

烟叶发酵过程中产木聚糖酶菌株的分离及鉴定

范一文, 林美燕, 李旭东, 李喆, 陈雅文, 韩双艳
(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 本文研究了微生物对烟叶增香的作用, 研究结果对烟叶发酵有着重要意义。在研究中用于筛选的烟叶样品选自三个年份(2007年、2008年、2009年)的五个产地(毕节、楚雄、昆明、曲靖、襄县), 即有15组样品。对烟叶样品依次进行微生物的富集、分离纯化实验, 然后进行产木聚糖酶菌株的筛选, 筛选培养基经刚果红染色之后, 以菌落周围出现透明圈作为产木聚糖酶菌株的筛选标准。然后对筛选出的73株产酶菌株采用3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS法)进行木聚糖酶活力的测定, 从中选择一株产酶活性较高的菌株-Qb4号菌株, 进行形态学分析实验、生理生化实验、碳源利用分析实验以及16S rRNA保守序列分析, 最终将该菌鉴定为甲基营养型芽孢杆菌。将该菌应用于烟叶增香工艺流程中, 是未来本课题研究的主要方向。

关键词: 烟叶; 木聚糖酶; 分离纯化; 鉴定; 筛选

文章编号: 1673-9078(2013)11-2658-2662

Screening and Identification of a Xylanase-producing Strain during Tobacco Fermentation

FAN Yi-wen, LIN Mei-yan, LI Xu-dong, LI Zhe, CHEN Ya-wen, HAN Shuang-yan

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Microorganisms play an important role in tobacco aroma improving. The tobacco samples were selected from five areas (Bijie, Chuxiong, Kunming, Qujing, and Xiangxian) of three years (2007, 2008 and 2009), using nutrient agar for purification, and then cultured in the screening xylanase base for rescreening. The xylanase-producing strains was screened by determining the appear transparent circles among the colonies after Congo red staining. The xylanase activities of these strains were measured by 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS). Qb4 strain, which had higher xylanase activity, were identified as *Bacillus methylotrophilus* by analysis of its morphological, physiological and biochemical characteristics, carbon source utilization and the 16S rRNA conserved sequence.

Key words: tobacco; xylanase; purification; identification; screening;

木聚糖酶(Xylanase E C3.2.1.8)是一种主要的木聚糖降解酶类, 通过内切的方式降解木聚糖中1,4木糖苷键, 水解产物以低聚木糖为主, 并伴有少量的木糖和阿拉伯糖^[1]。木聚糖在自然条件下很难被降解利用, 使用化学方法可以提高木聚糖的降解率, 但是会导致环境污染, 而酶解法则不存在这个缺点, 木聚糖酶能够降解烟叶或其他物质中的木聚糖生成功能性低聚木糖产品^[2]。木聚糖酶广泛存在于细菌、放线菌、真菌中, 在烟叶工业、造纸工业、食品行业、纺织行业、能源工业、发酵行业和饲料行业都有极大的应用价值^[3-4]。

烟叶的品质与香气状况是以吸燃时所形成的烟

收稿日期: 2013-07-12

基金项目: 863 科技计划项目(2011AA100905)

作者简介: 范一文(1968-), 女, 高级实验师, 主要从事生物制药、微生物酶学方面的研究

通讯作者: 韩双燕

气中致香成分的组成和含量作为标准来衡量的, 而烟叶的发酵醇化则是提高烟叶品质和可用性的重要环节之一^[5]。发酵醇化过程中, 微生物、酶及相关化学物质的协同作用, 可以诱发一系列生化反应, 改善烟叶品质和香气状况^[6-7]。更为重要的是, 微生物发酵及生物酶的作用相比过滤嘴过滤等物理手段来说, 能够降解烟叶中的烟碱含量, 也改进了卷烟的品质, 尽量减少了烟叶中对人体有害物质的含量。烟叶表面的微生物十分丰富, 有细菌、霉菌、放线菌等, 一般以细菌为主。烟叶表面微生物在发酵醇化过程中产木聚糖酶, 对于烟碱的降解^[8]、降低有害物质、烟叶增香具有重要的作用。因此如何筛选烟叶中高产木聚糖酶菌株, 对于烟叶发酵的应用研究有重要意义。

目前, 分子生物学方法已被广泛用于微生物的分类和系统发育分析, 其中16S rRNA序列是细菌分类鉴定和系统发育分析中最常用的分子生物学指标^[9-10]。故本研究将以16S rRNA序列测定应用于微生

物菌株的准确鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 烟叶

本研究采用的筛选材料为从五个产地(毕节、楚雄、昆明、曲靖、襄县)采集到的烟叶样品,其年份分别是2007、2008、2009年,分组及编号按表1所示。

表1 样品分组明细

Table 1 The sample classification

年代	产地				
	毕节	楚雄	昆明	曲靖	襄县
2007	Ba	Ca	Ka	Qa	Xa
2008	Bb	Cb	Kb	Qb	Xb
2009	Bc	Cc	Kc	Qc	Xc

1.1.2 培养基与试剂

营养琼脂培养基。

产木聚糖酶筛选培养基:木聚糖 2%, KNO₃ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, NaCl 0.5%, K₂HPO₄ 0.05%, 琼脂 2%。

种子培养基:牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%。

木聚糖酶产酶培养基:麸皮 4%, 酵母粉 0.5%, 蛋白胨 1%, KH₂PO₄ 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.1%。

刚果红染液(1 mg/mL):将1 g刚果红溶于1 L蒸馏水中,于暗处保存。

1.2 方法

1.2.1 微生物的分离纯化

将十五组烟叶样品分别剪碎,取5 g样品加50 mL无菌生理盐水于锥形瓶中,摇床混合30 min得到悬浊液。再将所得悬浊液稀释一定的浓度梯度后,分别涂布于营养琼脂培养基上进行37 °C的培养。培养24 h后挑取单菌落,进一步纯化之后得到纯化菌株,进行斜面保存,置于4 °C冰箱。并依据表1将菌株分类编号,建立烟叶表面微生物菌种库。

1.2.2 产木聚糖酶菌株的筛选

将分离纯化所得的菌种用产木聚糖酶筛选培养基筛选,37 °C培养两天,测菌落直径。在长出菌落的培养基上,用刚果红染色法对其进行染色,刚果红会与木聚糖等多糖形成红色的复合物,当木聚糖被木聚糖酶分解成单糖后,复合物便没法形成,培养基中会出现以纤维素分解菌为中心的透明圈。观察并测量水解圈直径,同时将能够产木聚糖酶的菌株采用甘油冻存

法^[1]进行保存。

1.2.3 木聚糖酶活力测定

将筛选结果中有明显水解圈的菌株接入种子培养基中,35 °C,150 r/min摇床培养14 h后可以接种发酵液。将2 mL种子液接入木聚糖酶产酶培养基中进行摇瓶发酵3 d。将发酵液用2 mL离心管在8000 r/min离心10 min后,取上清液即得到粗酶液。

取粗酶液,加蒸馏水稀释至适当的稀释倍数,取1 mL于25 mL比色管,加入1 mL 1%木聚糖底物,在70 °C下准确反应30 min,立即拿出流水冷却后,加入3.0 mL DNS,沸水浴5 min后定容至25 mL,在540 nm紫外光下用紫外分光光度计测定其吸光度,根据被测液的吸光度,由木聚糖标准曲线计算样品中的总还原糖的浓度。然后根据公式计算酶活。

酶活性单位定义:在上述测定条件下,以每分钟水解底物生成1 μmol还原糖所需酶量定义为一个酶活性单位为U/mL。

1.2.4 菌种鉴定

1.2.4.1 形态观察

在LB培养基上培养菌株,37 °C培养24 h,观察菌落形态。

1.2.4.2 生理生化鉴定

根据《伯杰氏手册》对菌株进行以下生理生化鉴定:

革兰氏染色、接触酶实验、明胶水解、吲哚反应、硝酸盐还原试验、淀粉水解、葡萄糖产气、V-P试验、最适pH及温度特性实验。

1.2.4.3 碳源利用

将菌种分别接种含葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、核糖、松三糖、蜜二糖的不同碳源平板上,37 °C培养一天后,观察菌株生长情况。

1.2.4.4 16S rRNA 测序

菌株总RNA提取使用CTAB法,通过PCR获得16S rRNA扩增引物,委托北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序,所得结果在GenBank上进行同源性比对分析,并利用MEGA 3.1构建系统发育树,确定菌种。MEGA可用于序列比对、进化树的推断、估计分子进化速度、验证进化假说等。

2 结果与讨论

2.1 烟叶表面微生物的分离纯化结果

从烟叶样品中筛选出73株菌,各产地年份菌株总数如表2,并对其根据产地进行从1开始进行编号(如Bb1代表来自毕节产地2008年份的一株菌)。

表 2 各组样品菌株数量

Table 2 The Total number of strains in each group

年代	产地				
	毕节	楚雄	昆明	曲靖	襄县
2007	-	2	3	4	7
2008	20	4	4	5	3
2009	-	3	4	4	10

注：“-”表示该分组下没有筛选出菌株。

2.2 产木聚糖酶菌株筛选结果

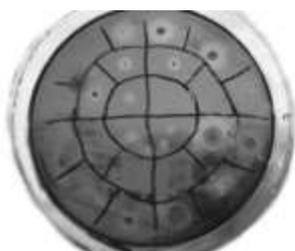


图 1 刚果红染色后产木聚糖酶菌的菌落周围出现透明圈

Fig.1 The Transparent zone Around the Strains After Dyeing by Congo Red Agent

2.3 产木聚糖酶活力结果

对以上九株菌进行产酶酶活测定，结果见表 3。水解圈直径与菌落直径比值大小也可以作为菌株产酶将分离出的 73 株菌进行产木聚糖酶菌株的筛选，得到

表 3 产木聚糖酶活测定结果

Table 3 Measurement results of xylanase activity

编号	Qb4	Qc2	Xa3	Xc4	Xc7	Xc8	Kb2	Bb9	Bb15
酶活 U/mL	4.79±0.11	2.29±0.08	2.69±0.12	3.35±0.09	3.48±0.05	2.75±0.08	2.74±0.10	4.86±0.09	5.50±0.12
透明圈直径/菌落直径 D/d	7.66±0.11	9.02±0.17	5.38±0.12	7.98±0.19	7.59±0.19	3.45±0.18	10.05±0.21	6.55±0.12	4.59±0.11

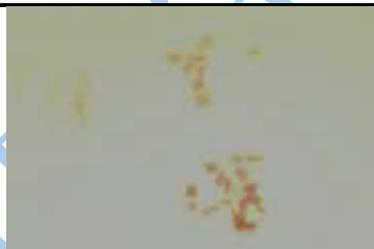


图 3 Qb4 号菌株菌落形态

Fig.3 The colony morphology of strain Qb4

2.4.2 生理生化鉴定结果

经实验鉴定，Qb4 号菌株生理生化特性为：革兰氏阳性；接触酶反应、明胶水解反应、硝酸盐还原实验、淀粉水解实验结果均为阳性。详细结果见表 4。

2.4.3 碳源利用

鉴定实验结果见表 5，说明该菌碳源利用范围较广泛，可以利用多种糖。

30 株能产木聚糖酶的菌，对这些菌采用甘油冻存法进行保存。其中水解圈较大的菌种编号为：Qb4、Qc2、Xa3、Xc4、Xc7、Xc8、Kb2、Bb9、Bb15，共九株菌。

活性的参考值，综合酶活和水解圈直径大小，最后决定以来自曲靖的 2008 年份的样品中的 Qb4 号菌株进行进一步研究，鉴定、pH 特性、DNA 测序等。

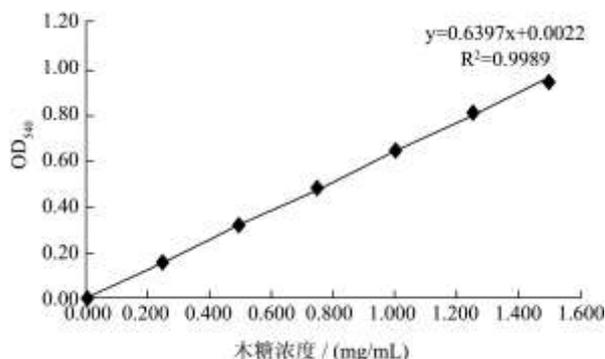


图 2 DNS 法测定还原糖标准曲线

Fig.2 Measurement of reducing sugar standard curve

2.4 Qb4 号菌种鉴定结果

2.4.1 形态鉴定

在营养琼脂培养基上，菌株生长良好。菌落为乳白色、突起，边缘呈锯齿状，如图 3 所示。由伯杰氏细菌鉴定手册，初步判定属于原核生物界厚壁菌门芽孢杆菌纲。

表 4 生理生化鉴定结果

Table 4 Physiological and biochemical characteristics of Strain 8

试验	结果
革兰氏染色	+
接触酶反应	+
明胶水解	+
吲哚反应	-
硝酸盐还原试验	+
淀粉水解	+
葡萄糖产气	-
V-P 试验	-

注：1、阳性+，2、阴性-。

2.5 16S rRNA 测序结果

表 5 碳源利用实验结果

Table 5 The usage of carbon source by the strain

碳源	结果
葡萄糖	+
乳糖	+
蔗糖	+
甘露糖	+
核糖	+
松三糖	+
蜜二糖	+

注：利用+，不利用-。

经测序得出 Qb4 号菌株的 16S rRNA 序列，见图 4。用 BLAST 与 GeneBank 数据库中的序列比较，从 GeneBank 中获得和该菌株序列相近种属的 16S rRNA 序列，构建系统发育树，见图 5。序列对排使用 CLUSTAL

图 4 Qb4 号菌株的 16S rRNA 基因序列

Fig.4 16S rRNA gene sequence of the strain Qb4

编号	基因序列
1	CCTTGGCCCC TTCGGCGGCT GGCTCATAAA GGTACCTCA CCGACTTCGG GTGTTGCAAA
61	CTCTCGTGGT GTGACGGGCG GTGTGTACAA GGCCCCGGGAA CGTATTACC GCGGCATGCT
121	GATCCGCGAT TACTAGCGAT TCCAGCTTCA CGCAGTCGAG TTGCAGACTG CGATCCGAAC
181	TGAGAACAGA TTTATGGGAT TGGCTAAACC TTGCGGTCTC GCAGCCCTTT GTTCTGTCCA
241	TTGTAGCACG TGTGTAGCCC AGGTCATAAG GGGCATGATG ATTTGACGTC ATCCCCACCT
301	TCCTCCGGTT TGTCACCGGC AGTCACCTTA GAGTGCCCAA CTAAATGCTG GCAACTAAGA
361	TCAAGGGTTG CGCTCGTTGC GGGACTTAAC CCAACATCTC ACGACACGAG CTGACGACAA
421	CCATGCACCA CCTGTCACTC TGTCCCCGAA GGGAAAGCCC TATCTCTAGGG TTGTACAGAG
481	GATGTCAAGA CCTGGTAAGG TTCTTCGCGTT GCTTCGAATT AAACCACATG CTCCACCGC
541	TTGTGCGGGC CCCC GTCAAT TCCTTTGAGT TTCAGTCTG CGACCGTACTC CCCAGGCGG
601	AGTGCTTAAT GCGTTAGCTG CAGCACTAAG GGGCGGAAAC CCCCTAACAC TTAGCACTCA
661	TCGTTTACGG CTGGAAACTA CCCAAA

X 1.81，使用软件 MEGA3.1 构建系统无根发育树，重复次数为 1000。

经比对，根据核糖体基因 16S 区域在细菌鉴定中的要求，大于 99% 即可视为同一个种，鉴定为 WJ20121118-1: *Bacillus methylotrophicus* (甲基营养型芽孢杆菌)。

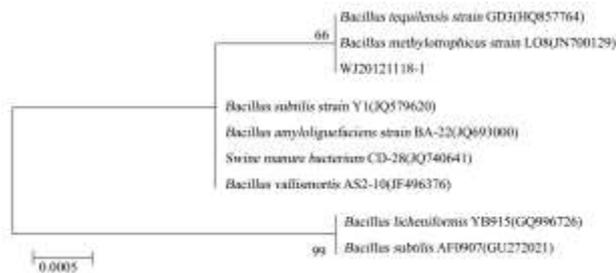


图 5 系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree

3 结论

3.1 本研究对毕节、楚雄、昆明、曲靖、襄县五个产地，取 2007、2008、2009 三个年份的十五组烟叶样品进行微生物的富集、分离纯化、产酶筛选，建立了一个 73 株细菌的菌种库，得到了具有较高产木聚糖酶活的 9 株菌，选取其中一株产木聚糖酶菌株 Qb4，对其进行微生物生理生化以及 16S rRNA 的鉴定，研究结果表明该菌株是甲基营养型芽孢杆菌。

3.2 烟叶发酵醇化过程中，酶的催化作用能使烟叶中化学成分分解、合成和再转化^[12]。据本课题组的其它研究结果表明，烟叶表面微生物不仅可以产木聚糖酶，还可以产纤维素酶、果胶酶、蛋白酶、淀粉酶等。如何将这

些烟叶表面微生物所产的酶应用到烟叶发酵中，以改善烟叶品质，达到增香效果，是本课题组今后研究的方向。

参考文献

[1] Wu K, Liu B, Zhang J, et al. Trichoderma viridexy lanase purification and properties [J]. J Biol., 2001, 18(6): 15-16

[2] 王聪,张光杰.木聚糖酶高产黑曲霉的选育及其酶学性质的研究[J].生物技术通报,2010,6:227-230,250
Wang Cong, Zhang Guang jie. Study on Mutation and Enzymic Properties of Highly Production Xylanase Strain [J]. BIOTECHNOLOGY BULLETIN, 2010, 6:227-230, 250

[3] 孙宇哲,王彦超,郝再彬,等.木聚糖酶菌株的筛选及酶切位点的分析[J].广西植物,2010,30(4):563-567
Sun Yu zhe, WangYanchao, HaoZaibin, et al. Xylanase Strain Screening and Restriction Sites Analysis [J]. Guihaia, 2010, 30(4): 563-567

- [4] 张桂敏,庄永红,刘婷,等.土壤微生物 DNA 木聚糖酶基因多样性的研究[J].土壤学报,2006,43(2):295-299
Zhang Guimin, Zhuang Yonghong, Liu Ting, et al. Soil microbial DNA xylanase gene diversity research [J]. Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(2): 295-299
- [5] 黄静文,段焰青,者为,等.短小芽孢杆菌改善烟叶品质的研究[J].烟草科技,2010,8(277):61-64
Huang Jingwen, DuanYanqing, Zhe Wei, et al. Improvement of Flue-cured Tobacco Quality with Bacillus pumilus [J]. Tobacco Science & Technology, 2010, 8(277): 61-64
- [6] 左天觉.烟草的生产、生理和生物化学[M].朱尊权,等译.上海:上海远东出版社,1993
Zuo Tian jue. Production, physiology and biochemistry of tobacco [M]. Shanghai: Shanghai Yuandong Publishing company, 1993
- [7] 杨虹琦,周冀衡,罗泽民,等.微生物和酶在烟叶发酵中的应用[J].湖南农业科学,2003,6:63-66
Yang Hong qi, Zhou Ji heng, Luo Ze min, et al. Application of Microbe And Enzyme on the Fermentation of Tobacco Leaves [J]. Hunan Agriculture Science, 2003, 6: 63-66
- [8] 李梅云.烟碱的微生物降解研究进展[J].微生物学杂志, 2006,26(3):94-97
Li Mei yun. Advancement of Nicotine Degrading Microorganisms for Flue-cured Tobacco [J]. Journal of Microbiology, 2006,26(3): 94-97
- [9] 陈剑山,郑服丛.ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J].安徽农业科学,2007,35(13):3785-3786
Chen Jian shan, Zheng Fu cong. Application of ITS sequences in fungi classification and identification [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(13): 3785-3786
- [10] 刘文强,贾玉萍,赵宏坤.16S rRNA 在细菌分类鉴定研究中的应用[J].动物医学进展,2006,27(11):15-18
Liu Wenqiang, JiaYuping, Zhao Hongkun. Application of 16S rRNA in the study of identification and classification of bacteria [J]. Animal medical progress, 2006, 27(11): 15-18
- [11] 郭淑清,田锋.菌种的甘油冷冻保存法[J].山西医科大学学报,2000,31(4):382
Guo Shu qing, Tian Feng. Preserved by freezing glycerol strain [J]. Journal of Shanxi Medical University, 2000, 31(4): 382
- [12] 郑小嘎,刘萍,张修国.烟叶人工发酵过程中增香途径的研究进展[J].山东农业大学学报(自然科学版),2003,34(1): 144-147
Zheng Xiao ga, Liu Ping, Zhang Xiu guo. Progress in studies of flavoring methods in the process of tobacco leaf fermentation [J]. Journal of Shandong Agricultural University, 2003, 34(1): 144-147