

文章编号: 1000-5013(2009)05-0538-05

产几丁质酶菌株的分离与鉴定及产酶条件优化

李红然, 贺淹才, 刘治江, 刘杨斐

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021)

摘要: 从土壤中分离到一株产几丁质酶的细菌 LL-C. 该菌经 16S rDNA 序列同源性分析及形态培养特征、生理生化特征分析, 鉴定为 *Luteibacter rhizovicius*, 属于黄单胞菌科(Xanthomonadaceae). 以不同发酵时间、碳源、氮源、起始 pH 值、培养基装液量和培养温度为因素, 考察 LL-C 菌株产几丁质酶的优化条件. 结果表明, 最有利于该菌产几丁质酶的条件: 碳源为胶体几丁质、氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 培养基起始 pH 值为 4.5, 培养基装液量为 30 mL, 培养温度为 32℃, 振荡培养时间为 7 d, 此优化条件下, 摇瓶产酶活力为 $115.02 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$.

关键词: 几丁质酶; *Luteibacter rhizovicius*; 优化; 酶活力

中图分类号: Q 939.11; Q 93-331

文献标识码: A

几丁质酶(Chitinase, EC3.2.1.14)属于糖基水解酶家族, 是降解几丁质的关键酶类, 广泛存在于微生物和动植物体内^[1]. 几丁质酶, 尤其是微生物几丁质酶在生物病虫害防治方面已引起人们的广泛关注^[2]. 另外, 几丁质酶已应用于降解几丁质资源, 生产具有生物活性的氨基寡糖及产生菌体蛋白^[3]. 目前, 人们对微生物几丁质酶的研究主要涉及芽孢杆菌、木霉、链霉菌等, 但还未见 *Luteibacter rhizovicius* 产几丁质酶的报道. 本研究对筛选到的一株高产几丁质酶菌株进行鉴定, 研究其产酶发酵条件.

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 土壤样品来源于几丁质加工厂排污口附近的土壤.

(2) 分离培养基(1 L): 胶体几丁质 5 g, 蛋白胨 5 g, 酵母粉 2.5 g, NaCl 5 g, 琼脂 15~20 g, pH = 7.0~7.4.

(3) 种子培养基, 即 LB 液体培养基(1 L): NaCl 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, pH = 7.0.

(4) 基础产酶培养基(1 L): 胶体几丁质 5 g, 蛋白胨 3 g, KH_2PO_4 0.3 g, K_2HPO_4 0.7 g, MgSO_4 0.5 g, NaCl 5 g, pH = 7.0~7.4. 以上培养基均在 121℃ 的高压蒸汽中灭菌 20 min.

1.2 菌株的分离方法

采用稀释涂布平板法^[4], 将土壤样品均匀地涂布于分离培养基上, 置于 30℃ 下恒温培养 3~7 d. 挑取透明圈直径比菌落直径大的菌落, 采用稀释涂布平板法做二次纯化并保存.

1.3 菌种鉴定

(1) 形态特征、培养及生理生化特征鉴定. 将筛选到的产几丁质酶活性比较高的菌株命名为 LL-C, 参照文[5]进行培养及特征鉴定.

(2) 16S rDNA 序列测定. 菌株基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[6]. 引物采用细菌 16S rDNA 通用引物^[7] F27: 5'-AGA GTTTGATCA TGGCTCA G-3' (靶向 *E. coli* 16S rDNA 的 8~27 位核苷酸) 和 R1492: 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3' (靶向 *E. coli* 16S rDNA 的 1492~1513 位核苷酸). PCR 扩增体系(50 μL): 10×Taq Buffer 5 μL, 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 4 μL, 2.5 mmol·L⁻¹ dNTP

收稿日期: 2008-06-25

通信作者: 贺淹才(1949-), 男, 教授, 主要从事生物化学与分子生物学的研究. E-mail: yche@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C04010011)

4 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物各 2 μL , DNA 模版约 1 μg , Taq 酶 41.68 nkat, 补加重蒸水至总体积为 50 μL . PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. PCR 产物测序由上海生物工程技术有限公司完成, 所测序列提交 GenBank 数据库进行序列比较, 并应用 PHYLIP 软件进行同源性分析.

1.4 菌株摇瓶产酶条件优化

将在种子培养基中生长良好的液体菌种, 按 2% 的接种量接种于产酶培养基 (250 mL 三角瓶装有 25 mL 的培养液) 中, 置于 180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床上震荡培养. 分别研究培养时间、碳源、氮源、培养基起始 pH 值、培养基装液量和培养温度对该菌株产酶的影响.

1.5 胞外几丁质酶活力的测定

几丁质酶活力测定按文[8]的方法, 稍作修改. 发酵液在 4 $^{\circ}\text{C}$, 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 取 0.5 mL 上清液用 McIlvaine (pH = 6.6) 缓冲液补足至 1 mL. 然后, 加入 0.5 mL 质量分数为 1% 的胶体几丁质, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下温浴 40 min 后, 再于 100 $^{\circ}\text{C}$ 下煮沸 10 min; 冰浴冷却后加入 1.5 mL 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂, 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 下再煮沸 10 min, 冷却. 离心后, 取上清液在波长 540 nm 下测吸光度 (D), 并以已知浓度的 N-乙酰氨基葡萄糖 (NAG) 做标准对照.

2 结果与讨论

2.1 产几丁质酶菌株的分离与鉴定

2.1.1 产几丁质酶菌株的分离 经两轮平板筛选, 得到透明圈直径与菌落直径之比较大的单菌落, 如图 1 所示. 命名该菌株为 LL-C, 并确定为初始菌株.

2.1.2 菌株 LL-C 的形态及生理鉴定 形态特征、培养及生理生化特征鉴定结果表明, LL-C 菌为革兰氏染色阴性杆菌, 运动性观察确定其有鞭毛. 在牛肉膏蛋白胨琼脂平板上培养呈黄色圆形菌落, 边缘颜色稍浅, 直径约为 2 mm, 表面微隆起、边缘整齐、湿润、半透明、易挑取, 但在含几丁质平板上菌落边缘稍带锯齿 (图 1).

该菌为好氧菌, 能以几丁质为唯一碳源生长, 耐 NaCl 的质量分数为 7%, 且当 NaCl 质量分数在 5% 以下, 其生长良好. 此外, 该菌能利用葡萄糖、蔗糖、果糖、纤维二糖、半乳糖和山梨醇作为碳源, 利用蛋白胨、牛肉膏、硫酸铵、氯化铵和硝酸铵等作为氮源. 其接触酶阳性, 甲基红试验和脲酶试验呈阴性, 还原硝酸盐, 不从蛋白胨中产生硫化氢, 能水解明胶、淀粉, 分解牛奶并产碱.

2.1.3 16S rDNA 序列分析 经 PCR 扩增得到 LL-C 菌的 16S rDNA 序列片段为 1 429 bp, 在 GenBank 中的登录号为 EU022023. 以 16S rDNA 序列的相似性为划分属的标准^[9], 将所获得的 16S rDNA 序列提交 GeneBank 进行 BLAST 比对分析, 得到与其 16S rDNA 序列相似性较高序列的分布. 选取 19 个相似性在 95% 以上的序列, 运用 PHYLIP 软件进行同源性分析, 并以 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 结果如图 2 所示.

从系统发育树中, 可以看出 LL-C 菌株与 *Luteibacter rhizovicius* 1-O-2 的亲缘关系最近. 结合该 LL-C 菌的形态特征及生理生化特征分析, 将其鉴定为 *Luteibacter rhizovicius*, 属于黄单胞菌科 (Xanthomonadaceae).

2.2 菌株摇瓶发酵条件实验

2.2.1 培养时间对产酶的影响 接种培养 4 d 后, 每隔 12 h 取样测定其胞外几丁质酶活力 (Z), 结果如图 3 所示, 从图 3 中可看出, 该菌株的最佳产酶时间为 7 d. 培养 7 d 后, 酶活力开始下降, 而 7.5 d 后酶活力又有所升高, 在 8.5 d 时的酶活力接近最大值.

分析原因是, 培养 7 d 后, 菌体渐渐衰退产酶能力下降; 之后, 菌体开始死亡、崩解, 致使少量的胞内几丁质酶向细胞外释放, 此时胞外酶活力升高.

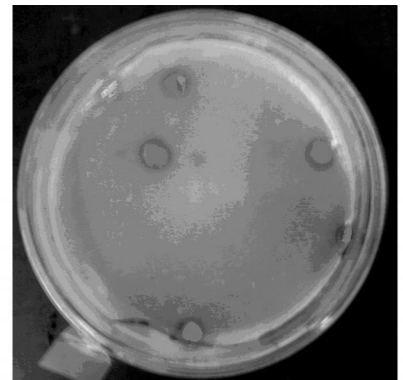


图 1 LL-C 菌的菌落特征
Fig. 1 The colony of strain LL-C

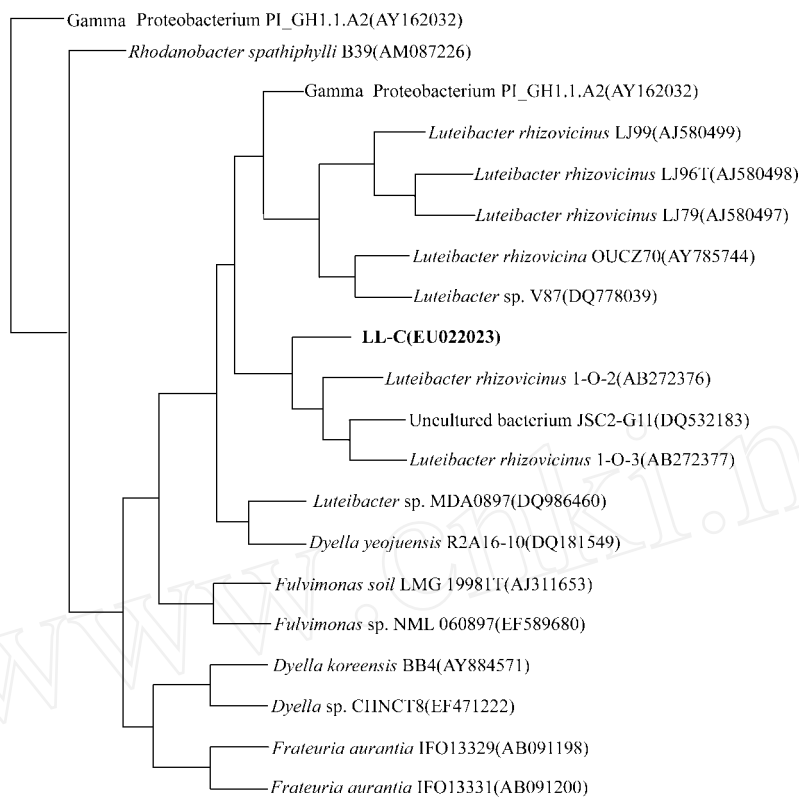


图 2 LL-C 菌的 16S rDNA 系统发育进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of strain LL-C 16S rDNA

2.2.2 最适碳源 在 1 L 的基础产酶培养基上,分别以 5 g 的粉末几丁质、葡萄糖、蔗糖、淀粉作为碳源,其他成分保持不变.培养后,分别测其胞外几丁质酶活力,比较碳源对产酶的影响,结果如表 1 所示.

从表 1 的结果可知,以胶体几丁质为碳源时酶活力最高,粉末几丁质为碳源次之,而以葡萄糖、蔗糖、淀粉为碳源时则测不到酶活.说明,该几丁质酶为诱导酶,且诱导物几丁质的粒度大小对产酶有较大影响.

2.2.3 最适氮源 在上述碳源优化的基础上,分别以 3 g 的牛肉膏,酵母膏,尿素, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, NaNO₃ 和 NH₄Cl 作为氮源,其他成分保持不变.培养后,分别测其胞外几丁质酶活力,比较氮源对产酶的影响,结果如表 2 所示.

从表 1 的结果可知,以无机氮源 (NH₄)₂SO₄ 为最佳氮源,而有机氮源酵母膏则不利于该菌产几丁质酶,其原因还不清楚.环肽、氨基酸衍生物和一些简单的嘌呤类衍生物是一些天然的几丁质酶抑制剂^[10-12].因此,有机氮源酵母膏、蛋白胨、牛肉膏中含有的一些氨基酸类或者多肽类,可能会抑制该几丁质酶活性.

表 1 碳源和氮源对产酶的影响

Tab. 1 The effect of different carbon source on the chitinase production

碳源		无碳源		胶体几丁质		几丁质粉末		葡萄糖		蔗糖		可溶性淀粉							
z/μkat ·L ⁻¹		36.51		36.51		14.84		0		0		0							
氮源		无氮源		蛋白胨		牛肉膏		酵母膏		尿素		(NH ₄) ₂ SO ₄		NH ₄ NO ₃		NaNO ₃		NH ₄ Cl	
z/μkat ·L ⁻¹		35.17		35.17		1.34		0.56		0.24		4.86		3.76		1.45		3.28	

2.2.4 最适起始 pH 值 在上述碳源、氮源优化的基础上,考察产酶培养基起始 pH 值对产酶的影响,

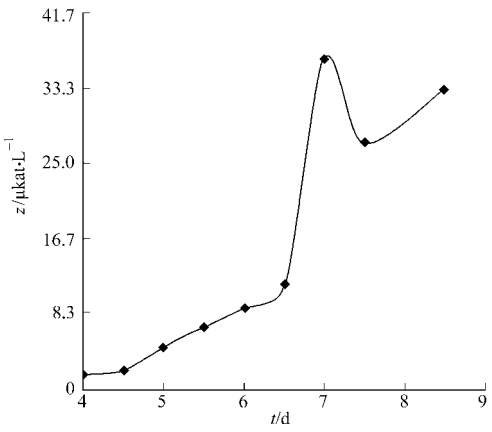


图 3 培养时间对产酶的影响

Fig. 3 The effect of cultivated time on the chitinase production

结果如图 4 所示. 从图 4 可以看出,培养基起始 pH 值在 4.0~6.5 范围内酶活力较高,控制培养基起始 pH 值为 4.5,酶活力达到 $115.02\text{ }\mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.2.5 培养温度 在上述培养基优化的基础上,比较不同培养温度()对产酶的影响. 从图 5 可以看出,32 为该菌株的最适产酶温度,温度低于 30 或高于 32 均不利于该酶的产生.

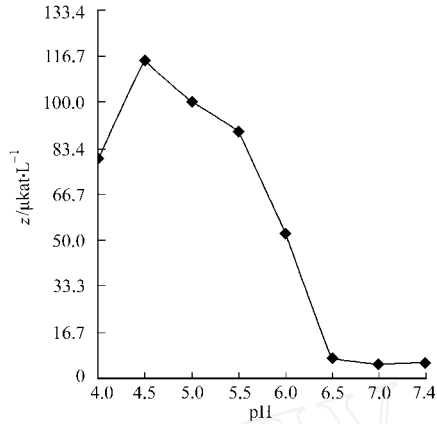


图 4 培养基起始 pH 值对产酶的影响
Fig. 4 The effect of medium initial pH on the chitinase production

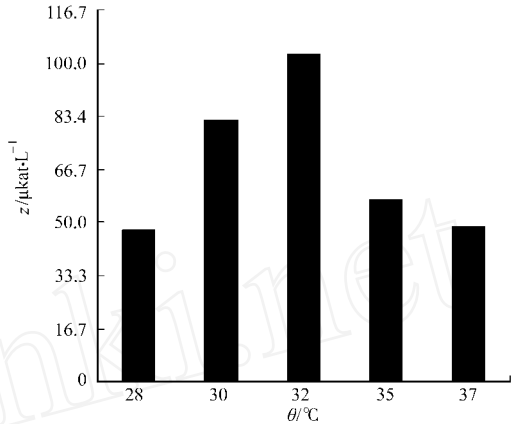


图 5 培养温度对产酶的影响
Fig. 5 The effect of cultivated temperature on the chitinase production

2.2.6 最适装液量 考察装液量(V)对接种发酵后酶活力的影响,结果如图 6 所示. 结果表明,以 30 mL 装液量为最佳.

3 结束语

从自然界土壤中筛选到一株产几丁质酶的 LL-C 菌株,据其形态、培养特征生理生化试验及 16S rDNA 序列分析,鉴定为黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)中的 *Luteibacter rhizovicius*. 考察 LL-C 菌株在培养基中生长碳源和氮源的要求,表明胶体几丁质是较好的碳源、(NH₄)₂SO₄ 是较好的氮源. 该特点在几丁质酶的发酵生产上应用有优势. 目前,由于几丁质酶活力测定方法及酶活力单位的定义不统一^[13-18],因此,酶活力暂时只能以测定方法来定,还便于相互比较.

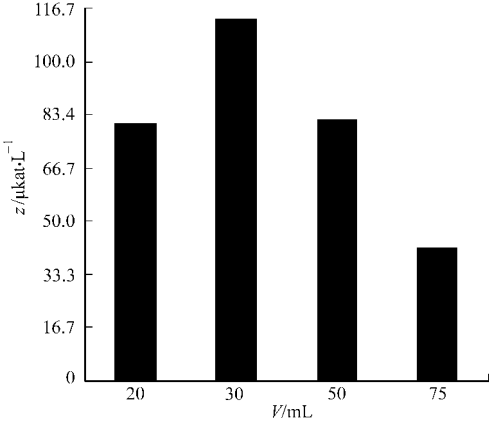


图 6 装液量对产酶的影响
Fig. 6 The effect of cultured medium volume on the chitinase production

参考文献:

[1] TA KEOMI M, SA TOSHIA A, TA KESHI H, et al. Purification and characterization of a chitinase from *A mycolatopsis orientalis* with N-acetylactosamine-repeating unit releasing activity[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 336(2): 514-520.

[2] ROCO A, PEREZ L M. In vitro biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators[J]. Electron J Biotechnol, 2001, 4(2): 68-73.

[3] PAN KAJ P, DEEPTI A, TUSHAR B, et al. Optimisation of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation[J]. Process Biochemistry, 2004, 40(9): 2962-2967.

[4] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.

[5] 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.

[6] WEN P C, TSONG T K. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA [J]. Nucl Acids Res, 1993, 21(9): 2260-2263.

- [7] 袁勇军,陆兆新,黄丽金,等. 烟碱降解细菌的分离、鉴定及其降解性能的初步研究[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 181-184.
- [8] JOSHI S, KOZLOWSKI M, RICHENS S, et al. Chitinase and chitobiase production during Fermentation of genetically improved *Serratia liquefaciens* [J]. Enzyme Microb Technol, 1989, 11(5): 289-296.
- [9] 都立辉,刘 芳. 16S rRNA 基因在细菌菌种鉴定中的应用[J]. 乳业科学与技术, 2006, 120(5): 207-209.
- [10] JOHANSEN J E, BINNERUP S J, KROER N, et al. *Luteibacter rhizovicinus* gen nov, sp. nov, a yellow-pigmented gammaproteobacterium Isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(6): 2285-2291.
- [11] ANDERSEN O A, DIXON M J, EGGLESTON I M, et al. Natural product family 18 chitinase inhibitors [J]. Nat Prod Rep, 2005, 22(5): 563-579.
- [12] IZUMIDA H, IMAMURA N, SANO H. A novel chitinase inhibitor from a marine bacterium, *Pseudomonas* sp. [J]. J Antibiot: Tokyo, 1996, 49(1): 76-80.
- [13] 邱力友,王明道,戚远成,等. 链霉菌 A048 产几丁质酶最佳发酵工艺研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 58-62.
- [14] NAWANI N N, KAPADNIS B P. Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(2): 651-660.
- [15] KAO Po-min, CHEN Chih-i, HUANG Shu-chen, et al. Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1 [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 34(2): 172-178.
- [16] 贺淹才,刘爱花,张荣奎,等. 嗜麦芽窄食单胞菌产生的几丁质酶的特性 [J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2008, 29(2): 245-249.
- [17] 贺淹才,刘爱花,柴思捷,等. 改进的 RBB 染色法初步筛选几丁质酶基因 *chiA* 的表达 [J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2008, 29(4): 563-566.
- [18] 李红然,贺淹才,刘治江. 几丁质酶抑制剂的研究进展 [J]. 生物学通报, 2007, 42(1): 8-10.

Isolation, Identification of Chitinase Producing Microorganism and Optimization of Its Fermentation Conditions

LI Hong-ran, HE Yan-cai,
LIU Zhi-jiang, LIU Yang-fei

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: A chitinase producing strain LL-C was isolated from soil. According to the analysis of the 16S rDNA sequence, the cultivation condition, its morphology and physiological characteristics of the LL-C, it was identified as *Luteibacter rhizovicinus* belong to Xanthomonadaceae. The effects of a range of factors on the production of chitinase of the LL-C were studied, including time, carbon source, nitrogen source, pH, volume of medium and cultural temperature. Experimental results showed that the optimal carbon and nitrogen source were colloid chitin and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ respectively. The optimal cultivation conditions for LL-C producing chitinase were 250 mL flask containing 30 mL medium with initial pH 4.5, 30 °C incubating temperature and shaking cultivation for 7 days. Under optimized conditions, the chitinase activity produced by LL-C could reach $115.02 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$.

Keywords: chitinase; *Luteibacter rhizovicinus*; optimization; enzyme activity

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 陈国华)