

链霉菌 9-1-1 产几丁质酶的发酵条件研究

奚家勤, 尹启生, 宋纪真, 周汉平, 魏春阳

中国烟草总公司郑州烟草研究院, 郑州高新技术产业开发区枫杨街 2 号 450001

摘要: 从烟草根际土样中分离、筛选得到 1 株几丁质酶活性比较高的链霉菌 9-1-1, 为评价该菌株利用价值, 对其发酵条件(碳源、氮源、初始 pH、表面活性剂及发酵时间)进行了研究。结果表明: 该菌株的最佳发酵条件以 1% 胶体几丁质为碳源, 发酵液初始 pH 值为 6.5, 以 1% 蛋白胨为氮源, 0.1% 吐温 80 作为表面活性剂, 发酵时间为 96 h, 接种量为 1%, 最高酶活达到 56 U/mL。

关键词: 链霉菌 9-1-1; 几丁质酶; 培养条件

中文图书号: S476.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-5708(2008)增刊-0033-03

Study on fermentation condition for producing chitinase from *Streptomyces* sp. 9-1-1

XI Jia-qin, YIN Qi-sheng, SONG Ji-zhen, ZHOU Han-ping, WEI Chun-yang
Zhengzhou Tobacco Research Institute of CNTC, Zhengzhou 45001, China

Abstract: *Streptomyces* sp. 9-1-1 which demonstrates high chitinase activity was isolated and screened from rhizosphere of tobacco. In order to evaluate its value, the activity of chitinase was tested in different culture conditions, including carbons source, nitrogen source, initial pH, surfactant, fermentation time. Results indicated that the highest activity of chitinase was 56U/mL using 1% chitin as carbons source in medium and initial pH of fermentation fluid was 6.5 with 1% peptone as nitrogen, 0.1% Tween-80 as a surfactant, fermentation time being 96h.

Key words: *Streptomyces* sp.; chitinases; fermentation condition

几丁质是由 N-乙酰氨基葡萄糖组成的大分子物质, 是植物病原真菌细胞壁和昆虫体壁的主要组成成分; 几丁质酶和几丁质二糖酶能将几丁质降解成几丁质寡糖和单糖, 从而破坏真菌的细胞壁, 起到防治真菌性病害的作用; 许多微生物都能产生几丁质酶, 据不完全统计, 已发现产生几丁质酶的微生物约有 46 个属, 近 70 个种^[1]。有关微生物几丁质酶的研究国内外已有不少报道, 刘爱新等^[2]研究表明, 几丁质酶、 β -1, 3-葡聚糖对烟草赤星病等多种病原真菌有不同程度的拮抗作用。但从烟草根际土壤中分离产几丁质酶

微生物并应用于烟草真菌性病害的防治方面的报道却较少。2004 ~ 2006 年, 项目组从安徽、河南、福建、湖北、云南等采集 100 个烟草根际土样, 通过分离、筛选得到一株几丁质酶活性比较高的链霉菌 9-1-1。链霉菌 9-1-1 对烟草黑腥病菌有较强抑制作用^[3], 为评价该菌株的利用价值, 对该菌的产酶培养条件进行了试验, 旨在寻求组成简单, 来源丰富且成本低的培养基为生产应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

链霉菌(*Streptomyces* sp.) 9-1-1, 由郑州烟草研究院农业研究室分离获得。

1.2 斜面菌种培养基

采用高氏一号培养基。

1.3 胶态几丁质的制备

参照徐红革等^[4]的方法。

作者简介: 奚家勤, 硕士, 中国烟草总公司郑州烟草研究院工程师, 主要从事烟草病虫害及烟叶仓储害虫防治研究。

Tel: 0371-67672316, E-mail: xjq168@yahoo.com.cn

基金项目: 中国烟草总公司郑州烟草研究院院长基金项目 [042005C210] 几丁质酶产生菌防治烟草黑腥病研究”的内容之一。

收稿日期: 2008-06-10

1.4 培养基

(1) 发酵种子培养基: 10 g/L 胶态几丁质 30 mL, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.06 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, NH_4NO_3 0.3 g, KH_2PO_4 0.2 g。用蒸馏水定容 100 mL, 装入 250 mL 三角瓶中高压蒸汽灭菌后备用。

(2) 产酶基本培养基: 几丁质 15 g, 蛋白胨 2 g, 酵母粉 2 g, K_2HPO_4 0.7 g, KH_2PO_4 0.3 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, 水 1000 mL, pH 7.2。

1.5 3,5-二硝基水杨酸试剂的制备

3,5-二硝基水杨酸试剂(DNS)的制备参照王玮^[5]的方法。

1.6 菌株发酵种子培养

链霉菌 9-1-1 接种在基本培养基平板上, 在 26 °C 条件下培养 4 d。用接种环在平板上挑取一块菌丝接种到装有 100 mL 液体发酵种子培养基三角瓶中, 在 26 °C、120 r/min 摇床中培养 72 h 作为液体种子。然后以 1% (v/v) 的接种量接入盛有 100 mL 产酶培养基三角瓶中, 在 26 °C、120 r/min 的摇床中培养。

1.7 链霉菌 9-1-1 发酵培养条件研究

1.7.1 碳源的筛选

在摇瓶产酶培养基中分别加入几丁质粉末、胶态几丁质、葡萄糖、麦芽糖、淀粉、蔗糖作为液体摇瓶产酶培养基的不同碳源, 并以 1% 的蛋白胨作为氮源, 进行发酵培养, 测定发酵上清液的酶活力。

1.7.2 氮源的筛选

在摇瓶产酶培养基中分别加入蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、硝酸铵、硫酸铵作为液体摇瓶产酶培养基的不同氮源, 并以 1% 的胶态几丁质作为碳源, 进行发酵培养, 测定发酵上清液的酶活。

1.7.3 培养基起始 pH 值对产酶的影响

在最佳碳源和最佳氮源条件下, 试验培养基起始 pH 值分别为 4.5、5.0、5.5、6.5、7.5 对产酶的影响。

1.7.4 培养基中不同表面活性剂对产酶的影响

在最佳碳源和最佳氮源条件下, 试验培养基中分别加入吐温 80、聚乙二醇、胆汁酸及 SDS 作为表面活性剂对产酶的影响。

1.7.5 培养时间对产酶的影响

在优化条件下, 试验培养时间分别为 24 h、36 h、48 h、54 h、60 h、66 h、72 h、84 h、96 h、108 h、120 h 对产酶的影响。

1.7.6 几丁质酶酶活力的测定

采用 DNS (3,5-二硝基水杨酸) 测定还原糖的方法^[6]测定几丁质酶活力。取 10 mL 发酵液在 6000

r/min 下离心 10 min, 在 3 根 50 mL 离心管中分别加入 1 mL 发酵上清液和 1 mL 质量分数为 1% 的胶态几丁质; 往其中 1 根离心管加入 1 mL DNS, 放入 100 °C 水浴 10 min 作为对照; 另外 2 根离心管于 40 °C 水浴 60 min 后, 加入 1 mL DNS, 放入 100 °C 水浴 10 min, 3 根管中均加入 10 mL 蒸馏水, 6000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 540 nm 测量光密度。还原糖含量以 N-乙酰氨基葡萄糖作标准曲线计算。

酶活力单位 (U/mL) 定义: 在上述反应条件下, 每分钟产生 1 μ mol 相当于 N-乙酰葡萄糖胺的还原糖需要的酶量 (1 U)。

2 结果与讨论

2.1 不同碳源对 9-1-1 产几丁质酶的影响

在基本培养基中添加 1% 的各种碳源 (几丁质粉末、胶态几丁质、淀粉、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖), 以基本培养基为对照, 研究了不同碳源物质对链霉菌 9-1-1 产几丁质酶的影响, 结果见图 1。由图 1 看出, 用胶态几丁质作碳源时合成几丁质酶酶活力最高, 几丁质粉末次之, 葡萄糖最低。几丁质酶是一种诱导酶, 添加几丁质对几丁质酶的诱导有较强的作用, 但和几丁质粉相比, 胶态几丁质诱导能力更强。

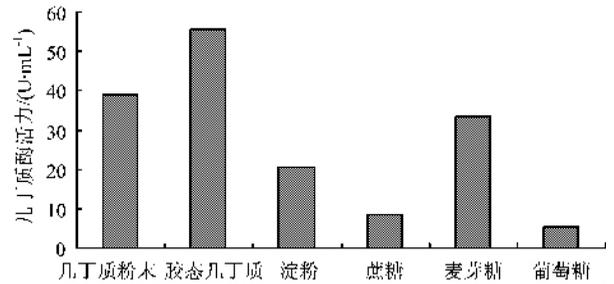


图 1 不同碳源对链霉菌 9-1-1 产生几丁质酶的影响

2.2 不同氮源对 9-1-1 产几丁质酶的影响

以 1% 胶态几丁质为碳源, 分别以 1% 蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、硝酸铵、硫酸铵作为不同氮源, 接入菌种 26 °C、120 r/min 摇床培养 96 h, 试验不同氮源对产酶的影响, 结果如图 2 所示。结果表明: 用 1% 蛋白胨作氮源时合成几丁质酶酶活力最高, 酵母膏、牛肉膏次之, 硝酸铵、硫酸铵作氮源时合成几丁质酶酶活力较低。

2.3 发酵液初始 pH 对链霉菌 9-1-1 产几丁质酶的影响

利用 1% 蛋白胨作氮源, 胶态几丁质作碳源, 发酵液不同初始 pH 对链霉菌 9-1-1 合成几丁质酶的影响如图 3 所示。pH 4.5~6.5 范围内, 随着 pH 的增加几丁质

酶活力增加; pH 6.5~7.5 范围内, 几丁质酶活力呈下降趋势。pH 值为 6.5 时, 酶活力最高, 达到 56 U/mL。

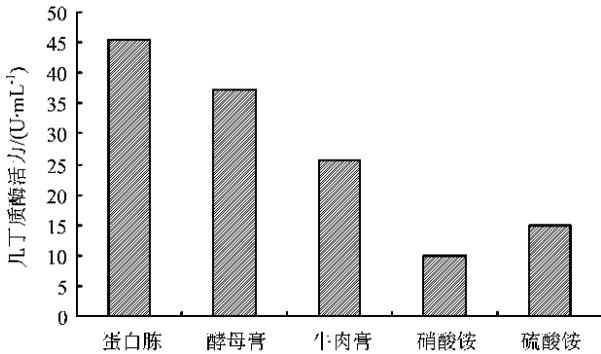


图 2 不同氮源对菌株 9-1-1 产生几丁质酶的影响

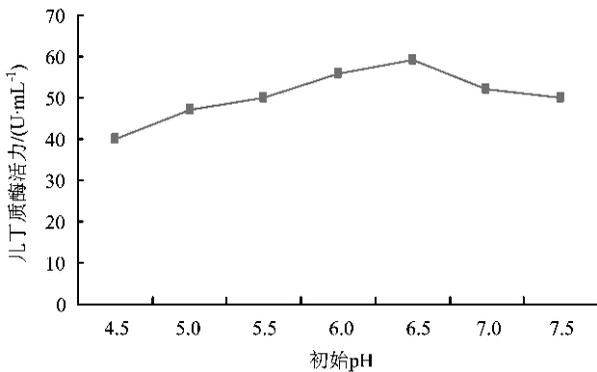


图 3 发酵液初始 pH 对菌株 9-1-1 产生几丁质酶的影响

2.4 不同表面活性剂对链霉菌 9-1-1 产几丁质酶的影响

采用 0.1% (W/V) 的吐温 80、聚乙二醇、胆汁酸及 SDS 作为表面活性剂, 未加表面活性剂的作为对照, 进行产酶试验, 试验结果如图 4。0.1% 胆汁酸及 0.1% 吐温 80 都能提高几丁质酶活力。因 0.1% SDS 对菌体生长有抑制作用, 几丁质酶活力较低。从生产成本考虑, 选用吐温 80 作为表面活性剂。

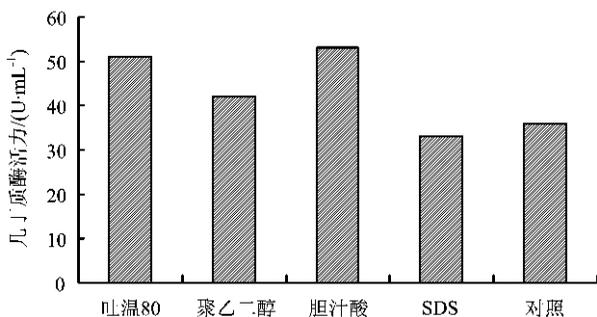


图 4 不同表面活性剂对菌株 9-1-1 产生几丁质酶的影响

2.5 链霉菌 9-1-1 的产酶曲线

在最优化培养条件下以 1% (W/V) 几丁质作为碳

源, 1% (W/V) 蛋白胨为氮源, 发酵液初始 pH 为 6.5 的产酶培养基对链霉菌 9-1-1 合成几丁质酶的过程进行了研究, 结果如图 5 所示。发酵培养开始一段时间内几丁质酶活力上升缓慢, 至 72 h 以后酶活力迅速增加, 至 96 h 时几丁质酶活力达到最高值。

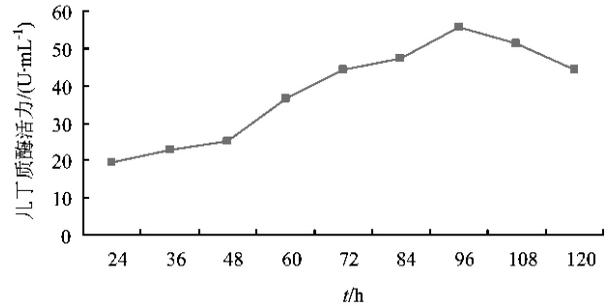


图 5 菌株 9-1-1 产生几丁质酶过程中酶活力的变化

3 结果与讨论

几丁质酶对真菌的作用很大程度上可能与真菌细胞壁的结构有关^[8]。对链霉菌 9-1-1 合成几丁质酶的最优化培养条件进行了研究且获得了理想的结果, 该菌株的最佳发酵条件以 1% 胶体几丁质为碳源, 发酵液初始 pH 值为 6.5, 以 1% 蛋白胨为氮源, 0.1% 吐温 80 作为表面活性剂, 发酵时间为 96 h, 接种量为 1%, 最高酶活力达到 56 U/mL。

为了进一步提高几丁质酶的活力, 还需要通过菌种复合诱变技术筛选高产菌株或者通过基因工程技术克隆几丁质酶基因, 然后构建克隆载体和表达载体, 并通过适宜的基因转化手段将其转至高效表达系统中。

参考文献

- [1] 孙胜利, 喻子牛, 贾新成. 微生物产几丁质酶的研究和应用进展[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(5): 47-50.
- [2] 刘爱新. 烟草几丁酶 β -1,3-葡聚糖的抑制作用[J]. 微生物学通报, 1999, 26(1): 15-17.
- [3] 奚家勤, 宋纪真, 周汉平, 等. 产几丁质酶菌的分离、筛选及其对烟草病原真菌的抑制作用[J]. 烟草科技, 2006(3): 55-58.
- [4] 徐红革, 彭辉银, 刘家欣, 等. WHS3 菌株产几丁质酶对棉铃虫 HaSNPV 的增效作用[J]. 中国病毒学, 2002, 17(3): 239-242.
- [5] 王玮. 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖[A]. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 197-199.
- [6] 李华, 刘开启, 王革. 利用还原糖法测定木霉菌产几丁质酶特性[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2003, 16(1): 19-22.
- [7] 克拉西里尼科夫 H A. 细菌和放线菌的鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1965.
- [8] Sivan A, Chet I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum* [J]. J Gen Microbiol, 1989, 135: 675-682.