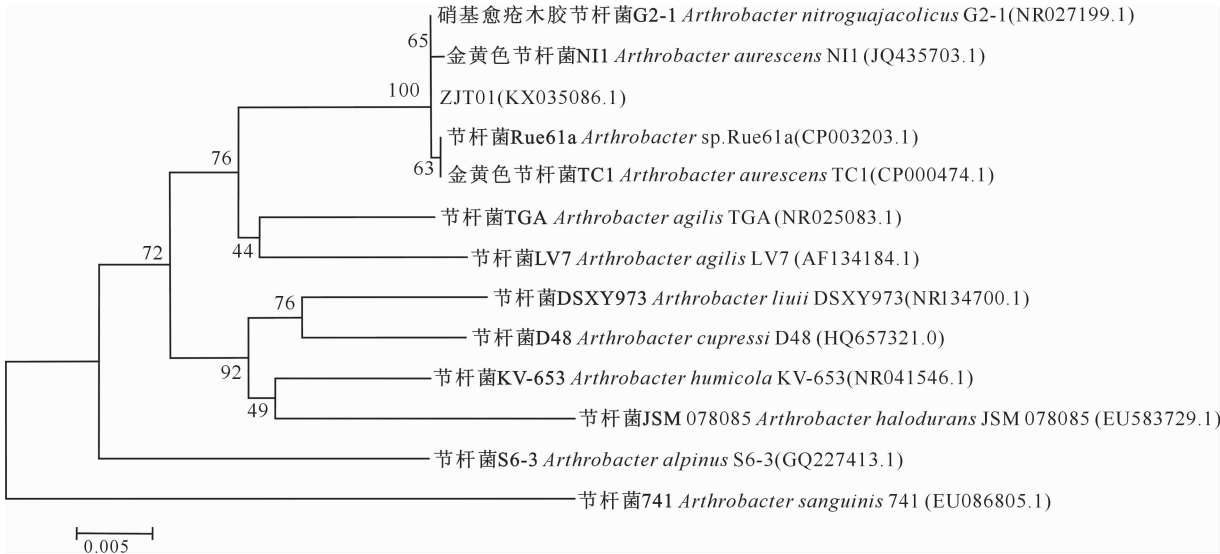


图 3 基于 16S rDNA 序列构建的菌株 ZJT01 的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic analysis of strain ZJT01 based on 16S rDNA

2.1.4 菌株 ZJT01 的生长曲线 菌株 ZJT01 的生长曲线如图 4 所示。图 4 显示,该菌株生长的前 4 h 属于延缓期,菌株生长速率最慢;4~18 h 属于对数生长期,生长速率较快。

因此最佳发酵时间为 72 h。

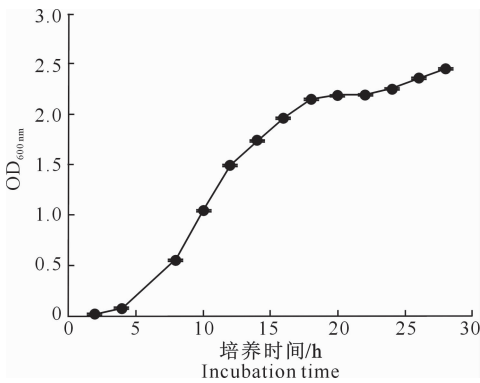


图 4 菌株 ZJT01 在 LB 培养基中的生长曲线
Fig. 4 Growth curve of strain ZJT01 in LB medium

2.2 菌株 ZJT01 产角蛋白酶的发酵及反应条件优化

2.2.1 降解羽毛的最适发酵条件 由图 5 可知,当温度逐渐上升到 32 ℃时,菌株 ZJT01 产角蛋白酶活性达到最高(10.3 U/mL);温度高于 32 ℃时,角蛋白酶活性降低,因此最佳发酵温度为 32 ℃。发酵 72 h 时,菌株角蛋白酶活性达到最大(13.6 U/mL),之后随时间延长,角蛋白酶活性逐渐降低,

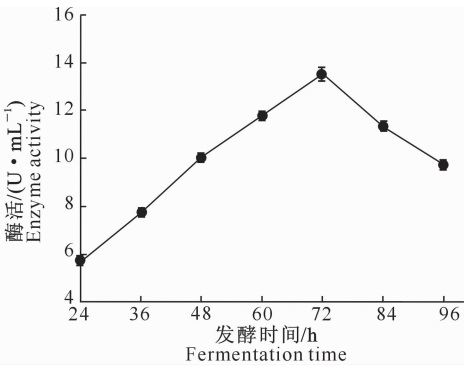
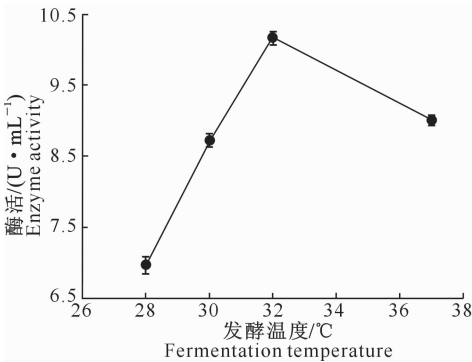


图 5 发酵温度和时间对菌株 ZJT01 产角蛋白酶活性的影响

Fig. 5 Effect of fermentation temperature and time on keratinase activity of strain ZJT01

2.2.2 粗酶液的最适反应 pH 和温度 由图 6 可知,当缓冲液 pH 为 8 时,酶活性最大,表明该角蛋白酶为碱性蛋白酶; pH 为 7~8 时酶活性比较稳

定。当粗酶液反应温度为 35 ℃ 时,酶活性最大,温度低于 35 ℃ 时,酶活性急剧下降,因此确定该酶最适反应温度为 35 ℃。

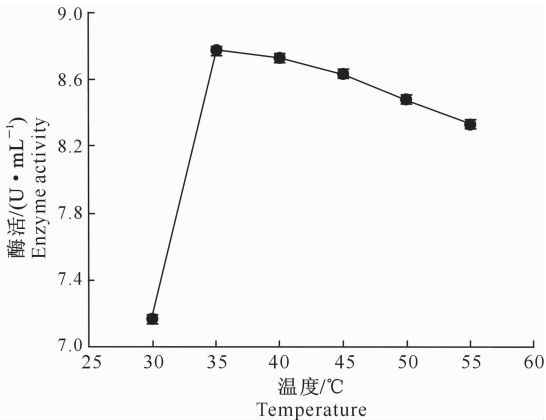
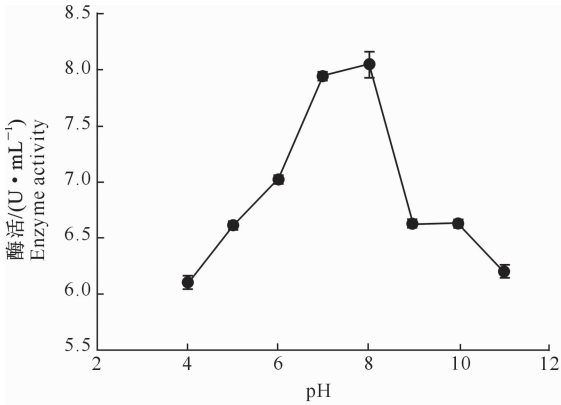


图 6 pH 和温度对菌株 ZJT01 产角蛋白酶活性的影响
Fig.6 Effect of pH and temperature on keratinase activity of strain ZJT01

2.3 菌株 ZJT01 的 DES 和 NTG 突变及筛选

2.3.1 DES 和 NTG 突变 通过向菌悬液中加入不同梯度的 DES 和 NTG 进行诱变,获得角蛋白酶酶活提高的菌株。加入的 DES 和 NTG 梯度与致死率的关系见图 7。图 7 表明,随着诱变剂剂量的不断增加,致死率也逐渐增大;随着处理时间的延长,致死率也不断增大。根据施巧琴等^[18]的研究结论,在菌种选育过程中,致死率达 80% 左右时有利于正

突变的产生。由图 7 可知,在 5 mL 菌液中添加 45 μL DES,诱变时间为 20 min 时,致死率达到 89.5%,有利于产生正突变,故最佳诱变条件为加入 9 μL/mL DES,处理 20 min。在 5 mL 菌液中加入终质量浓度为 0.6 mg/mL 的 NTG,诱变时间为 15 min 时,致死率为 85.8%,有利于产生正突变,故最佳诱变条件为加入质量浓度 0.6 mg/mL 的 NTG,处理 15 min。

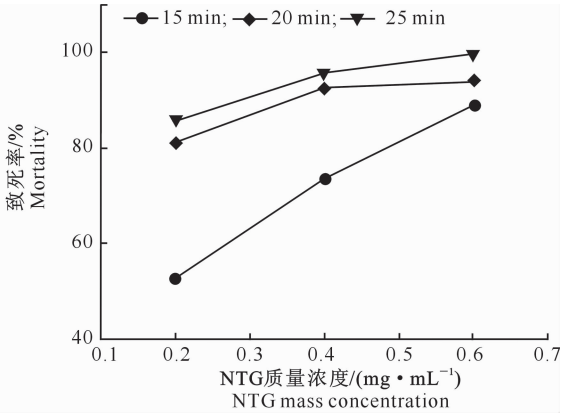
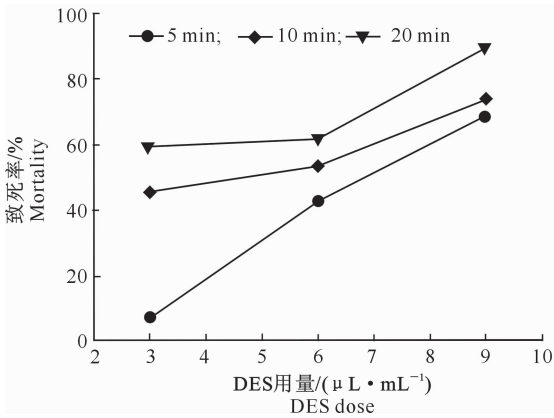


图 7 菌株 ZJT01 的 DES 和 NTG 突变条件筛选
Fig.7 DES and NTG mutation of strain ZJT01

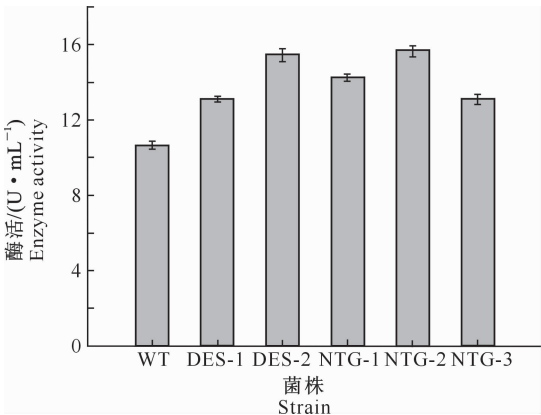
2.3.2 诱变菌株筛选 选择 DES 和 NTG 最佳诱变条件处理菌株 ZJT01,分别对其诱变。初筛时,筛选出水解圈直径比亲本增大的突变株,并将筛到的正突变菌株进行发酵复筛。结果(图 8)表明,用 DES 和 NTG 分别通过 3 轮诱变后,获得了 5 个角蛋白酶活性增大的突变株,分别是 DES-1、DES-2、

NTG-1、NTG-2、NTG-3,其中 DES-2 突变株角蛋白酶活性最高,为 15.7 U/mL,与亲本(10.6 U/mL)相比酶活性提高了 48%;NTG-2 居次。

2.4 菌株 ZJT01 原生质体制备酶解条件的优化

溶菌酶对原生质体制备的影响主要由溶菌酶质量浓度、酶解时间和酶解温度决定。菌株 DES-2 原

生质体的酶解条件见表 2。由表 2 可知,向菌悬液中加入终质量浓度为 10 mg/mL 的溶菌酶时,原生质体形成率最高(80.2%),故溶菌酶最佳终质量浓度为 10 mg/mL。随着温度升高,原生质体形成率也不断增大,当温度为 37 ℃ 时,达到最高值90.3%,故 37 ℃ 是原生质体形成的最适酶解温度。随着酶解时间延长,原生质体形成率下降,酶解时间为 0.5 h 时,原生质体形成率最高(92.6%),故最适酶解时间为 0.5 h。



WT. 野生型菌株;DES. DES 突变株;NTG. NTG 突变株
WT. Wild-type;DES. DES mutant strains;
NTG. NTG mutant strains

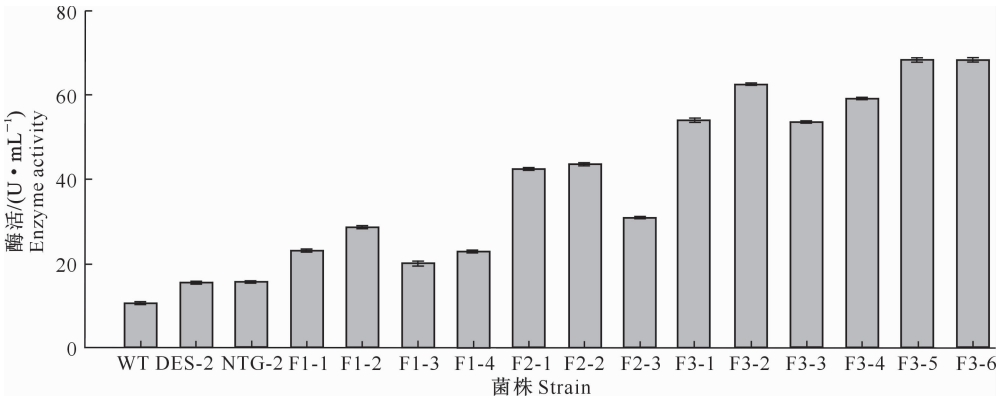
图 8 菌株 ZJT01 DES 和 NTG 突变株的角蛋白酶活性

Fig. 8 Keratinase activity of strain ZJT01 by DES or NTG mutagenesis

表 2 菌株 ZJT01 原生质体的酶解条件		
Table 2 Enzymatic conditions of ZJT01 protoplast		
指标 Index	处理 Treatment	原生质体形成率/% Protoplast formation rate
溶菌酶终质量浓度/ (mg · mL ⁻¹) Lysozyme concentration	CK	0
	8	63.7
	10	80.2
	20	24.8
	30	36.7
水解温度/℃ Hydrolysis temperature	CK	0
	23	72.9
	30	86.2
	33	88.6
	37	90.3
水解时间/h Hydrolysis time	CK	0
	0.5	92.6
	1.0	73.2
	1.5	42.4
	2.0	52.8

2.5 菌株 ZJT01 的基因组改组

对亲本 DES-2 和 NTG-2 原生质体分别按照 2.4 节优化条件进行原生质体制备、灭活和融合,再生菌落为 F1 代融合菌株。通过 3 轮递归原生质体融合、再生,不同融合子代标记为 F1、F2、F3。将各代融合子接种至牛奶平板上,筛选水解圈直径增加的菌株,进行发酵复筛,检测角蛋白酶活性,结果见图 9。图 9 显示,从 F3 代中筛选出了 22 个菌株,发现有 6 个角蛋白酶活性提高的菌株,其中角蛋白酶活性最高的为 F3-5,达 68.7 U/mL,与亲本菌株(10.6 U/mL)相比提高了 5.48 倍。



WT. 野生型菌株;F1-. 第 1 轮基因组改组的突变株;F2-. 第 2 轮基因组改组的突变株;F3-. 第 3 轮基因组改组的突变株
WT. Wild-type;F1-. The first round of genome shuffling mutant strains;F2-. The second round of genome shuffling mutant strains;
F3-. The third round of genome shuffling mutant strains

图 9 菌株 ZJT01 通过基因组改组后的角蛋白酶活性变化

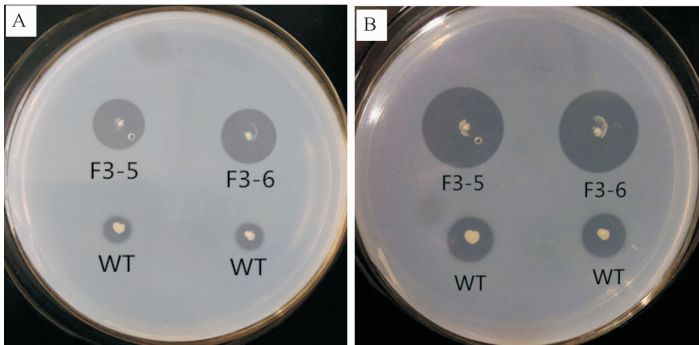
Fig. 9 Change of keratinase activity of strain ZJT01 by genome shuffling

2.6 改良菌株 ZJT01 的遗传稳定性

将酶活性较高的突变株 F3-5 和 F3-6 进行传代

培养,结果见图 10。从图 10 可以看出,菌株生长速度无明显变化,菌株传代 5 代后角蛋白酶产量没有

差别,证明经基因组改组获得的突变菌株性状稳定。



(A)菌株培养 48 h;(B)菌株培养 72 h;WT. 野生型菌株;F3-5,F3-6. 突变株
(A) Strains cultivated for 48 h;(B)Strains cultivated for 72 h;WT. Wild-type;F3-5,F3-6. Mutant strains

图 10 菌株 ZJT01 突变株和野生菌株在牛奶平板上的产角蛋白酶量

Fig. 10 Keratinase production of mutant and wild-type strains of ZJT01 on milk plate

3 讨 论

每年全世界会产生 800 万 t 的羽毛废弃物,这些羽毛废弃物往往被倾倒掩埋或者焚烧成灰烬,导致了严重的环境污染问题^[19-20]。利用微生物分泌的角蛋白酶来高效降解角蛋白,可以使羽毛中的角蛋白废弃物重新得以利用,因此引起人们越来越多的关注^[21-22]。本研究分离的菌株 ZJT01 具有很强的羽毛降解能力,通过 16S rDNA 分子鉴定,构建系统进化树以及生理生化特性试验,初步鉴定 ZJT01 为节杆菌属,并命名为节杆菌(*Arthrobacter* sp.) ZJT01。与菌株 ZJT01 亲缘关系最近的为金黄色节杆菌 TC1(*Arthrobacter aureus* TC1)^[23]和节杆菌 Rue61a(*Arthrobacter* sp. Rue61a)^[24],但均未见与这 2 个菌株降解角蛋白有关的报道。节杆菌属目前已有的 87 个有效种中,也未见相关报道。

本研究结果表明,菌株 ZJT01 在 LB 固体培养基上于 20~37 ℃ 下生长状态良好,与 Cai 等^[7]在研究芽孢杆菌时得出的结论相似。菌株 ZJT01 最适发酵时间为 72 h,最适发酵温度为 32 ℃。粗酶液在 pH 为 7~8 时酶活性比较稳定,而在 pH 为 8.0 时活性最高,该结论与 Tork 等^[25]在短小芽孢杆菌 NRC21(*Bacillus pumilus* NRC21)上的研究结果一致。

本研究利用 DES 和 NTG 诱变 ZJT01,获得突变体库,然后通过基因组改组技术使菌株 ZJT01 的角蛋白酶活性提高。结果显示,菌株 ZJT01 通过 DES 和 NTG 突变,其角蛋白酶活性与亲本相比只增加了 48%,但通过 3 轮基因组改组后,其角蛋白酶活性增加了 5.48 倍,并可稳定遗传,说明基因组

改组技术是有效的菌种改良策略。

综上所述,本研究通过基因组改组技术,成功选育出 2 株角蛋白酶高产菌株(3-5 和 F3-6),这 2 株菌对羽毛降解能力较强,具有一定的开发潜力。

[参考文献]

[1] 季金殿,岳寿松,黄亦钧,等.一株羽毛角蛋白降解菌的鉴定与系统发育分析[J].西南农业学报,2009(3):838-841.
Ji J D,Yue S S,Huang Y J,et al. Identification and phylogenetic analysis of feather-degrading bacterium [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences,2009(3):838-841.

[2] Lange L,Huang Y,Busk P K. Microbial decomposition of keratin in nature;a new hypothesis of industrial relevance [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2016(100):2083-2096.

[3] Ben Elhoul M,Zarai Jaouadi N,Rekik H,et al. Biochemical and molecular characterization of new keratinolytic protease from *Actinomyces viridilutea* DZ50 [J]. International Journal of Biological Macromolecules,2016,92:299-315.

[4] Brandelli A. Bacterial keratinases;useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond [J]. Food and Bioprocess Technology,2008(1):105-116.

[5] Gupta R,Rajput R,Sharma R,et al. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2013(97):9931-9940.

[6] Herzog B,Overy D P,Haltli B,et al. Discovery of keratinases using bacteria isolated from marine environments [J]. Syst Appl Microbiol,2016(39):49-57.

[7] Cai C,Zheng X. Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new *Bacillus subtilis* KD-N2 using response surface methodology [J]. J Ind Microbiol Biotechnol,2009(36):875-883.

[8] Saha S,Dhanasekaran D,Shanmugapriya S,et al. *Nocardia* sp. SD5;a potent feather degrading rare actinobacterium isolated from feather waste in Tamil Nadu,India [J]. J Basic Micro-

- biol,2013(53):608-616.
- [9] Syed D G, Lee J C, Li W J, et al. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis* [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(5): 1868-1871.
- [10] El-Gendy M M. Keratinase production by endophytic *Penicillium* sp. Morsyl under solid-state fermentation using rice straw [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2010(162): 780-794.
- [11] Sivakumar N, Raveendran S. Keratin degradation by bacteria and fungi isolated from a poultry farm and plumage [J]. British Poultry Science, 2015, 56(2): 210-217.
- [12] Zhang Y F, Liu S Y, Du Y H, et al. Genome shuffling of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* YF11 for improving nisin Z production and comparative analysis [J]. J Dairy Sci, 2014 (97): 2528-2541.
- [13] Gong J, Zheng H, Wu Z, et al. Genome shuffling: progress and applications for phenotype improvement [J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(6): 996-1005.
- [14] Zhang J, Wang X, Diao J, et al. Streptomycin resistance-aided genome shuffling to improve doramectin productivity of *Streptomyces avermitilis* NEAU1069 [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2013(40): 877-889.
- [15] Shi D J, Wang C L, Wang K M. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009(36): 139-147.
- [16] 张纪忠. 微生物分类学 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 89-109.
- Zhang J Z. Microbial taxonomy [M]. Shanghai: Fudan University Press, 1990: 89-109.
- [17] Noel R K, Wolfgang L, William B, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. 2nd ed. New York: Springer-Verlag Inc, 2010.
- [18] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- Shi Q Q, Wu S G. Genetic improvement of industrial micro-organisms [M]. Beijing: Science Press, 2003.
- [19] Bright A. Plumage colour and feather pecking in laying hens, a chicken perspective [J]. British Poultry Science, 2007, 48 (3): 253-263.
- [20] Xia Y, Masse D I, McAllister T A, et al. Anaerobic digestion of chicken feather with swine manure or slaughterhouse sludge for biogas production [J]. Waste Management, 2012, 32(3): 404-409.
- [21] Verma A, Singh H, Anwar S, et al. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential [J]. Crit Rev Biotechnol, 2016(10): 1-16.
- [22] Wang Q Y, Liao M D. Biodegradation of feather wastes and the purification and characterization of a concomitant keratinase from *Paecilomyces lilacinus* [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2014, 50(3): 279-285.
- [23] Strong L C, Rosendahl C, Johnson G, et al. *Arthrobacter aureus* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds [J]. Appl Environ Microbiol, 2002(68): 5973-5980.
- [24] Niewerth H, Schuldes J, Parschat K, et al. Complete genome sequence and metabolic potential of the quinaldine-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. Rue61a [J]. BMC Genomics, 2012 (13): 534.
- [25] Tork S E, Shahein Y E, El-Hakim A E, et al. Purification and partial characterization of serine-metallokeratinase from a newly isolated *Bacillus pumilus* NRC21 [J]. Int J Biol Macromol, 2016(86): 189-196.