

新疆天山雪莲根部冻土产酶微生物的初步研究

张国华^{1,2}, 罗会颖², 陈劲春¹, 姚斌²

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

摘要:利用不同培养基对新疆天山雪莲根部冻土微生物进行了分离与培养,通过 16S 或 18S rDNA 序列扩增初步鉴定了分离所得微生物,并构建系统发育树。结合选择性培养基进行了产蛋白酶、产甘露聚糖酶、产木聚糖酶、产纤维素酶和产淀粉酶等微生物的筛选。结果表明,新疆天山雪莲根部冻土中蕴含着丰富的产酶微生物,分离得到的 34 株细菌中大部分都能产酶,其中以产淀粉酶为主,部分产纤维素酶、甘露聚糖酶和木聚糖酶。产淀粉酶细菌主要属于 *Pseudeomonas*, *Flavobacterium* 和 *Arthrobacter* 等属,产纤维素酶细菌主要属于 *Pseudeomonas* 和 *Arthrobacter* 等属。分离得到的 5 株真菌,以产淀粉酶和木聚糖酶为主。

关键词:雪莲;根部冻土;产酶微生物

中图分类号:Q93-3, Q949.783.5

文献标识码:A

文章编号:1008-0864(2008)02-0082-06

Pilot Studies on Enzyme-Producing Microflora in Frozen Soil at the Root of *Saussureae involucratae* Kar. et Kir. et Maxim from Tianshan, Xinjiang Autonomous Region

ZHANG Guo-hua^{1,2}, LUO Hui-ying², CHEN Jin-chun¹, YAO Bin²

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The microflora in the frozen soil at the root of *Saussureae involucratae* Kar. et Kir. et Maxim from Tianshan in Xinjiang Autonomous Region were isolated under different culture conditions and identified by 16S or 18S rDNA sequences amplification, the neighbor-joining phylogenetic tree was then constructed. The microflora producing all kinds of enzymes including proteinase, mannanase, xylanase, cellulase and amylase etc, were screened by selective media. The results showed that rich enzyme-producing microflora existed in the frozen soil. Among 34 bacteria strains isolated, most of them mainly excreted amylase, and partly excreted cellulose degrading enzyme, such as mannanase, protein degrading enzyme and xylanase. The strains which excreted amylase are mainly in genus of *Pseudeomonas*, *Flavobacteriu* and *Arthrobacter*, while the bacteria that excreted cellulase belong to *Pseudeomonas* and *Arthrobacter*. Five fungi strains isolated from the frozen soil can produce amylase or xylanase.

Key words: *Saussureae involucratae* Kar. et Kir. et Maxim; frozen soil near root; enzyme-producing microflora

在自然界中存在很多极端环境,如高盐、强酸、强碱、低温、高热和高辐射等,为一般生物生长和存活的极限,但却生长着能适应这些极端环境的相应的微生物^[1-3]。作为地球上的边缘生命现象,极端微生物的存在,具有极大的应用价值,同时,它们还能在生命的起源、系统进化等方面给人们以许多重要启示和拓展。目前,极端微生物已成为国际研究的热门领域,日本、美国、欧洲等国都已经启动了极端微生物的研究计划^[4]。主要

研究工作包括:①新物种的发现;②新产物的研究与生产;③极端酶的结构与功能分析;④极端酶基因的克隆与表达;⑤极端酶适应机理的分子基础及遗传原理;⑥基因组分析等^[2]。

在低温环境下,低温微生物能够生存,主要是由于其酶能在低温下有效地发挥催化作用^[4-7]。近年来,关于低温酶的研究广泛开展,主要集中在其耐冷机制和生物工程应用方面。已有二十多种低温酶得到了纯化、基因克隆或表达,大部分低温

收稿日期:2007-12-27;修回日期:2008-01-21

基金项目:国家 948 项目(2007-Z3)资助。

作者简介:张国华,硕士研究生,从事微生物工程研究。通讯作者:姚斌,研究员,博士,博士生导师,从事微生物工程研究。

Tel:010-68975126; E-mail:yaobin@mail.caas.net.cn。陈劲春,教授,博士,博士生导师,从事生物制药研究。

酶是从南极和北极以及海水中的低温菌中分离获得的^[8,9]。

我国的低温环境很多,有 49 198 条冰川,总面积达 59 406 km²,仅次于俄罗斯、加拿大和美国,居世界第四位。此外冰川周围的冻土区、雪线以上的地域,以及巨大的深海区,都蕴藏着丰富的微生物资源,包括大量的冷适应微生物资源^[10]。

因此,我们以新疆天山雪莲根部冻土为实验材料,选择与饲料工业紧密相关的酶,包括蛋白酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶、纤维素酶、淀粉酶等进行产酶微生物研究,以期为这一独特环境来源的特殊微生物及功能基因资源库的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及培养基

1.1.1 土样 自新疆天山采取雪莲根部冻土,保存 4℃ 备用。

1.1.2 培养基 LB 液体培养基(培养对象为常规细菌):蛋白胨 1%、酵母提取物 0.5%、氯化钠 1%, pH 7.2。LB 固体培养基为 LB 液体培养基中含有 1.5% 琼脂。

高氏液体培养基(培养对象为放线菌):可溶性淀粉 2%、硫酸亚铁 0.01%、硫酸镁 0.05%、氯化钠 0.05%、磷酸氢二钾 0.05%、硝酸钾 0.1%, pH 7.2。高氏固体培养基为高氏液体培养基中加入 1.5% 琼脂。

PDA 液体培养基(培养对象为真菌):去皮马铃薯切片加水煮沸 20 min,过滤,马铃薯浸出物浓度 20%、葡萄糖 2%, pH 7.2。PDA 固体培养基为 PDA 液体培养基中加入琼脂 1.5%。

产酶筛选培养基平板都包括蛋白胨 1%、酵母提取物 0.5%、氯化钠 1%、琼脂 1.5%, pH 7.2。各添加 1% 的酪蛋白、魔芋粉、木聚糖、可溶性纤维素或可溶性淀粉,分别用于蛋白酶、 β -甘露聚糖酶、 β -木聚糖酶、纤维素酶及淀粉酶的筛选^[11-17]。

1.2 菌液的制备

无菌条件下,取 5 g 土样材料(要尽量做到均匀取样)置于 50 mL 无菌蒸馏水中,每隔 20 min 振荡一次,振荡数次充分摇匀后,静置 0.5 h。取出上清用无菌蒸馏水进行梯度稀释,分别得到

10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 倍稀释液,备用。

1.3 微生物的分离培养及鉴定^[18]

各梯度稀释菌液分别涂布在 LB 培养基、高氏培养基和 PDA 培养基平板上,15℃ 低温培养 3~4 d 后,挑取形态差异的菌落(主要是通过观察菌落的大小、颜色、菌落表面皱褶等形态),用相应的液体培养基振荡培养,再通过稀释涂板、菌落划线等方法得到单一纯化菌种。

培养各纯化菌种,离心收集菌体,用细菌基因组提取试剂盒(Tiangen Biotech Co. LTD.),提取细菌基因组 DNA;用液氮冻融法提取真菌基因组 DNA^[19]。扩增各菌种 16S 或 18S rDNA 基因序列,从而对分离纯化的微生物进行初步鉴定。所用 PCR 引物、反应体系及程序如下:

细菌:根据 16S rDNA 保守序列设计合成引物:27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-TACGGHTACCTTACGACTT-3')。反应体系共 50 μ L,包括模板基因组 DNA 1.0 μ L,两种引物各 1.0 μ L,10 倍反应缓冲液 5.0 μ L, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 4.0 μ L, Taq DNA polymerase 0.5 μ L, ddH₂O 37.5 μ L。反应程序为:94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1.5 min, 30 个循环。

真菌:引物为 NS1 (5'-GTAGTCATATGCTT-GTCTC-3'), ITS4 (5'-TCCTCCCGCTTATTGATATGC-3')。反应体系共 50 μ L, ddH₂O 37.5 μ L, 10 \times Buffer 5.0 μ L, dNTP 4.0 μ L, NS1 1.0 μ L, ITS4 1.0 μ L, TaqE 0.5 μ L, 模板 1.0 μ L。反应程序为:94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1.5 min, 30 个循环。

对获得的 PCR 产物进行序列分析,通过 BLAST 程序对所获得序列进行比对^[20],结合 ClustalX1.83 与 Tree-View1.6.6 软件分别构建新疆天山雪莲根部冻土微生物的系统发育树^[21,22]。

1.4 分离微生物的产酶及筛选

将纯化保存的菌液点种于产酶筛选平板上,15℃ 低温培养 3~4 d 后,观察水解圈情况。产蛋白酶菌株水解圈可以从平板上直接观察。产纤维素酶、产 β -木聚糖酶和产 β -甘露聚糖酶菌株的水解圈,需要将 0.5% 刚果红倒入平板中染色 30 min,然后用 5% 氯化钠浸泡脱色 1 h,出现透明圈的为阳性。将卢哥氏碘液倒入产淀粉酶菌株平板中,出现不能被碘染色的水解圈者为阳性。

2 结果

2.1 微生物分离及鉴定

利用不同培养基,经过梯度稀释平板涂布、单斑分离等方法,共纯化得到 39 株菌,其中包括细菌 34 株,真菌 5 株,没有得到放线菌(见表 1)。

提取的 34 株细菌基因组 DNA,扩增其 16S rDNA 序列,并用 BLAST 与 NCBI 数据库比较,结果表明,序列相似性大于 99% 的菌株共有 16 株,其中 10 株属假单胞菌(*Pseudomonas*),L-11 菌株与 GenBank 库中一种不可培养微生物表现了最高为 100% 的相似性。13 个菌株(M-1、M-2、L-2、G-1、G-5、G-6、G-9、G-10、G-11、G-14、G-15、G-17 与 G-18)与数据库序列表现了 98% 的相似性,主要包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和杆菌属(*Bacterium*)等。与数据库细菌 16S rDNA 对比最高相似度为 97% 的有 L-6、G-2 与 G-19,分别为假单胞菌属(*Pseudomonas*)和根瘤菌属(*Rhizobium*),有继续研究的价值。菌株 G-4 与 G-12 比对的最高相似度为 96%,为潜在的新种。其中 G-4 与 G-2(相似性 97%)之间的亲源关系较近。L-6、G-4 与 G-2 处于系统发育树的底端,显示出与其他分离假单胞菌株较远的遗传距离(见图 1)。

分离得到的 5 株真菌(P-1、P-2、P-4、P-5 和 P-6)与数据库中 18S rDNA 比对,相似度都高于 99%,处于系统发育树的另外分支(见图 1)。分别为 *Zasmidium cellare* (EF137362.1)、*Cryptococcus tephrensensis* (DQ000318.1)、*Cryptococcus* sp. (DQ645520.1)、*Rhodotorula pinicola* (AB126652.1)和 *Cryptococcus chernovii* (AF444354.1)。

2.2 微生物产酶分析

分离得到的 34 株细菌中,大部分菌都能产生水解酶类,以产生淀粉酶为主。有 19 株细菌产生淀粉酶,12 株细菌产生纤维素酶,7 株细菌产生木聚糖酶。其中,菌株 L-4 (*Arthrobacter* sp.)能产生 4 种水解酶,包括淀粉酶、纤维素酶、甘露聚糖酶和木聚糖酶。与假单胞菌具有较高的序列相似性的菌株 L-3、L-10、G-2、G-11 和 G-16 都能产生 3 种水解酶。11 株细菌不产任何检测的水解酶(见表 1),这可能与产酶诱导条件的不合适及菌群生长环境的改变有关。

分离得到的 5 株真菌中,P-1、P-4 和 P-6 能产生木聚糖酶,P-2 和 P-5 能产生淀粉酶。

3 讨论

在地球两极、高山、冰川及冷库等特殊环境中生活着一类微生物即冷适应微生物^[3,10]。根据其生长温度特性可分为两类^[23],一类是必须生活在低温下且其最高生长温度不超过 20℃,最适温度在 15℃,在 0℃ 或以下可生长繁殖的微生物嗜冷菌。另一类其最高生长温度高于 20℃,最适温度高于 15℃,在 0~5℃ 可生长繁殖的微生物称为耐冷菌。低温微生物在低温条件下对自然界的物质循环起重要作用,能分解环境中的大分子物质,如蛋白质、碳水化合物或小分子的环境污染物,还可分解人工合成的一些化合物^[24],对全球生态起着重要作用。

近年来,低温生物的研究材料主要来源于南极和北极以及深海水^[8-10]。我国的低温环境有很多,如冰川,冰川周围的冻土区、雪线以上的地域等,都蕴藏着丰富的微生物资源尤其是冷适应微生物资源,我国已经在逐渐开展这方面的研究^[10],但是对植被根部冻土微生物的研究很少。本研究以从新疆天山采取的雪莲根部冻土样作为实验的出发材料,研究植被根部冻土微生物分布情况。通过分析雪莲根部冻土样的微生物分布,研究结果显示植被根部冻土中以假单胞菌为优势菌群,这可能与该类菌与雪莲的互作有关。但是,由于培养基、培养温度等条件的局限性,分离得到的菌株不能完全表明微生物的多态性。进一步结合环境基因组及 PCR-DGGE 等手段可以对微生物多样性及分布有更深的了解。

低温微生物能在低温环境下生存是由于其可以产生在低温下有效地发挥催化作用的酶^[4-7]。与常温酶相比,低温酶的蛋白质分子往往有更多的氢键和盐键,能形成相对松动和具有弹性的结构,从而增强分子结构的柔韧性。低温酶具有高催化活性和温度敏感性的显著特征。本研究从分离的微生物中筛选分析了与饲料工业紧密相关的若干酶的产酶情况,包括蛋白酶、 β -甘露聚糖酶、 β -木聚糖酶、纤维素酶、淀粉酶等。结果表明,新疆天山雪莲根部冻土中蕴含着丰富的产酶微生物,分离菌株没有检测到蛋白酶的产生,而

表 1 新疆天山雪莲根部冻土微生物及产酶情况
 Table 1 The microflora isolated from the frozen soil at the root of *Saussureae involucratae* Kar.
 et Kir. et Maxim. from Tianshan, Xinjiang and their excreted enzymes.

菌株编号 Microflora order	鉴定种属及 NCBI 登录号 Identified microfloran genus and accession number	相似度 Similarity(%)	淀粉酶 Amylase	纤维素酶 Cellulase	甘露聚糖酶 Mannanase	木聚糖酶 Xylanase
细菌	Bacteria					
M-1	<i>Arthrobacter</i> sp. (AJ810894.1)	98	√	-	-	-
M-2	<i>Flavobacterium</i> sp. (AM167565.1)	98	√	-	-	-
M-3	<i>Pseudomonas trivialis</i> (DQ536517.1)	99	-	-	-	-
L-1	<i>Pseudomonas trivialis</i> (DQ536517.1)	99	√	-	-	-
L-2	<i>Pseudomonas</i> sp. (AJ551142.1)	98	√	-	√	-
L-3	<i>Pseudomonas trivialis</i> (DQ536517.1)	99	√	√	√	-
L-4	<i>Arthrobacter</i> sp. (AJ810894.1)	99	√	√	√	√
L-5	<i>Pseudomonas</i> sp. (EF419342.1)	99	√	-	√	-
L-6	<i>Pseudomonas migulae</i> (AF074383.1)	97	√	-	-	-
L-7	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (EF114343.1)	99	-	√	-	-
L-8	<i>Pseudomonas migulae</i> (AF074383.1)	99	√	√	-	-
L-9	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ465010.2)	99	-	-	-	-
L-10	<i>Pseudomonas</i> sp. (EF601816.1)	99	√	√	√	-
L-11	<i>Uncultured bacterium</i> (DQ980715.1)	100	√	-	-	-
G-1	<i>Bacterium</i> H15 (AY345557.1)	98	√	-	-	-
G-2	<i>Pseudomonas</i> sp. (AJ551160.1)	97	-	√	√	-
G-3	<i>Flavobacterium</i> sp. (AM177626.1)	99	√	-	-	-
G-4	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> (AY152673.1)	96	-	-	-	-
G-5	<i>Pseudomonas</i> sp. (AJ551160.1)	98	√	√	-	-
G-6	<i>Pseudomonas</i> sp. (AJ551142.1)	98	√	√	-	-
G-7	<i>Arthrobacter nitroguaiacolicus</i> (AJ512504.1)	99	-	-	-	-
G-8	<i>Serratia proteamaculans</i> (AB334771.1)	99	-	-	-	-
G-9	<i>Flavobacterium</i> sp. (AM167561.1)	98	-	-	-	-
G-10	<i>Bacterium</i> H15 (AY345557.1)	98	√	-	-	-
G-11	<i>Pseudomonas</i> sp. (AJ551160.1)	98	√	√	√	-
G-12	<i>Janthinobacterium</i> sp. (AJ551147.1)	96	-	√	-	-
G-13	<i>Pseudomonas</i> sp. (AJ551142.1)	99	-	-	-	-
G-14	<i>Pedobacter duraquae</i> (AM491368.1)	98	-	-	-	-
G-15	<i>Bacterium</i> H15 (AY345557.1)	98	-	-	-	-
G-16	<i>Pseudomonas veronii</i> (AB334768.1)	99	√	√	-	√
G-17	<i>Bacterium</i> H15 (AY345557.1)	98	-	-	-	-
G-18	<i>Pseudomonas</i> sp. (AJ551160)	98	√	√	-	-
G-19	<i>Rhizobium</i> sp. (DQ337571.1)	97	-	-	-	-
P-3	<i>Pseudomonas</i> sp. (AM409368.1)	99	-	-	-	-
真菌	Fungi					
P-1	<i>Zasmidium cellare</i> (EF137362.1)	100	-	-	-	√
P-2	<i>Cryptococcus tephrensensis</i> (DQ000318.1)	100	√	-	-	-
P-4	<i>Cryptococcus</i> sp. (DQ645520.1)	99	-	-	-	√
P-5	<i>Rhodotorula pinicola</i> (AB126652.1)	99	√	-	-	-
P-6	<i>Cryptococcus chernovii</i> (AF444354.1)	99	-	-	-	√

注:√表示产酶;-表示未检测到产酶。

Note: √ indicates the presence of excreted enzymes; - indicates no excreted enzymes detected.

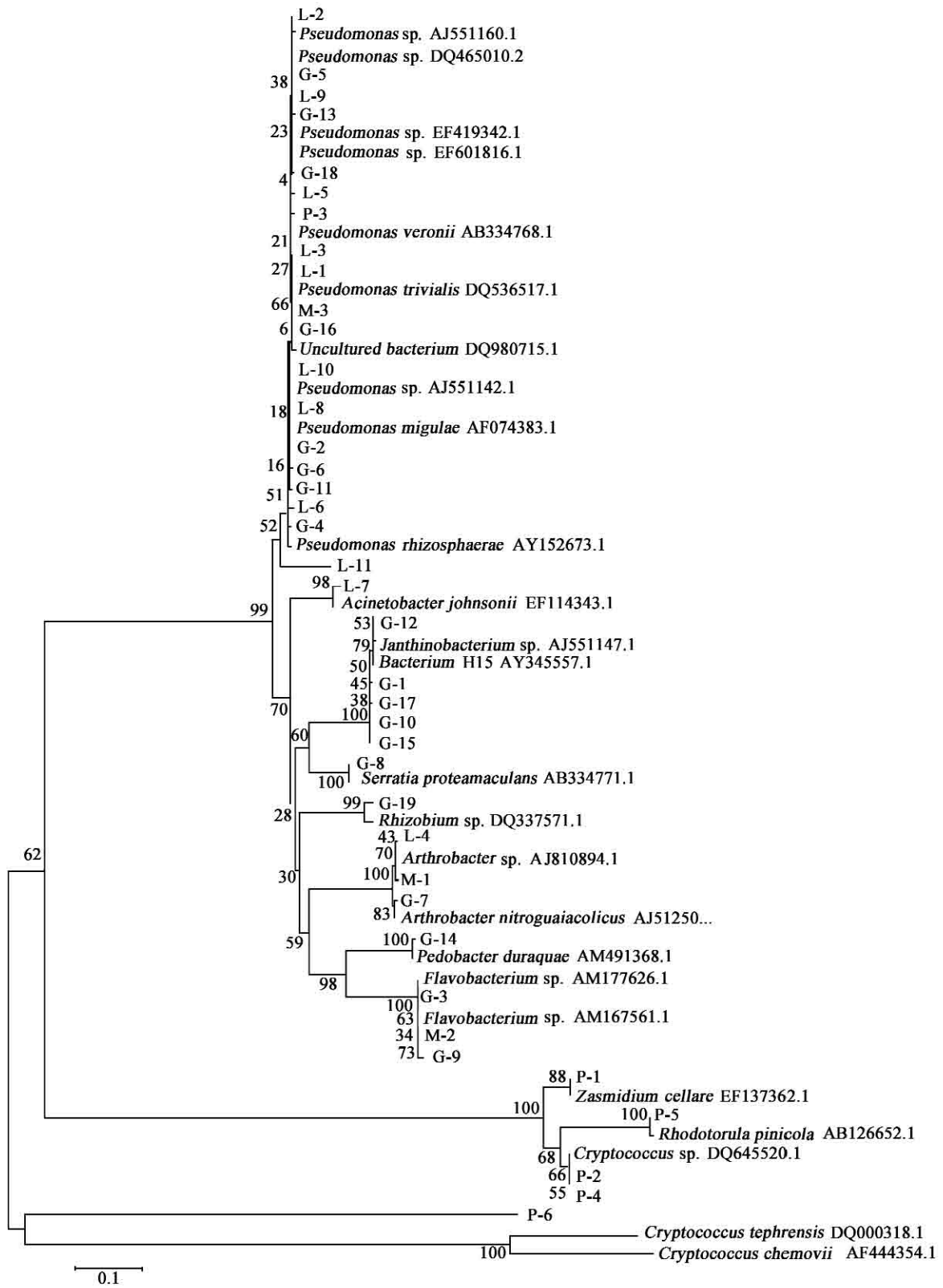


图 1 新疆天山雪莲根部冻土微生物系统发育树

Fig. 1 The neighbor-joining phylogenetic tree of the microflora isolated from the frozen soil at the root of *Saussureae involucratae* Kar. et Kir. et Maxim. from Tianshan, Xinjiang.

以产淀粉酶和纤维素酶为主,部分产甘露聚糖酶和木聚糖酶等多糖酶,多糖水解酶的丰富可能利于微生物利用植物根部的营养。

参 考 文 献

- [1] 李王秀. 新的生命形式—极端微生物[J]. 阴山学刊, 2000, 15(3): 32-35.
- [2] 范光南, 傅世宗, 蔡海洋. 极端环境微生物的研究概况[J]. 福建热作科技, 2000, 25(2): 12-15.
- [3] 曾胤新, 蔡明红, 俞 勇, 等. 微生物低温酶适冷机制研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(10): 52-56.
- [4] Deming J W. Psychrophiles and polar regions [J]. Current Opinion in Microbiology, 2002, 5: 301-309.
- [5] Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation [J]. Nature Review Microbiology, 2003, 1: 200-208.
- [6] Morita Y, Nakamura T, Hasann Q, et al.. Cold-active enzymes from cold-adapted bacteria [J]. J. Am. Oil. Chem. Soc., 1997, 74: 441-444.
- [7] Feller G, Narinx E, Arpigny J L, et al.. Enzymes from psychrophilic organisms [J]. FEMS Microbiol. Rev., 1996, 18: 189-202.
- [8] Siddiqui K S, Cavicchioli R. Cold adapted enzymes [J]. Annu. Rev. Biochem., 2006, 75: 403-433.
- [9] Nichols D S, Nichols P D, McMeekin T A. Ecology and physiology of psychrophilic bacteria from Antarctic saline lakes and sea ice [J]. Sci. Prog., 1995, 78: 311-347.
- [10] Feller G, Narinx E, Arpigny J L. Temperature dependence of growth, enzymes secretion and activity of psychrophilic Antarctic bacteria [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1994, 41: 477-479.
- [11] 梅承芳, 江晓路, 牟海津, 等. 碱湖高产碱性蛋白酶菌的选育和产酶条件研究[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(4): 613-617.
- [12] 杨文博, 沈 庆, 佟树敏. 产 β -甘露聚糖酶地衣芽孢杆菌的分离筛选及发酵条件[J]. 微生物学通报, 1995, 22(3): 154-157.
- [13] 孙振涛, 刘建军, 赵祥颖, 等. 一株产木聚糖酶菌株的分离、鉴定及其酶学特性研究[J]. 生物技术, 2007, 17(4): 74-77.
- [14] Petrescu I, Lamotte-Brasseur J, Chessa J P, et al.. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae* [J]. Extremophiles, 2000, 4: 137-144.
- [15] 高建民, 翁海波, 席 宇, 等. 一株嗜热嗜酸纤维素酶高产霉菌分离鉴定及其酶学性质研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 715-718.
- [16] 王晓红, 郝 军, 傅 力, 等. 低温淀粉酶产生菌的筛选及酶学性质研究农产品加工[J]. 农产品加工学刊, 2007, 1(1): 7-9.
- [17] Feller G, Payan F, Theys F. Stability and structural analysis of α -amylase from the Antarctic psychrophile *Alteromonas haloplactis* A23 [J]. Eur. J. Biochem., 1994, 222: 441-447.
- [18] 黄光祥, 周志刚, 何凤旭, 等. 南海底层层鱼突颌鹦嘴鱼 *Scarus oifrons* Temminck et Schlegel, 1846 肠道产酶微生物研究[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(5): 95-100.
- [19] 王亚如, 姚斌, 罗会颖, 等. 来源鱼 *Selenomonas ruminantium* 的高比活植酸酶基因在毕赤酵母中的高效表达[J]. 中国农业科学, 2004, 37(5): 762-768.
- [20] Altschul S F, Gish W, Miller W, et al.. Basic local alignment search tool [J]. J. Mol. Biol., 1990, 215: 403-410.
- [21] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing of phylogenetic trees [J]. Mol. Biol. Evol., 1987, 4: 406-425.
- [22] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39: 783-791.
- [23] Herbert R A. The ecology and physiology of psychrophilic microorganisms [A]. In: Herbert R A, Codd G A eds. Microbes in extreme environments [M]. London: Academic Press, 1986, 1-23.
- [24] Wiebe W J, Sheldon W M, Pomeroy L R. Bacterial growth in the cold: evidence for an enhanced substrate requirement [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1992, 58(1): 359-364.