

研究报告



植物根际芽胞杆菌菌种资源采集及其具有过水解催化活性水解酶基因的克隆

王倩 李欢 郑琳 贾文敬 黄建忠* 李欣 董思圳 舒正玉*

福建师范大学生命科学学院 工业微生物发酵技术国家地方联合工程研究中心 教育部工业微生物工程中心
福建 福州 350108

摘要:【背景】芽胞杆菌源枯草杆菌蛋白酶(subtilisin carlsberg)、乙酰基木聚糖酯酶(acetyl xylan esterase)和头孢菌素乙酰水解酶(cephalosporin acetyl hydrolase)具有较高的过水解催化活性,有商业开发价值。【目的】挖掘芽胞杆菌菌株中具有过水解酶催化活性的水解酶蛋白基因,为后续制备过水解酶及酶法合成过氧乙酸奠定基础。【方法】利用定向筛选培养基,从植物根际及纳豆产品中筛选产蛋白酶芽胞杆菌候选菌株,并利用 RFLP 及 16S rRNA 基因对其进行鉴定。从蛋白酶高产芽胞杆菌菌株中克隆枯草杆菌蛋白酶、乙酰木聚糖酯酶和头孢菌素乙酰水解酶的全长基因。【结果】从植物根际土壤及纳豆产品中分离到 85 个候选菌株, RFLP 及 16S rRNA 基因鉴定结果表明候选菌株均为芽胞杆菌,分别属于 *Bacillus subtilis*、*Bacillus cereus*、*Bacillus pumilus* 和 *Bacillus megaterium* 四个类群。从 *B. subtilis* NSYT-3 克隆的枯草杆菌蛋白酶基因编码的多肽链全长 381 个氨基酸,从 *B. pumilus* OSLJ-3 克隆得到的乙酰基木聚糖酯酶基因编码的多肽链全长 320 个氨基酸,从 *B. subtilis* NSYT-3 克隆的头孢菌素乙酰水解酶基因编码的多肽链全长 318 个氨基酸,3D 结构模拟表明这 3 个酶蛋白均具有 α/β 水解酶折叠家族蛋白结构特点。【结论】芽胞杆菌源具过水解催化活性水解酶基因的克隆,为后续开发酶法合成过氧乙酸工艺奠定了基础。

关键词: 根际细菌, 芽胞杆菌, 过水解催化活性, 枯草杆菌蛋白酶, 乙酰木聚糖酯酶, 头孢菌素乙酰水解酶

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31370802, 31870787); Natural Science Foundation of Fujian Province (2017J01441)

*Corresponding authors: Tel: 86-591-22868212

E-mail: HUANG Jian-Zhong: hjz@fjnu.edu.cn; SHU Zheng-Yu: shuzhengyu@fjnu.edu.cn

Received: 21-07-2019; **Accepted:** 16-10-2019; **Published online:** 28-10-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31370802, 31870787); 福建省自然科学基金(2017J01441)

*通信作者: Tel: 0591-22868212

E-mail: 黄建忠: hjz@fjnu.edu.cn; 舒正玉: shuzhengyu@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2019-07-21; 接受日期: 2019-10-16; 网络首发日期: 2019-10-28

Isolation and classification of *Bacillus* sp. strains to mine genes encoding perhydrolysis activity

WANG Qian LI Huan ZHENG Lin JIA Wen-Jing HUANG Jian-Zhong* LI Xin
DONG Si-Zhen SHU Zheng-Yu*

National & Local United Engineering Research Center of Industrial Microbiology and Fermentation Technology; Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education; College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China

Abstract: [Background] Subtilisin carlsberg, acetyl xylan esterase and cephalosporin acetyl hydrolase from *Bacillus* sp. display high perhydrolysis activity in previous reports, and are worth developing for commercial application. [Objective] To produce perhydrolysis activity-encoding genes were cloned from *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere soil samples and natto soybean products. [Methods] Protease-producing thermotolerant *Bacillus* sp. strains were screened from rhizosphere soil samples and natto soybean products using directed-screening medium, and then identified using 16S rRNA gene sequencing. Three full-length hydrolase genes (including subtilisin carlsberg, acetyl xylan esterase and cephalosporin acetyl hydrolase) were cloned from *Bacillus* sp. strains and then analyzed using sequence alignment. [Results] Total 85 protease-producing pseudo-*Bacillus* sp. strains was screened, and then identified and classified into four groups: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus megaterium*. Three full-length hydrolase genes, subtilisin carlsberg gene (encoding 381 aa) from *B. subtilis* NSYT-3, acetyl xylan esterase gene (encoding 320 aa) from *B. pumilus* OSLJ-13, and cephalosporin acetyl hydrolase gene (encoding 318 aa) from *B. subtilis* NSYT-3, were cloned. All of the simulated 3D structure of subtilisin carlsberg, acetyl xylan esterase, and cephalosporin acetyl hydrolase were coincident with the typical structural characterization of α/β hydrolase fold enzymes. [Conclusion] Cloning and expression of hydrolase with perhydrolysis activity-encoding genes from *Bacillus* sp. strains will lay the foundation for the enzymatic synthesis technology of peroxyacetic acid.

Keywords: Rhizosphere bacteria, *Bacillus* sp., Perhydrolysis activity, Subtilisin carlsberg, Acetyl xylan esterase, Cephalosporin acetyl hydrolase

植物根际通过植物、微生物及土壤的互作形成了一个特殊的微生态环境, 植物根际土壤中已分离出真菌、细菌、古细菌、病毒等多种类型的微生物^[1]。植物根际微生物可促进植物生长; 增强植物的抗逆性(耐盐)、抗病能力; 促进土壤中各种化合物及元素的矿化过程及物质循环, 提升土壤肥力^[2]。根际微生物在与植物互作过程中可产生包括纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶、淀粉酶、果胶酶、磷酸酶、脂肪酶、蛋白酶等多种水解酶^[3]。从根际土壤(宏基因组文库)或根际微生物中挖掘新型酶蛋白已成为开发新型生物催化剂的常规途径之一^[4-5]。

α/β 水解酶折叠家族酶蛋白(α/β hydrolase fold enzymes)是指酶蛋白的 3D 分子结构中存在 8 个平

行的 β -折叠片层(β -sheet), β -折叠片层之间和周围围绕有系列 α -螺旋(α -helix)结构, 能催化水解反应(醇解反应或氨解反应)等的一类酶蛋白^[6]。 α/β 水解酶折叠家族酶蛋白是截至目前研究最为深入透彻的一类蛋白质家族, 也是已完成结构解析种类和数量最多的蛋白质家族。作为重要的工业生物催化剂, 该家族的多种酶蛋白已实现商业化生产, 并广泛应用于绿色制药、食品加工、可降解高分子材料的合成、生物能源等领域^[7]。除了水解反应, α/β 水解酶折叠家族的酶蛋白还可以催化包括过水解反应在内的 17 种其他化学反应, 是一种具有多功能催化活性(promiscuous activity)的生物催化剂^[8]。在水解酶催化乙酸酯(乙酸或乙酸盐)水解反应过程

中,反应体系中的过氧化氢可与水分子竞争,攻击第二过渡态复合物[酶-Ser-O-C(O)-CH₃]中的酯键,并释放出过氧乙酸,该催化活性即为水解酶的过水解释催化活性^[9]。过氧乙酸作为一种重要的工业原料,在油脂加工、脱木质素、纤维素或纺织品的漂白、污水处理等领域具有较好的应用前景^[10]。传统的化学合成工艺对设备和工艺要求高(耐浓硫酸腐蚀),存在严重的生产安全问题(过氧乙酸浓度大于70%时容易爆炸),因此,开发酶法合成过氧乙酸的绿色生产工艺具有重要的意义^[9]。

由于过水解释催化活性属于 α/β 水解酶的多功能催化活性,因此挖掘并开发具有较好过水解释催化活性的酶蛋白具有重要的意义。已报道的具有良好过水解释催化活性(过水解释活性/水解活性 >1)的 α/β 水解酶有 *Bacillus subtilis* 源枯草杆菌蛋白酶(subtilisin carlsberg, EC 3.4.21.62, 缩写为 SCP)和头孢菌素乙酰水解酶(cephalosporin acetyl hydrolase, EC 3.1.1.41, 缩写为 CAH)、*Bacillus pumilus* 源和 *Thermotoga maritima* 源乙酰基木聚糖酯酶(acetyl xylan esterase, EC 3.1.1.72, 缩写为 AXE)、*Mycobacterium smegmatis* 源 Acyl transferase (EC 3.1.1.2)、*Pseudomonas fluorescens* 源 Aryl esterase (EC 3.1.1.2)等^[9,11-13]。上述酶蛋白及其应用基本上被 Genencor、Procter & Gamble、Dynisco 和 Dupont 等国际知名公司专利垄断。 α/β 水解酶催化合成过氧乙酸反应中,底物之一为过氧化氢,产物为过氧乙酸,均为强氧化剂,对酶蛋白对氧化剂的耐受性提出了较高的要求,产物过氧乙酸常通过偶联原位化学氧化解决。为克服底物过氧化氢对酶蛋白的潜在毒害,可通过引入葡萄糖氧化酶建立葡萄糖氧化酶- α/β 水解酶(过水解释催化活性)偶联反应来实现。因此,克隆并表达各类具有较高过水解释催化活性的 α/β 水解酶,并测定其对过氧化氢的 K_m 值,从而筛选出能与葡萄糖氧化酶高效偶联的酶蛋白,对提高葡萄糖氧化酶- α/β 水解酶双酶催化偶联反应的催化效率和操作稳定性具有重要的意义。

由于枯草芽胞杆菌分泌的纳豆激酶(nattokinase)与本研究拟克隆的枯草杆菌蛋白酶具有高度的序列及结构一致性(仅少数几个氨基酸差异),因此本文除了主要从植物根际土壤中分离并鉴定芽胞杆菌外,也对部分市售纳豆产品中的芽胞杆菌进行了分离鉴定。本文从植物根际土壤及纳豆产品中分离获得了85株产蛋白酶芽胞杆菌,基于限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和16S rRNA基因序列进行了初步分类,同时结合已报道的芽胞杆菌源具较高过水解释催化活性的酶蛋白资源(SCP、CAH和AXE),克隆了相应类群芽胞杆菌菌株中的SCP、CAH和AXE蛋白的编码基因,为后续开发利用上述酶蛋白催化合成过氧乙酸奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 土壤、纳豆产品样品

土壤样品分别采自山东青岛莱西、福建永泰、山西洪洞等8个地区19种植物的根际土壤。对土壤样品进行植物名称结合地域原则进行编号,如从洪洞(Hongtong)地区采集的小麦(*Triticum aestivum*)根际土壤,编号为TAHT。从上述各种样品中分离出的芽胞杆菌菌株再依次用序号编号。纳豆产品从市场随机购买,并基于商品名称进行编号。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

干酪素、三氯乙酸、福林酚、L-酪氨酸等各种化学试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

LATaq DNA聚合酶、限制性内切酶 *Hha* I、*Msp* I 和 *Rsa* I、 λ -*Hind* III digest DNA Marker, DL2000 DNA Marker、pMD™19-T Vector Cloning Kit等均购自宝生物工程(大连)有限公司; Gel Extraction Kit 为 Omega 公司产品。本实验使用的引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,具体引物序列、引物的 T_m 等信息见表1。PCR 扩增仪和电泳仪, Bio-Rad 公司; 紫外凝胶成像系统, UVP 公司; UV 2600 紫外分光光度计, 岛津公司。

表 1 本实验所用的 PCR 引物

Table 1 Pairs of the primers used in this study

Primers name	Primers sequence (5'→3')	T_m (°C)	Annealing temperature (°C)	PCR product (bp)
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	54.2	51	1 514
1492r	GGTTACCTTGTTACGACTT	52.8		
BSS(F)	TGCTTGTGAAGATTTTCAGAGGCAGC	59.9	60	1 443
BSS(R)	CGAGTCTACGGAAATAGCGAGAGA	59.4		
AXE(F)	GTCGGTCGTCCTCCTTTATTCGTTTCAT	60.4	60	1 341
AXE(R)	CGATTCTCGGATTCATCCTTCACATCAT	58.3		
CAH(F)	ATGGAAC TAAGCCGGGAAAGTCTTAAACA	59.5	60	1 328
CAH(R)	GCACATAAATAAAGCGGACGTCGTAATCA	58.8		

蛋白酶定性筛选培养基(g/L): 干酪素 15.0, 琼脂 20.0, 氯化钠 10.0, 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, pH 7.0–7.5。

蛋白酶发酵培养基(g/L): 豆粕粉 3.0, 乳糖 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15, NaCl 0.5, K_2HPO_4 0.02, KH_2PO_4 0.08, pH 6.0。

1.3 产蛋白酶芽胞杆菌菌株的分离

芽胞杆菌菌株的分离采用热处理法^[14], 产蛋白酶芽胞杆菌菌株的分离采用含干酪素的蛋白酶定向筛选培养基^[15]。具体如下: 称取 1 g 土样(或纳豆粉末)添加到 100 mL 的无菌水中, 在 80 °C 下振荡 20 min, 静置片刻。取上清液梯度稀释, 从 10^{-5} 梯度的试管中取 50 μ L 涂布蛋白酶定性筛选培养基, 37 °C 培养 12–16 h。待筛选平板上的菌落长出后, 先将菌落影印到另外一个定性筛选平板上, 并向原始平板中添加适量 6% (质量体积比)的三氯乙酸。从影印平板上挑取原始筛选平板上有明显水解圈的对应该菌落, 划线挑取单菌落, 编号并甘油管低温保存。

1.4 芽胞杆菌菌株产蛋白酶能力的定量检测

将上述定性筛选获得的产蛋白酶芽胞杆菌菌株接种到 LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 培养 8 h。活化后的菌悬液按照 5% (体积比)的接种量接入蛋白酶发酵培养基中。装液量为 50 mL (250 mL), 37 °C、200 r/min 培养 56 h。于 4 °C、8 000 r/min 离心 20 min 收集发酵上清液, 以备测定蛋白酶活性。

1.5 蛋白酶活性测定方法

蛋白酶活性的测定方法采用 Folin-酚法, 参照

Huang 等^[16]和 Chen 等^[17]并稍作修改。具体如下: 1 mL 2% 干酪素溶液(20 mmol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液) 40 °C 水浴 2 min 后加入 1 mL 适当稀释后的待测酶液, 40 °C 反应 10 min 后, 向反应体系中加入 2.0 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应, 12 000 r/min 离心 2 min, 取 1 mL 上清液加入 5 mL 0.4 mol/L Na_2CO_3 和 1 mL Folin-酚, 40 °C 反应 20 min 后, 在 660 nm 下测量上述混合物的吸光度。

1 个酶活单位(U)定义为: 在上述条件下, 每分钟释放出 1 μ mol 酪氨酸所需要的酶量。

1.6 产蛋白酶芽胞杆菌菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

1.6.1 提取芽胞杆菌基因组 DNA

芽胞杆菌基因组 DNA 的提取方法参照孙明等^[18]。活化后的芽胞杆菌细胞经溶菌酶处理后, 2% (质量体积比)的 SDS 裂解细胞; 经苯酚抽提、无水乙醇沉淀等处理后, 获得芽胞杆菌全基因组 DNA。

1.6.2 PCR 扩增 16S rRNA 基因

芽胞杆菌菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增参照 Ouattara 等^[19]。PCR 扩增引物为 27f 和 1492r (具体序列见表 1)。PCR 反应体系(总体积 25 μ L): 10 \times Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.0 μ L, 引物 27f (10 μ mol/L) 1.0 μ L, 引物 1492r (10 μ mol/L) 1.0 μ L, *LATaq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.1 μ L, 基因组 DNA 1.0 μ L, ddH₂O 18.4 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 51 °C 1 min, 72 °C 1 min, 20 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增

产物经电泳检测并纯化后用于后续实验。

1.7 产蛋白酶芽胞杆菌菌株 16S rRNA 基因限制性片段长度多态性分析

经电泳检测并纯化后的 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物分别用 3 种限制性内切酶 *Hha* I、*Msp* I 和 *Rsa* I 进行酶切, 酶切产物进行电泳观察。基于酶切产物对芽胞杆菌进行初步分类。

1.8 产蛋白酶芽胞杆菌 16S rRNA 基因的聚类分析

从前述分类获得的每个类群中分别挑选产胞外蛋白酶酶活最高的 2 个菌株, 测定其 16S rRNA 基因序列, 并提交 NCBI 核苷酸数据库。根据 16S rRNA 基因序列, 利用 MEGA 5.1 (Neighbor-Joining method) 对从土壤中分离的芽胞杆菌进行聚类分析。

1.9 三种具有过水解酶催化活性的酶蛋白编码基因的克隆

根据已知 *B. subtilis* SCP 蛋白和 CAH 蛋白编码基因的核苷酸序列, 分别设计引物对 BSS(F)/BSS(R) 和 CAH(F)/CAH(R), 以 *B. subtilis* NSYT-3 的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 SCP 和 CAH 编码基因; 根据已知 *B. pumilus* AXE 蛋白编码基因的核苷酸序列设计引物对 AXE(F)/AXE(R), 以 *B. pumilus* OSLJ-13 的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 AXE 蛋白的编码基因。引物对的核苷酸序列、PCR 扩增时使用的退火温度及 PCR 产物的大小见表 1。

1.10 SCP、CAH 和 AXE 蛋白多肽链氨基酸序列聚类分析

从 NCBI 数据库中分别检索出不同 *B. subtilis* 菌株的 SCP 蛋白和 CAH 蛋白多肽链氨基酸序列, 以及不同 *B. pumilus* 菌株的 AXE 蛋白多肽链氨基酸序列, 并分别与本实验中从 *B. subtilis* NSYT-3 菌株克隆的 SCP 和 CAH、从 *B. pumilus* OSLJ-13 菌株克隆的 AXE 蛋白的多肽链氨基酸序列进行比对。利用 MEGA 5.1 (Neighbor-Joining method) 对上述酶蛋白进行聚类分析。

1.11 SCP、CAH 和 AXE 蛋白的 3D 结构模拟

根据克隆基因编码的多肽链氨基酸序列, 利用 Swiss-model 进行同源建模; 获得的 PDB 文件利用

YASARA 软件可视化, 并评估前述基于序列比对对预测的催化三联体氨基酸残基之间的氢键网络。

2 结果与分析

2.1 产蛋白酶根际细菌的初筛

由于芽胞杆菌产生的芽胞具有较好的热耐受性^[20], 因此本研究用高温处理土壤悬液(实验中使用的热处理温度为 80 °C), 可以有效杀灭土壤中的大多数微生物, 达到富集芽胞的目的。本实验从各种植物的根际土壤中均分离到产蛋白酶的细菌菌株(图 1)。从每种植物根际土壤(或纳豆样品)分离平板上挑选出 1-3 个菌落, 共挑选出 85 个菌株进行后续实验。不同细菌菌落周围的水解圈大小存在显著的差异(图 1), 说明不同菌株之间产蛋白酶能力存在一定的差异。由于从常温根际土壤中也分离到耐热的非芽胞杆菌菌株^[21-22], 因此, 筛选平板上获得的菌株是否为芽胞杆菌菌株还需进一步进行分子鉴定。

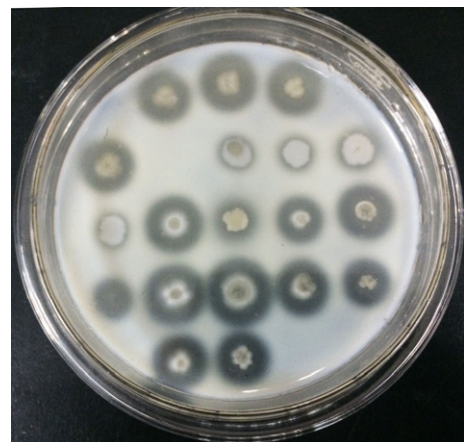


图 1 产蛋白酶菌株在筛选培养基上的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of protease-producing bacterial strains

注: 筛选培养基从左到右、从上到下的菌株编号依次为: NSYT-1, NSYT-2, NSYT-3, NSBY-2, NSHM-1, NSHM-2, NSHM-3, BCPH-2, BCPH-1, NSSC-2, NSCX-3, NSSC-1, TAHD-1, BNYT-2, OSLJ-13, NSSC-3, NSBY-1, NSCX-1, NSBY-3.

Note: From left to right and up to down of screening medium, the corresponding strains number: NSYT-1, NSYT-2, NSYT-3, NSBY-2, NSHM-1, NSHM-2, NSHM-3, BCPH-2, BCPH-1, NSSC-2, NSCX-3, NSSC-1, TAHD-1, BNYT-2, OSLJ-13, NSSC-3, NSBY-1, NSCX-1, NSBY-3.

2.2 根际细菌产蛋白能力的定量分析

各种根际细菌在产蛋白酶诱导培养基中均可分泌产生胞外蛋白酶(表 2)。不同细菌菌株分泌产生胞外蛋白酶的能力存在较大的差异, 细菌菌株产胞外蛋白酶的能力与土壤类型、植物类型和植物生长状态有关。本实验中主要农作物如水稻(*Oryza sativa* L., 缩写为 OS)、小麦(*Triticum aestivum*, 缩写为 TA)、油菜(*Brassica napus* L.,

缩写为 BN)等植物的根际土壤中均分离到产胞外蛋白酶能力较高的细菌菌株(发酵上清液蛋白酶活性均大于 10 U/mL)。同时也观察到, 经过长期人工驯化后的产蛋白酶细菌菌株, 如纳豆产品(natto soybean, 缩写为 NS)中分离获得的细菌菌株均表现出较高的产蛋白酶能力, 其中 NSYT-3 菌株的发酵上清液中蛋白酶的酶活达到 49.9 ± 0.2 U/mL。

表 2 不同根际细菌菌株产蛋白酶能力的比较

Table 2 Protease activity of the fermentation broth from bacteria strains isolated from rhizosphere soils

Strains	Protease activity (U/mL)	Strains	Protease activity (U/mL)	Strains	Protease activity (U/mL)
BNYT-1	2.9±0.2	CPGG-5	2.1±0.1	PALJ-7	9.6±0.4
BNYT-2	10.5±0.0	CPGG-6	4.1±0.2	BCPH-1	10.9±0.1
AGYT-1	9.7±1.1	CPGG-7	4.1±0.8	BCPH-2	8.4±0.4
FSYT-1	9.0±0.2	CPGG-8	1.9±0.0	BCPH-3	7.4±0.1
FSYT-2	3.2±0.1	AFGG-1	0.2±0.2	BCPH-4	3.2±0.3
FSYT-3	5.9±1.1	AFGG-2	3.9±0.5	BCPH-5	5.1±0.1
TAHD-1	12.2±0.6	AFGG-3	0.7±0.2	BCPH-6	4.8±0.0
TAHD-2	7.2±0.4	ACLJ-2	3.7±0.1	BCPH-7	7.5±0.3
PSHD-1	5.6±0.1	OSLJ-1	3.2±0.1	AMPH-1	2.5±0.1
PSHD-2	0.3±0.1	OSLJ-2	3.2±0.8	AMPH-2	5.1±0.2
TALX-1	2.4±0.0	OSLJ-3	6.8±0.1	SOCY-1	2.7±0.1
TALX-2	3.4±0.1	OSLJ-4	4.9±0.2	SOCY-2	10.7±0.4
ZMLX-1	6.3±0.0	OSLJ-6	3.2±0.2	NSSC-1	11.8±0.3
ZMLX-2	1.7±0.2	OSLJ-7	1.2±0.1	NSSC-2	9.2±0.1
PPYL-1	5.2±6.6	OSLJ-8	4.2±0.3	NSSC-3	9.9±0.1
PPYL-2	1.0±0.2	OSLJ-9	3.5±0.1	NSBY-1	11.6±0.3
PPYL-3	2.1±0.0	OSLJ-10	2.0±0.0	NSBY-2	18.4±0.1
PPYL-4	3.8±0.2	OSLJ-11	2.5±0.3	NSBY-3	9.5±0.2
PPYL-5	3.3±0.2	OSLJ-12	3.7±0.0	NSYT-1	29.9±1.8
PPYL-6	2.3±0.1	OSLJ-13	10.4±0.3	NSYT-2	45.8±0.7
CCYL-1	1.0±0.2	OSLJ-14	3.2±0.3	NSYT-3	49.9±0.2
CCYL-2	6.3±0.2	OSLJ-15	8.4±0.2	NSCX-1	10.8±0.7
CCYL-3	2.5±0.1	OSLJ-16	8.3±0.1	NSCX-2	4.3±0.3
CCYL-4	7.1±0.4	PALJ-1	6.1±0.0	NSCX-3	11.8±0.1
FVYL-1	4.7±0.1	PALJ-2	4.0±0.5	NSHM-1	6.2±0.2
CPGG-1	4.5±0.1	PALJ-3	2.7±0.3	NSHM-2	5.8±0.0
CPGG-2	3.6±0.0	PALJ-4	3.9±0.1	NSHM-3	6.5±0.2
CPGG-3	7.1±0.4	PALJ-5	2.8±0.3		
CPGG-4	2.3±0.5	PALJ-6	5.9±0.2		

2.3 产蛋白酶耐热菌株 16S rRNA 基因的 RFLP 分析

以产蛋白酶细菌菌株的基因组 DNA 为模板, 以 27f 和 1492r 为引物, PCR 特异性扩增出一条长度为 1 516 bp 的 DNA 片段(图 2A)。该 PCR 扩增产物经 *Hha* I 酶切后, 产生两种酶切带型(图 2B), 带型 1 含 868、406 和 239 bp 三种片段; 带型 2 含 577、405、348 和 182 bp 四种片段。PCR 扩增产物经 *Msp* I 酶切后产生 3 种酶切带型(图 2C), 带型 1 含 602、386、207、146 和 106 bp 五种片段; 带型 2 含 534、386、207、124 和 106 bp 五种片段; 带型 3 含 604、385、207、124 和 105 bp 五种片段。带型 2 和带型 3 每条泳道后面两条小片段(124 和 106 bp, 124 和 105 bp), 由于 DNA 扩散未清晰区分开, 但每条泳道的第一条片段(534/604 bp)区分明显。PCR 扩增产物经 *Rsa* I 酶切后, 产生 3 种酶切带型(图 2D), 带型 1 含 466、402、351、142 和 97 bp 五种片段; 带型 2 含 433、402、396 和 97 bp 四种片段; 带型 3 含 620、497、434、402 和 97 bp 五种片

段(结合后续核苷酸序列分析发现, 该泳道中的 1 026 bp 和 890 bp 属于 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物不完全酶切产物)。

对经 PCR 扩增获得的每一株产蛋白酶耐热菌株的 16S rRNA 基因片段, 分别用限制性内切酶 *Hha* I、*Msp* I 和 *Rsa* I 进行酶切, 并基于每种限制性内切酶的带型(图 2)进行分类, 分类结果如表 3 所示。上述产蛋白酶耐热菌株(表 2)的 16S rRNA 基因经 RFLP 分析, 一共可以分为 12 个类群(表 3)。从每一个类群中挑选产蛋白酶能力最高的两个菌株, 对其 16S rRNA 基因进行核苷酸序列测定。

2.4 产蛋白酶菌株 16S rRNA 基因序列的聚类分析

对经核苷酸测序获得的产蛋白酶菌株 16S rRNA 基因序列与 ATCC 标准菌株进行比对和聚类分析。分析结果表明: 本次筛选的菌株均为芽胞杆菌(*Bacillus* sp.), 获得的芽胞杆菌分属 4 种类型, 分别为 *Bacillus subtilis*、*Bacillus pumilus*、*Bacillus cereus* 和 *Bacillus megaterium* (图 3)。

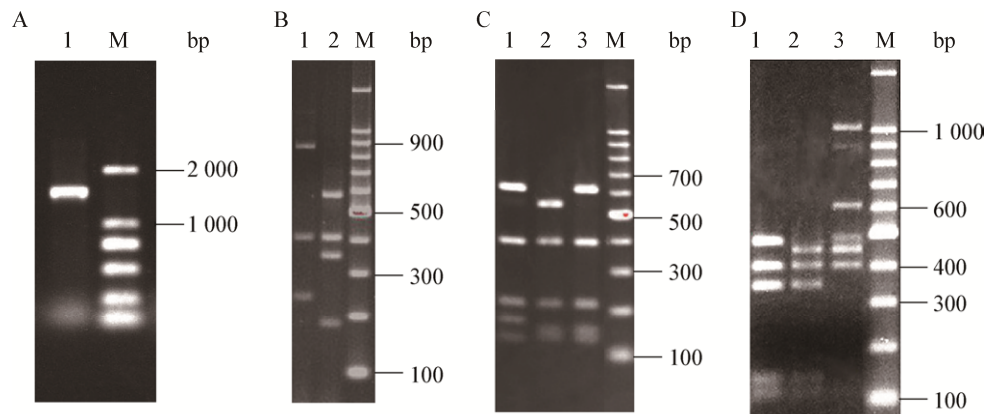


图 2 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物及其限制性内切酶酶切产物的琼脂糖凝胶电泳图

Figure 2 Gel-electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA gene fragment and the restriction pattern

注: M: DNA marker; A: 16S rRNA PCR 扩增产物电泳图; B: 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物经 *Hha* I 酶切后的酶切产物电泳图; C: 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物经 *Msp* I 酶切后的酶切产物电泳图; D: 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物经 *Rsa* I 酶切后的酶切产物电泳图。

Note: M: DNA marker; A: Gel-electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA gene fragment; B: Restriction pattern of PCR-amplified 16S rRNA gene fragment digested with *Hha* I; C: Restriction pattern of PCR-amplified 16S rRNA gene fragment digested with *Msp* I; D: Restriction pattern of PCR-amplified 16S rRNA gene fragment digested with *Rsa* I.

表 3 产蛋白酶耐热菌株的 RFLP 分型

Table 3 RFLP types of protease-producing pseudo-Bacillus sp. strains

Types of RFLP	Strains	Types of RFLP	Strains
H1M1R3	<u>OSLJ-13</u> ; <u>BNYT-2</u>	H1M2R1	<u>NSYT-2</u> ; <u>NSYT-3</u>
H1M3R2	<u>TAHD-2</u> ; <u>FSYT-1</u>	H2M1R2	<u>SOCY-1</u> ; <u>OSLJ-16</u> ; CPGG-2
H1M2R2	<u>OSLJ-12</u>	H2M3R1	<u>CCYL-3</u>
H2M2R1	<u>BCPH-6</u> ; <u>CCYL-2</u> ; CPGG-1; ZMLX-2	H1M3R3	<u>NSSC-1</u> ; <u>AGYT-1</u> ; NSHM-2; PPYL-5; AFGG-2; CPGG-3
H2M3R2	<u>BCPH-2</u> ; <u>CCYL-4</u> ; CPGG-4; CPGG-5; CPGG-6; CPGG-8; AFGG-1; PPYL-1; PPYL-3; PPYL-4; PPYL-6; CCYL-1; BCPH-1; BCPH-3; BCPH-7; BCPH-4; AMPH-1; AMPH-2; TALX-2; ZMLX-1; OSLJ-2; OSLJ-3; OSLJ-6; OSLJ-11; SOCY-2; FSYT-3; PSHD-1; PSHD-2; NSHM-3	H1M2R3	<u>NSCX-1</u> ; <u>NSBY-2</u> ; OSLJ-15; OSLJ-9; FSYT-2; TAHD-1; PALJ-7; OSLJ-14; NSBY-1; BNYT-1; NSSC-3; NSSC-2; NSBY-3; NSYT-1; NSCX-2; NSCX-3; NSHM-1; AFGG-3
		H2M1R1	<u>OSLJ-10</u> ; <u>PALJ-2</u> ; ACLJ-2; ALLJ-9; OSLJ-4; PALJ-1; PALJ-3; PALJ-4; PALJ-5; PALJ-6; BCPH-5; FVYL-1
		H2M2R2	<u>PPYL-2</u> ; <u>OSLJ-8</u> ; TALX-1; OSLJ-1; OSLJ-7; CPGG-7

注: 下划线菌株为 16S rRNA 基因测序菌株.

Note: The underlined strain is 16S rRNA gene sequencing strain.

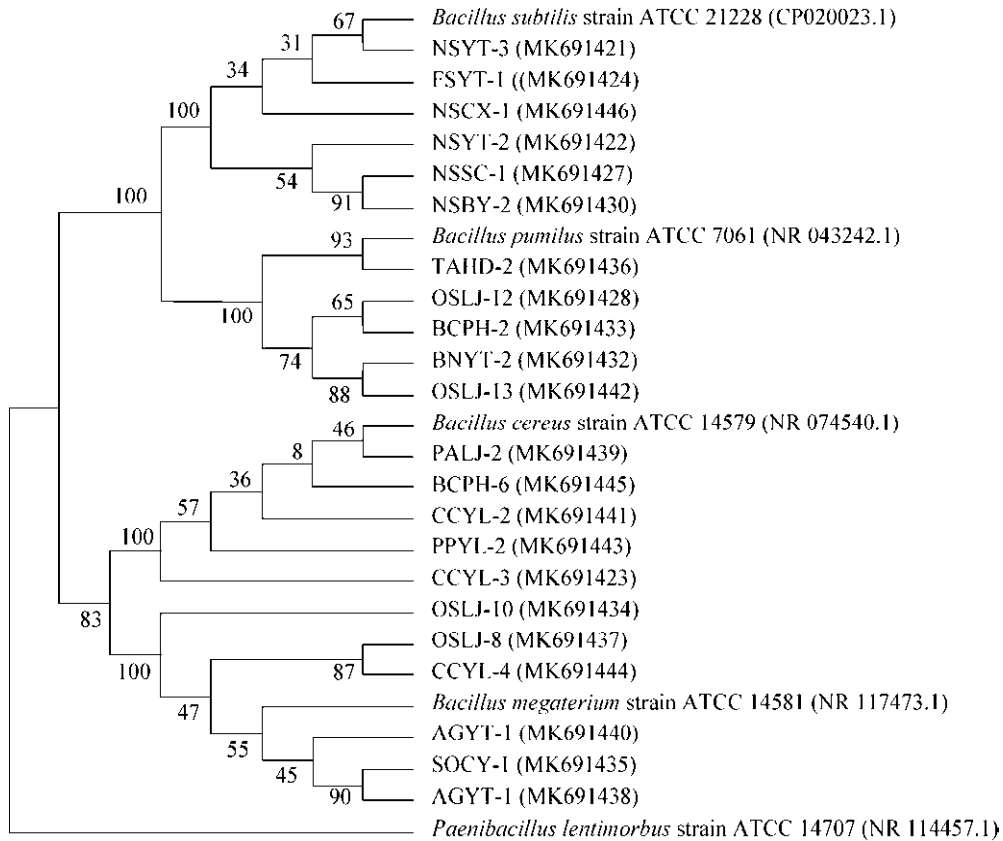


图 3 产蛋白酶菌株的 16S rRNA 基因序列的聚类分析

Figure 3 Phylogenetic analysis of protease-producing strains using 16S rRNA gene sequences

注: 括号里的数字代表 GenBank 中的序列号; 每个分支上的数字代表进化百分数.

Note: Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank; the number at each branch point is the percentage supported by bootstrap.

2.5 SCP、CAH 和 AXE 多肽链氨基酸序列聚类分析

已有专利及文献表明, *B. subtilis* 产生的 SCP、CAH 蛋白及 *B. pumilus* 产生的 AXE 蛋白均具有较高的过水解催化酶活^[11-12], 因此, 本研究从分离到的 *B. subtilis* NSYT-3 菌株和 *B. pumilus* OSLJ-13 菌株中分别克隆上述酶蛋白基因。从 *B. subtilis* NSYT-3 菌株克隆的 SCP 蛋白的编码基因全长 1 146 bp (NCBI 登录号: MK673994), 编码 381 个氨基酸, 该肽链的氨基酸序列与已报道的 *B. licheniformis* 和 *B. lentus* 产生的 SCP 蛋白(PDB 登录号分别为: 1AF4 和 1NDQ)的氨基酸序列的一致性(identity)分别为 70%和 60%。从 *B. subtilis*

NSYT-3 菌株克隆的 CAH 蛋白的编码基因全长 957 bp (NCBI 登录号: MK673996), 编码 318 个氨基酸, 该肽链的氨基酸序列与已报道的 *B. subtilis* 产生的 CAH 蛋白(PDB 登录号分别为: 1ODS)其氨基酸序列具有高度的序列一致性, 一致性达 98%。从 *B. pumilus* OSLJ-13 菌株克隆的 AXE 蛋白的编码基因全长 963 bp (NCBI 登录号: MK673995), 编码 320 个氨基酸, 该肽链的氨基酸序列与已报道的 *B. pumilus* 产生的 AXE 蛋白(PDB 登录号为 2XLB)的氨基酸序列具有高度一致性, 达 97%。聚类分析结果显示, 本研究克隆的 3 种酶蛋白与其他同功蛋白具有高度的序列一致性, 分属于 SCP、CAH 和 AXE 三类酶蛋白家族(图 4)。

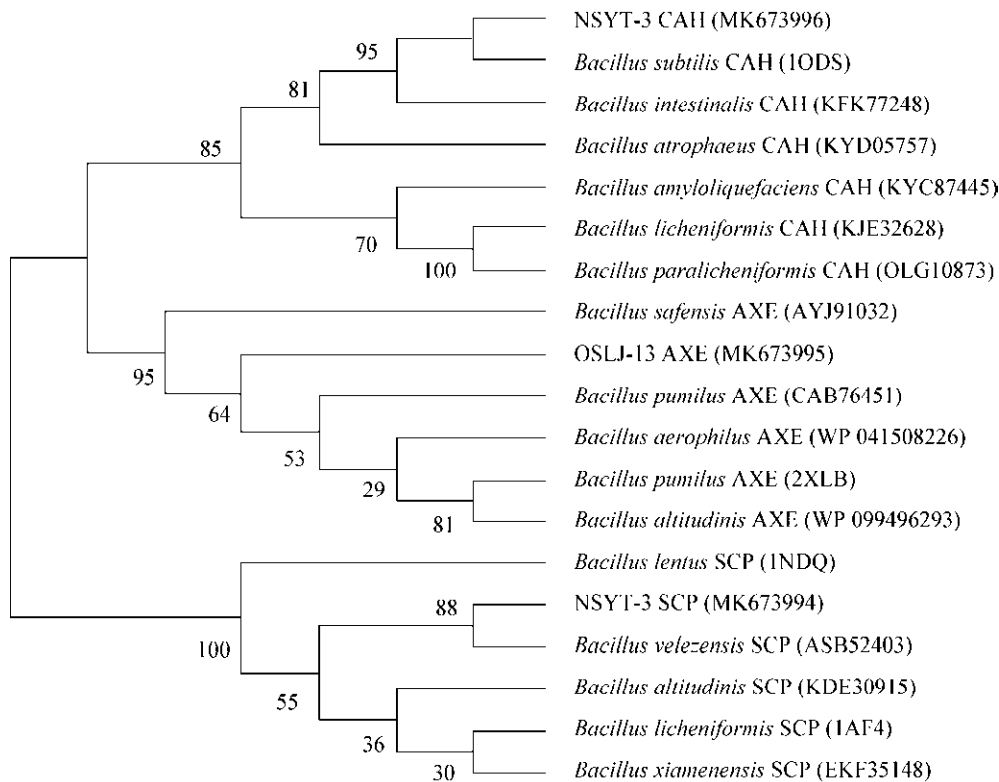


图 4 本研究克隆的 3 种酶蛋白多肽链氨基酸序列的聚类分析

Figure 4 Phylogenetic analysis of amino acid sequences from subtilisin carlsberg, cephalosporin acetyl hydrolase and acetyl xylan esterase, respectively

注: 括号里的数字代表 GenBank 中的序列号; 每个分支上的数字代表进化百分数。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank; The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap.

2.6 具有过水解酶催化活性的酶蛋白 3D 结构模拟

分别以已结构解析的 SCP (PDB 数据库: 1AF4)、AXE (PDB 数据库: 2XLB)和 CAH (PDB 数据库: 1ODS)为模板, 对从 *B. subtilis* NSYT-3 菌株克隆的 SCP 蛋白、*B. pumilus* OSLJ-13 菌株克隆的 AXE 蛋白和从 *B. subtilis* NSYT-3 菌株克隆的 CAH 蛋白进行同源建模, 获得的 PDB 文件经 YASARA 软件优化并可视化后, 从图 5A、5B 和 5C 可以看出, 模拟获得的 3D 分子结构均具有 α/β

水解酶折叠家族蛋白的结构特征, 分子结构中央均为系列 β -折叠片层结构, 系列 α -螺旋围绕在 β -折叠片层结构的周围。基于序列比对预测为催化三联体的氨基酸残基之间(分析数据未显示, SCP 蛋白高度保守的氨基酸残基为 Asp¹³⁸、His¹⁷⁰ 和 Ser³²⁷; AXE 蛋白高度保守的氨基酸残基为 Ser¹⁸¹、Asp²⁶⁹ 和 His²⁹⁸; CAH 蛋白高度保守的氨基酸残基为 Ser¹⁸¹、Asp²⁶⁹ 和 His²⁹⁸)均可形成氢键网络(键长均在 1.767 Å–1.826 Å 之间, 与氢键键长范围相符, 图 5D、5E 和 5F)。

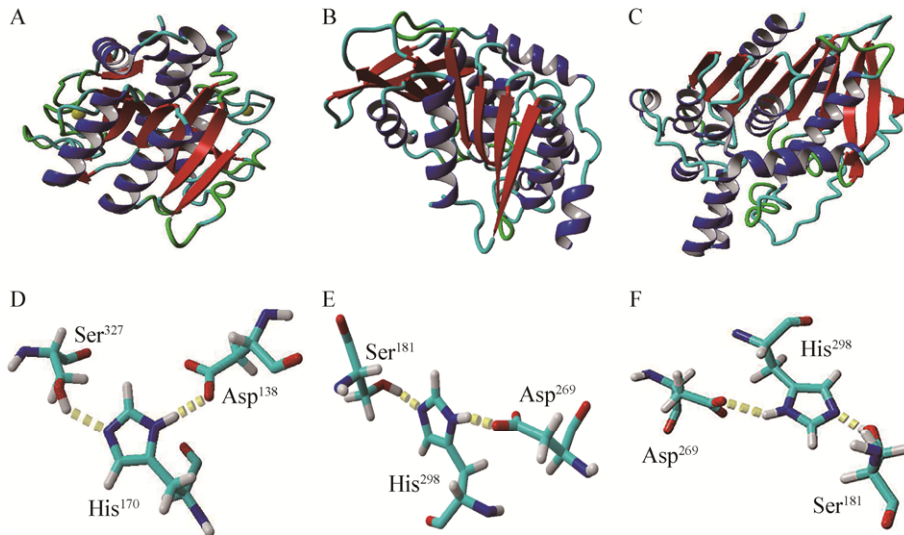


图 5 从 *B. subtilis* NSYT-3 克隆的 Subtilisin carlsberg 和 Cephalosporin acetyl hydrolase 及从 *B. pumilus* OSLJ-13 克隆的 Acetyl xylan esterase 的 3D 结构模型及其活性中心催化三联体之间形成的氢键网络

Figure 5 3D structural model and hydrogen-bond network between the residues of the catalytic triad from *B. subtilis* NSYT-3 subtilisin carlsberg, *B. subtilis* NSYT-3 cephalosporin acetyl hydrolase and acetyl xylan esterase from *B. pumilus* OSLJ-13

注: A: 从 *B. subtilis* NSYT-3 克隆的 Subtilisin carlsberg 的 3D 结构模型; B: 从 *B. pumilus* OSLJ-13 克隆的 Acetyl xylan esterase 的 3D 结构模型; C: 从 *B. subtilis* NSYT-3 克隆的 Cephalosporin acetyl hydrolase 的 3D 结构模型; D: 组成 Subtilisin carlsberg 活性中心催化三联体的氨基酸残基及其氢键网络; E: 组成 Acetyl xylan esterase 活性中心催化三联体的氨基酸残基及其氢键网络; F: 组成 Cephalosporin acetyl hydrolase 活性中心催化三联体的氨基酸残基及其氢键网络。

Note: A: The overall 3D structure of subtilisin carlsberg from *B. subtilis* NSYT-3. β -strands were represented as arrows and surrounded by α -helices. B: The overall 3D structure of acetyl xylan esterase from *B. pumilus* OSLJ-13. β -strands were represented as arrows and surrounded by α -helices. C: The overall 3D structure of cephalosporin acetyl hydrolase from *B. subtilis* NSYT-3. β -strands were represented as arrows and surrounded by α -helices. D: Asp¹³⁸, His¹⁷⁰ and Ser³²⁷ formed the catalytic triad of *B. subtilis* NSYT-3 subtilisin carlsberg within the range of H-bond interactions. E: Ser¹⁸¹, Asp²⁶⁹ and His²⁹⁸ formed the catalytic triad of *B. pumilus* OSLJ-13 acetyl xylan esterase within the range of H-bond interactions. F: Ser¹⁸¹, Asp²⁶⁹ and His²⁹⁸ formed the catalytic triad of *B. subtilis* NSYT-3 cephalosporin acetyl hydrolase within the range of H-bond interactions.

3 讨论与结论

根际微生物与植物的互作可有效增强植物抗逆(及抗病)能力,提高植物吸收和利用各类营养物质,促进植物生长。如植物根际的 *Bacillus* sp.、*Pseudomonas* sp.及 *Streptomyces* sp. 等菌株,通过合成抗生素、酶等代谢产物有效拮抗根结线虫的侵害^[23]。Mandal 等(2018)调查分析了植物根际芽胞杆菌菌株的种类,从植物根际土壤中分离并鉴定出具有不同生理功能(如溶磷、释氨、合成吡啶乙酸、抗真菌、产生淀粉酶、蛋白酶纤维素酶等酶蛋白)的 10 余种芽胞杆菌菌株^[24]。根际微生物类型、丰度及其分泌的各种酶蛋白活性已成为判断土壤肥力的重要参考依据之一^[25-26]。采用类似实验方法,本课题组先前从植物根际土壤中也快速分离到胞外脂肪酶高产菌株^[27],比较并分析相关文献后发现,从植物根际土壤中分离获得胞外酶高产菌株的方法,较传统的从特定生境中筛选目的菌株(如从油污土壤中分离脂肪酶高产菌株、从屠宰场土壤中分离蛋白酶高产菌株)^[28]具有诸多优点:(1) 根际土壤中微生物种类更丰富,可以获得各种类型微生物菌株;(2) 根际土壤中菌落数量更多,无需富集培养;(3) 根际土壤微生物代谢活力强,胞外酶生产能力高。从植物根际筛选特定微生物菌群有可能成为一种简便快捷、具有通识性的途径和方法。

α/β 水解酶折叠家族酶蛋白表现出来的过水解催化活性,属于其多功能催化活性(promiscuous activity),具有重要的开发价值。目前相关的专利及产品均为宝洁、杜邦等国际公司所垄断,因此,开发具有自主知识产权的过水解酶产品具有重要意义。本文从筛选到的芽胞杆菌菌株中克隆了不同类群具有过水解催化酶活的系列候选基因,候选基因后续的重组表达实验结果表明,从 *B. subtilis* NSYT-3 菌株克隆的 CAH 重组蛋白和从 *B. pumilus* OSLJ-13 菌株克隆的 AXE 重组蛋白均具有过水解催化活性,比活力分别为 2.0 U/mg 和 0.9 U/mg,其对过氧化氢的 K_m 分别为 87.1 mmol/L 和 107.0 mmol/L。

从 *B. subtilis* NSYT-3 菌株克隆的 SCP 基因在大肠杆菌中异源表达时,重组蛋白均形成了包涵体,其表达体系还有待进一步优化。葡萄糖氧化酶与上述重组蛋白偶联反应的催化效率及其在黑色素脱色中的应用效果正在评估中。同时,基于多肽链氨基酸序列比对,我们也发现不同菌种(菌株)编码的酶蛋白多肽链氨基酸残基在某些位点表现出强烈的菌种(菌株)差异性。如 *B. pumilus* OSLJ-13 AXE 蛋白多肽链的 Pro²³⁵、Leu²⁵⁰ 和 Phe³⁰⁰,在其他菌种(菌株)的 AXE 蛋白多肽链的相应位置分别被 Arg、Gly 和 Gly 所替代,结合模拟的 3D 结构对这些差异性位点进行深入分析,将有助于利用蛋白质工程手段快速提高酶蛋白的过水解催化活性或降低酶蛋白对过氧化氢的 K_m 值^[7]。

本研究结果将为后续深入研究 α/β 水解酶过水解催化活性的催化机理、相关酶制剂的制备开发等奠定基础。

REFERENCES

- [1] Dessaux Y, Grandclément C, Faure D. Engineering the rhizosphere[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(3): 266-278
- [2] Aloo BN, Makumba BA, Mbega ER. The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability[J]. Microbiological Research, 2019, 219: 26-39
- [3] Ma XM, Zarebanadkouki M, Kuzyakov Y, et al. Spatial patterns of enzyme activities in the rhizosphere: effects of root hairs and root radius[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 118: 69-78
- [4] Achari GA, Ramesh R. Characterization of quorum quenching enzymes from endophytic and rhizosphere colonizing bacteria[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018, 13: 20-24
- [5] Wierzbicka-Woś A, Henneberger R, Batista-García RA, et al. Biochemical characterization of a novel monospecific endo- β -1,4-glucanase belonging to GH family 5 from a rhizosphere metagenomic library[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1342
- [6] Jochens H, Hesseler M, Stiba K, et al. Protein engineering of α/β -hydrolase fold enzymes[J]. ChemBiochem, 2011, 12(10): 1508-1517
- [7] Jones BJ, Lim HY, Huang J, et al. Comparison of five protein engineering strategies for stabilizing an α/β -hydrolase[J]. Biochemistry, 2017, 56(50): 6521-6532
- [8] Rauwerdink A, Kazlauskas RJ. How the same core catalytic

- machinery catalyzes 17 different reactions: the serine-histidine-aspartate catalytic triad of α/β -hydrolase fold enzymes[J]. ACS Catalysis, 2015, 5(10): 6153-6176
- [9] Yin DT, Kazlauskas RJ. Revised molecular basis of the promiscuous carboxylic acid perhydrolase activity in serine hydrolases[J]. Chemistry, 2012, 18(26): 8130-8139
- [10] Carboni-Oerlemans C, Domínguez de María P, Tuin B, et al. Hydrolase-catalysed synthesis of peroxy-carboxylic acids: biocatalytic promiscuity for practical applications[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 126(2): 140-151
- [11] Tao WY, Xu Q, Huang H, et al. Efficient production of peracetic acid in aqueous solution with cephalosporin-deacetylating acetyl xylan esterase from *Bacillus subtilis*[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(12): 2121-2127
- [12] Despotovic D, Vojcic L, Blanusa M, et al. Redirecting catalysis from proteolysis to perhydrolysis in subtilisin carlsberg[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167(3): 279-286
- [13] Mathews I, Soltis M, Saldajeno M, et al. Structure of a novel enzyme that catalyzes acyl transfer to alcohols in aqueous conditions[J]. Biochemistry, 2007, 46(31): 8969-8979
- [14] Földes T, Bánhegyi I, Herpai Z, et al. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89(5): 840-846
- [15] Kasana RC, Salwan R, Yadav SK. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2011, 37(3): 262-276
- [16] Huang Q, Peng Y, Li X, et al. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*[J]. Current Microbiology, 2003, 46(3): 169-173
- [17] Chen XL, Zhang YZ, Gao PJ, et al. Two different proteases produced by a deep-sea psychrotrophic bacterial strain, *Pseudoaltermonas* sp. SM9913[J]. Marine Biology, 2003, 143(5): 989-993
- [18] Sun M, Zhu CG, Yu ZN. Cloning of parasporal body protein gene resembling to S-layer protein genes from *Bacillus thuringiensis* CTC strain[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2001, 41(2): 141-147 (in Chinese)
孙明, 朱晨光, 喻子牛. 类似 S-层蛋白的苏云金芽胞杆菌伴胞晶体蛋白基因的克隆[J]. 微生物学报, 2001, 41(2): 141-147
- [19] Ouattara HG, Reverchon S, Niamke SL, et al. Molecular identification and pectate lyase production by *Bacillus* strains involved in cocoa fermentation[J]. Food Microbiology, 2011, 28(1): 1-8
- [20] Goralach-Lira K, Coutinho HDM. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of Northeastern Brazil[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2007, 38(1): 135-141
- [21] Santana MM, Portillo MC, Gonzalez JM, et al. Characterization of new soil thermophilic bacteria potentially involved in soil fertilization[J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2013, 176(1): 47-56
- [22] Santana MM, Gonzalez JM. High temperature microbial activity in upper soil layers[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(22): fnv182
- [23] Mhatre PH, Karthik C, Kadirvelu K, et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a potential alternative tool for nematodes bio-control[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 17: 119-128
- [24] de Mandal S, Singh SS, Kumar NS. Analyzing plant growth promoting *Bacillus* sp. and related genera in Mizoram, Indo-Burma biodiversity Hotspot[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018, 15: 370-376
- [25] Gianfreda L. Enzymes of importance to rhizosphere processes[J]. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2015, 15(2): 283-306
- [26] Nannipieri P, Giagnoni L, Renella G, et al. Soil enzymology: classical and molecular approaches[J]. Biology and Fertility of Soils, 2012, 48(7): 743-762
- [27] Shu ZY, Lin RF, Jiang H, et al. A rapid and efficient method for directed screening of lipase-producing *Burkholderia cepacia* complex with organic solvent tolerance from plant rhizosphere[J]. Microbiology China, 2009, 36(6): 809-814 (in Chinese)
舒正玉, 林瑞凤, 江欢, 等. 从植物根际定向批量筛选广谱有机溶剂耐受性脂肪酶产生菌[J]. 微生物学通报, 2009, 36(6): 809-814
- [28] Waghmare SR, Gurav AA, Mali SA, et al. Purification and characterization of novel organic solvent tolerant 98 kDa alkaline protease from isolated *Stenotrophomonas maltophilia* strain SK[J]. Protein Expression and Purification, 2015, 107: 1-6