

高效产几丁质酶微生物的分离和筛选

Isolation and screening of highly efficient chitinase microorganisms

乔宏萍* 孙春黎 武晓英 吴丽华 赵文婧

(太原师范学院生物系, 太原 030619)

Qiao Hongping* Sun Chunli Wu Xiaoying Wu Lihua Zhao Wenjing

(Department of Biology, Taiyuan Normal University, Taiyuan 030619, Shanxi Province, China)

几丁质酶是具有生物催化活性、能水解几丁质的一类水解酶,许多微生物可通过胞外诱导产生该酶。几丁质广泛存在于植物病原菌、线虫卵和昆虫的细胞壁中,防治植物土传病害时,在土壤中加入几丁质可以刺激土壤微生物胞外分泌几丁质酶,从而抑制病虫害发生(郑秀丽等,2006;孙建波等,2010)。本研究在3种不同土壤中分离并筛选能够产生几丁质酶的微生物,对其中产酶量最高的菌株进行生长和产酶活性测定,以期为研究其抑制病原真菌的能力并应用于植物病害防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试土样:取太原市汾河公园多年生的植物海棠树、丁香树和松树下土壤,其腐殖质非常丰富,微生物种类多、含量高。采集时去除表层土壤,收集距地表10 cm的土壤50 g左右,立即放入自封袋带回实验室于4℃保存备用。

培养基:固体分离培养基:几丁质2.5 g/L、 K_2HPO_4 0.7 g/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L、 KH_2PO_4 0.3 g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 3 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、琼脂粉1.5 g/L, pH 7.0~7.2;液体分离培养基:固体分离培养基中不加琼脂粉;发酵产酶培养基:几丁质10 g/L、玉米淀粉5 g/L、可溶性淀粉3 g/L、 KH_2PO_4 0.45 g/L、 K_2HPO_4 1.05 g/L、 $NaNO_3$ 3.0 g/L、 $NaCl$ 0.1 g/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, pH 7.0。

试剂及仪器:本试验所用试剂均为国产分析纯。HRSP-H系列生化培养箱,海尔特种电器有限公司;WFJ7200型可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;奥林巴斯CX21生物显微镜,日本奥林巴斯公司。

1.2 方法

产几丁质酶活性测定:本研究以几丁质为唯一碳源,分离高产几丁质酶的微生物。将采集得到的3种土样分别称取1 g加入到100 mL液体分离培养基中进行富集培养,30℃下振荡培养4 h后,无菌生理盐水稀释,分别取稀释梯度为 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 的溶液0.1 mL,涂布于固体分离培养基平板上,每处理3次重复,于30℃培养箱中培养48 h后观察菌株生长情况,计算菌落数,显微镜下直接观察菌落形态并将形态各异的菌株纯化后保存。将分离纯化所得菌株接种于50 mL发酵产酶培养基中,30℃振荡培养48 h后,取发酵上清液测定酶活性,筛选产几丁质酶的菌株。酶活性采用3,5-二硝基水杨酸法测定(Cha et al., 2004)。在37℃下1 min内将底物几丁质转化产生1 μ mol还原糖需酶量定为1个酶活性单位(U)。

生长曲线的测定:采用比浊法测定产酶活性最高的菌株在不同时间段的生长量。将产酶菌株接种在100 mL液体发酵培养基中,用未接种培养液作空白对照,30℃下培养。分别于0、4、8、12、24、36、48、72、96 h时,利用可见分光光度计在波长600 nm下测定OD值,绘制菌株的生长曲线。

产酶曲线的测定:将产酶活性最高的菌株接种在100 mL液体发酵培养基中,用未接种的培养液作空白对照,30℃下培养。分别于0、4、8、12、24、36、48、72、96 h时取发酵上清液,采用3,5-二硝基水杨酸法测定产几丁质酶活性,绘制菌的产酶曲线。

1.3 数据分析

采用SPSS 22.0软件对不同菌株产生的酶活性进行one-way ANOVA分析,应用Duncan氏新复极差法检验不同菌株间产酶活性的差异显著性。

基金项目:太原师范学院大学生创新项目(CXCY1626),山西省科技厅项目(2016021104)

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: xiaoqiao2001@hotmail.com

收稿日期:2018-06-20

2 结果与分析

2.1 不同土样菌株的分离结果

48 h后在几丁质分离平板上可看到明显的菌落,且3种土样分离所得菌落数也不同。海棠树、丁香和松树土样中菌落数分别约为 7.12×10^9 、 3.2×10^9 、 6.1×10^9 个/g,表明这3种土样中均含有丰富的产几丁质酶微生物,且海棠树土样中产几丁质酶的微生物数量最高,可能与土壤中腐殖质含量不同有关。

2.2 菌株产几丁质酶的活性

将3种土样分离获得的菌株根据菌落形态颜色不同,共纯化出11株菌株,分别编号为A-1~A-4、B-1~B-4、C-1~C-3。纯化菌株都可以分泌几丁质酶,

菌株C-3产生的几丁质酶活性最高,为546 U/L,显著高于其它菌株($P < 0.05$),后续试验将测定其不同时间段的生长量和产酶能力。其次是菌株B-3,酶活性为470 U/L;菌株A-1产生的酶活性最低,为213 U/L(表1)。

2.3 菌株C-3的生长曲线和产酶曲线

菌株C-3在0~12 h处于生长迟缓期;12~36 h处于对数生长期,在36 h OD值达到最大值,为1.85;36~72 h处于稳定生长期;72 h后处于衰亡期。菌株C-3在进入对数生长期时开始产酶,12~48 h酶活性迅速增加,在48 h时达到最大值,为576 U/L,之后酶活性开始下降(图1)。

表1 本试验纯化所得11株菌株产生的几丁质酶活性测定结果

Table 1 Chitinase activities of 11 purified strains microorganisms in this study

U/L

菌株 Strain	酶活性 Chitinase activity	菌株 Strain	酶活性 Chitinase activity	菌株 Strain	酶活性 Chitinase activity
海棠树土 A-1	213±1 h	丁香树土 B-1	413±2 d	松树土 C-1	396±3 e
Begonia soil A-2	293±2 g	Clove soil B-2	440±1 c	Pine soil C-2	403±3 e
A-3	416±1 d	B-3	470±2 b	C-3	546±1 a
A-4	373±2 f	B-4	413±1 d		

表中数据为平均数±标准差。数据后不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

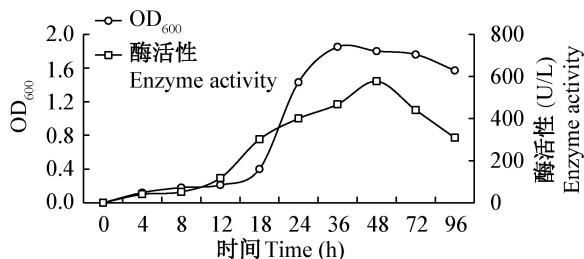


图1 菌株C-3的生长曲线和产酶曲线

Fig. 1 Growth curve and enzyme production curve of strain C-3

3 讨论

产几丁质酶的微生物作为生防菌一直以来都是植物病理学研究的热点(杨春林等,2009;孙建波等,2010),但是多集中在理论水平,真正应用于生产实际的很少,菌种单一、酶活性低、产酶能力不稳定等因素严重制约了其发展。本研究从腐殖质肥沃的土壤中分离得到11株形态各异且高效产几丁质酶的微生物,丰富了产几丁质酶的菌种资源。本试验分离筛选得到的菌株产酶能力均在200 U/L以上,特别是菌株C-3在基础发酵培养基发酵48 h酶活力就可以达到576 U/L;为提高其产酶活性和稳定性,今后可进一步对其培养条件和产酶条件进行优化,以期将其应用于生产实践。

参考文献 (References)

- Cha JM, Cheong KH, Cha WS, Choi DB, Roh SH, Kim SL. 2004. Optimal conditions for chitinase production by *Serratia marcescens*. *Biotechnology & Bioprocess Engineering*, 9(4): 297-302
- Sun JB, Wang YG, Li W, Peng M. 2010. Screening and identification of chitinase-producing bacterium and its antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Fruit Science*, 27(3): 427-430 (in Chinese) [孙建波, 王宇光, 李伟, 彭明. 2010. 产几丁质酶香蕉枯萎病拮抗菌的筛选、鉴定及抑菌作用. *果树学报*, 27(3): 427-430]
- Yang CL, Xi YD, Xie HR, Liu BW, Zhang M, Peng HX. 2009. Chitinase production conditions of *Trichoderma harzianum* Th-30 and its antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Protection*, 36(4): 295-300 (in Chinese) [杨春林, 席亚东, 谢华蓉, 刘波微, 张敏, 彭化贤. 2009. 哈茨木霉 Th-30 几丁质酶的生产条件及对灰霉病菌的拮抗作用. *植物保护学报*, 36(4): 295-300]
- Zheng XL, Zheng AP, Wang Y, Li P. 2006. Screening and identification of chitinase-producing *Aureobacterium flavescens* F₂ against some plant pathogens. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 22(7): 431-433 (in Chinese) [郑秀丽, 郑爱萍, 王艺, 李平. 2006. 一种新的几丁质酶产生菌 F₂ 的筛选与鉴定初报. *中国农学通报*, 22(7): 431-433]

(责任编辑:李美娟)