

张艾艾, 潘建刚, 张超君, 等. 10 株产菊粉酶细菌的筛选及鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 360–363.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.117

10 株产菊粉酶细菌的筛选及鉴定

张艾艾^{1,2,3}, 潘建刚^{1,2,3}, 张超君^{1,2,3}, 张伟², 季祥^{1,2,3}

(1. 内蒙古科技大学生物工程与技术研究所, 内蒙古包头 014010; 2. 内蒙古科技大学数理与生物工程学院, 内蒙古包头 014010;
3. 内蒙古自治区生物质能源化利用重点实验室, 内蒙古包头 014010)

摘要:以包头当地菊芋根际土为材料, 筛选到 10 株产菊粉酶细菌, 其中芽孢杆菌的产酶活性相对较高。对部分菌株的鉴定结果表明, 产菊粉酶细菌分属于厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria), 它们分别是短杆菌(*Brevibacterium* sp.) (A1)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*) (A3)、多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*) (A6、A8)、杆菌属(*Bacillus* sp.) (A7)。目前关于短杆菌属、多黏类芽孢杆菌和嗜麦芽窄食单胞菌具有产菊粉酶能力的报道较少见。

关键词:菊粉酶; 细菌; 筛选; 鉴定

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0360-03

菊粉酶(inulinase)是糖基水解酶 32 家族(glycosyl hydrolases family 32)的一员, 又称 β -2,1-D-果聚糖酶, 它能特异地作用于 β -2,1-D-果聚糖果糖苷键^[1-4]。根据其作用于底物的方式不同, 又可分为内切菊粉酶(endoinulinase, EC 3.2.1.7)和外切菊粉酶(exoinulinase, EC 3.2.1.80), 目前该酶被广泛用于菊芋制备低聚果糖的工业生产, 这主要是因为菊芋富含菊糖, 而菊糖是由 D-呋喃果糖分子经 β -2,1 糖苷键聚合而成的聚合度较高的直链多糖, 在菊粉酶的作用下, 它可以从内部和末端水解自身的 β -2,1 糖苷键, 从而降解为低聚果糖^[5-8]。而微生物由于来源广泛, 种类多, 它已经成为菊粉酶筛选的良好来源, 但是迄今为止, 在工业上还是很缺乏具有高产酶活性的功能菌株。因此, 如何筛选获得具有高产菊粉酶活性的目的菌株已经成为众多研究者的关注焦点^[9-15]。这其中又以产菊粉酶真菌的研究居多, 而对于细菌的研究较少。因此, 本研究以内蒙古包头当地菊芋种植的根际土壤为材料, 定向筛选产菊粉酶细菌, 以期对菊芋制备低聚果糖提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菊芋根部土壤来源于包头市东河区沙尔沁镇。菊粉、琼脂、葡萄糖、酵母膏、蛋白胨, 购自上海蓝季科技发展有限公司。3,5-二硝基水杨酸, 购自上海远帆助剂厂。冰醋酸、酒石酸钾钠、KCl、NaNO₃、K₂HPO₄、(NH₄)₂H₂PO₄、FeSO₄·7H₂O、MgSO₄·7H₂O, 购自天津市风船化学试剂有限公司。上述药

品均为分析纯。

DNS 试剂: 取 3,5-二硝基水杨酸 3.15 g, 加水 500 mL, 水浴至 45 ℃, 逐步加入 100 mL 0.2 g/mL 氢氧化钠, 然后加入酒石酸钾钠 91 g、苯酚 2.5 g、无水亚硝酸钠 2.5 g, 搅拌使之溶解, 冷却后定容至 1 000 mL, 贮存于棕色瓶中, 放置 1 周后使用。

醋酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 值 4.6): 准确称取醋酸钠 0.803 6 g, 加少量蒸馏水溶解, 再加入冰醋酸 0.59 mL, 调节 pH 值至 4.6, 加蒸馏水定容至 200 mL。

1.2 培养基配制

富集培养基: 酵母膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。初筛培养基: 菊粉 30 g, KCl 0.5 g, NaNO₃ 3 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, K₂HPO₄ 1 g, 蒸馏水 1 000 mL, 琼脂 15 g。复筛培养基(同发酵培养基): 菊粉 20 g, 蛋白胨 10 g, (NH₄)₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, NaNO₃ 5 g, 蒸馏水 1000 mL, 琼脂 15 g(发酵培养基无)。斜面保藏培养基: 马铃薯 20 g, 蔗糖(葡萄糖) 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, 琼脂 15~20 g, pH 值自然。

1.3 菌株筛选

富集培养: 取菊芋根际土 5 g, 放入 100 mL 无菌水中, 170 r/min 振荡 1 h 得悬浮液, 将 1 mL 摇匀的悬浮液加入含有 50 mL 富集培养液的三角瓶中, 37 ℃ 下 170 r/min 振荡培养 48 h。

初筛: 将经过富集培养的菌液用无菌水稀释为 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 等 4 个不同的浓度, 分别吸取 0.5 mL 不同浓度土壤悬液于初筛培养基上, 涂布均匀后, 把培养皿倒置放入恒温培养箱中, 28 ℃ 培养 2~3 d, 并观察菌种的生长情况, 利用“透明圈法”对目的菌落进行分离纯化, 最后对所得的菌株进行斜面培养保藏。

复筛: 利用纯化与酶活性测定相结合的方法复筛产菊粉酶细菌, 先将纯化的目的菌株接种于复筛培养基上, 28 ℃ 恒温培养 2~3 d; 然后选取生长较快的菌株接入含有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 ℃、170 r/min 恒温水浴摇床

收稿日期: 2014-08-24

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31360126、20977106); 内蒙古自然科学基金(编号: 2013MS0513)。

作者简介: 张艾艾(1979—), 女, 内蒙古包头人, 硕士研究生, 主要从事生物质能源化利用研究。E-mail: zaa_2005@163.com。

通信作者: 季祥, 副教授, 主要从事生物质能源化利用的研究。

E-mail: jixiang@imust.cn。

培养 72 h;发酵液 3 500 r/min 离心 15 min,得到的上清液即为粗酶液;最后用 DNS 法测定粗酶液酶活性,从中获得产酶活性较高的菌株。

1.4 酶活性的测定

1.4.1 果糖标准曲线的绘制 试验方案见表 1,将各试管沸水浴 7 min,显色后快速冷却,之后用蒸馏水定容至 10 mL,充分混匀后在 550 nm 下测吸光度,以果糖浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制果糖标准曲线,结果如图 1 所示。

表 1 果糖标准曲线试验方案

试管号	试剂用量 (mL)		
	1 mg/mL 果糖标准液	蒸馏水	DNS 试剂
0	0	2.0	2
1	0.2	1.8	2
2	0.4	1.6	2
3	0.6	1.4	2
4	0.8	1.2	2
5	1.0	1.0	2
6	1.2	0.8	2

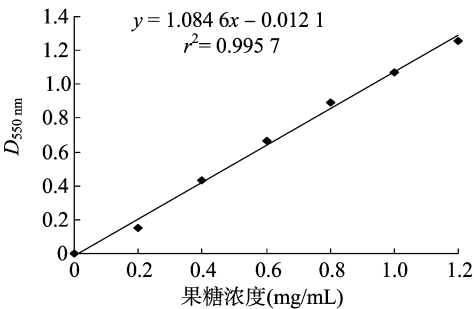


图1 果糖标准曲线

1.4.2 酶活性的测定 菊粉酶活性单位定义^[16]:反应体系中 1 min 转化底物产生 1 μmol 还原糖所需的酶量即为 1 个活性单位 (U/mL)。酶活性测定参照文献^[17],略有改动。向 0.5 mL 粗酶液中加入 2.5 mL 1% 菊糖 (醋酸缓冲液配制), 37 ℃ 反应 20 min,沸水灭活 10 min,加入 DNS 2 mL,沸水浴中 7 min 显色,快速冷却后加 5 mL 蒸馏水定容到 10 mL,以去离子水为空白对照,用可见分光光度计测吸光度。设 3 次重复,取平均值。

1.4.3 酶活性的计算 按下面的公示来计算单位酶活性^[15]:酶活性 = $D \cdot n \cdot 1\,000 / (k \cdot t)$ 。式中: n 为稀释倍数; k 为曲线斜率; t 为反应时间 (s)。

1.5 产菊粉酶细菌的 16S rRNA 分子鉴定和系统发育分析

利用菌落 PCR 技术扩增所得目的菌株的 16S rRNA 序列,引物选用 27F (5′ - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3′) 和 1492R (5′ - TACGGYTACCTTGTTACGACTT - 3′),具体方法参考文献^[18]。然后利用 Blast 程序寻找 GenBank 中与各目的序列同源性最高的序列作为参考,最后用 ClustalX 1.81 软件进行序列多重比对,利用 MEGA 4 软件以 Neighbor - Joining 法进行系统发育分析 (采样量 1 000 次),构建系统发育树^[18]。

2 结果与分析

2.1 产菊粉酶菌株产酶活性测定

由图 2 可见,10 株产菊粉酶细菌的产酶活性随时间的延

长呈规律性变化,除菌株 A1、A4 外,其他菌株的产酶活性都是第 1 天最高,此后呈下降趋势;而菌株 A1、A4 的产酶活性以第 2 天最高,此后开始下降。

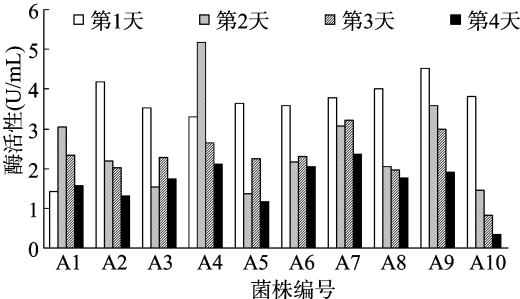


图2 不同菌株的产酶活性

由图 2 还可知,菌株 A4 在培养第 2 天产酶活性最高,远高于其他菌株的产酶活性,但它们的产酶活性最高出现的时间并不一致,所以对第 2 天的各菌株的产酶活性进行重新测定,结果如图 3 所示。菌株 A4 第 2 天的产酶活性达到了 5.62 U/mL,远高于菌株 A9 的 3.58 U/mL,A7 的 3.08 U/mL,A1 的 3.03 U/mL。

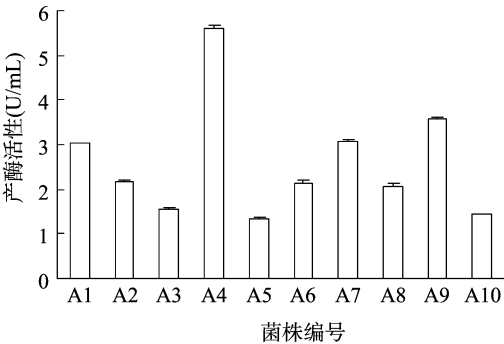


图3 不同菌株第 2 天的产酶活性

2.2 部分产菊粉酶菌株的菌落形态

在以菊粉为唯一碳源的培养基上,经过恒温培养产生菌株 28 株,对这 28 株菌株进行划线培养,其中有 10 株单菌落产生明显的透明圈,部分筛选菌落形态见图 4,可见各菌株之间对菊糖的水解能力存在一定差异。

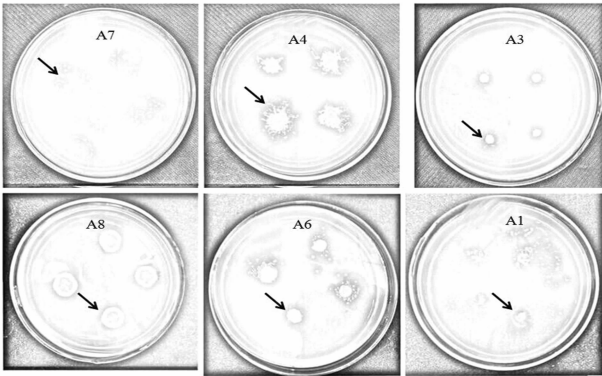


图4 部分菌种菌落形态

2.3 部分产菊粉酶细菌的系统发育分析

16S rRNA 序列比对结果 (表 2) 表明,部分产菊粉酶细菌分别是短杆菌属 (*Brevibacterium* sp.) (A1)、嗜麦芽窄食单胞

菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) (A3)、多黏类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) (A6、A8), 而 A7 可能是短杆菌属或芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.), 进一步的系统发育分析表明它更接近于 *Bacillus* sp.。

此外, 系统进化树信息表明 (图 5), 上述产菊粉酶细菌分别属于厚壁菌门 (Firmicutes) 芽孢杆菌纲 (Bacilli) 孢杆菌目 (Bacillales)、放线菌门放线菌纲 (Actinobacteria) 放线菌目 (Actinomycetales) 和变形菌门 (Proteobacteria) γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 黄色单胞菌目 (Xanthomonadales), 其中以厚壁菌门最为常见。

3 结论与讨论

本研究以菊芋根际土壤为材料, 筛选到 10 株具有较高产

表 2 部分产菊粉酶菌株 16S rRNA 的序列比对分析

条带号	最相似菌株 (NCBI 登录号)	相似性 (%)
A1	<i>Brevibacterium</i> sp. 210_45 (GQ199747.1)	100
A1	<i>Brevibacterium</i> sp. 210_26 (GQ199728.1)	100
A3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (KC764984.1)	99
A3	<i>Stenotrophomonas</i> sp. QW30 (KF737373.1)	99
A6	<i>Paenibacillus polymyxa</i> SQR-21 (CP006872.1)	99
A6	<i>Paenibacillus polymyxa</i> M1 (HE577054.1)	99
A7	<i>Brevibacterium</i> sp. 210_45 (GQ199747.1)	99
A7	<i>Bacillus</i> sp. AB76 (KC019203.1)	99
A8	<i>Paenibacillus polymyxa</i> CJX518 (KF991241.1)	99
A8	<i>Paenibacillus polymyxa</i> 1851 (EU982546.1)	99

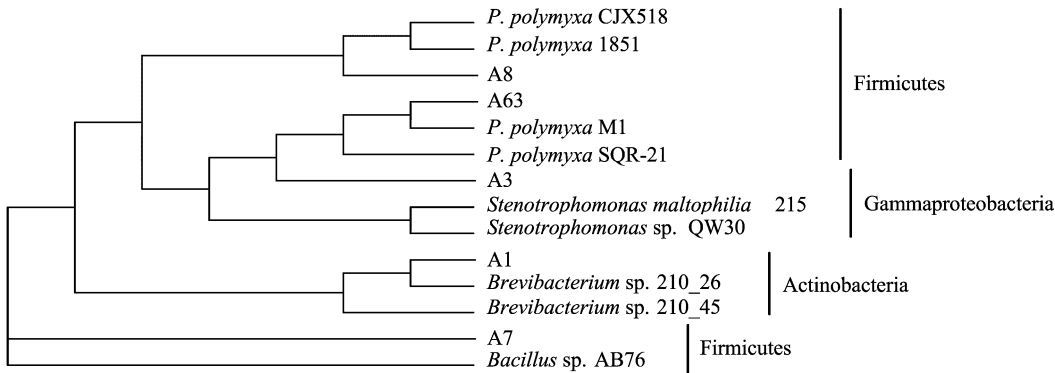


图 5 部分产菊粉酶细菌 16S rRNA 的系统发育树分析

酶活性的产菊粉酶细菌, 并对其中部分菌株加以鉴定。测序结果表明, 产菊粉酶细菌多为厚壁菌门, 此外也包含放线菌门和变形菌门, 且来自厚壁菌门和放线菌门的细菌可能具有较好的产菊粉酶活性, 如彼尔姆短杆菌 (A1) 和芽孢杆菌 (A7) 要高于多黏类芽孢杆菌 (A6、A8), 而变形菌门的细菌产菊粉酶活性则较差。

张扬等曾筛选到一株巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*), 而且该菌的产酶活性在培养 2 天后达到最高^[4], 这与本研究中的菌株 A4 产酶性能一致, 因此 A4 也可能是巨大芽孢杆菌。Pandey 等发现产菊粉酶的细菌包括假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、黄杆菌属 (*Staphylococcus*) 和埃希菌属 (*Escherichia*) 等许多类型^[19], 而本研究则发现, 除上述细菌外, 短杆菌属 (*Brevibacterium* sp.)、多黏类芽孢杆菌 (*P. polymyxa*) 和嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 也具有产菊粉酶能力, 只不过这 3 类细菌产菊粉酶能力较弱。因此, 本研究后续将关注利用紫外诱变、化学突变技术以及重离子诱变技术来获取高产菊粉酶活性菌。

参考文献:

[1] Pons T, Olmea O, China G, et al. Structural model for family 32 of glycosyl-hydrolase enzymes[J]. Proteins, 1998, 33(3): 383-395.
[2] 宫颖, 于基成, 刘秋, 等. 微生物源菊粉酶的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(7): 2146-2150.
[3] 冯珊, 朱宏阳, 黄声岚. 菊粉酶及其应用研究进展[J]. 海峡药

学, 2013, 25(12): 8-10.
[4] 顾夕梅, 陈晓佩, 奚晓桐, 等. 菊粉酶及其制备低聚果糖研究进展[J]. 广东化工, 2014, 41(7): 95-96.
[5] Li Y, Liu G L, Chi Z M. Ethanol production from inulin and unsterilized meal of Jerusalem artichoke tubers by *Saccharomyces* sp. W0 expressing the endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp. [J]. Bioresource Technology, 2013, 147(21): 254-259.
[6] 李娟, 曹泽虹, 李超, 等. 响应面法优化黑曲霉深层发酵产内切型菊粉酶工艺[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 207-212.
[7] 熊伍平, 王成华, 陆雁, 等. 一个外切菊粉酶基因的克隆表达及酶学性质[J]. 生物加工过程, 2013, 11(3): 40-45.
[8] 王静, 金征宇, 江波, 等. *Aspergillus ficuum* 内切菊粉酶的酶解条件优化及酶解动力学研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 161-165.
[9] 韩睿. 青海产菊粉酶菌株的筛选及分子鉴定[J]. 农业科学与技术: 英文版, 2015, 25(2): 224-227.
[10] 张瑞, 朱启忠, 张扬. 产菊粉酶芽孢杆菌发酵条件优化[J]. 资源开发与市场, 2013, 29(7): 676-678.
[11] 赵洁, 朱启忠, 耿松, 等. 产菊粉酶菌株的筛选及发酵条件研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(9): 107-110.
[12] 黄玉玲, 王桂峰, 隆小华, 等. 产菊粉酶菌株的筛选及产酶条件优化[J]. 食品工业科技, 2012, 33(21): 160-163.
[13] 张泽生, 王翠, 张荣萍, 等. 产菊粉酶微生物的筛选及发酵工艺的研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 498-501, 497.
[14] 罗登林, 袁海丽, 曾小宇, 等. 响应面法优化 *Aspergillus niger* X-6 发酵生产菊粉酶工艺的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 138-141.

李学平,刘 萍. 盐碱化土壤中 1 株耐盐解磷放线菌的生物学特性[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):363-365.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.118

盐碱化土壤中 1 株耐盐解磷放线菌的生物学特性

李学平,刘 萍

(滨州学院资源环境系,山东滨州 256600)

摘要:采用平板法进行菌种初筛和生物学特性研究,经筛选纯化得到 1 株高效解磷菌 F1312,对该菌株的生物学特性在碳源、氮源、温度、pH 值等方面进行了初步研究,并采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计对发酵条件进行了初步探讨。结果表明:经筛选所得的菌株 F1312 初步判断为放线菌;对 F1312 进行生物学测定,该菌株在所供 4 种碳源、氮源、pH 值、温度条件下均能生长,其最适碳源为麦芽糖,最适氮源为酵母浸膏粉,最适 pH 值为 7,最适温度为 30 ℃;在发酵条件的优化组合试验中,F1312 的最适解磷条件为:pH 值=7,温度 30 ℃,碳氮比 20:1,转速 150 r/min。

关键词:高效解磷菌;生物学;解磷效果;正交试验;放线菌

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0363-03

在土壤性质、作物类型、磷肥种类和用量等一系列因素的影响下,每年施入的磷大约有 75%~90% 积累在土壤中成为难溶形态的磷^[1],当季利用率一般仅为 10%~25%^[2]。因此,如何提高磷肥利用率一直备受研究人员关注。

大量研究表明,土壤中的许多微生物都能够将植物难以吸收利用的无效磷转化为可吸收利用的有效磷形态^[3-5],这种微生物叫解磷菌。土壤中解磷菌能够增加磷酸钙的溶解性,提高土壤中的可溶性磷含量,从而提高植物对磷的利用效率,改善植物营养条件^[6]。对不同种类解磷微生物溶磷效果的研究发现,细菌、酵母、霉菌接种在不同磷源上时,表现出的溶磷能力不同^[7-11]。因此,研究解磷菌的解磷特性以及生物学特性,对促进植物生长发育以及解磷真菌在农学上的应用起着重要作用。本研究采集草坪根际土壤,对解磷菌进行筛选并进行生物学特性研究,并对发酵液条件优化组合进行研究,以探讨解磷菌的最适生长环境以及解磷的最适合条件。

1 材料与方法

1.1 供试样品

采集内陆盐碱地草坪根际土壤,采用抖土法将收集的土样放入密封袋内立刻带回实验室冷藏,备用。

1.2 培养基配方

收稿日期:2014-10-16

基金项目:山东省自然科学基金联合专项项目(编号:ZR2012CL05);国家级大学生创新训练计划项目(编号:201310449124);山东省自然科学基金(编号:ZR2013EEL001)。

作者简介:李学平(1978—),女,山东临沂人,博士,副教授,主要从事陆地环境微生物研究。E-mail:lixueping2008@163.com。

1.2.1 基础培养基 本试验中菌种初筛用的是有机磷固体培养基和无机磷固体培养基,配方如下:(1)有机磷固体培养基:葡萄糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, CaCO_3 5 g, 卵磷脂 0.2 g, 琼脂 15~20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0~7.5。(2)无机磷固体培养基:葡萄糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g, 琼脂 15~20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0~7.5。

1.2.2 保存培养基 菌种保存时用到的培养基为斜面培养基,其配方为:葡萄糖 15 g, NaNO_3 1 g, K_2HPO_4 0.5 g, KCl 0.25 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, 琼脂 8 g, 蒸馏水 500 mL, 自然 pH 值。

1.2.3 复筛培养基 菌种复培(纯化)时用的培养基为有机磷液体培养基和无机磷液体培养基,配方为:(1)有机磷液体培养基:葡萄糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, CaCO_3 5 g, 卵磷脂 0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0~7.5。(2)无机磷液体培养基:葡萄糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0~7.5。

1.2.4 活化培养基 经过观察,知道纯化所得的菌种为放线菌类,所以活化时用到的培养基为高氏培养基,其配方为:葡萄糖 20 g, KNO_3 1 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH

[15]王 翠. 产菊粉酶菌株的筛选及菊粉酶性质的研究[D]. 天津:天津科技大学,2010:8-10.

[16]王建华,刘艳艳,姚 斌,等. 高产菊粉酶酵母筛选、发酵和酶学性质研究[J]. 生物工程学报,2000,16(1):60-64.

[17]王 琳. 产菊粉酶菌株的筛选及其酶学特性的研究[D]. 南京:南京农业大学,2007:6-11.

[18]宁泊英. 两种常用农药对叶际微生物群落结构的影响及叶面农药残留的原位降解研究[D]. 北京:中国科学院研究生院,2010:26-28.

[19]Pandey A, Soccol C R, Selvakumar P, et al. Recent developments in microbial inulinases. Its production, properties, and industrial applications [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1999, 81(1): 35-52.