

安曼云,焦丽丽,伊 炜,等. 云南松毛虫肠道中产脂肪酶菌的研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):91-93.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.025

云南松毛虫肠道中产脂肪酶菌的研究

安曼云¹,焦丽丽¹,伊 炜²,崔立华¹

(1. 云南经济管理学院工程学院,云南昆明 650106; 2. 云南省林业职业技术学院,云南昆明 650205)

摘要:采用微生物筛选培养和酶学方法,研究了云南松毛虫肠道内产脂肪酶菌群及产酶特性,为松毛虫的综合开发利用提供理论依据。结果表明,从云南松毛虫幼虫肠道内共分离筛选获得 193 株产脂肪酶的菌株,涉及 3 个菌属:82 株假单胞菌属(*Pseudomonas*)、67 株芽孢杆菌属(*Bacillus*)和 44 株克雷伯氏菌属(*Klebsiella*);其中,假单胞菌属为优势菌群,占总菌株数量的 42.49%;供试的 9 株菌株表现出不同的产脂肪酶活性,并从中筛选得到了 1 株高产脂肪酶菌株 P-50,最适作用温度为 35 ℃,pH 值为 8,经发酵至 60 h 时生长量达到最大,在 48 h 左右时酶活性达到最高;P-50 初步确定为中温产碱性脂肪酶菌。

关键词:云南松毛虫;产脂肪酶菌;酶活性;假单胞菌属

中图分类号: Q814 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0093-03

近年来,随着胃肠道微生态理论的深入研究,有关昆虫肠道微生物的研究已成为新热点^[1-2]。脂肪酶是一类特殊酯键水解酶,广泛存在于动植物组织微生物体中,其中发现能产脂肪酶的细菌约有 28 个属^[3-4]。目前,已在多种昆虫肠道中发现各类产酶菌群,并对酶学性质进行了研究,昆虫肠道中存在不同功能的菌群^[5-8]。由于微生物脂肪酶作用的温度和 pH

值范围比动植物脂肪酶的更宽,易获得较高纯度酶制剂,适合于工业上大规模生产^[9-10]。因此,不断筛选出具有新特性和高活性的脂肪酶是一项非常有意义的工作。

云南松毛虫(*Dendrolimus houi* Lajonquiere)属鳞翅目(Lepidoptera)枯叶蛾科(Lasiocampidae),是林业的重大害虫之一,但是从营养学和资源学的角度来看,它又具有极大的开发利用价值^[11-12]。目前国内外对松毛虫的研究主要集中在防治方面,且在相关产酶微生物资源研究时,多从土壤、淤泥中分离筛选,但对松毛虫的利用以及肠道微生物的研究报道较少^[13]。由于松毛虫长期食用多种松类针叶,对松油脂有着特殊的消化体系,可能肠道内存在着特殊的微生物菌群资源^[14-15]。因此,本研究拟以云南松毛虫为试验材料,研究松

收稿日期:2016-11-01

基金项目:云南省应用基础研究计划青年项目(编号:2014FD070)。

作者简介:安曼云(1984—),女,甘肃张掖人,硕士,讲师,主要从事植物学方面的研究。E-mail:344745803@qq.com。

通信作者:崔立华,硕士,副教授,主要从事植物学方面的研究。E-mail:895987674@qq.com。

区域比对分析,确定引起甘肃省苹果果实炭疽病的病原为胶孢刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides*),有关甘肃省苹果炭疽病病原菌的多样性有待进一步研究。

参考文献:

- [1]符丹丹. 中国苹果炭疽病病原菌的遗传多样性[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [2]王 薇,符丹丹,张 荣,等. 苹果炭疽叶枯病病原学研究[J]. 菌物学报,2015,34(1):13-25.
- [3]González E, Sutton T B. Population diversity within isolates of *Colletotrichum* spp. causing *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple in three orchards in north Carolina[J]. Plant Disease, 2004, 88(12): 1335-1340.
- [4]吴芳芳,檀根甲,陈仁虎. 苹果果实炭疽病的研究进展[J]. 安徽农业大学学报,2002,29(1):29-33.
- [5]张 荣,王素芳,崔静秋,等. 陕、豫两省苹果炭疽病病原鉴定[J]. 中国农业科学,2009,42(9):3224-3229.
- [6]White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. New York: Academic Press, 1990:54-55.
- [7]Gardes M, Bruns T D. ITS primers with enhanced specificity for

- basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. Molecular Ecology, 1993, 2(2):113-118.
- [8]王晓鸣,李建义. 陕西省炭疽菌的研究[J]. 真菌学报, 1987, 6(4):211-218.
- [9]Sutton B C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* [M]. Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureau International, 1992:112-114.
- [10]Biggs A R. Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. [J]. Plant Disease, 1999, 83(11):1001-1005.
- [11]González E, Sutton T B, Correll J C. Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests[J]. Phytopathology, 2006, 96(9):982-992.
- [12]Chung W H, Ishii H, Nishimura K, et al. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan[J]. Plant Disease, 2006, 90(4):506-512.
- [13]Guerber J C, Liu B, Correll J C, et al. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility[J]. Mycologia, 2003, 95(5):872-895.

毛虫肠道内产脂肪酶菌株及酶学特性,为松毛虫的综合利用及产脂肪酶微生物新资源的开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 云南松毛虫 采自云南省楚雄州永仁县云南松母树林,共计 60 只幼虫。

1.1.2 培养基 试验培养基名称及配方^[16]。分离培养基:肉膏 5.0 g/L、蛋白胨 10.0 g/L、NaCl 5 g/L、琼脂 15.0 g/L, pH 值 = 7.0; 脂肪酶筛选培养基:牛肉膏 5.0 g/L、蛋白胨 10.0 g/L、橄榄油 20.0 mL、琼脂 15.0 g/L, pH 值 = 7.0; 活化培养基:牛肉膏 5.0 g/L、蛋白胨 10.0 g/L、橄榄油 20.0 mL、琼脂 15.0 g/L, pH 值 = 7.0; 高产脂肪酶菌株筛选培养液:酵母膏 5.0 g/L、(NH₄)₂SO₄ 5.0 g/L、K₂HPO₄ 2.0 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L、NaCl 3.0 g/L、橄榄油 20.0 mL、云南松节油 20 mL, pH 值 = 7.0; 发酵培养基:酵母膏 5.0 g/L、(NH₄)₂SO₄ 5.0 g/L、K₂HPO₄ 2.0 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L、NaCl 3.0 g/L、云南松节油 20 mL, pH 值 = 8.0。

1.2 试验方法

1.2.1 产脂肪酶菌株的分离筛选及分子鉴定 用无菌水饲养云南松毛虫 1 d 后,解剖虫体取其肠道,经研磨、稀释后涂布于分离培养基上,37 ℃ 培养 48 h。挑取形态各异的纯菌落接种到脂肪酶筛选培养基进行培养,筛选能产生透明圈的菌株。对菌株进行 DNA 提取[细菌 DNA 提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司],采用 16S rDNA 通用引物进行 16S rDNA 序列的扩增和测序分析。计算分离率及分离频率。

分离频率 = $a/b \times 100\%$ 。

式中: a 为分离到的某一指定类型真菌的菌株数量,株; b 为分离的真菌菌株数量,株。

分离率 = $a/c \times 100\%$ 。

式中: a 为分离到的某一指定类型真菌的菌株数量,株; c 为分离样品总数,60 只。

1.2.2 高产脂肪酶菌株筛选 从假单胞菌属、芽孢杆菌属、克雷伯氏菌 3 个菌属中分别选取 3 株供试菌株筛选高产脂肪酶,分别为 P-13、P-50、P-106; P-03、P-19、P-154; P-06、P-28、P-67。将这 9 株供试菌株分别接种于高产脂肪酶菌株筛选培养液中培养(以云南松节油为底物,橄榄油作对照底物),48 h 后测定脂肪酶活性(采用醋酸铜比色法^[17])。

1.2.3 高产菌株酶解特性、生长量、产酶特性确定 设置 5 个反应温度梯度(25、30、35、40、45 ℃)和 5 个 pH 值梯度(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)测定酶活性,确定最适温度以及在最适温度下的最适 pH 值。将高产脂肪酶菌株接种于发酵培养液中继续培养,24 h 后每隔 12 h 测定菌株生长量及酶活性。

2 结果与分析

2.1 云南松毛虫肠道中产脂肪酶菌株的筛选

从云南松毛虫幼虫肠道内共分离筛选获得 193 株产脂肪酶的菌株,涉及 3 个菌属:82 株假单胞菌属(*Pseudomonas*)、67 株芽孢杆菌属(*Bacillus*)和 44 株克雷伯氏菌属(*Klebsiella*) (表 1)。产脂肪酶菌在云南松毛虫肠道中的分离率较高,最低

的为 73.33%,说明云南松毛虫肠道中存在有大量的产脂酶菌群。在这 3 个菌属中,假单胞菌属为优势菌群,占总菌株数量的 42.49%;克雷伯氏菌属最少,为 22.80%。

表 1 云南松毛虫肠道产脂肪酶菌群组成

属名	拉丁名	菌株数 (株)	分离率 (%)	分离频率 (%)
假单胞菌属	<i>Pseudomonas</i>	82	136.67	42.49
芽孢杆菌属	<i>Bacillus</i>	67	111.67	34.72
克雷伯氏菌属	<i>Klebsiella</i>	44	73.33	22.80

2.2 云南松毛虫肠道中高产脂肪酶菌株的筛选

9 株产脂肪酶菌株对橄榄油和云南松节油 2 种底物的水解活性不同。由图 1 可知,当以松节油为底物时的酶活性大于对照橄榄油为底物时的酶活性(菌株 P-154 除外),菌株 P-154 的酶活性表现最低,而且偏向于底物橄榄油。以松节油为底物时,云南松毛虫肠道中产脂肪酶菌群的酶活性表现为假单胞菌属(酶活性平均值 4.80 U/mL) > 克雷伯氏菌属(2.94 U/mL) > 芽孢杆菌属(2.65 U/mL),其中假单胞菌属中菌株 P-50 的酶活性最大,为 5.06 U/mL,初步确定为高产脂肪酶菌株。

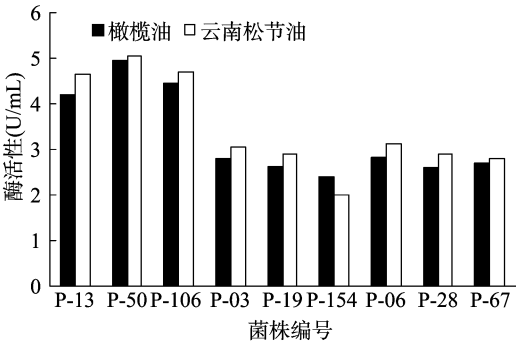


图 1 2 种底物对 9 株菌产脂肪酶活性的影响

2.3 高产脂肪酶菌株酶学性质分析

由图 2 可知,P-50 的最适宜温度为 35 ℃,其酶活性达 4.7 U/mL(图 2-a)。在最适温度 35 ℃ 条件下,P-50 的最适 pH 值为 8 时,酶活性达到最大值(图 2-b),说明菌株 P-50 为中温产碱性脂肪酶菌。

2.4 高产脂肪酶菌株生长及产酶特性

以 D_{600 nm} 值来衡量菌株 P-50 的生长量,P-50 的生长量是随着培养时间的延长而增加,当培养 60 h 左右时,生长量达到最大值,随后不再增加(图 3-a)。而在 P-50 生长对数时期,培养 48 h 时 P-50 表现出较高的酶活性,为 5.8 U/mL,随后缓慢下降(图 3-b)。

3 结论与讨论

昆虫肠道中蕴含丰富的微生物资源,从中筛选出具有新特性和高活性的脂肪酶是一项非常有意义的工作。本研究首次从云南松毛虫幼虫肠道内共分离获得 193 株产脂肪酶的菌株,涉及 3 个菌属:假单胞菌属、芽孢杆菌属和克雷伯氏菌属,其中假单胞菌属为优势菌群,占总菌株数量的 42.49%。结果表明,长期寄生于松毛虫肠道中的产脂酶菌群种类丰富多样,为脂肪酶菌资源的开发利用提供了新的来源途径。目前,生产上常见的产脂肪酶菌株主要有假单胞菌属、芽孢杆菌属、

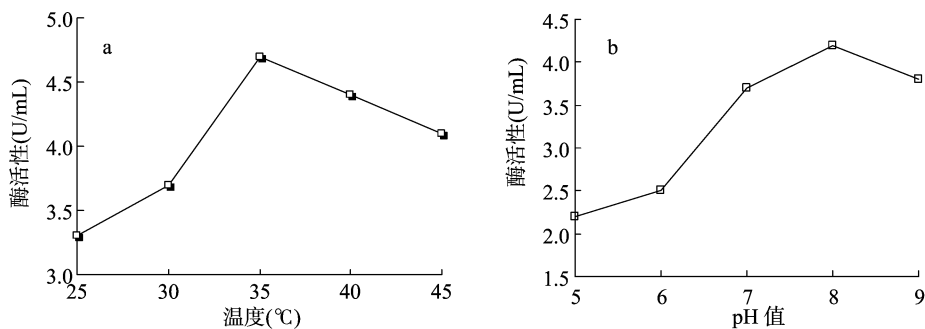


图2 温度与 pH 值对 P-50 菌株酶活性的影响

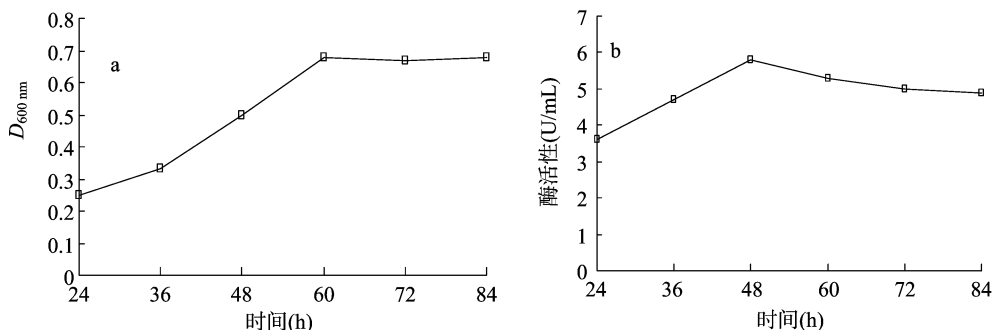


图3 菌株 P-50 的生长与产酶特性

无色杆菌属 (*Photorhabdus*)、色杆菌属 (*Chromobacterium*) 和产碱菌属 (*Alcaligenes*) 5 个菌属^[3]。本研究中分离的假单胞菌属和芽胞杆菌属为常见菌属,已在多种昆虫[桑天牛 (*Aripiona germari*)、白蚁 (*Tsitermes ampliceps*)、蝗虫 (*Atractomorpha sinensis*)]中分离获得,但分离得到的克雷伯氏菌属的菌株研究还较少,有待进一步研究。

云南松毛虫肠道中产脂肪酶菌群的酶活性表现不同,从中筛选得到了 1 株高产脂肪酶菌株 P-50,属于假单胞菌属。以松节油为专一底物时,该菌株表现出较高的脂肪酶活性,并初步确定为中温产碱性脂肪酶菌(最适作用温度为 35 ℃,最适 pH 值为 8)这与鳞翅目昆虫碱性肠道 (pH 值为 8.0 ~ 10.0) 环境相关联。然而, P-50 与已有高产酶菌株的酶活性相比还有很大的差距,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 郭 军, 吴 杰, 邓先余, 等. 昆虫肠道菌群的功能研究进展[J]. 应用昆虫学报, 2015, 52(6): 1345-1352.
- [2] 黄 云, 詹先进, 蓝家样, 等. 昆虫肠道微生物的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(11): 2888-2890.
- [3] Hasan F, Shah A A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(2): 235-251.
- [4] 刘虹蕾, 缪 铭, 江 波, 等. 微生物脂肪酶的研究与应用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 376-381.
- [5] 袁秀洁. 桑天牛成虫肠道优势细菌菌群研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
- [6] 袁志辉, 蓝希铂, 杨 廷. 家蚕肠道细菌群体调查与分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(2): 285-291.
- [7] 刘 航. 白蚁和蝗虫肠道共生细菌群落结构研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.
- [8] Ashida H, Ogawa M, Kim M, et al. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier[J]. Nature Chemical Biology, 2012, 8(1): 36-45.
- [9] Anuradha P, Rani D J, Vijayalakshmi K, et al. Pasha microbial lipases: a potential tool for industrial applications[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2009, 3(1): 301-306.
- [10] 董明奇, 史 岩, 姜春雷, 等. 脂肪酶高产菌株的筛选及酶学特性研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2008, 45(4): 985-990.
- [11] 刘高强, 魏美才, 王晓玲. 松毛虫资源开发及其资源化管理的初步设想[J]. 西北林学院学报, 2004, 19(4): 119-122.
- [12] 许国莲. 云南省云南松毛虫研究进展[J]. 西南林业大学学报, 2008, 28(3): 42-44.
- [13] 刘湘早. 云南松毛虫生物学特性及综合治理[J]. 西南林业大学学报, 2006, 26(3): 52-54.
- [14] 孙佑赫, 周开艳, 熊 智. 云南松毛虫肠道产纤维素酶菌株的筛选鉴定及酶学性质[J]. 华北农学报, 2012, 27(增刊1): 254-258.
- [15] 王金华, 李 彪, 张武先, 等. 五龄恩茅松毛虫幼虫的肠道好氧细菌多样性分析[J]. 应用昆虫学报, 2013, 50(1): 230-234.
- [16] 黄 晶, 袁丽红, 孙 镇. 脂解麻疯树油脂脂肪酶产生菌的筛选鉴定及其催化特性[J]. 微生物学报, 2011, 51(4): 488-494.
- [17] 江慧芳, 王雅琴, 刘春国. 三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(8): 72-75.