

莱氏野村菌产几丁质酶条件及酶学性质研究*

翟逸 涂增 王金芳 万永继**

(西南大学生命科学学院 重庆 400715)

摘要 对莱氏野村菌(*Nomuraea rileyi*)菌株 CQ031021 产几丁质酶条件及酶学性质进行了研究。结果表明:该菌株最适产酶碳源为 2.0%(W/V)葡萄糖,氮源为 1.2%(W/V)复合氮源(蛋白胨、牛肉膏按 1:1 的比例),接种量为孢悬液 2mL(1×10^7 个/mL),培养温度 28℃,培养液初始 pH6.0,培养时间 6d,一定浓度的吐温-80 对几丁质酶活性有促进作用,而 SDS 有抑制作用。粗酶液最适反应温度 50℃,最适 pH6.0,在 40℃ 以下及 pH5.5~6.5 范围内酶活力较稳定。

关键词 莱氏野村菌,几丁质酶,酶学性质,产酶条件

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1082-04

Studies on the Production and Properties of Chitinase from *Nomuraea rileyi* Strain CQ031021*

ZHAI Yi TU Zeng WANG Jin-Fang WAN Yong-Ji**

(School of Life Sciences, SouthWest University, Chongqing 400715)

Abstract The producing condition and properties of chitinase secreted by *Nomuraea rileyi* strain CQ031021 were studied. The optimal conditions for the strain to produce chitinase are 6 days of 28℃ with the initial pH 6.0, and the liquid medium containing 2.0% glucose as its carbon source and 0.6% peptone plus 0.6% beef extract as nitrogen source after inoculating dosage 2mL suspension of conidia (1×10^7 /mL). The optimal temperature and pH for enzyme activity is 50℃ and 6.0, respectively, while the activity can be enhanced by Tween-80 and inhibited by SDS. The enzyme activity is stable under 40℃ and in pH range of 5.5~6.5.

Key words *Nomuraea rileyi*, Chitinase, Enzyme properties, Producing condition

莱氏野村菌(*Nomuraea rileyi*)是一种重要的昆虫病原真菌,在害虫的生物防治上有应用潜力。几丁质(Chitin)是由 N-乙酰-D-氨基葡萄糖(NAG)构成的多聚物。几丁质构成大多数真菌的细胞壁,它也大量存在于昆虫和动物体表及消化道上,是真菌病害和农林害虫有效防治的限制因素之一^[1]。几丁质酶(Chitinase)是一类水解酶,可将几丁质降解为几丁寡糖和 N-乙酰-D-氨基葡萄糖单体,在侵染寄主的过程中与蛋白酶等水解酶类协同降解昆虫的体壁,是昆虫病原真菌的一个重要毒力因子^[2]。有关微生物几丁质酶的研究,国内外已有较多报道^[3-11],但有关莱氏野村菌几丁质酶产酶条件的研究还未见报道。本文以实验室分离的莱氏野村菌菌株 CQ031021 为材料,对其几丁质酶的产酶条件及酶学性质进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

莱氏野村菌(*Nomuraea rileyi*)CQ031021 菌株,分离自重庆市,现保存于西南大学生命科学学院无脊椎动物病理与应用微生物学实验室。

1.2 主要生化试剂

几丁质, N-乙酰-D-氨基葡萄糖为 Sigma 公司产品, 5-二硝基水杨酸,酒石酸钾钠,苯酚,无水亚硫酸钠,氢氧化钠等试剂均为成都市科龙化工试剂厂产品。

1.3 培养基

1.3.1 种子培养基:SMAY 培养基。

1.3.2 活化培养基:PDA 培养基。

1.3.3 产酶基础培养基(g/L):蔗糖 10 粉状几丁质

* 西南大学博士启动基金(No. 100082)

** 通讯作者 Tel: 023-68251585, E-mail: Wanyj@swau.edu.cn

收稿日期:2007-01-22, 修回日期:2007-04-16

5,蛋白胨 5,牛肉膏 5, KH_2PO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, pH6.0。

1.4 实验方法

1.4.1 胶体几丁质的制备:参照 Roberts^[12]方法。

1.4.2 培养方法:在 150mL 三角瓶中装入 30mL 产酶基础培养基,灭菌、冷却,每瓶接入 2mL 孢子悬液 (10^7 个/mL),然后于 28℃、150r/min 条件下恒温振荡培养。每一平行样品设 3 次重复。

1.4.3 几丁质酶活力的测定:在 0.5mL 胶体几丁质和 1mL 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 体系中加入 1mL 发酵液,50℃ 准确水浴 1h,以 DNS^[13]法测定反应产生的还原糖。在上述反应体系中,一个酶活单位(U)定义为 50℃ 下,每分钟酶催化胶体几丁质释放出 1 μg N-乙酰-D-氨基葡萄糖(NAG)所需的酶量。

2 结果与分析

2.1 培养时间对莱氏野村菌产酶的影响

实验结果如图 1 所示,在产酶基础培养基中,莱氏野村菌在最初的 2d 中产酶量比较低,但从第 3 天到第 6 天的时间内酶活显著增加,并在第 6 天时酶活达到最大。随培养时间延长,培养液中几丁质酶的活性开始下降。因此在以后的试验中,选择第 6 天作为最佳酶活力的测定时间。

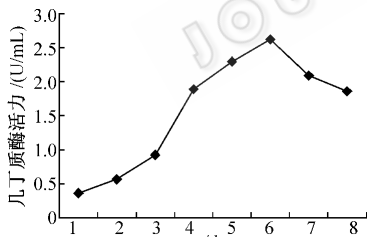


图 1 产酶时间曲线

2.2 碳源对莱氏野村菌产几丁质酶的影响

分别以葡萄糖、乳糖、麦芽糖、淀粉代替产酶基础培养基中的蔗糖,试验不同碳源对莱氏野村菌产几丁质酶的影响。实验结果(图 2)表明:当以葡萄糖为碳源时发酵液中几丁质酶活力最高,乳糖次之,淀粉最低。因此选择葡萄糖作为适宜碳源。

2.3 不同葡萄糖浓度对莱氏野村菌产几丁质酶的影响

以 2.0%(W/V)葡萄糖为碳源,改变葡萄糖浓度进行产酶试验。结果如图 3 所示,随葡萄糖浓度增加,发酵液中几丁质酶的活力随之增加,当葡萄糖浓度为 2.0% 时酶活力最高。此后,随葡萄糖浓度

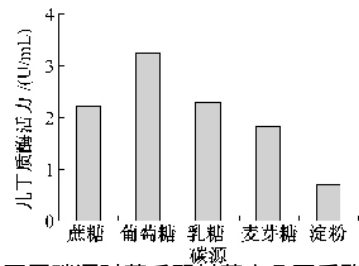


图 2 不同碳源对莱氏野村菌产几丁质酶的影响

进一步增加,几丁质酶活力开始降低。这可能是由于葡萄糖效应阻遏了几丁质酶的生物合成。

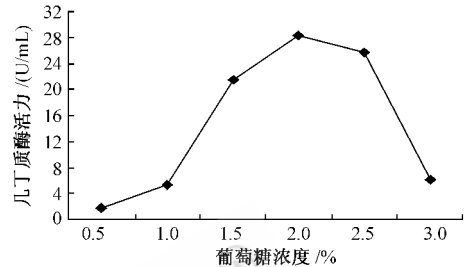


图 3 葡萄糖浓度对莱氏野村菌产几丁质酶的影响

2.4 不同氮源浓度对莱氏野村菌产几丁质酶的影响

将培养基中氮源(蛋白胨、牛肉膏按 1:1 的比例)的浓度分别调整为 0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4%、1.6%(W/V)。结果如图 4 所示,随氮源浓度增加,发酵液中酶活增加,当浓度达到 1.2% 时酶活力达最大。此后氮源浓度再增加酶活力开始下降。

2.5 接种量对莱氏野村菌产几丁质酶的影响

在接入孢子悬液体积均为 2 mL 的条件下,改变孢子悬液浓度进行产酶试验。结果如图 5 所示,发酵液中几丁质酶活力随孢子浓度增大而增加,并在孢子浓度为 10^7 时达到最大,此后浓度再增大发酵液中酶活开始下降。

2.6 培养温度对莱氏野村菌产几丁质酶的影响

分别在 22℃、24℃、26℃、28℃、30℃、32℃ 下对菌株进行培养,考察温度对其产几丁质酶的影响。实验结果表明(图 6),该菌株最佳产酶培养温度为 28℃。这与有关资料报道的丝状真菌产几丁质酶最适温度为 28℃^[14]一致。

2.7 培养基初始 pH 对产酶的影响

将培养液初始 pH 分别调为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,研究 pH 对莱氏野村菌产几丁质酶的影响。实验结果表明(图 7),在 pH 从 4.0 到 6.0 的变化过程中,发酵液中几丁质酶的活力呈增加的趋势,并在 pH 值为 6.0 时达到最大。此后,随 pH 进一步增加

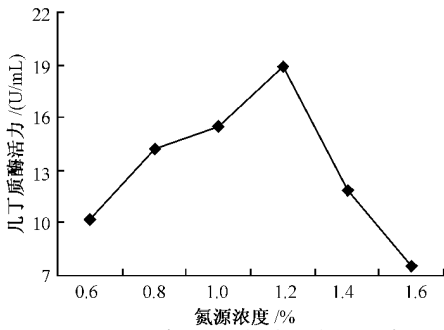


图4 不同氮源浓度对产酶的影响

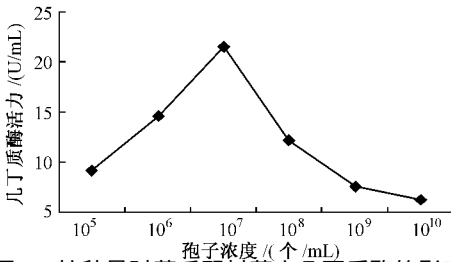


图5 接种量对莱氏野村菌产几丁质酶的影响

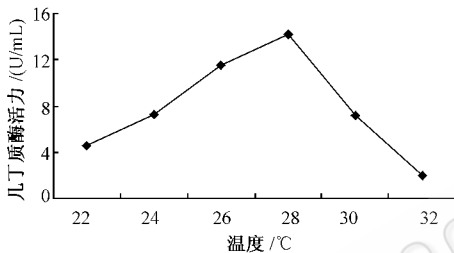


图6 不同培养温度对莱氏野村菌产几丁质酶的影响

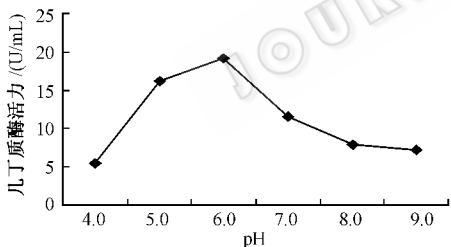


图7 不同初始 pH 对莱氏野村菌产几丁质酶的影响

发酵液中酶活力开始下降。

2.8 通气状况对产酶的影响

分别以透气性良好的棉塞、封口膜和不透气的塑料膜封口摇瓶,对莱氏野村菌进行发酵。实验结果表明,以棉塞、封口膜封口的摇瓶中几丁质酶活性均高于以塑料膜封口摇瓶中几丁质酶活性。这表明莱氏野村菌为好氧性真菌,通气状况会影响其几丁质酶的产生。

2.9 不同表面活性剂对产酶的影响

在培养液中分别添加 0.1%、0.2%、0.3% (W/V) 的吐温-80 和十二烷基硫酸钠 (SDS),以不加这两种活性物质的发酵液为对照。实验结果如

图 9 所示,一定浓度的吐温-80 可促进几丁质酶的产生,而 SDS 对几丁质酶的产生有明显抑制作用。

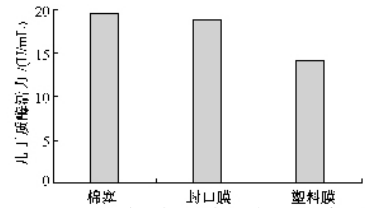


图8 通气状况对产酶的影响

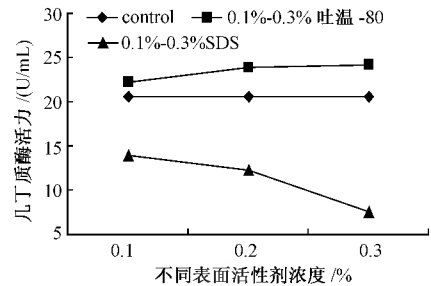


图9 不同表面活性剂对莱氏野村菌产几丁质酶的影响

2.10 最适反应温度及热稳定性实验

将粗酶液分别置于不同温度下进行酶解反应,实验结果(图 10)表明,莱氏野村菌分泌的几丁质酶最适反应温度为 50℃。将粗酶液在不同温度下保温 1h,测其酶活,结果以相对酶活力表示,以未保温酶活为 100%,实验结果如图 11 所示,温度低于 40℃ 时酶较稳定,酶活均高于 70%。当温度高于 60℃ 时酶活力下降很快,80℃ 时酶活几乎丧失,说明该酶对高温比较敏感。

2.11 最适反应 pH 及 pH 稳定性实验

将粗酶液分别加入到 pH4.0~8.0 的缓冲液中,按 1.4.3 方法测其酶活力。实验结果如图 12 所示,该酶最适反应 pH 为 6.0;室温下将粗酶液于不同 pH 缓冲液中保温 1h,测其残留酶活力,结果以相对酶活力表示,以未保温的酶液酶活力为 100%。实验结果如图 13 所示,在 pH5.5~6.5 范围时,室温保温 1h 酶活力损失均小 25%,而在 pH4.0~4.5 及 pH7.5~8.0 范围内室温保温 1h 酶活力损失 60%~85%,表明该酶在 pH5.5~6.5 之间比较稳定。

3 讨论

微生物几丁质酶大多为诱导酶^[15]。实验中发现,在以几丁质为单一碳源和氮源的培养基中,莱氏野村菌生长情况较差,产酶量极低,在以糖类、单一氮源为基础而不添加诱导物的培养基中产酶量也比

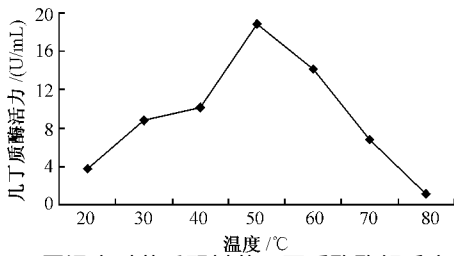


图 10 不同温度对莱氏野村菌几丁质酶解反应的影响

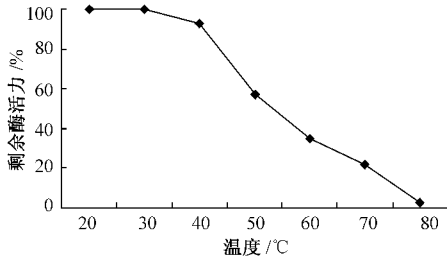


图 11 莱氏野村菌几丁质酶热稳定性

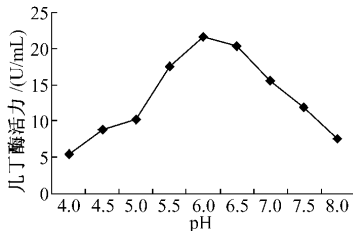


图 12 pH 对莱氏野村菌几丁质酶解反应的影响

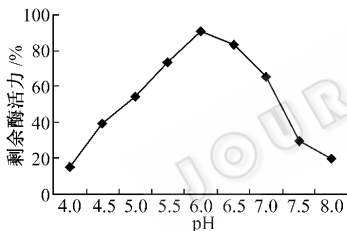


图 13 pH 对莱氏野村菌几丁质酶稳定性的影响

较低。而在以常用糖类作为碳源基础上添加适量粉状几丁质并使用复合氮源可使酶产量大幅度提高。这表明莱氏野村菌菌株 CQ031021 几丁质酶是诱导酶。

大多数真菌为好氧性真菌,通气状况良好与否直接影响菌体的生长情况,进而影响到酶的产生。实验结果表明,以透气性良好的棉塞、封口膜封口时培养液中几丁质酶活性均高于不透气的塑料膜。在菌的培养及转接过程中也发现类似情况,通气性好时,菌丝生长状况良好,产孢量大,而透气性不好时情况则正相反。这说明良好的通气状况不仅有利于莱氏野村菌菌体生长而且也有利于几丁质酶的产生,表面活性物质可改变细胞膜的透性,进而影响几丁质酶的分泌。实验中发现,一定浓度的表面活性剂吐温-80 可促进产酶,而 SDS 则对酶的产生有抑

制作用。因此,在培养过程中可添加适量的吐温-80,以提高几丁质酶的产量。

粗酶酶学性质研究结果表明,该酶的最适反应温度为 50°C,40°C 以下时酶比较稳定。低温时酶稳定性较好,可能与它较低环境生长温度^[16]有关,酶解反应最适 pH 为 6.0 并且在 pH5.5~6.5 范围间酶活较稳定,表明该酶属于酸性几丁质酶。

本文通过对莱氏野村菌几丁质酶产酶条件的研究,对其酶学性质有了初步的了解,为下一步研究莱氏野村菌几丁质酶与毒力的关系奠定基础。目前关于莱氏野村菌几丁质酶与毒力关系的研究国内还未见到有相关方面的报道。但对其它昆虫病原真菌几丁质酶的研究表明,几丁质酶的确与菌株的致病力有关,张爱文^[17]等人通过对白僵菌的致病力与菌株生长特性及几丁质酶活性的关系的实验表明:致病力高的菌株其几丁质酶活性也高。Weiguo Fang^[6]等人的研究表明:几丁质酶的过量表达可明显提高白僵菌的致病力。现在我们还不能证实莱氏野村菌产生的几丁质酶与感染致病力高低的关系,但有一点可以肯定,在莱氏野村菌侵染害虫的过程中,其产生的几丁质酶一定起着重要的作用。

参考文献

- [1] Shternshis M V, Beljaev A A, Shtatova T V, et al. J Bio Control, 2002, 47(6): 697~706.
- [2] 任文彬, 张世清, 黄俊生. 中国生物工程杂志, 2006, 26(7): 31.
- [3] Leger R J, Cooper R M, Chamley A K. J Invertebr Pathol, 1991, 58: 415~426.
- [4] Havukkala I, Mitamura C, Hara S, et al. J Invertebr Pathol, 1993, 61: 97~102.
- [5] Sun C K, Sanggyu P, Dong G L. J Invertebr Pathol, 1999, 73: 276~281.
- [6] Weiguo Fang, Bo Leng, Yuehua Xiao, et al. J Appl Environ Microbiol, 2005, 71(1): 363~370.
- [7] Khemika S G, Tawee D, Paranya C, et al. J Sci, 2006, 33(3): 347~355.
- [8] 陈三凤, 李季伦. 微生物学通报, 1993, 20(3): 156~160.
- [9] 杨文博, 冯波. 微生物学通报, 1997, 27(2): 84~88.
- [10] 唐亚雄, 赵建, 丁诗华, 等. 微生物学报, 2001, 41(1): 82~86.
- [11] 郭润芳, 李多川. 微生物学报, 2006, 46(1): 99~103.
- [12] Roberts W K. J Gen Microbiol, 1988, 134: 169~178.
- [13] 朱利泉. 实验原理与方法. 成都: 成都科技大学出版社, 1997, pp. 147~149.
- [14] 杨革, 陈洪章, 李佐虎. 高校化学工程学报, 2005, 19(3): 365.
- [15] Smith R J, Gnula E A. J Invertebr Pathol, 1983, 42: 319~326.
- [16] 涂增, 翟逸, 万永继. 西南农业大学学报(自然科学版), 2006, 28(1): 49~53.
- [17] 张爱文, 刘维真, 邓春生, 等. 生物防治通报, 1990, 6(4): 161~163.