

文章编号: 1000-5013(2007)02-0178-04

土壤产几丁质酶菌株的筛选鉴定及产酶条件

张荣奎, 贺淹才, 刘爱花, 魏 巍, 李红然

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 利用几丁质为碳源,从土壤中筛选出 3 株产几丁质酶菌株,其中酶活最高的为一株革兰氏阴性菌. 对该菌株应用 16S rDNA 法进行鉴定,结果为嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*). 通过单因素优化法和均匀设计法实验,结果表明,以质量分数 0.5% 的胶体几丁质为碳源,质量分数 1.0% 的蛋白胨为氮源,及 30 和 pH 值为 7.2,发酵 60 h 的条件是菌株的最合适产酶条件. 此时,胞外几丁质酶活力最高.

关键词: 嗜麦芽窄食单胞菌; 几丁质酶; 16S rDNA 鉴定; 发酵条件

中图分类号: Q 93-331; Q 814.1; Q 939.96

文献标识码: A

几丁质是自然界中储量仅次于纤维素的生物多聚体,它广泛存在于真菌、硅藻、节肢动物和原生动物等生物体中,是绝大多数真菌细胞壁的结构物质,同时还是昆虫中肠围食膜的主要成分^[1]. 几丁质酶(Chitinase, EC3.4.1.14)^[2]可催化水解几丁质的 -1,4 糖苷键生成 *N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖(NA G),它在植物病虫害,尤其是对真菌病的防治方面,以及在几丁质废物的转化和利用等方面都具有重要作用,其研究受到人们的广泛重视. 本文通过几丁质作为碳源,从土壤中筛选到 3 株产几丁质酶菌株. 通过 16S rDNA 法^[3],对其中酶活最高的菌株进行了分子生物学鉴定和产酶条件测定,为其进一步的研究打下了基础.

1 材料与方法

1.1 培养基

1.1.1 平板培养基 (1) 细菌几丁质培养基(分离用):蛋白胨 10 g, K₂HPO₄ 0.7 g, MgSO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 0.3 g, 胶体几丁质 5.0 g, 琼脂 15~20 g, 蒸馏水 1 L, pH 值为 7.2. (2) 纯几丁质培养基:胶体几丁质 5.0 g, KNO₃ 1.0 g, NaCl 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 L, pH 值为 7.2.

1.1.2 摇瓶培养基 (1) 种子培养基(LB 培养基):蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1 L, pH 值为 7.0. (2) 发酵培养基:用细菌几丁质培养基(分离用),但不加琼脂.

1.2 菌株的分离

1.2.1 菌株初步分离 从生产几丁质的工厂排污沟附近土壤采集土样,经过烘干及风干干燥,置于 60 目分样筛过筛,备用. 称取 1 g 土样放入加有 9 mL 无菌水的离心管,分别稀释制成 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ 不同稀释倍数的土壤溶液. 从 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ 不同稀度倍数的 4 管土壤稀释液中各吸取 0.1 mL,接种在纯几丁质培养基和细菌几丁质培养基的平板上,用涂布棒涂布均匀,在 30 下培养 72 h.

1.2.2 菌种的二次筛选 从第 1 次稀释涂布的平板中挑取可以产生透明圈的菌落,再一次通过稀释涂布的方法,将其接种于纯几丁质平板和细菌几丁质平板上,培养 72 h,以取得纯菌落平板. 从第 2 次筛选

收稿日期: 2006-06-28

作者简介: 张荣奎(1978-),男,硕士研究生,主要从事酶工程的研究;通讯作者:贺淹才(1949-),男,教授,硕士生导师. E-mail: yche@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C04010011)

的纯菌平板上选取水解圈直径与菌落直径比最大的菌种,将其接种于 50 mL 的 LB 种子培养基上,12 h 后以 2% 的接种量接于 100 mL 的细菌几丁质发酵培养基中,在 30 ℃ 下进行扩大培养。

1.3 菌种的鉴定

1.3.1 细菌染色体 DNA 提取 从新培养产几个质酶活性高的革兰氏阴性细菌平板上,挑取一环菌落至加有 500 μL TE 缓冲液的 1.5 mL 微量离心管中,混匀后沸水浴 1.5 min,迅速低温离心($12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min,取上层清液分装后,置 4 ℃ 下保存备用。

1.3.2 16S rDNA 引物 根据 16S rDNA 的结构,应用 B2/B3 做引物,该引物扩增片段包含 V8 和 V9 两个高变区,扩增产物大小为 1 050 bp (base pair,碱基对)左右。这两个引物序列为 B2: 5'-ACG GGC GGT GTG TAC-3'; B3: 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'。

1.3.3 聚合酶链反应(PCR)检测 PCR 反应体系为 20 μL ,二次蒸馏水 12.6 μL ,10 倍扩增缓冲液 2.0 μL ,25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}\text{Mg}^{2+}$ 1.6 μL ,各 2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的脱氧核苷三磷酸(dNTP) 0.4 μL ,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物各 1.0 μL ,DNA 模板 1.0 μL ,5 GU $\cdot\text{L}^{-1}$ Taq 酶 0.4 μL 。PCR 循环:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 60 s,50 ℃ 退火 60 s,72 ℃ 延伸 90 s,循环 30 次,并在 72 ℃ 后延伸 15 min。

1.3.4 扩增产物的电泳分析 用 1 倍的 TAE 缓冲液配制质量分数为 1% 琼脂糖凝胶。取 PCR 扩增产物 10 μL ,加 2 μL 溴酚蓝指示剂,混匀后加样,于 100 V 下电泳 1.5 h,紫外灯下观察电泳结果。

1.3.5 序列测定与分析 将观察到的 PCR 产物切胶,用胶回收试剂盒回收后,连接到 pMD18-T 上,送北京奥科生物公司进行测序。然后,将测序结果通过 Gene Bank 进行 BLAST 序列比对,得出结果。

1.4 几丁质酶活力的测定

酶活性测定采用 DNS 法^[4]。取发酵液于 4 ℃ 下离心($12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min 后,将 0.5 mL 上层清液酶液与 0.5 mL 胶体几丁质置于 37 ℃ 中水浴反应 30 min,煮沸 10 min,经 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min。取 0.5 mL 加入 0.5 mL DNS,煮沸 5 min 迅速冷却,再加入 4 mL 蒸馏水,测定 540 nm 的 $D(\cdot)$ (Optical Density,光密度)值。根据 *N*-乙酰氨基葡萄糖标准曲线,将两组 $D(\cdot)$ 差值折算成还原糖量,再根据酶活力单位的定义,计算几丁质酶活力(*U*)。一个酶活力单位(*U*)定义为:在 37 ℃ 下,每分钟产生相当于 1 μmol *N*-乙酰氨基葡萄糖的还原糖量所需的酶量。

1.5 产酶条件试验

(1) 生长曲线。配制 3 瓶发酵培养基,摇床培养,每 8 h 取样一次测定菌体浓度。(2) 酶活曲线。配制 3 瓶发酵培养基,放置到摇床培养,每 12 h 取样 1 次测定酶活。(3) 最适合 pH 值的测定。配制 6 瓶发酵培养基,分别调整培养基的 pH 值为 6.6,7.0,7.2,7.4,7.6 和 7.8,摇床培养 60 h,测定酶活。(4) 最适碳源的测定。配制 4 瓶发酵培养基,C 源质量分数分别调整为 0.5% 的胶体几丁质、粉末几丁质、葡萄糖、蔗糖,培养 60 h 后,测定酶活。(5) 最适氮源的测定。配制 4 瓶发酵培养基,把 N 源调整为质量分数为 1.0% 的蛋白胨和酵母膏,或者质量分数为 0.5% 的 KNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,培养 60 h,测定酶活。最适碳氮源测定是按照单因素优化法和均匀设计法安排操作方案,并均作平行样多次测定所得结果。

2 结果与讨论

2.1 筛选结果

通过二次筛选,得到 3 株产几丁质酶菌株。通过革兰氏染色鉴定,其中一株为革兰氏阳性菌,另外两株为革兰氏阴性菌。对 3 株菌株中酶活力最高的一株革兰氏阴性菌株通过显微镜拍照,如图 1 所示。

2.2 菌种的鉴定

通过 PCR 扩增得到 16S rDNA 产物,连接到 pMD18-T 上,进行酶切,电泳后拍照如图 2 所示。经证明 PCR 产物确实连接到载体上后,送北京奥科生物公司测序。将测序结果通过 Bio Edit 与已知的细菌 16S rDNA 序列比对寻找到两个高变区分别位于 148~214 bp 和 526~595 bp。然后用在线的 Blast 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行同源性分析,结果表明,1 该序列与嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)菌株 LMG11087^[5],S-1^[6] 等的 16SrRNA 基因序列相同。由此可以推测,该菌株为嗜麦芽窄食单胞菌菌株。

2.3 产酶条件

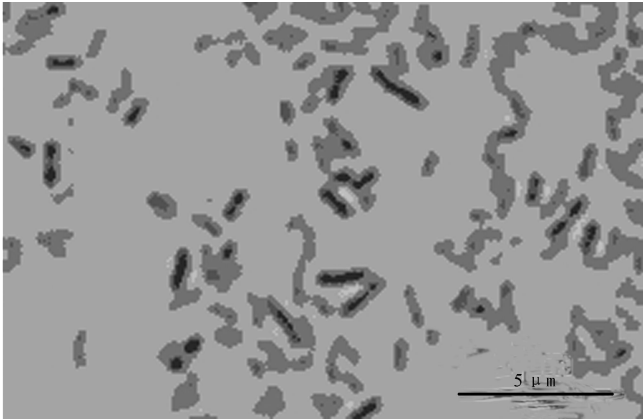


图 1 酶活力最高的菌株显微照片

Fig. 1 Photograph of *Stenotrophomonas maltophilia* that produces chitinase



图 2 酶切连接载体电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis results of restriction enzymedigestion on recombinant plasmid

2.3.1 生长过程 24 h 后,菌体的质量浓度迅速提高,先呈淡黄色,而后颜色逐步加深渐至深黄色,粘稠度也逐步提高;大约在 40 h 时,菌体质量浓度(C)达到最大,60 h 后有明显下降,如图 3 所示.

2.3.2 产酶过程 在 pH 值为 7.2 的产酶培养基中,自 12 h 开始产酶,60 h 达到最大值,其酶活力(U)

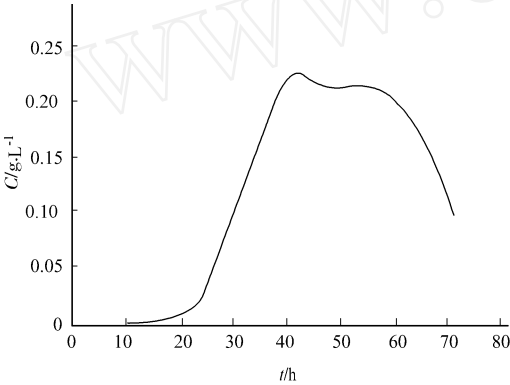


图 3 菌体生长曲线

Fig. 3 Growth curve of *Stenotrophomonas maltophilia*

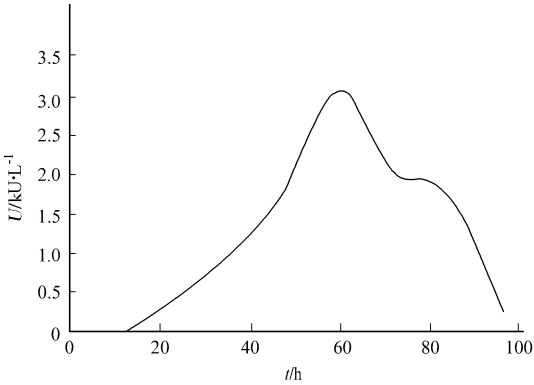


图 4 酶活曲线

Fig. 4 Chitinase activity curve of the strain

明显下降,与生长曲线相对应,也表现出滞后性.表明该菌产酶峰值比许多细菌出现得早^[2,7].

2.3.3 培养基 pH 值的影响 pH 值对产酶的影响关系,如表 1 所示.由表 1 可以看出,初始 pH 值为 7.0~7.4 时,酶活力较高,其中初始 pH 值为 7.2 时,酶活力最高,达到 3.063 6 kU · L⁻¹.所以,培养基初始以 pH 值 7.0~7.4 较为适宜,与苏云金芽孢杆菌相近^[2].另外,研究表明该酶为碱性蛋白,酶活力最适 pH 为弱碱性,不同于大部分已知的几丁质酶^[2,7-8].

表 1 培养基 pH 值对产酶的影响

Tab. 1 Effect of pH on synthesis of chitinase

pH	6.6	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8
$U/kU \cdot L^{-1}$	0.988 3	2.668 0	3.063 6	2.569 5	1.976 5	2.001 0

2.3.4 不同碳源和氮源对产酶的影响 不同碳源和氮源对产酶的影响,如表 2 所示.由表 2 可知,在以葡萄糖和蔗糖为碳源时,菌体无法产生几丁质酶,而以两种形态的几丁质为碳源时,菌体均产生几丁质酶,且胶体几丁质产酶活力比粉末几丁质高.说明除几丁质外,其他糖类碳源均会抑制几丁质酶的生产,与 Nawani 的研究结果一致^[8].由表 2 可知,培养基中加有机氮产酶活力比加无机氮高,有机氮中以

表 2 不同碳源和氮源对产酶影响

Tab. 2 Effect of nitrogen source and carbon sources on synthesis of chitinase

不同 C 源	葡萄糖	蔗糖	胶体几丁质	粉末几丁质	不同 N 源	蛋白胨	酵母膏	(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃
$U/kU \cdot L^{-1}$	0	0	3.063 6	1.581 2	$U/kU \cdot L^{-1}$	2.668	2.001	1.482 3	0.691 7

蛋白胨为最高,酶活力达到 2.668 kU · L⁻¹.与大部分产几丁质酶微生物研究结果相似^[2,7-8].其原因可

能是,菌种特性对有机氮利用率较高.这与生长过程中观察到的现象基本一致,添加有机氮的培养基中菌体浓度上升速度比添加无机氮的快.

3 结束语

以胶体几丁质为碳源,从土壤中筛选出3株胞外产几丁质酶菌株,通过16S rDNA法对其中产几丁质酶活力最高的一株革兰氏阴性菌株进行鉴定,确认为嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)菌株.通过单因素优化法和均匀设计法实验,结果表明,该菌株在以质量分数为0.5%胶体几丁质为碳源,质量分数为1.0%蛋白胨为氮源,30℃和pH值7.2的条件下发酵60h,胞外几丁质酶酶活力达到最高值为3.063 6 kU·L⁻¹.这是国内第1次筛选到产几丁质酶的麦芽窄食单胞菌菌株,且所产几丁质酶为碱性蛋白.研究结果对该菌株产几丁质酶的进一步研究有重要意义.

参 考 文 献

- [1] BROGLIE K E. Chitinase and plant protection[J]. Rev Plant Pathol, 1993, 2: 411-421.
- [2] 李力,黄胜元,关雄.产几丁质酶的苏云金杆菌菌株筛选及酶合成条件研究[J].中国病毒学,2000,15(51): 94-97.
- [3] CHANG Yu-cheng, YANG Chiyea, LI Chin, et al. Identification of *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp and *Vibrio* sp with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 107: 131-137.
- [4] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验技术[M].北京:高教出版社,1997:111-116.
- [5] MOORE E R, KRUGER A S, HAUBEN L, et al. 16SrRNA gene sequence analyses and inter-and intrageneric relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 151(2): 145-153.
- [6] MIYAJI T, OTTA Y, SHIBATA T, et al. Purification and characterization of extracellular alkaline serine protease from *Stenotrophomonas maltophilia* strain S-1[J]. Lett Appl Microbiol, 2005, 41(3): 253-257.
- [7] MADHAVAP N K, BAIJU T V, SANDHYA C, et al. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*[J]. Process Biochem, 2004, 39: 1583-1590.
- [8] NAWANI N N, KAPADNIS B P. Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs [J]. Process Biochem, 2005, 40: 651-660.

Isolation and Identification of a Chitinase-Producing Bacterium

in Soil and Studies on the Chitinase Fermentation Condition

ZHANG Rong-kui, HE Yan-cai, LIU Ai-hua,

WEI Wei, LI Hong-ran

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: Three strains with chitinase activity were isolated from soil. The strain with the maximum enzyme activity level was a Gram negative bacterium which was identified as *Stenotrophomonas maltophilia* chitinase strain by 16S rDNA method. The study on the synthetic conditions for the chitinase by single factor optimization method and uniform design method showed that the optimal synthesis conditions for chitinase was as follows: the strain was cultured for 60 hours in a basic medium (pH 7.2, 30℃) added by 0.5% chitin and 1.0% peptone.

Keywords: *Stenotrophomonas maltophilia*; chitinase; 16S rDNA identification; fermentation conditions

(责任编辑: 黄仲一)