

【文章编号】 1004-1540(2009)03-0274-04

# 高活性几丁质酶产生菌的筛选及鉴定

鲜 乔, 蒋家新, 张拥军, 李轶萍, 安晓欢  
(中国计量学院 生命科学学院, 浙江 杭州 310018)

**【摘要】** 从四川、陕西、浙江等地食用菌栽培的土壤样品中, 筛选到一株性能优良、产几丁质酶活力较强的菌株 BLC08609, 并结合菌落形态、生理生化指标和 16S rDNA 序列分析对其进行鉴定。结果显示, 菌株 BLC08609 能以食用菌细胞壁(以几丁质为主)为唯一碳源生长, 在菌株 BLC08609 个体形态和生理生化特性鉴定的基础上, 通过 16S rDNA 测序鉴定, 确定 BLC08609 为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

**【关键词】** 几丁质酶; 地衣芽孢杆菌; 真菌细胞壁  
**【中图分类号】** X172 **【文献标识码】** A

## Isolating and identification of a higher enzyme activity strain BLC08609 producing chitinase

XIAN Qiao, JIANG Jia-xin, ZHANG Yong-jun, LI Yi-ping, An Xiao-huan  
(College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** A strain named BLC08609 with higher chitinase activity and high quality was isolated from soil samples in China. Its population shape and individual form were observed and identified from the aspects of physiological and biochemical characteristics and molecular biology. The result shows that the chitin can be the only carbon source for the BLC08609 to grow. Based on the identification of the population shape, the individual form and physiological and biochemical characteristics of the strain BLC08609, it is determined as *Bacillus licheniformis* through 16sDNA sequence appraisal. The experimental basis is provided for the selection and breeding of high yield strains of chitinase by this research.

**Key words:** chitinase; *Bacillus licheniformis*; identification

几丁质是大多数真菌细胞壁的主要成分之一<sup>[1]</sup>, 自然界中几丁质的降解主要由几丁质酶来完成。现已发现许多动物、植物和微生物都可产生

几丁质酶, 微生物几丁质酶的用途最为广泛。食用菌细胞壁的关键组分几丁质及少量葡聚糖使其质地异常坚韧, 可以被几丁质酶降解为几丁质寡糖

【收稿日期】 2009-06-26

【基金项目】 863 计划专题项目(No. 2007AA10Z342)

【作者简介】 鲜 乔(1985-), 女, 湖北宜昌人, 硕士研究生。主要研究方向为农产品精深加工。

和单糖.因此,利用几丁质酶进行食用菌细胞壁的破壁处理表现出巨大的应用价值.通过查阅相关文献发现,国外有关几丁质酶法用于食用菌破壁来提取有效成分的研究未见报道,而国内关于酶法破壁提取食用菌有效成分的研究已有报道<sup>[2-3]</sup>,均采用的是纤维素酶、果胶酶、蛋白酶、蜗牛酶等商品化酶.针对食用菌细胞壁的关键组分几丁质来筛选专一性酶的研究还未见报道.

本研究对筛选的食用菌细胞壁关键组分几丁质专一水解能力较强的菌株 BLC08609,进行了生理生化和 16S rDNA 序列分析,以期为研究高产几丁质酶菌株的选育工作提供良好的实验室基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 土壤样品来源 土壤取自四川、陕西、江西、浙江、湖北等地食用菌栽培季节过后的土壤,置 4℃ 冰箱保存,备用.

1.1.2 试剂 DNA 分子标准及试剂盒、Taq<sup>TM</sup> DNA 聚合酶和 DNase I 均购买于 TaKaRa 公司;琼脂糖购自 Promega 公司;供试细粉几丁质购于山东奥康公司;乙酰葡萄糖胺、3,5-二硝基水杨酸(DNS)购于华东医药公司;其他试剂均为分析纯.

1.1.3 培养基 ①初筛培养基:碱洗后的黑木耳胶质粉 0.25 g,磷酸氢二钾 0.07 g,磷酸二氢钾 0.03 g,硫酸镁 0.05 g,硫酸亚铁 0.001 g,琼脂 2 g,水 100 mL,pH 7.0.②分离培养基:胶体几丁质 0.25 g,蛋白胨 0.05 g,酵母膏 0.05 g,磷酸氢二钾 0.07 g,磷酸二氢钾 0.03 g,硫酸镁 0.05 g,硫酸亚铁 0.001 g,琼脂 2 g,水 100 mL,pH 7.0.③种子培养基:蛋白胨 1 g,牛肉膏 0.3 g,氯化钠 0.5 g,pH 7.4.④摇瓶发酵培养基:细粉几丁质 1 g,玉米粉 0.5 g,淀粉 0.3 g,硝酸钠 0.3 g,磷酸氢二钾 0.105 g,磷酸二氢钾 0.045 g,氯化钠 0.01 g,硫酸镁 0.05 g,硫酸亚铁 0.003 g,水 100 mL,pH 7.0.

1.1.4 仪器 生化培养箱,显微镜,数显酸度计,摇床,紫外-可见分光光度计,MJ PTC-200 PCR 仪,凝胶成像系统,超速低温冷冻离心机,高压灭菌锅.

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌种筛选 分别取采集到的 70 份土样各 10 g,溶于 100 mL 已灭菌的生理盐水,摇匀后菌液梯度稀释到  $10^{-3}$  倍,涂布于初筛平板,置 37℃ 培养箱中培养 72 h,形成单菌落,挑选透明圈较大或明亮菌落,进行摇瓶发酵培养,测定发酵液几丁质酶活力.

1.2.2 胶体几丁质制备 称取几丁质粉 5 g,加入 200 mL 已冷却到 4℃ 的 33% 的浓盐酸,于 37℃ 水浴锅保温 30 min,过滤取滤液,加入冷却至 4℃ 的双蒸水 2 000 mL,搅拌 30 min,4℃ 冰箱过夜,离心取沉淀,分散至少许双蒸水中,即得;1% 胶体几丁质磷酸缓冲液:取 1 mL 胶体几丁质溶于 0.2 mol/L 磷酸氢二钠 37.5 mL 和 0.2 mol/L 磷酸二氢钠 62.5 mL 中(pH 6.6).

1.2.3 DNS 法做标准曲线 参考肖湘<sup>[4]</sup>方法,以 N-乙酰氨基葡萄糖作为标准品.

1.2.4 酶活测定 取离心处理后发酵液 1 mL 与 1 mL 1% 胶体几丁质磷酸缓冲液于 40℃ 水浴 30 min,然后沸水浴 10 min,中止反应后离心,取上清 0.5 mL,再加入 0.5 mL DNS,煮沸 7 min,迅速冷却,加水 4 mL,于 540 nm 处测 OD 值.以发酵液加 DNS 试剂为空白.

几丁质酶的酶活单位(U):在 37℃ 下,每分钟形成 1 μg 氨基葡萄糖时所用酶量为一个酶活单位.

### 1.2.5 菌种鉴定

1.2.5.1 菌落特征观察和生理生化测定 菌株 BLC08609 菌落形态特征、革兰氏染色、生理生化鉴别试验,参照《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[5]</sup>(第八版)进行属和种的鉴别.

1.2.5.2 菌株生长特性研究 (1)最适生长 pH 值的测定:将各菌株按 1% 接种量分别接种于 pH 值为 3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0 的 LB 液体培养基中,并设空白对照培养基,振荡培养 12 h,使用紫外分光光度计在 600 nm 处测其 OD 值.(2)最适生长温度的测定:将各菌株按 1% 接种量接种于最适 pH 的 LB 液体培养基中,分别在 20,28,37,45,50,55,60℃ 温度下培养 12 h,使用紫外分光光度计在 600 nm 处测其 OD 值.(3)最适 NaCl 浓度的测定:将各菌株按 1% 接种量接种于最适 pH、最适温度的 LB 液体培养基中,分

别在 0.1%, 0.3%, 0.5%, 1%, 3%, 5% NaCl 质量分数下培养 12 h, 使用紫外分光光度计在 600 nm 处测其 OD 值。(4) 生长曲线的测定: 将各菌株按 1% 接种量接种于最适 pH 和最适 NaCl 质量分数的液体培养基中, 于最适温度振荡培养 12 h, 每隔 1 h 取样 1 次, 测定活菌数。

1.2.5.3 16S rDNA 鉴定 平板划线得到菌株 BLC08609 单菌落, 细菌基因组 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南(第三版)》<sup>[5]</sup>的方法。依据细菌 16S rDNA 中最保守的序列<sup>[6]</sup>, 设计引物: Primer F: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', Primer R: 5'-AAG GAG GTG WTC CAR CC-3'。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 热循环参数: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 30 次, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 2  $\mu$ L 反应液进行 1% 琼脂糖电泳检测, PCR 扩增产物送到上海英骏生物技术有限公司测序。测序结果进行双向拼接后, 在 Genbank 中进行 Blast 同源序列检索和比较, 下载与其同源性最高的几株细菌模式株的 16S rDNA 序列, 进行 16S rDNA 同源性分析, 用 Neighbor 程序(邻位相接法)构建系统发育树。

## 2 结果

### 2.1 菌种的初筛

从各地土壤样品中分离到 216 株产几丁质酶的菌, 包括细菌、真菌, 土样稀释涂布后, 菌落生长缓慢, 2 d 后平板才陆续长出可见菌落, 3 d 后才陆续可以挑出单菌落, 大部分透明圈不明显。其中有 4 株菌株形成的透明圈较大且明亮, 生长状况良好。

以 N-乙酰氨基葡萄糖作为标准品, 得到还原糖含量与 OD<sub>540</sub> 之间的关系: 还原糖量( $\mu$ g/mL) = (OD<sub>540</sub> + 0.0461)/0.001,  $R^2 = 0.9928$ 。

通过 DNS 法测其酶活, 菌株 BLC08609 酶活较高, 为 17.86 U/mL, 本试验选择其作为供试菌株。

### 2.2 菌落的形态特征

菌落在胶体几丁质为唯一碳源的分离培养基上生长, 培养 24 h 后形成白色菌落, 背面乳白色, 边缘整齐, 直径为 5 mm, 菌落圆、光滑, 质地致密突起, 菌落干, 有透明圈和菌膜, 无沉淀。

### 2.3 菌株生长特性研究

菌株 BLC08609 的生长 pH 值条件、生长温度、生长所需 NaCl 质量分数以及生长曲线及生物量见图 1、图 2、图 3 及图 4。

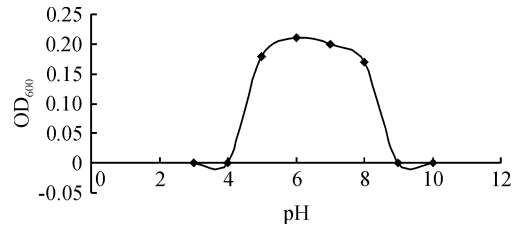


图 1 菌株在不同 pH 下生长情况

Figure 1 Growth of strain at different incubation pH

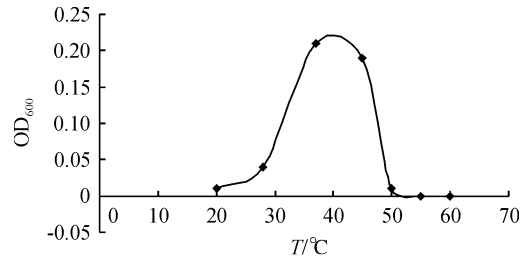


图 2 菌株在不同温度下生长情况

Figure 2 Growth of strain at different incubation temperatures

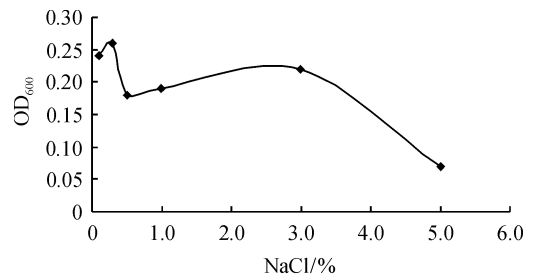


图 3 菌株在不同 NaCl 质量分数下生长情况

Figure 3 Growth of strain at different concentration of NaCl

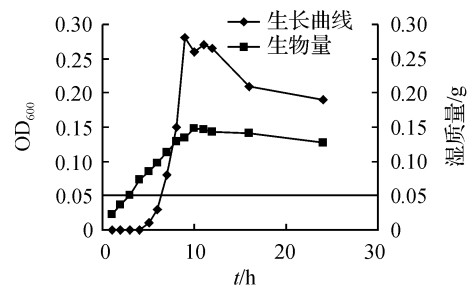


图 4 菌株的生长曲线与生物量

Figure 4 Growth curve and biomass of strain

从图1可知,BLC08609的最适生长pH在5.0~8.0范围,在pH4.0~5.0和pH8.0~9.0之间,菌数急剧下降;从图2可知,最适生长温度在37~42℃,在低于28℃和高于50℃的条件下,BLC08609生长十分缓慢;从图3可知,BLC08609的最适生长NaCl质量分数为0.3%;从图4的生长曲线可看出,该菌在0~4h为生长迟缓期,菌数没有明显变化,5~10h为对数生长期,在此期间,活菌数数量直线上升,在10h之后就进入稳定期,菌体数量维持在一定水平。

## 2.4 菌株的生理生化鉴定结果

结果表明,BLC08609为革兰氏阳性菌,能液化明胶,水解淀粉和纤维素,还原硝酸盐,对多种还原糖都能分解产酸,但都不产气,具体鉴定指标见表1。

表1 BLC08609的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characters of the chitinase-producing bacterium BLC08609

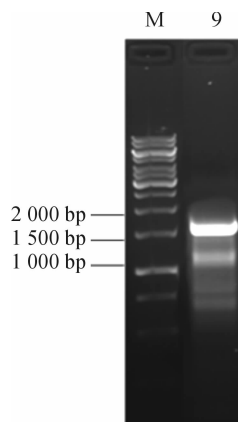
测试项目	结果	测试项目	结果
革兰氏染色	+	VP反应	+
细胞大小(μm)	0.7×2.5	MR试验	+
淀粉水解	+	D-葡萄糖	+
纤维素水解	-	乳糖	-
明胶水解	+	D-木糖	-
还原硝酸盐	+	L-蔗糖	+
卵磷脂酶试验	+	麦芽糖	+
吡啶	-	L-甘露醇	-
柠檬酸盐	+	山梨醇	+
色氨酸	-	L-阿拉伯糖	-
棉子糖	-	D-海藻糖	-
产硫化氢	-	D-葡糖胺	+
产气	-	L-鼠李糖	-

注:“+”和“-”分别代表阳性和阴性反应。Note:“+”and“-”present positive and negative reactions, respectively.

## 2.5 菌株的分子生物学鉴定结果

2.5.1 PCR扩增结果 BLC08609染色体DNA进行PCR扩增后,在1500bp左右处有一明亮的特征条带(细菌16S rDNA平均大小为1540bp),经过琼脂糖凝胶电泳验证了该扩增产物的存在和大小,BLC08609的16S rDNA序列长度

为1544bp,如图5。



M—Marker;9—BLC08609菌扩增产物

图5 BLC08609菌PCR扩增16S rDNA

Figure 5 PCR amplification of BLC08609 16S rDNA

2.5.2 测序结果及同源性分析 测序结果表明,BLC08609的16S rDNA序列长度为1544bp。将该株细菌测序结果拼接后在GenBank数据库中进行Blast,分别与相近的菌株构建发育树,发育树如图6。在构建的系统发育树中,BLC08609与地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) FM178969.1同属一个分支。

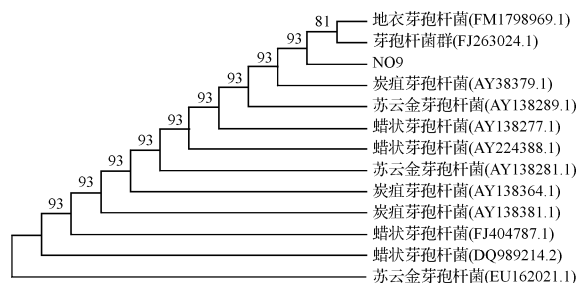


图6 基于16S rDNA序列同源性构建的系统发育树

Figure 6 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence homology

结合伯杰氏细菌鉴定手册,综合生理生化鉴定和分子生物学鉴定,结果显示BLC08609为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

## 3 讨论

自从Benecke首次报道分离几丁质和几丁质酶,几丁质酶的利用一直是生命科学中的重大课

(下转第282页)

因典型的保守序列,即具有6个保守的半胱氨酸位点,符合典型的气味结合蛋白的特点<sup>[8-11]</sup>。

本文虽然克隆到了GOBP1和GOBP2的cDNA片段,但要研究茶尺蠖气味结合蛋白与气味分子相互识别的分子机理,还需进一步克隆它们的基因全长序列,研究其基因结构和时空差异表达,并进行原核生物表达,以获得重组蛋白,用于免疫亲和实验等深入的研究。

### 【参 考 文 献】

- [1] 熊兴平. 茶尺蠖防治技术研究进展及展望[J]. 中国茶叶, 2003,13:15-17.
- [2] 王桂荣,郭予元,吴孔明. 昆虫触角气味结合蛋白的研究进展[J]. 昆虫学报,2002,45(1):131-137.
- [3] VOGT R G, RIDDIFORD L M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae[J]. Nature, 1981,293:161-163.
- [4] PELOSI P, MAIDA R. Odorant-binding proteins in insects[J]. Comp Biochem Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1995,111(5):503-514.
- [5] 朱彬彬,姜勇,牛长缨,等. 家蝇气味结合蛋白基因cDNA

片段的克隆与序列分析[J]. 昆虫学报,2005,48(5):804-809.

- [6] 李红亮,聂文敏,高其康. 中华蜜蜂气味结合蛋白 ASP2 cDNA的克隆及原核表达[J]. 中国农业科学,2008,41(3):933-938.
- [7] GUI L Y, CHEN Z M, LIU S S. Effect of exogenous methyl jasmonate-induced tea volatiles on host-selection behavior of insects[J]. 茶叶科学,2004,24(3):166-171.
- [8] SCALONI A, MONTI M, ANGELI S. Structural analysis and disulfide bridge pairing of two odorant binding proteins from *Bombyx mori* [J]. Biochemistry Physiology Research Communication, 1999,266:386-391.
- [9] LEAL W S, NIKONOVAL L, PENG G. Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth, *Bombyx mori* [J]. Federation of European Biochemical Societies, 1999,464:85-90.
- [10] DAMBERGER F, NIKONOVA L, HORST R. NMR characterization of a pH-dependent equilibrium between two folded solution conformations of the pheromone-binding protein from *Bombyx mori* [J]. Protein Science, 2000,9:1038-1041.
- [11] 赵新成,阎云花,王琛柱. 雄性棉铃虫和烟青虫对雌性信息素的触角电生理反应[J]. 动物学报,2003,49(6):795-799.

(上接第277页)

题之一. 微生物产几丁质酶的筛选、鉴定、酶学性质方面的研究<sup>[7-9]</sup>与应用是近年来关注的重点,但目前仍存在所筛选的产酶菌株产酶量低的问题. 筛选产酶量高的菌株,探索使酶活稳定的方法,进一步选育高产几丁质酶菌株的研究亟待进一步开展. 本文筛选可作用于食用菌细胞壁关键组分几丁质、高产几丁质酶的菌株并对其进行鉴定,相关研究还未见有报道.

在几丁质酶产生菌的筛选中,由于几丁质平板上,菌落周围形成的透明圈除与菌株产酶有关外,还与菌株所能分泌的几丁质内切酶与外切酶的比例有关,比例越小,透明圈越明亮,仅以菌落周围的透明圈大小判断菌株的产酶能力,容易忽略掉一些高产菌株. 本文以食用菌胶质粉(几丁质为主要成分)为唯一碳源制成初筛平板,综合考虑菌落周围的透明圈大小、明亮程度及菌落大小等因素,然后通过发酵测定酶活力,筛选出可作用于食用菌细胞壁(几丁质)的地衣芽孢杆菌BLC08609,且酶活较高. 该研究为筛选可分解几丁质的菌株提供了基础并为食用菌破壁的研究提供了条件.

### 【参 考 文 献】

- [1] 裘维蕃. 菌物学大全[M]. 北京:科学出版社,1998:27-79.
- [2] 张立娟,于国萍. 细胞破壁酶在黑木耳多糖提取中作用条件的研究[J]. 食用菌,2005(3):8-10.
- [3] 姜红,孙宏鑫,李晶,等. 酶法提取黑木耳多糖[J]. 食品与发酵工业,2005,31(6):131-133.
- [4] 肖湘,周樱,王凤平. 高效几丁质降解菌的分离、鉴定及其几丁质酶系的研究[J]. 海洋学报,2003,25(1):138-142.
- [5] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译. 北京:科学出版社,1984:729-758.
- [6] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 黄培堂,译. 北京:科学出版,2002:2-137.
- [7] IKEDA M, MIYAUCHI K, MOCHIZUKI A. et al. Purification and characterization of chitinase from the stomach of silver croaker *Pennahia argentatus* [J]. Protein Expression and Purification, 2009,65:214-222.
- [8] LEE Y G, CHUNG K C, WI S G, et al. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704 [J]. Protein Expression and Purification, 2009,65:244-250.
- [9] LIEN T S, YU S T, WU S T. Induction and purification of a thermophilic chitinase produced by *Aeromonas* sp. using glucosamine [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2007,12:610-617.