

刘蒲临,程德勇,缪礼鸿. 产几丁质酶侧孢短芽孢杆菌 M64 的产酶条件优化及部分酶学性质研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):468-471. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.135

产几丁质酶侧孢短芽孢杆菌 M64 的产酶条件优化及部分酶学性质研究

刘蒲临,程德勇,缪礼鸿

(武汉轻工大学生物与制药工程学院,湖北武汉 430023)

摘要:在紫外诱变的基础上,采用单因素试验和正交试验对侧孢短芽孢杆菌(*Brevibacillus laterosporus*) M64 发酵生产几丁质酶的培养条件和培养基进行优化,并对粗酶液的酶学特性进行了初步研究。结果表明,碳氮源的种类与浓度、培养温度、pH 值以及表面活性剂吐温 80 浓度对该菌株产几丁质酶有显著影响。突变株使用优化后的培养条件,其发酵上清液中几丁质酶活力达到 55.19 U/mL,为未优化前的 2.56 倍;粗酶液最适催化温度为 60 ℃,且在 80 ℃ 预处理 2 h 后仍具有降解几丁质的能力,表现出了良好的热稳定性。

关键词:侧孢短芽孢杆菌;几丁质酶;产酶条件;酶学性质

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0468-04

几丁质是由几丁质合酶以尿嘧啶二磷酸-*N*-乙酰葡萄糖胺为前体,催化 *N*-乙酰葡萄糖胺以 β -1,4 糖苷键相连形成长链后,不同长链之间以反平行(α 型)或平行(β 型)的方式相互作用所形成的^[1]。几丁质是构成丝状真菌和担子菌细胞壁的主要成分,同时广泛存在于节肢动物外骨骼和甲壳纲动物的外壳中^[2]。据统计,自然界中每年产生的几丁质超过 100 亿 t,是仅次于纤维素的第二大有机物^[3]。

几丁质酶可以催化几丁质的水解,广泛存在于微生物和高等动植物体内^[4]。微生物所产生的几丁质酶除了可以水解几丁质获取营养、赋予细菌竞争或寄生优势以外,还可以降解真菌细胞壁和昆虫几丁质外壳,进而应用于植物的病虫害防治^[5]。此外,几丁质降解所形成的几丁寡糖具有抗菌、调节免疫力和抗癌等功效,在功能食品和保健药品等方面具有广阔的应用前景^[6-7]。因此本研究以前期筛选得到的具有几丁质降解能力的侧孢短芽孢杆菌 M64 为出发菌株,通过紫外诱变和正交试验等手段提高和优化其发酵产酶能力并研究了粗酶液的部分酶学性质,为进一步研究开发其所产几丁质酶提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

侧孢短芽孢杆菌 M64,由笔者所在课题组前期筛选得到。几丁质粉末购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

收稿日期:2015-09-29

基金项目:国家“863”高新技术研究发展计划(编号:2013AA102805);

武汉轻工大学科研启动经费(编号:2014RZ19)。

作者简介:刘蒲临(1985—),男,湖北武汉人,博士,讲师,主要从事环境微生物学研究。Tel:(027)83956793;E-mail:liunan3585@163.com。

通信作者:缪礼鸿,博士,教授,主要从事资源与环境微生物学研究。

Tel:(027)83956793;E-mail:miaowhpu@126.com。

1.2 试验方法

1.2.1 胶体几丁质制备 将 10 g 几丁质粉末加入 100 mL 浓盐酸中,磁力搅拌 2 h 后室温静置 24 h。将几丁质的酸溶液转移至 1 L 蒸馏水中,搅拌均匀。5 000 g 离心 10 min 收集胶体几丁质沉淀。使用蒸馏水反复冲洗至 pH 值为 6.5 左右。最终使用 200 mL 蒸馏水重悬沉淀,获得 5% 的胶体几丁质母液。

1.2.2 培养基配制 (1)菌体扩增与计数培养基:牛肉膏蛋白胨培养基。(2)初始发酵培养基,在 Hoster 等所使用培养基配方^[8]基础上有所更改:胶体几丁质 5.0 g/L,酵母膏 2.0 g/L, KH_2PO_4 3.0 g/L, K_2HPO_4 2.0 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L。(3)突变株筛选培养基:初始发酵培养基中添加琼脂至浓度为 15.0 g/L。

1.2.3 几丁质酶酶活测定 使用 DNS 法(3,5-二硝基水杨酸比色法)^[9],以 β -D-N-乙酰氨基葡萄糖绘制标准曲线,分别对待测样品以及样品空白进行测定。将 1 min 产生相当于 1 μmol β -D-N-乙酰氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量定义为 1 个活力单位(U)。

1.2.4 紫外诱变与突变株筛选 将出发菌株接种至 50 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中,37 ℃、180 r/min 振荡培养 10 h。离心收集菌体,使用 50 mL 无菌生理盐水进行重悬,平板计数法测定菌悬液浓度。转移 5 mL 菌悬液至无菌培养皿中,在距离 40 W 紫外灯 50 cm 处,分别处理 15~105 s。紫外照射完毕后,进行平板菌落计数,并按照以下公式计算致死率:

致死率 = (照射前菌悬液浓度 - 照射后菌悬液浓度) / 照射前菌液浓度 \times 100%。

观察并测定菌落在胶体几丁质固体培养基上所形成的水解圈大小。挑取水解圈较大的单菌落接种至初始发酵培养基中,测定发酵液中几丁质酶的酶活。

1.2.5 培养条件优化 以初始发酵培养基为基础,通过单因素试验分别考察 pH 值、培养温度、培养时间和吐温 80 浓度

对发酵液中几丁质酶活力的影响。

1.2.6 培养基优化 通过单因素试验确定不同培养基成分对发酵液中几丁质酶活力的影响,选取影响较大的因素进行正交试验,确定 M64 产几丁质酶的最佳培养基构成。

1.2.7 粗酶液酶学性质研究 (1)最适温度和 pH 值的测定:分别于 20~80 ℃ 以及 pH 值为 3.0~10.0 条件下测定发酵上清液中几丁质酶的活性。(2)热稳定性的测定:将发酵上清液置于 20~80 ℃ 下水浴 2 h 后检测酶活。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变与突变株筛选

2.1.1 紫外致死曲线 菌株 M64 的紫外致死曲线如图 1 所示。当紫外处理时间为 15 s 时,菌体致死率为 9.02%。随着处理时间延长至 60 s,菌体致死率增长至 87.22%。当紫外处理时间大于 75 s 时,菌体致死率已接近 100%。本试验选择致死率在 80%~90% 的紫外线剂量,确定诱变所使用照射时间为 60 s。

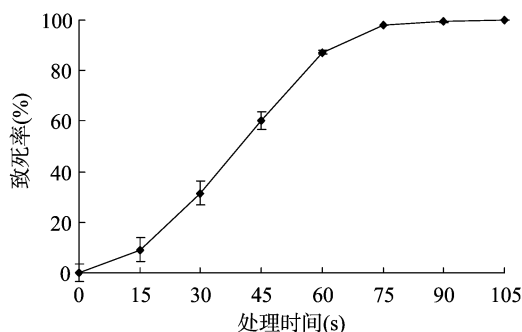


图1 侧孢短芽孢杆菌 M64 的紫外致死曲线

2.1.2 紫外诱变后菌株的筛选 经过紫外诱变的菌悬液经梯度稀释后涂布于含有 1% 胶体几丁质的固体培养平板上,避光培养 72 h 后观察透明圈产生情况。测量并计算透明圈直径(H)与菌落直径(C)的比值,从中挑选出比值较大的单菌落完成初筛。将比值较大的 10 株突变株分别划线纯化,培养形成种子液后以 1% 接种量接种至初始发酵培养基中,37 ℃、180 r/min 振荡培养 36 h,使用 DNS 法测定发酵液中几丁质酶活力。突变株筛选结果如表 1 所示。其中,菌株 M64-7 几丁质酶活力最高,达到 32.30 U/mL,为野生型菌株的 1.50 倍。突变株 M64-7 经过多次划线传代后酶活力保

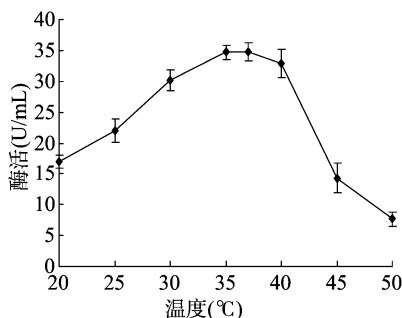
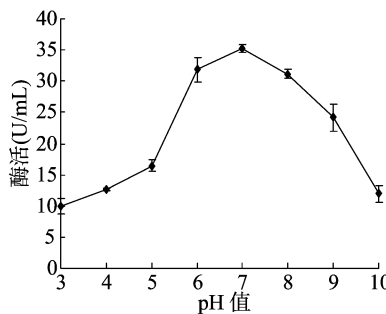


图3 培养温度与起始 pH 值对几丁质酶产量的影响

2.2.3 吐温 80 含量对几丁质酶产量的影响 表面活性剂能增强细胞膜的通透性,从而提高几丁质酶产量。将非离子表

持稳定,具有较好的遗传稳定性,故以突变株 M64-7 进行后续相关试验。

表 1 紫外诱变后突变株的筛选与酶活测定

突变株编号	透明圈直径 H (mm)	菌落直径 C (mm)	H/C	几丁质酶活力(U/mL)	与野生型的比值
M64-1	8.4	1.9	4.42	20.00 ± 0.36	0.93
M64-2	9.1	1.9	4.79	21.57 ± 0.75	1.00
M64-3	8.0	2.0	4.00	20.93 ± 1.38	0.97
M64-4	9.5	2.0	4.75	27.23 ± 0.25	1.26
M64-5	12.5	2.5	5.00	27.77 ± 1.10	1.29
M64-6	9.8	2.5	3.92	20.07 ± 1.03	0.93
M64-7	9.5	2.5	3.80	32.30 ± 0.56	1.50
M64-8	11.2	2.5	4.48	23.73 ± 0.47	1.10
M64-9	9.0	2.0	4.50	23.90 ± 1.04	1.11
M64-10	6.0	1.5	4.00	19.07 ± 0.93	0.88

2.2 突变株培养条件的优化

2.2.1 培养时间对几丁质酶产量的影响 将过夜培养的突变株 M64-7 的菌液以 1% 接种量接种于初始发酵培养基中,37 ℃、180 r/min 振荡培养,每隔 6 h 测定发酵液中几丁质酶活和菌体生长量。图 2 表明,菌株 M64-7 在 36 h 产酶达到最大值,36 h 与 42 h 几丁质酶活差异不显著。发酵液酶活变化曲线与菌体生长情况表现出了良好的一致性。

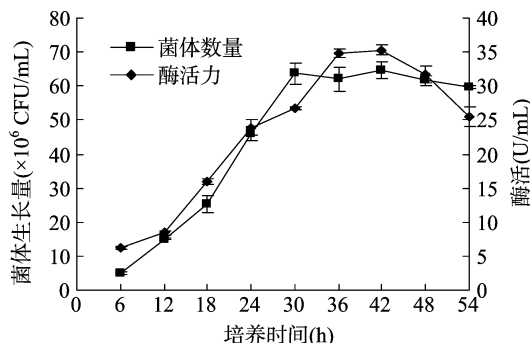


图2 突变株 M64-7 的生长曲线与发酵液酶活变化曲线

2.2.2 培养温度与起始 pH 值对几丁质酶产量的影响 将突变株 M64-7 的种子液以 1% 接种量接种至不同 pH 值或不同培养温度的初始发酵培养基中进行振荡培养(180 r/min),36 h 后测定发酵液中的几丁质酶活力。图 3 表明,该菌株在初始 pH 值为 7.0 以及培养温度为 37 ℃ 时,产酶达到最高水平。

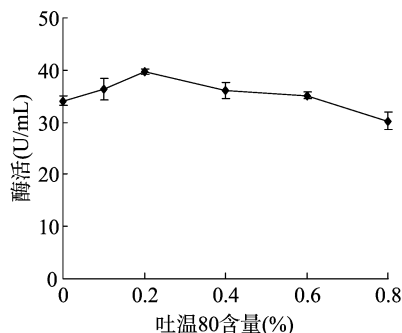


图4 吐温80含量对几丁质酶产量的影响

面活性剂吐温 80 添加至初始发酵培养基中,至终浓度分别为 0.1%、0.2%、0.4%、0.6% 和 0.8%。在最适 pH 值和培养温

度下培养 36 h 后,发酵上清液中的酶活如图 4 所示。当吐温浓度小于 0.2% 时,发酵液酶活随着吐温 80 浓度的增大而增强;吐温 80 浓度为 0.2% 时,发酵液酶活达到最大值。因此,本研究最终选择培养基中的吐温 80 浓度为 0.2%。

2.3 不同的培养基成分对发酵液中几丁质酶产量的影响

2.3.1 氮源种类与浓度对几丁质酶产量的影响 以初始发酵培养基为基础,在其他成分不变的条件下,分别添加不同浓度的酵母膏、胰蛋白胨、牛肉膏、 NH_4Cl 以及 KNO_3 ,比较不同氮源对几丁质酶产量的影响。在相同接种量和培养条件下,以有机物作为氮源有助于几丁质酶产量的提高,当培养基中含有 8.0 g/L 的酵母膏时,发酵液中几丁质酶活力达到 49.68 U/mL(图 5-a);而向培养基中添加无机氮(NH_4Cl 与 KNO_3)不会显著影响几丁质酶的产量(图 5-b)。

2.3.2 碳源种类与浓度对几丁质酶产量的影响 在培养基中其他成分不变的条件下,分别添加不同浓度的胶体几丁质、葡萄糖和蔗糖,比较不同碳源对几丁质酶产量的影响,结果如图 6 所示。胶体几丁质含量由 0.5% 增加至 2.5% 时,几丁质酶产量先逐渐增加后趋于平缓,说明该菌株几丁质酶的表达受到外源几丁质的诱导;但当培养基中不含胶体几丁质时,几丁质酶仍有部分表达(图 6-a)。以葡萄糖或蔗糖作为碳源时,发酵液中几丁质酶含量明显下降(图 6-b)。

2.3.3 缓冲盐浓度对几丁质酶产量的影响 将初始发酵培养基中的磷酸盐浓度定义为 100%,调整培养基中磷酸盐相

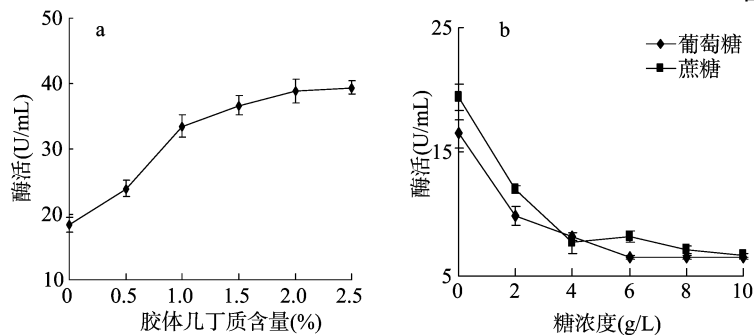


图6 培养基中碳源种类与浓度对几丁质酶产量的影响

2.3.4 培养基成分的正交优化 根据单因素试验的结果,选择酵母膏作为氮源,胶体几丁质作为碳源和缓冲盐浓度一起进行正交试验,确定最佳培养基配方。菌体的发酵均在最佳培养条件下进行(含 0.2% 吐温 80),结果如表 2 所示。使用 SPSS 10.0 对数据进行处理后,发现在 $\alpha=0.05$ 的显著性水平上酵母膏和胶体几丁质的浓度变化显著影响了几丁质酶的产量($P<0.05$);而培养基中的缓冲盐浓度的变化对几丁质酶产量的影响不显著。此外,极差(R)结果表明,酵母膏浓度对几丁质酶产量的影响较大。考察上述 3 个因素在 4 个水平上的变化之后,得出最佳产酶培养基成分为:酵母膏 6.0 g/L,胶体几丁质含量 2.0%,缓冲盐浓度为初始发酵培养基的 50%。经重复试验验证,使用该配方后,菌株 M64-7 酶活稳定在 (55.19 ± 0.48) U/mL。

2.4 温度与 pH 值对发酵液中几丁质酶活力的影响

温度与 pH 值对几丁质酶活力的影响如图 8 所示。发酵液最适催化温度为 60℃;当反应温度为 80℃ 时,酶活为最高值的 41.17% (图 8-a)。图 8-b 表明,发酵液在 pH 值为

对浓度至 25%~200% 不等,比较不同缓冲盐浓度对几丁质酶产量的影响,结果如图 7 所示。培养基中缓冲盐浓度为初始培养基缓冲盐浓度的 50%~125% 时,单位体积发酵液所表现出的几丁质酶活力稳定在较高水平;低于或高于该浓度范围均使几丁质酶的产量有所下降。

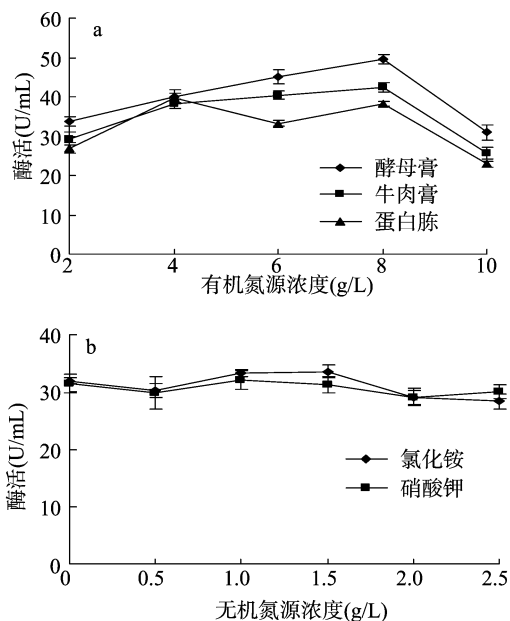


图5 培养基氮源种类与浓度对几丁质酶产量的影响

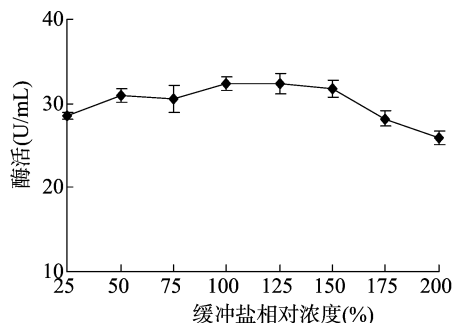


图7 培养基中缓冲盐相对浓度对几丁质酶产量的影响

7.0 时表现出了最高酶活力。为了进一步研究几丁质酶对高温的耐受能力,将发酵液分别置于 20~80℃ 预处理 2 h,在 60℃ 以及 pH 值=7.0 的条件下测定残余的酶活力,结果(图 8-c)表明,经过 60℃ 预处理后,其酶活力没有受到显著影响;当预处理温度提高至 80℃ 时,其酶活力仍为原来的 37.75%,具有较强的热稳定性。

3 讨论与结论

侧孢短芽孢杆菌在自然界中常常定植于水体、土壤以及昆虫的体表,对鳞翅目、鞘翅目、双翅目的多种昆虫以及一些线虫具有杀灭作用;该菌还产生与拮抗性有关的酶和抗生素,抑制多种病原细菌或真菌的生长^[10]。几丁质酶已被证明是微生物产生真菌拮抗能力的重要原因之一,然而国内尚未对侧孢短芽孢杆菌中几丁质酶的产量及其影响因素展开研究。因此,本试验以前期所筛选的侧孢芽孢杆菌 M64 为基础,通过紫外诱变提高其产酶能力,并探索其产酶的最佳条件与影响因素。该菌株产几丁质酶的最佳培养温度为 37℃,最佳酸

表 2 菌株 M64-7 产几丁质酶培养基成分的正交优化

样品编号	酵母膏浓度 (g/L)	胶体几丁质 含量(%)	缓冲盐含量 (%)	酶活 (U/mL)
1	4.0	1.5	75	25.21
2	2.0	1.0	50	25.12
3	4.0	2.5	100	50.83
4	2.0	2.0	100	30.50
5	8.0	2.0	75	43.15
6	2.0	2.5	125	40.21
7	8.0	1.0	125	40.30
8	6.0	2.5	75	45.50
9	6.0	2.0	50	55.12
10	8.0	2.5	50	46.13
11	6.0	1.5	125	42.65
12	4.0	1.5	50	39.04
13	4.0	2.0	125	40.98
14	4.0	1.0	75	26.70
15	8.0	1.5	100	51.15
16	6.0	1.0	100	37.68
R	14.98	13.22	7.40	
P	0.018	0.049	0.272	

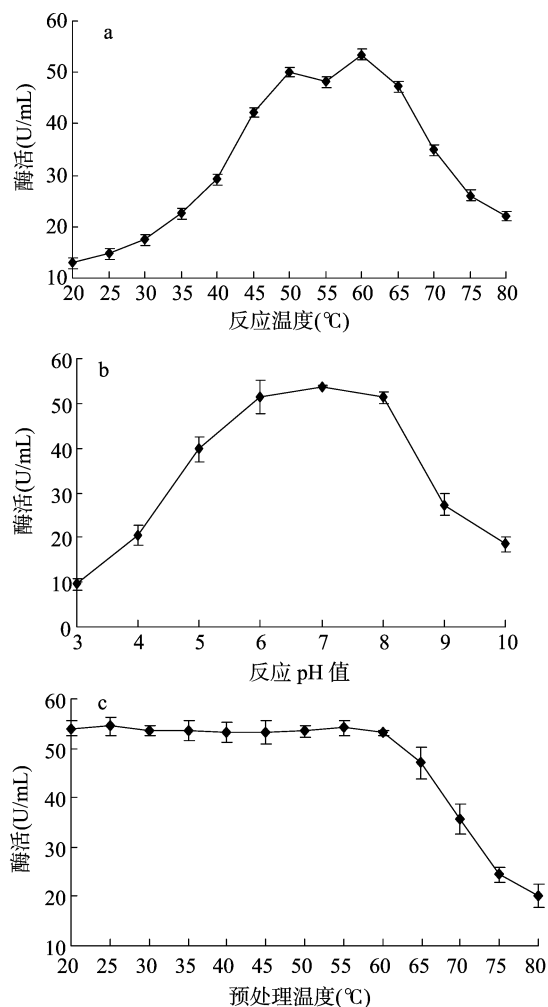


图 8 温度与 pH 值对发酵液中几丁质酶活力的影响

几丁质酶的产量有显著影响。胶体几丁质可以诱导几丁质酶的表达,葡萄糖等速效碳源对几丁质酶的产生有明显的抑制作用。有机氮源浓度的提高也有助于菌体合成并分泌几丁质酶。当发酵培养基中酵母膏浓度由 2 g/L 提高至 8 g/L 时,发酵液中几丁质酶的含量提高了 31%。经过紫外诱变与培养条件优化之后,突变株发酵液酶活达到 55.19 U/mL,为初始野生型菌株的 2.56 倍。酶学分析表明,菌株 M64-7 发酵液中几丁质酶的最适反应温度为 60 °C,80 °C 预处理 2 h 仍具有 37.75% 的催化活性。Karthik 等研究指出,微生物几丁质酶的最适反应温度主要介于 40 ~ 60 °C 之间,耐受温度平均在 50 °C 左右^[11]。因此,M64-7 所分泌几丁质酶的耐热性处于较高水平。综上所述,本研究探索了影响侧孢短芽孢杆菌产几丁质酶的几个营养因素,并显著提高了几丁质酶的产量,为该菌株在几丁质废弃物生物转化以及生物拮抗方面的推广与应用奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Manjeet K, Purushotham P, Neeraja C, et al. Bacterial chitin binding proteins show differential substrate binding and synergy with chitinases[J]. Microbiological Research, 2013, 168: 461-468.
- [2] 钟万芳, 丁少军. 细菌几丁质酶的结构与功能研究进展[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(4): 1-3.
- [3] Suma K, Podile A R. Chitinase A from *Stenotrophomonas maltophilia* shows transglycosylation and antifungal activities[J]. Bioresource Technology, 2013, 133: 213-220.
- [4] Laribi - Habchi H, Bouanane - Darenfed A, Drouiche N, et al. Purification, characterization, and molecular cloning of an extracellular chitinase from *Bacillus licheniformis* strain LHH100 isolated from wastewater samples in Algeria[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 1117-1128.
- [5] 付 星, 闫巧娟, 江正强, 等. 高产几丁质酶巴伦葛类芽孢杆菌的筛选和发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2015, 42(4): 625-633.
- [6] Nanjo F, Sakai K, Ishikawa M, et al. Properties and transglycosylation reaction of a chitinase from *Nocardia orientalis*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53: 2189-2196.
- [7] Usui T, Matsui H, Isobe K. Enzymic synthesis of chitooligosaccharides utilizing transglycosylation by chitinolytic enzymes in a buffer containing ammonium sulfate[J]. Carbohydrate Research, 1990, 203: 65-77.
- [8] Hoster F, Schmitz J E, Daniel R. Enrichment of chitinolytic microorganisms; isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 66: 434-442.
- [9] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31: 426-428.
- [10] Rui L. *Brevibacillus laterosporus*, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species[J]. Insects, 2013, 4: 476-492.
- [11] Karthik N, Binod P, Pankey A. Purification and characterization of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp. [J]. Bioresource Technology, 2015, 188: 195-201.

碱度为 pH 值 = 7.0。培养基中碳源和氮源的种类与浓度对