

片烟产果胶酶细菌的鉴定及酶活测定

代同成¹ 范坚强² 郑湖南² 包可翔² 王永泽¹ 王金华^{1*}

(1. 湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室 湖北 武汉 430068)

(2. 福建中烟工业公司 福建 厦门 361022)

摘要: 以果胶为碳源, 对津巴布韦片烟烟叶表面产果胶酶细菌进行分离, 采用 16S rDNA 限制性酶切片段长度多态性分析(ARDRA)和测序方法, 结合形态学、生理生化实验, 对所分离产果胶酶菌株进行鉴定, 同时研究培养时间、温度、起始 pH、接种量对菌株产酶的影响。结果表明, 从津巴布韦片烟烟叶表面分离得到的产果胶酶菌株主要为芽孢杆菌属的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 和产碱菌属的粪产碱菌 *Alcaligenes faecalis*。在所分离的菌株中, 枯草芽孢杆菌 T10 酶活力最高, 以 6% 的接种量, 在温度为 35 °C、起始 pH 为 7.5 条件下培养 48-56 h, 其果胶酶酶活为 571 U/mg, 聚半乳糖醛酸裂解酶酶活为 297 U/mg。

关键词: 津巴布韦片烟, ARDRA, 鉴定, 聚半乳糖醛酸裂解酶, 果胶酶

Identification of pectin-degrading strains isolated from tobacco strips and evaluation of its pectinase activity

DAI Tong-Cheng¹ FAN Jian-Qiang² ZHENG Hu-Nan² BAO Ke-Xiang²
WANG Yong-Ze¹ WANG Jin-Hua^{1*}

(1. Hubei University of Technology Key Laboratory of Fermentation Engineering, Ministry of Education, Wuhan, Hubei 430068, China)

(2. China Tobacco Fujian Industrial Corporation, Xiamen, Fujian 361022, China)

Abstract: Bacterial strains with pectinase activity were isolated from Zimbabwe tobacco strips using pectin as carbon source. ARDRA patterns of 16S rDNA combined with 16S rDNA sequence analysis, physiological and biochemical experiments were used to identify the isolated strains. Different conditions including incubating time, growth temperature, initial pH and inoculation quantity for the enzyme production were also studied. The results indicated that bacteria isolated from Zimbabwe tobacco strips with high pectin-degrading ability mainly belong to *Bacillus subtilis* (genus *Bacillus*) and *Alcaligenes faecalis* (genus *Alcaligenes*). Among these strains, *Bacillus subtilis* strain T10 possessed the highest pectinase activity (571 U/mg) and polygalacturonate lyase activity (297 U/mg) under its optimum en-

基金项目: 福建中烟工业公司项目

* 通讯作者: Tel: 86-27-88032319; 信箱: jinhwang99@126.com

收稿日期: 2010-10-17; 接受日期: 2011-02-22

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

zyme fermentant conditions, which use 6% (V/V) culture fluid as the inoculum for enzyme production in the initial pH 7.5 fermentation medium at 35 °C for 48–56 h.

Keywords: Zimbabwe tobacco strips, Amplified ribosomal DNA restriction analysis, Identification, Polygalacturonate lyase, Pectinase

对于烟草制品, 果胶质是一种不利于吸味质量的吸湿性化学成分, 其在燃吸过程中影响烟叶的燃烧性, 可产生甲醇, 甲醇进一步氧化为甲醛、甲酸等成分, 不仅给烟气带来刺激性, 而且较高的果胶质含量还会导致卷烟焦油量升高^[1-2]。

通常采用 2 种途径降解烟草中果胶, 一种途径是向烟叶表面施加果胶酶, 另一种途径是直接喷洒可产生果胶酶的发酵液。如于建军等^[3]采用外加果胶酶处理烟叶, 可使果胶含量明显降低, 中性致香物质增加。夏炳乐等^[4]用果胶酶在内的生物酶制剂处理烟叶, 加速了其总糖等的降解, 香味物质总量增加的同时, 感官质量也得到明显提高, 醇化时间大大缩短。上述所添加的酶为外源酶, 如果能够从烟叶本身得到可生产果胶酶微生物, 对之加以研究, 用来生产果胶酶处理烟叶, 因其菌种本身来源于烟叶, 改善烟叶品质的同时, 安全性也可得到更好保障。因此, 了解来源于烟叶表面产果胶酶微生物种类, 能为降低烟叶中果胶提供研究依据, 为有针对性地降低烟草中果胶含量奠定基础。

扩增 rDNA 限制性酶切片段分析法(Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA), 是一种快速、简便、有效的分子水平分类方法, 目前被广泛应用于微生物分类及鉴定等。其基于 rRNA 的保守性和特异性, 对扩增 rDNA 片段进行酶切分析, 在这一序列上的差异导致特异性限制性片段长度多态性谱带, 从而分析及揭示微生物多样性和系统发育差异^[5-6]。

本研究从烟叶表面筛选产果胶酶细菌, 并对其进行形态学、生理生化、16S rDNA 限制性酶切片段长度多态性分析(ARDRA)和测序方法分析, 同时对酶活较高菌株的发酵产酶条件进行初步研究, 以期充分了解烟叶表面产果胶酶菌的种类及其酶活, 为降低烟草中果胶含量, 提高烟草制品品质提供有价值的参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 样品为 2006 年津巴布韦片烟烟叶, 用灭菌剪刀剪碎至 1 cm² 小块, 再用灭菌研钵研碎至粉末状, 装入封口聚乙烯袋中, 常温保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: 果胶、聚半乳糖醛酸、D-半乳糖醛酸均购自 Sigma 公司; Premix Ex Taq、PCR 引物、Alu I 酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR 仪(美国伯乐公司, PTC-200); 722 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); UV-2802H 紫外分光光度计(UNICO, 上海); 凝胶成像系统(BINTA 2020D)。

1.1.3 培养基: 富集培养基/基础培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH 7.0–7.2。

果胶分离培养基 A (g/L): 果胶 5.0, 酵母膏 5.0, MgSO₄·7H₂O 2.0, K₂HPO₄ 1.0, 琼脂 20, pH 7.0–7.2。

果胶分离培养基 B (g/L): 果胶 5.0, 酵母膏 5.0, MgSO₄·7H₂O 2.0, K₂HPO₄ 1.0, 琼脂 20, 刚果红 0.15, pH 7.0–7.2。

种子培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH 7.0–7.2。

发酵培养基(g/L): 果胶 10.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, 酵母膏 5.0, K₂HPO₄ 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.3, pH 7.0–7.2。

1.2 菌株的分离筛选

将 1 g 烟末放入 100 mL 富集培养基, 37 °C、220 r/min 培养 24 h, 取培养液在果胶分离培养基 A 上稀释涂布, 培养后挑选单菌落纯化, 直至获得纯种, 将纯化菌种接种到果胶分离培养基 B 上培养, 挑取透明圈直径/菌落直径(H/C 值)大于 1.2 的菌株接种到斜面培养基上, 4 °C 保存待用。

1.3 酶活力测定及蛋白质含量测定

1.3.1 粗酶液的制备: 将保存的斜面菌株活化后,

接入种子培养基 37 °C、220 r/min 恒温培养 12 h, 以 4%的接种量接入发酵培养基, 37 °C、220 r/min 恒温培养 48 h, 将发酵液 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为粗酶液。

1.3.2 聚半乳糖醛酸裂解酶活力测定: 取稀释的粗酶液 20 μ L, 加入到 2 mL 含 0.2%聚半乳糖醛酸溶液(pH 9.4的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液配制), 50 °C 反应 15 min, 用 3 mL 0.03 mol/L 磷酸溶液终止酶反应, 在 235 nm 处测 OD 值, 以灭活酶液作为空白对照。不饱和半乳糖醛酸在 235 nm 处的摩尔吸光系数是 4 600 L/(mol·cm)^[7], 据此可通过 OD 值计算出饱和半乳糖醛酸含量。

酶活定义: 每分钟使聚半乳糖醛酸裂解产生 1 μ mol 不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.3.3 果胶酶活力测定: 0.2 mL 稀释酶液加到 1.8 mL 0.4%果胶溶液(pH 9.4的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液配制)中摇匀, 50 °C 水浴 30 min 后, 加 2 mL DNS, 迅速在沸水中水浴 10 min, 冷却, 蒸馏水定容至 15 mL, 摇匀; 空白为 0.2 mL 稀释酶液中加入 2 mL DNS、1.8 mL 0.4%果胶溶液, 50 °C 水浴 30 min, 冷却, 蒸馏水定容至 15 mL, 摇匀。550 nm 下测 OD 值^[8], 根据还原糖标准曲线计算出所含还原糖量。

酶活定义: 果胶酶降解果胶每小时产生 1 mg 还原糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.3.4 蛋白质含量测定: 蛋白质浓度的测定采用 Bradford 方法测定^[9], 标准蛋白质为牛血清蛋白。

1.4 培养条件对菌株生长的影响^[10]

1.4.1 盐度: 将菌种接种到含氯化钠为 0、1%、2%、3%、4%、5%、7%、10%的基础培养基中培养, 每隔 6 h 取样, 测 OD₆₀₀^[11]。

1.4.2 温度: 菌种转接后, 置于 5 °C、10 °C、15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、37 °C、40 °C、45 °C、50 °C、220 r/min 摇床培养, 每隔 6 h 取样, 测 OD₆₀₀。

1.4.3 起始 pH: 菌种转接到 pH 为 4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、10.0 的基础培养基培养, 每隔 6 h 取样, 测 OD₆₀₀。

1.5 培养条件对发酵产酶的影响

研究培养时间、温度、起始 pH、接种量对菌株发酵产酶的影响。

1.5.1 培养时间: 以 4%的接种量接种发酵培养基, 培养 4 d, 每隔 8 h 测酶活, 检测培养时间对产酶的影响。确定最适发酵时间。

1.5.2 温度: 以 4%的接种量接种发酵培养基, 于 25 °C、28 °C、30 °C、33 °C、35 °C、37 °C、40 °C 培养, 在最适培养时间下测酶活。确定最适发酵温度。

1.5.3 起始 pH: 以 4%的接种量接种发酵培养基, 分别调节 pH 为 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0, 在最适培养时间和温度下培养, 测酶活。确定最适发酵起始 pH。

1.5.4 接种量: 分别以 2%、4%、6%、8%、10%的接种量接种发酵培养基, 在最适培养时间、温度、起始 pH 下发酵培养, 测酶活。确定最适发酵接种量。

1.6 形态学与生理生化鉴定

参考《常见细菌鉴定手册》^[12], 对菌株进行生理生化鉴定。将 37 °C 培养 24–48 h 菌龄的种子进行革兰氏染色、芽孢染色, 油镜下观察细菌的形态和大小。

1.7 16S rDNA 的 PCR 扩增、酶切分型及测序分析

采用细菌 16S rDNA 通用引物(27F: 5'-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACC TTGTTACGACTT-3')^[13]对菌株总 DNA 模板进行 16S rDNA 扩增, 扩增条件: 94 °C 10 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 80 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。取 4.5 μ L PCR 产物, 1%琼脂糖凝胶电泳进行产物检测, 紫外灯箱观察扩增效果。

采用 *Alu* I 酶对 PCR 产物进行酶切分型^[14–16], 酶切后取 10 μ L 酶切产物, 2.5%琼脂糖凝胶电泳进行产物检测, 紫外灯箱观察酶切效果。

序列测定和分析: 将 16S rDNA 扩增产物送交金斯瑞测序公司测序, 所测序列进行 BLAST 同源性比对分析(www.ncbi.nlm.nih.gov), 使用序列分析软件 MEGA 4.1-ClustalW 程序对序列进行排列,

采用邻接法 (Neighbor-Joining) 以相近序列构建 16S rDNA 基因系统发育树^[17]。

2 结果与分析

2.1 菌的分离与形态学特征

分离得到的 17 株果胶酶产生菌, 革兰氏染色结果为: 16 株为革兰氏阳性菌(如图 1 中菌株 T10), 菌体大小为(0.5–1.0) μm ×(2.5–4.8) μm , 呈杆状, 对状或链状排列, 有孢子, 孢子椭圆, 端生或中生; 1 株为革兰氏阴性菌(如图 1 中菌株 T16), 菌体大小为(0.5–0.7) μm ×(0.8–2.6) μm , 呈直杆状, 无孢子。经平板培养 48 h 后, 观察结果为: 16 株革兰氏阳性菌, 菌落圆形, 乳白色, 不透明, 不湿润, 无光泽, 直径

约 5 mm, 部分有褶皱, 边缘不整齐; 1 株革兰氏阴性菌, 菌落圆形, 透明, 湿润, 有光泽, 直径约 7 mm, 光滑, 边缘整齐。

2.2 细菌 16S rDNA 序列分析、酶切分型及系统发育树的构建

分别以 17 株细菌的总 DNA 为模板扩增各自的 16S rDNA, 产生大约 1 500 bp 的扩增片段(图 2), 用限制性内切酶 *Alu* I 对 PCR 产物进行 ARDRA 多态性分析, 结果得到 2 种酶切条带(图 3), 有 16 株细菌属于一个类型, 为优势 ARDRA 型。第 2 个类型有 1 株细菌, 即 T16。

从图 2 可看出, 扩增产物长度为 1 500 bp 左右, 符合扩增要求。

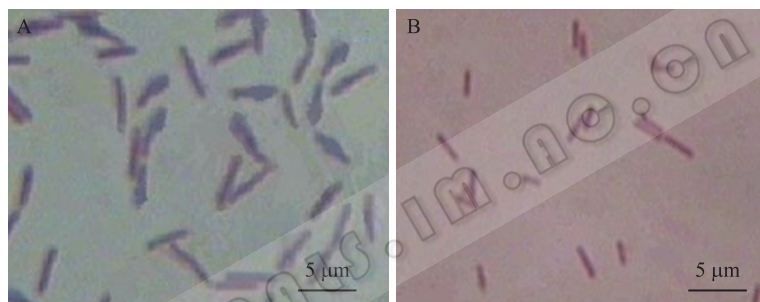


图 1 两株果胶酶产生菌革兰氏染色照片(36 h, ×1 000)

Fig. 1 Gram staining micrograph of the two pectin-degrading bacteria (36 h, ×1 000)

注: A: 枯草芽孢杆菌 T10; B: 粪产碱菌 T16.

Note: A: *Bacillus subtilis* T10; B: *Alcaligenes faecalis* T16.

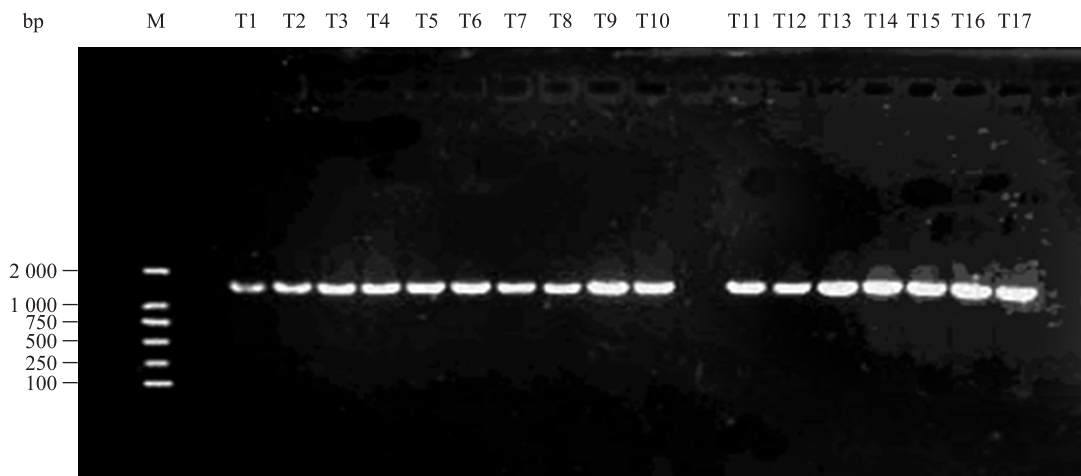


图 2 16S rDNA PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 16S rDNA PCR production agarose gel electrophoretogram

Note: M: DL2000 DNA marker.

从图 3 可知, 分离菌株的 16S rDNA 经 *Alu I* 酶切后产生 2 个 ARDRA 类型, 对 2 个 ARDRA 型中的代表性菌株 T10 (第 1 个 ARDRA 型中酶活最高)、T16 进行测序。

系统发育树结果显示, 菌株 T10 属于芽孢杆菌属, 与 *Bacillus subtilis* 具有 99% 以上的同源性, 菌株 T16 与 *Alcaligenes faecalis* 的 16S rDNA 同源性为 99% (图 4)。

2.3 生理生化鉴定结果

根据 16S rDNA 鉴定结果, 菌株 T10 属于芽孢杆菌属, 将菌株 T10 与枯草芽孢杆菌标准菌株

Bacillus subtilis NRRL NRS-744^T 进行比较, 据表 1 可知, 菌株 T10 厌氧不生长, pH 5.7 下可以生长, 最适生长 pH 为 7.0, 10 °C–50 °C 时皆可生长, 最适生长温度为 37 °C, 盐度 1%–10% 皆可生长, 最适生长盐度为 2%, 接触酶、氧化酶、V-P 反应阳性, D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露醇皆可产酸, 水解明胶、淀粉, 利用柠檬酸盐, 不利用丙酸盐, 酪氨酸水解、硝酸盐还原阳性, 苯丙氨酸脱氨酶阴性, 不产生吡啶, 依据《常见细菌鉴定手册》^[18], 初步确定 T10 为枯草芽孢杆菌。

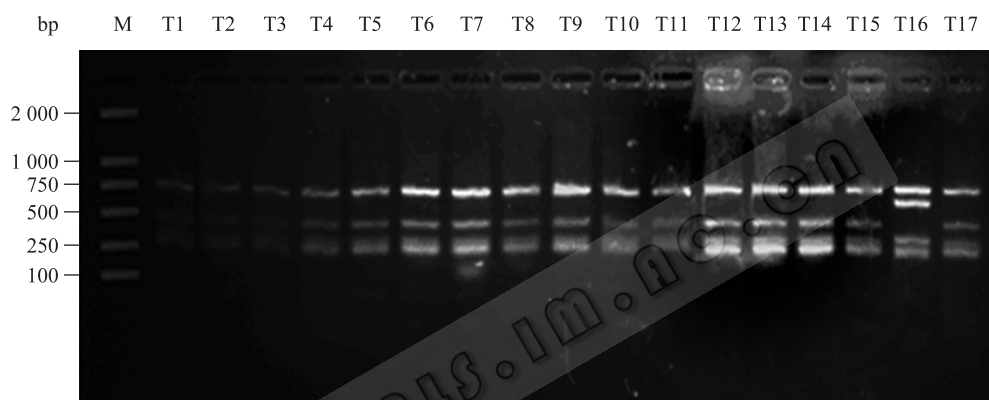


图 3 17 株细菌的 16S rDNA PCR 产物经 *Alu I* 酶切后产生的 ARDRA 类型

Fig. 3 ARDRA patterns of PCR-amplified 16S rDNA digested by endonuclease *Alu I* of the 17 bacterial strains

Note: M: DL2000 DNA marker.

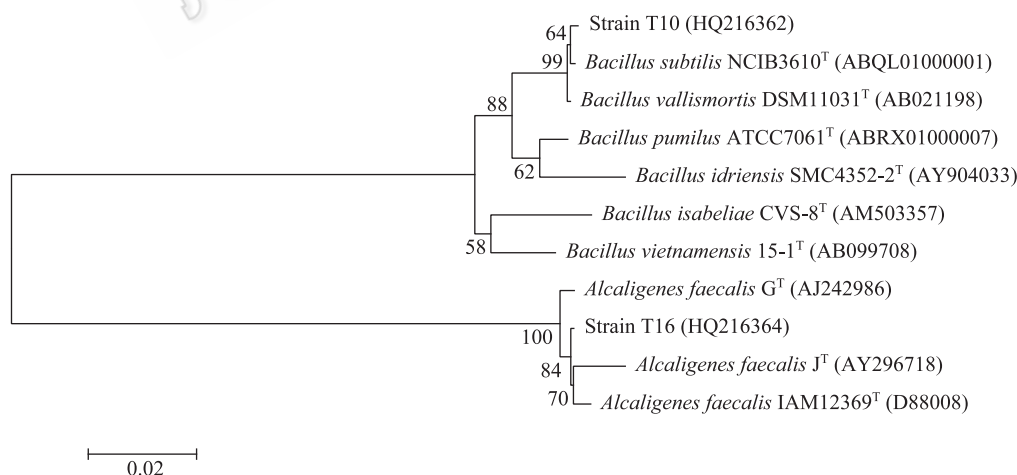


图 4 以 16S rDNA 序列为基础的果胶酶产生菌的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic Neighbour-Joining tree of the pectin-degrading bacteria based on 16S rDNA sequences

注: 发育节点的数字: Bootstrap 值; 括号中的序号: GenBank 序列登录号; 标尺所示刻度: 遗传距离为 0.02。

Note: Numbers at nodes: Bootstrap percentages (based on 1000 samplings); The numbers in parentheses: Accession numbers of sequences in GenBank; Bar: 0.02 sequence divergence.

表 1 菌株 T10 与枯草芽孢杆菌标准菌株的生理生化指标

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain T10 and type strain of *Bacillus subtilis*

鉴定特征 Characteristics	Strain T10	<i>Bacillus subtilis</i> NRRL NRS-744 ^T
厌氧生长 Anaerobic growth	-	-
pH 5.7 下生长 Growth at pH 5.7	+	+
3% NaCl 生长 Growth at 3% NaCl	+	+
5% NaCl 生长 Growth at 5% NaCl	+	+
7% NaCl 生长 Growth at 7% NaCl	+	+
10% NaCl 生长 Growth at 10% NaCl	+	+
0.001% 溶菌酶 0.001% Lysozyme	ND	-
接触酶 Catalase	+	+
氧化酶 Oxidase	+	+
V-P 测定 V-P test	+	+
产酸: Acid production from		
D-葡萄糖 D-Glucose	+	+
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	+	+
D-木糖 D-Xylose	+	+
D-甘露醇 D-Mannitol	+	+
明胶水解 Gelatine hydrolysis	+	ND
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+
利用 Utilization of		
柠檬酸盐 Citrate	+	+
丙酸盐 Propionate	-	-
酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	+	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	ND
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+
吲哚实验 Indole test	-	ND
5 °C 生长 Growth at 5 °C	-	-
10 °C 生长 Growth at 10 °C	+	+
50 °C 生长 Growth at 50 °C	+	+
55 °C 生长 Growth at 55 °C	-	-

注: +: 阳性; -: 阴性; ND: 未测定。

Note: +: Positive; -: Negative; ND: Not determined.

根据 16S rDNA 鉴定结果, 菌株 T16 属于产碱菌属, 将菌株 T16 与粪产碱菌标准菌株 *Alcaligenes faecalis* IAM12645^T 进行比较, 据表 2 可知, 菌株 T16 氧化酶、接触酶阳性, 水解淀粉, 不水解明胶, 不利用柠檬酸盐, 酪氨酸不水解, 甘露醇产酸, D-木糖不产酸, 硝酸盐还原阴性, 能利用亚硝酸盐厌氧生长, 不能水解邻硝基酚 β-D-半乳糖苷, 不水解酪氨酸, 不产生类黑色素, 苯丙氨酸脱氨酶、酰胺酶、脲酶阳性, 5 °C–45 °C 皆可生长, 最适生长温度 30 °C, 最适生长 pH 为 7.0, 盐度为 0 可以生长, 盐度为 10% 不能生长, 最适盐度为 4%。依据《常见细菌鉴定手册》^[19], 初步确定 T16 为粪产碱菌。

表 2 菌株 T16 与粪产碱菌标准菌株的生理生化指标
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain T16 and type strain of *Alcaligenes faecalis*

鉴定特征 Characteristics	Strain T16	<i>Alcaligenes faecalis</i> IAM12645 ^T
氧化酶 Oxidase	+	+
接触酶 Catalase	+	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+
明胶水解 Gelatine hydrolysis	-	ND
柠檬酸盐利用 Utilization of Citrate	-	-
酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	-	-
甘露醇产酸 Acid from mannitol	+	+
D-木糖产酸 Acid from D-Xylose	-	ND
5 °C 生长 Growth at 5 °C	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	+
亚硝酸盐厌氧生长 Anaerobic growth using NO ₂ ⁻	+	+
邻硝基酚 β-D-半乳糖苷水解 ONPG hydrolysis	-	-
酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	-	-
类黑色素 Melanin-like pigment	-	-
甲基红实验 Methyl red test	ND	-
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	+	+
酰胺酶 Amidase	+	+
脲酶 Urease	+	+
亚甲基蓝还原 Methylene blue reduction	ND	+

2.4 培养条件对发酵产酶的影响

如图 5 所示, 经不同时间培养, 发现菌株 T10 在 24–48 h 酶活力增幅较大, 果胶酶(PEC)活力在 48 h 时达到最大, 在 56 h 时为最高酶活的 96%, 聚半乳糖醛酸裂解酶酶活(PGL)在 56 h 时达到最大, 在 48 h 时为其最高酶活的 98%, 菌株 T10 在 24–56 h 酶活有较大的增幅, 其 PEC、PGL 均在 56 h 时达到最大。因此确定菌株 T10 的最适发酵时间为 48–56 h, 菌株 T16 最适发酵时间为 56 h。

在最适发酵时间下, 经不同温度培养, 如图 6 所示, 发现菌株 T10 在 35 °C 培养酶活达到最高, 菌株 T16 在 33 °C 培养, 酶活达到最高。

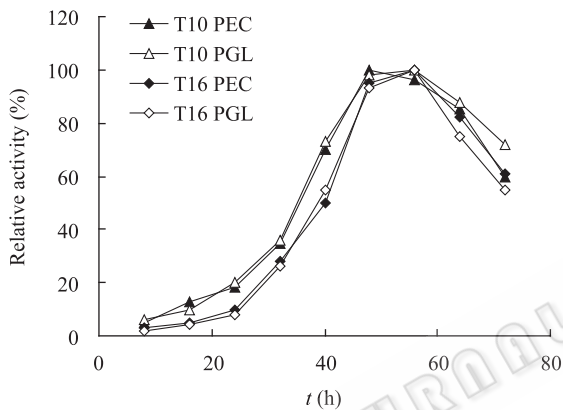


图 5 发酵时间对菌株产酶的影响
Fig. 5 The effect of fermentation time on the enzyme activity

Note: PEC: Pectinase; PGL: Polygalacturonate lyase.

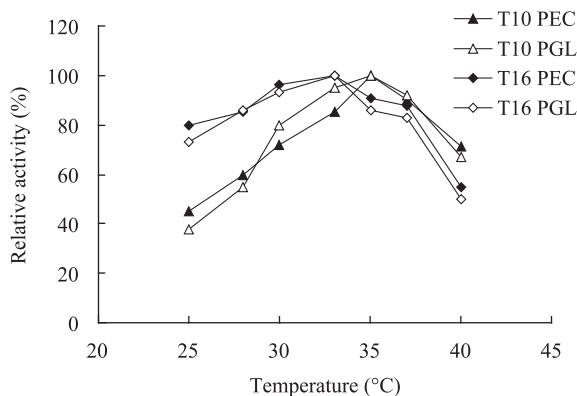


图 6 发酵温度对菌株产酶的影响
Fig. 6 The effect of fermentation temperature on the enzyme activity

Note: PEC: Pectinase; PGL: Polygalacturonate lyase.

在最适时间、最适温度下, 在不同 pH 条件下培养, 如图 7 所示, 发现菌株 T10 在 pH 为 7.5 时 PEC、PGL 酶活最高, 菌株 T16 在 pH 为 6.5 时 PEC、PGL 酶活最高。

在最适时间、最适温度、最适 pH 条件下, 进行不同接种量实验, 如图 8 所示, 发现菌株 T10 的最适接种量为 6%, 菌株 T16 最适接种量为 4%。

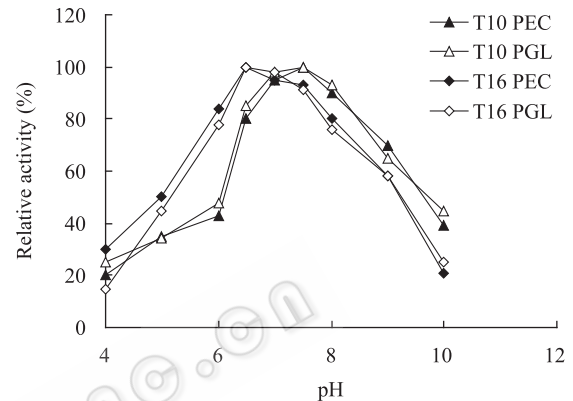


图 7 发酵起始 pH 对菌株产酶的影响
Fig. 7 The effect of initial fermentation pH on the enzyme activity

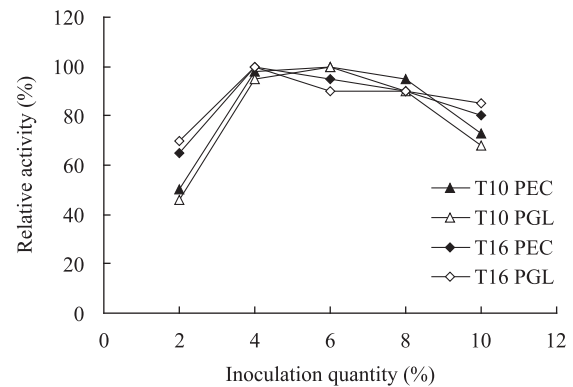


图 8 接种量对菌株产酶的影响
Fig. 8 The effect of inoculation quantity on the enzyme activity

2.5 津巴布韦烟叶产果胶酶的 2 个菌种的酶活

将菌株 T10、T16 分别在最适条件(时间、温度、pH、接种量)下发酵培养, 对于菌株 T10, 以 6% 的接种量, 在 35 °C、起始 pH 7.5 条件下发酵培养 48–56 h, 其果胶酶酶活为 571 U/mg, 聚半乳糖醛酸裂解酶酶活为 297 U/mg; 对于菌株 T16, 以 4% 接种

量, 在 33 °C、起始 pH 6.5 条件下培养 56 h, 其果胶酶酶活为 540 U/mg, 聚半乳糖醛酸裂解酶酶活为 275 U/mg, 具体结果见表 3。

从表 3 中我们可以得出, 在所分离的菌株中, 枯草芽孢杆菌 T10 的酶活最高, 在最适发酵条件下, 其果胶酶酶活为 571 U/mg, 聚半乳糖醛酸裂解酶酶活为 297 U/mg。

表 3 津巴布韦片烟烟叶产果胶酶的 2 个菌种酶活 Table 3 Enzyme activities of two types of pectin-degrading bacteria isolated from Zimbabwe tobacco strips		
菌种 Type of bacteria	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	粪产碱菌 <i>Alcaligenes faecalis</i>
菌株编号 No.	T10	T16
果胶酶酶活 Pectinase activity (U/mg)	571	540
聚半乳糖醛酸裂解酶酶活 Polygalacturonate lyase activity (U/mg)	297	275

3 结论

本文从烟叶表面分离到 17 株产果胶酶细菌, 采用形态学、16S rDNA、生理生化实验对分离菌株进行鉴定, 发现所分离菌株主要为芽孢杆菌属的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 和产碱菌属的粪产碱菌 *Alcaligenes faecalis*。之前也有文献报道, 产果胶酶微生物有枯草芽孢杆菌等^[20], 这与本文分离到的大量芽孢杆菌属菌株相一致。此外, 本文首次分离到一株可产果胶酶的新菌株, 粪产碱菌, 扩大了产果胶酶菌种来源。

在最优培养条件下, 在所分离的菌株中, 枯草芽孢杆菌 T10 酶活力最高, 其果胶酶酶活为 571 U/mg, 聚半乳糖醛酸裂解酶酶活为 297 U/mg。粪产碱菌 T16, 其果胶酶酶活为 540 U/mg, 聚半乳糖醛酸裂解酶酶活为 275 U/mg, 具有较高酶活, 有一定的应用价值, 其所产果胶酶酶学性质有待于进一步研究。

本文从烟叶表面分离到 2 种高产果胶酶细菌, 为直接利用烟叶表面微生物生产内源果胶酶来降低烟叶中果胶含量, 从而提高烟草制品品质提供了思路。

下一步, 将对枯草芽孢杆菌酶活最高菌株 T10、粪产碱菌 T16 所产果胶酶进行酶学性质研究, 并将其应用于降解烟叶果胶的处理中, 了解其降解烟叶中果胶的能力。

参 考 文 献

- [1] 闫克玉, 刘凤珠. 酶降解烟叶中细胞壁物质[J]. 生物技术, 2001, 11(4): 19-22.
- [2] 余永茂, 高芳馨, 张淑华. 微生物酶发酵低次烟叶初试报告[J]. 烟草科技, 1988(5): 16-18.
- [3] 于建军, 马海燕, 杨寒文, 等. 利用果胶酶降解烟叶中果胶的研究[J]. 江西农业学报, 2009, 21(3): 136-138.
- [4] 夏炳乐, 颜春雷. 生物酶制剂提高烟叶醇化质量[J]. 烟草科技, 2007(11): 13-16.
- [5] Vanechoutte M, Rossau R, De Vos P, et al. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA)[J]. FEMS Microbiology Letters, 1992, 93(3): 227-233.
- [6] 陈晓蕾, 张忠泽. 微生物的 ARDRA 检测[J]. 微生物学杂志, 1999, 19(2): 40-43.
- [7] Sakamoto T, Hours AR, Sakai T. Purification, characterization, and production of two pectic transeliminases with protopectinase activity from *Bacillus subtilis*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1994, 58(2): 353-358.
- [8] 张浩森, 缪静, 余晓斌. 果胶酶高产菌株的筛选及产酶条件的研究[J]. 生物学杂志, 2008, 25(1): 28-30.
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [10] 凌娟, 董俊德, 张燕英, 等. 一株珊瑚礁-海草床复合生态系统固氮菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(7): 962-968.
- [11] Jiang Y, Wen JP, Bai J, et al. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 147(1/2): 672-676.
- [12] 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: 364-398.
- [13] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [14] Fischer SE, Fischer SI, Magris S, et al. Isolation and char-

- acterization of bacteria from the rhizosphere of wheat[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(7): 895-903.
- [15] Caccamo D, Maugeri TL, Gugliandolo C. Identification of thermophilic and marine bacilli from shallow thermal vents by restriction analysis of their amplified 16S rDNA[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(3): 520-524.
- [16] 宁华, 张荣先, 陈浩, 等. 滇池中芽孢杆菌的 ARDRA 分类及溶藻特性[J]. 湖泊科学, 2008, 20(5): 675-680.
- [17] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111-120.
- [18] 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.
- [19] 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: 180-182.
- [20] Ahlawat S, Battan B, Dhiman SS, et al. Production of thermostable pectinase and xylanase for their potential application in bleaching of kraft pulp[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2007, 34(12): 763-770.

~~~~~  
(上接 p.802)

## 征 稿 简 则

### 3.4 摘要写作注意事项

3.4.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>