

# 南海海域几丁质降解菌的筛选及其特性研究

蔡亚萍<sup>1</sup>, 苏建强<sup>1</sup>, 谢 忠<sup>1</sup>, 郑天凌<sup>1,2\*</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 2. 近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学), 福建 厦门 361005)

**摘要:**从南海海域水样和沉积物中分离并筛选到两株几丁质降解菌,分别为 SCSS04和 SCSWE13. 16S rDNA 序列分析结果表明,菌株 SCSS04属于芽孢杆菌属,菌株 SCSWE13属于弧菌属. 两株菌几丁质酶的产生均需要几丁质的诱导,并在富营养培养基中产酶量较高. 菌株 SCSS04在培养第 9 天产酶量达到最高,所产生的几丁质酶最适反应温度为 40~50. 菌株 SCSWE13属于低温酶,在培养第 7 天产酶量达到最高,所产生的几丁质酶最适反应温度为 20~28.

**关键词:**南海; 几丁质降解菌; 几丁质酶; 特性

**中图分类号:** P 745

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0438-0479(2008) S2-0259-05

几丁质 (Chitin) 又称甲壳素或甲壳质,是以 P-1,4-N-乙酰氨基葡萄糖为基本单位的直链多聚物,广泛分布于自然界中,其储量位居第二,仅次于纤维素. 每年海洋中产生的几丁质代谢物就高达 8 万 t. 几丁质是多数真菌细胞壁的主要成分,同时也存在于昆虫的外壳和肠道中. 几丁质的降解产物几丁寡糖、壳聚糖和 N-乙酰氨基葡萄糖具有抗菌、抗肿瘤等活性. 几丁质系列产品在化工、食品、化妆品、印染、造纸、农业、环保等方面都有广泛用途<sup>[1]</sup>. 目前这些产品一般用化学降解的方法来制取,造成较严重的环境污染. 几丁质酶能对几丁质进行有效的降解,其降解完的产物有很广泛的利用价值,并且几丁质酶对几丁质的降解是一种最无污染的降解方法,所以对几丁质酶的研究显得意义重大.

海洋生物资源的开发和利用已成为 21 世纪世界各海洋大国竞争的焦点,在我国拥有的管辖海域中,其中南海面积占 70% 以上,且南海地理位置得天独厚,具有很高的生物多样性,可供进行主要天然药物资源的挖掘. 南海有 100 多万种微生物,这为生物活性先导化合物的发现与优化提供了丰富的资源. 研究人员利用分子模型、细胞模型、高通量筛选方法对海洋生物化合物进行活性筛选,南海生物的多样性为生物活性先导化合物的发现与优化提供了非常广阔的空间. 对南海海洋微生物的研究具有相当高的商业价值,对药学、

医学等的研究意义更为重大. 因此对南海海洋微生物的开发具有重要的意义和价值.

本文从中国南海海域分离并筛选到两株几丁质降解菌,并进行了 16S rDNA 鉴定,同时对其产生几丁质酶的一些特性进行测定. 这些成果为今后中国南海海洋微生物几丁质降解菌的研究提供了一定的补充,也将对今后微生物几丁质降解菌的研究开发提供一定的菌源.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株分离

实验用于筛选的菌株分离自中国南海海域水样及沉积物,采用梯度稀释涂布 2216E 平板法进行细菌分离<sup>[2]</sup>.

### 1.2 几丁质降解菌的筛选

胶体几丁质的配制:取 20 g 几丁质粉于 352 mL 浓盐酸混匀放置 24 h,过滤后加入冰水于 4 过夜,沉淀用去离子水洗至中性,称量后用 0.2 mmol/L 磷酸缓冲液制成 25% 的胶体几丁质溶液.

把菌株接种在含有 0.5% 胶体几丁质的 2216E 固体培养基中,在 25℃ 中培养 3~4 d,进行几丁质降解菌筛选,挑出菌落有透明圈的菌株,再在相同培养基上划线纯化培养,进一步验证是否具有几丁质降解活性后,于 2216E 斜面上划线保存.

### 1.3 几丁质降解菌的鉴定

采用 DNA 通用纯化试剂盒 (厦门鹭隆生物公司) 提取几丁质降解菌的基因组 DNA,用引物 Eubac27F<sup>[21]</sup> 和 Eubac1492R<sup>[21]</sup> 扩增 16S rDNA. 50 μL PCR 体系中含有细菌基因组 DNA 模板约 10~100

收稿日期: 2008-09-19

基金项目: 国家 863 计划 (2008AA09Z408), 国家自然科学基金 (40876061), 中国博士后科学基金 (20070420747), 国家基础科学人才培养基金项目 (J0630649) 资助

\* 通讯作者: wshwzh@xmu.edu.cn

ng,引物各 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , dNTPs 0.2 mmol/L, 1  $\times$ PCR buffer, ExTaq (Takara) 1 U; PCR 反应条件为 (1) 94 5 min, (2) 94 1 min, (3) 55 1 min, (4) 72 2 min (第 (2)到第 (4)步反应 30 个循环), (5) 72 8 min 反应结束后于 1%琼脂糖凝胶电泳检验.

PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶电泳回收后,与 pMD20-T载体 16 过夜连接,连接产物转化 *E. coli* DH5 感受态细胞,挑取阳性克隆送至英骏公司测序. 所测得序列用 DNAMAN 去除载体序列后,将有效序列在 NCB 上进行比对,找出相关序列,找出其所属的微生物种类范畴,并挑选相关序列,用 DNAMAN 软件分析,采用邻接法 (Neighbor-joining method) 构建系统发育树,自举值为 1 000.

#### 1.4 几丁质酶活的测定

DNS溶液的配制: 10 g 二硝基水杨酸 (DNS)溶于热的 200 g 酒石酸钾钠的 500 mL 水溶液中,再加入 2 g 重蒸酚、0.5 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、10 g NaOH. 微火加热并搅拌,待溶解后定容至 1 000 mL,置于棕色瓶中保存,放置一周后稳定,方可使用.

取发酵液于 10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为粗酶液,取 1.0 mL 酶液并加入 0.25 mL 用 0.2 mmol/L 磷酸缓冲液配制的 0.5%的胶体几丁质溶液 (对照为 1.0 mL 酶液 + 0.25 mL 0.2 mmol/L 磷酸缓冲液并在沸水浴中煮沸 5 min,使几丁质酶失活)于一定温度下水浴反应 2 h;取出、离心 (10 000 g, 5 min);取 1.0 mL 反应液上清于干净试管中加入 1.5 mL DNS 试剂,于沸水浴中加热反应 5 min;取出后用流动水迅速冷却,摇匀,离心 (10 000 g, 5 min),取 200  $\mu\text{L}$  上清液于酶标板中于 540 nm 波长处测光吸收值. 根据葡萄糖标准曲线计算酶活,酶活单位定义 (U): 在最适条件下,1 min 催化产生相当于 1  $\mu\text{mol}$  的 N-乙酰-D-氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量为 1 个单位.

#### 1.5 菌株所产生几丁质酶的最佳反应温度

菌株在培养基中 30、150 r/min 培养 7 d 后,按测定几丁质酶酶活的方法,分别放于 8、20、28、40、50、60、70 的水浴锅中反应 2 h,测定酶活. 以活性最高的温度下的几丁质酶活性为 100,计算其余温度下的相对酶活.

#### 1.6 不同培养时间、不同培养基对产酶量的影响

把菌株放于 5 种不同的培养基中于 30 中培养,并于不同的培养时间对菌株进行酶活的测定,反应温度为 SCSS04 为 40, SCSWE13 为 30.

5 种不同培养基成分如下:

A 培养基: 2216E 培养基;

B 培养基: 2216E 培养基 + 0.5% 胶体几丁质;

C 培养基: 海水 + 0.5% 胶体几丁质 + 1% 酵母粉, 0.5% 蛋白胨;

D 培养基: 海水 + 0.5% 蛋白胨 + 0.5% 胶体几丁质;

E 培养基: 海水 + 0.5% 酵母粉 + 0.5% 胶体几丁质.

## 2 结果与讨论

### 2.1 几丁质酶降解菌筛选

从南海水样及沉积物中共分离出 196 株细菌,通过筛选,得到 5 株产几丁质酶的菌株,分别为 SCSS04、SCSWE13、SCSWE01、SCSWE02、SCSWE10. 其中 SCSS04、SCSWE13、SCSWE01、SCSWE02、SCSWE10 四个菌株经 *Afa I*、*Msp I* 双酶切鉴定为同一属,所以本实验选取 SCSS04 (图 1)、SCSWE13 (图 2) 进行研究. SCSS04 分离自站位 Y20 沉积物, SCSWE13 分离自站位 YS09 300 m 水样,站位见图 3.

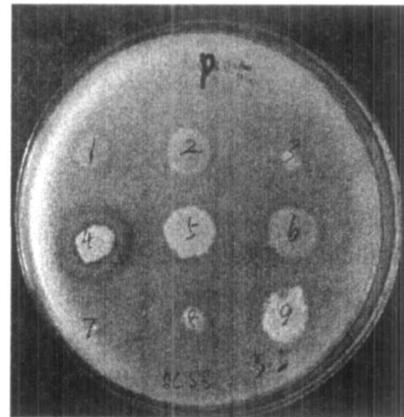


图 1 SCSS04 的菌落形态及透明圈

Fig. 1 Colony shape and clear zone of SCSS04

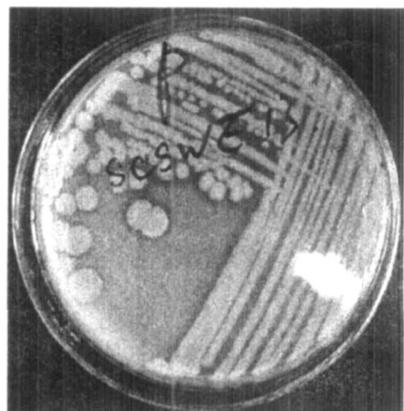


图 2 SCSWE13 的菌落形态及透明圈

Fig. 2 Colony shape and clear zone of SCSWE13

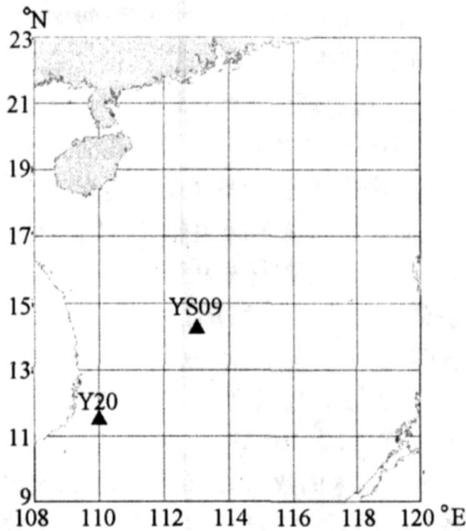


图 3 站位图

Fig 3 Stations for isolation of bacteria SCSS04 and SCSWE13

### 2.2 几丁质降解菌的 16S rDNA 鉴定

经鉴定 SCSS04 属于海洋地衣芽孢杆菌,而 SCSWE13 是属于弧菌属. SCSS04 进化树如图 4, SCSWE13 进化树如图 5.

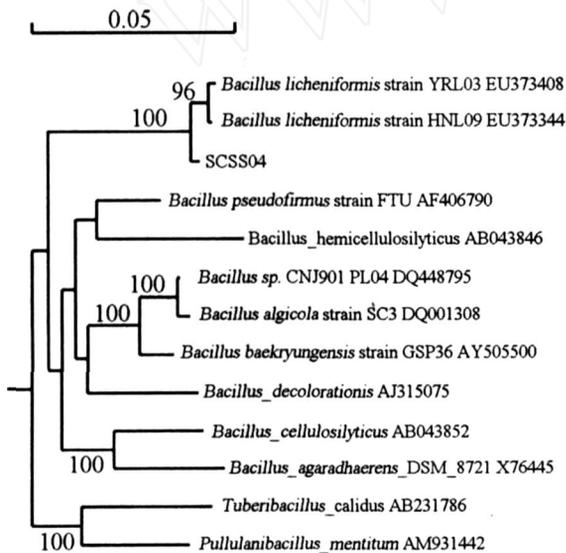


图 4 菌株 SCSS04 的系统发育进化树

Fig 4 Phylogenetic tree showing the relationship of bacterial 16S rDNA clones

### 2.3 几丁质酶的最适温度

从图 6 可以看出对于菌株 SCSS04 在 40 水浴下所测的酶活最大,50 水浴中所测的酶活跟 40 下的酶活相近,可以推测 SCSS04 酶活的最适温度在 40 与 50 之间.在低温情况下 SCSS04 菌株的几丁质酶的酶活较高,而在较高温度下几丁质酶的活性却很小,

表明该菌株所产的几丁质酶在高温情况下较容易失活,而在低温下比较稳定.

从图 7 可以看出菌株 SCSWE13 在 20、28 的酶活相近,该菌株的几丁质酶酶活的最适温度在 20 ~ 28 之间.该菌株几丁质酶的酶活在 8 到 20 多范围内随温度升高而递增,而在 28 以后,随着温度的增高,该菌株所产生的几丁质酶的酶活迅速降低.表明该菌株的几丁质酶对高温的耐受性很小,在 50 以后酶活处于较低水平.

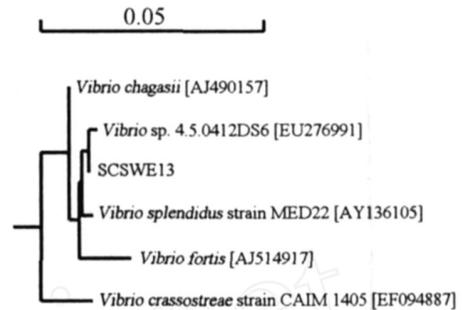


图 5 菌株 SCSWE13 的系统发育进化树

Fig.5 Phylogenetic tree showing the relationship of bacterial 16S rDNA clones

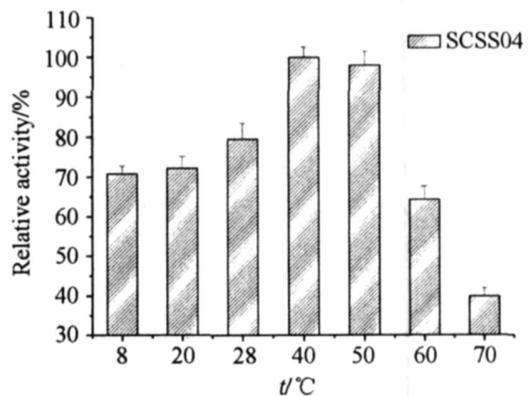


图 6 菌株 SCSS04 几丁质酶的最适反应温度

Fig.6 the most active temperature of the bacteria SCSS04

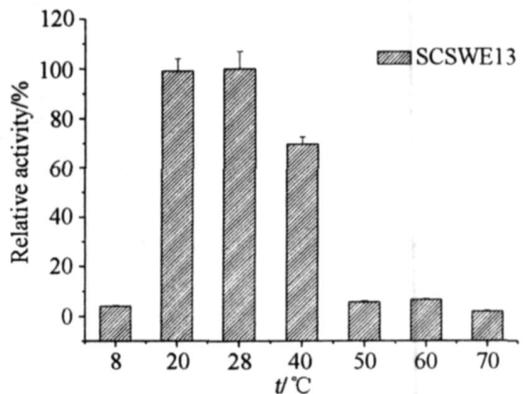


图 7 菌株 SCSWE13 几丁质酶的最适反应温度

Fig.7 The most active temperature of the bacteria SCSWE13

## 2.4 不同培养基对产酶量的影响

菌株 SCSS04随着培养时间的增多产酶量逐渐增高,在培养第9天达到最高,之后呈逐渐缓慢递减的趋势.在A培养基下产酶量为0,表明SCSS04菌株产几丁质酶需要胶体几丁质来诱导.在C培养基中产酶量是最高的.该菌株几丁质酶产生的时间是比较早的,从开始培养的前期就开始有少量酶产生(图8).

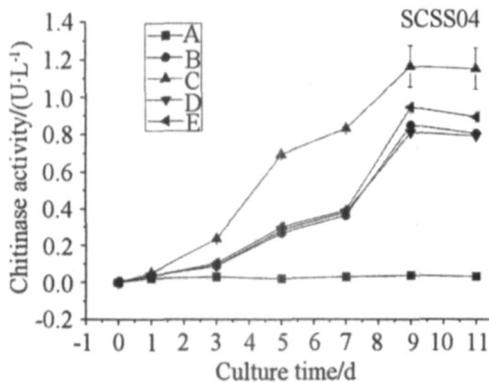


图8 不同培养基对菌株SCSS04产酶的影响

Fig 8 The effect of the different cultures to SCSS04

SCSWE13在培养基A中产酶量为0,表明SCSWE13菌株产几丁质酶同样需要胶体几丁质的诱导.该菌株在培养基C中的产酶量是最高的,而在B培养基中的产酶量次之,D、E培养基中的产酶曲线几乎相同.在C培养基中该菌株最高的产酶量出现在培养7d以后,而在B、D、E培养基中该菌株最高的产酶量出现在培养9d以后(图9).

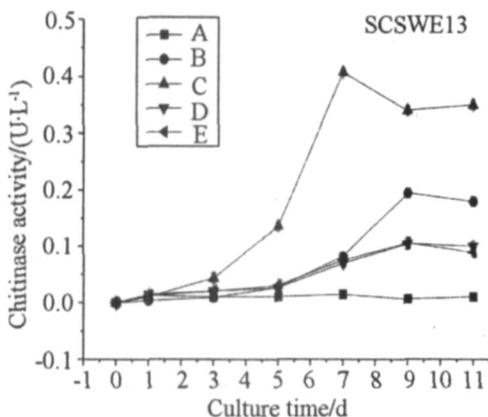


图9 不同培养基对菌株SCSWE13产酶的影响

Fig 9 The effect of the different cultures to SCSWE13

据已报道的文献表明产生几丁质酶的微生物种类为(1)细菌:粘质沙雷氏菌,环状芽孢杆菌,地衣芽孢杆菌,斯氏假单胞菌,巨大芽孢杆菌,液化沙雷氏菌,液

化肠杆菌,嗜水气单胞菌等等.(2)放线菌:灰色链霉菌,红色链霉菌及其它一些未定种的链霉菌.(3)真菌:溜曲霉,球孢白僵菌,米曲霉和木霉等.(4)粘菌、原生动物和藻类粘菌纲的某些种类富含几丁质酶.而产几丁质酶的海洋微生物种类据报道的有芽孢杆菌、弧菌<sup>[4]</sup>等,而其中弧菌的报道较多.我们所做实验的菌经鉴定属于地衣芽孢杆菌和弧菌属.

一般微生物几丁质酶的酶活最适温度为50~65,且在高温下容易失活.据我们测得的数据表明SCSS04的酶活最适合温度在40~50之间,这是比较接近所报道的50~65,而SCSWE13的酶活最适合温度我们测出来的数值为20~28,这跟以往的报道相差较远,所以SCSWE13可能是一株比较特殊的菌株.与以往报道的酶活力相比,SCSS04的酶活力是属于中等的<sup>[5]</sup>,而SCSWE13的酶活力偏低<sup>[6]</sup>.

从这两株菌株产生几丁质酶都是需要胶体几丁质来诱导的,且在C培养基中产酶量是最高的,原因有可能是该培养基提高了加量的营养物质,即丰富的碳源、氮源,而在D、E中都只有一种营养物质.

## 3 小结

本研究从中国南海海域水样和沉积物中分离并筛选到两株几丁质降解菌,其中SCSS04属于地衣芽孢杆菌,SCSWE13是属于弧菌属,菌株SCSWE13的几丁质酶酶活的最适温度在20~28之间,属于低温酶,具有较高的潜在工业应用价值.

## 参考文献:

- [1] 关海宁,徐桂花,刁小琴.微生物产几丁质酶的研究概况及其应用[J].中国食物与营养,2006(8):33-35.
- [2] Su J Q, Yang X R, Zheng T L, et al. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. Harmful Algae, 2007, 6: 799-810.
- [3] DeLong E F. Archaea in coastal marine environments[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(12):5685-5689.
- [4] 王志,蔡俊鹏,温其标.九孔鲍肠道及水体中产几丁质酶菌群的测定[J].华南理工大学学报:自然科学版,2005,33(3):87-90.
- [5] 杨家惠,杨志荣,朱文,等.一株产生几丁质酶细菌的分离与鉴定[J].四川大学学报:自然科学版,1997,34(5):693-698.
- [6] 杨承勇,周世宁,周毅频,等.海洋细菌11211的生长条件及其几丁质酶研究[J].中山大学学报:自然科学版,2000,39(6):91-95.

## Isolation and Characterization of Chitin-degrading Bacteria from South China Sea

CAI Ya-ping<sup>1</sup>, SU Jian-qiang<sup>1</sup>, XIE Zhong<sup>1</sup>, ZHENG Tian-ling<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, 2. State Key Laboratory of the Marine Environmental Science (Xiamen University), Xiamen 361005, China)

**Abstract:** In this study, 2 strains of chitin-degrading bacteria were screened from the water sample and sediment of South China Sea, namely SCSS04 and SCSW E13. Sequence analysis of 16S rDNA showed that strain SCSS04 belonged to genus *Bacillus* and strain SCSW E13 belonged to genus *Vibrio*. Presence of chitin was required for the production of chitinase, and high level of chitinase activity occurred in eutrophic medium. The chitinase produced by strain SCSS04 was most active at 40~50 °C and peaked at 9<sup>th</sup> day. The chitinase produced by strain SCSW E13 belonged to cold active enzyme as it was most active at 20~28 °C, and peaked at 7<sup>th</sup> day in batch cultivation.

**Key words:** South China Sea; chitinase; chitin-degrading bacteria; characterization

### 附录 1:

#### 菌株 SCSS04 16S rDNA 序列

GA TCCTGGCTCAGGACGAA CGCTGGCGGCGTGCC TAA TACA TGCAA GTCGA GCGGACCGACGGGA GCTTGC TCCCTTA GGTCA GCGGCGGACGGGTGA GT  
AACACGTGGGTAACTGCCTGTAA GACTGGGA TAACTCCGGGAAACGGGGCTAA TACCGGA TGCTTGA TTGAACCGCA TGGTTCAA TCA TAAAA GGTGGC  
TTTTA GCTACCACCTA CA GA TGGA CCCGCGGCGCA TTA GCTA GTTGGTGA GGTAA CGGCTACCAA GCGCA CGA TGC GTA GCCGACCTGA GA GGGTGA TCG  
GCCACACTGGGACTGA GACACGGCCCA GACTCCACGGGA GGCA GCA GTA GGGAA TCTCCGCAA TGGACGAAA GTCTGACGGA GCAACGCCCGCTGA G  
TGA TGAA GGT TTTCCGA TCGTAAAAC TCTGTGTGTA GGGAA GAACAA GTACCGTTGAA TA GGGCGGCACTTGACGGTACC TAA CCA GA GA GCCACGGCTA  
ACTACGTGCCA GCA GCCGCGTAA TAC GTA GGTGGCAA CGCTGTCCGGAA TTA TTGGCGTAAA GC GCGCGCA GCGGTTTCTTAA GTC GTA TGTGAAA GC  
CCCCGGCTCAACCGGGGA GGGTCA TTGAAAAC TGGGAACTTGA GTGCA GAA GA GGA GA GTGGAA TTCCACGTGTA GCGGTGAAA TGC GTA GA GA TGTGGA  
GGAAACCA GTGGCGAA GCGGACTCTCTGGTCTGTAACTGAC GCTGA GCGCGAAA GCGTGGGA GCGAACA GGA TTA GA TACCTGGTA GTCCACGCCGT  
AAACGA TGA GTGCGAA GTGTTABA GGGTTCCGCC TTA GTGCTGCA GCAAACGCA TTA GCA CTA GCTGGGGA GTACGGTGC GAA GACTGAAA CTCAA  
GGAA TTGA CGGGGGCCCGCA CAA GCGGTGA GCA TGTGGTTAA TTCGAA GCAACGCGAA GAA CTTACCA GGTCTTGACA TCCCTGACAACCTTA GA GA T  
AGGGCTTCCCTTCGGGGCA GA GTGACA GGTGGTGA TGGTGTCTGTA GCTCTGTGCTGA GA TGTGGGTTAA GTCCGCAACGA GCGCAACCTTGA T  
CTTA GTTGCCA GCA TTCA GTTGGGCACTTAA GGTGACTGCCGGTGA CAAACCGGA GGAA GGTGGGGA TGZACGTCAA TCA TCA TGCCCCTTA TGACCTG  
GGCTACACA CGTGTCAA TGGGCA GAA CAAA GGGCA GCGAA GCCGCGA GGTAA GCCAA TCCCA CAAA TCTGTTC TCA GTTCGGA TCGCA GTCTGCAAC  
TCGGACTGCGTGA GCTGGA TCGTA GTAA TCGCGA TCA GCA TGCCGCGGTGA TAC GTTCCGGGCTTGTA CACACC GCCCGTCA CACCAGAG  
TTTGTAACCCGAA GTCGGTGA GGTAACTTTTGA GCCA GCCGCCGAA GGTGGACA GGTGA TTGGGGTGA GTCGTAA CAA GGTAACC

### 附录 2:

#### 菌株 SCSW E13 16S rDNA 序列

AGA GTTTGA TCCTGGCTCAGGACGAA CGCTGGCGGCGTGCC TAA TACA TGCAA GTCGA GCGGAAACGAGCTA TCTGAACCTTCGGGGAC  
GA TAACGGCGTCA GCGGCGGACGGGTGA GTAA TGCC TA GGAA TTGCC TTGA TGTGGGGGA TAA CCA TTGAAAACGA TGGCTAA TACC  
GCTAA TGCC TACGGGCCAAA GA GGGGACCTTCGGGCTCTCGCTCAA GA TA TGCC TA GGTGGGA TTA GCTA GTTGTGA GGTAA TGGCT  
CAACCA GCGCAGCA TCCCTA GCTGGTCTGA GA GGA TGA TCA GCCACACTGGA ACTGA GACACGGTCCA GACTCTACGGGA GGCA G  
CA GTGGGGAA TA TTGCCAA TGGCGAAA GCTTGA GCCA TGCCGCGCTA GAA GAA GGCC TTCGGGTTGTAAA GTACTTCA GTTGTGA G  
GAA GGGGGTGTCTTAA TA GCGGCA TCTTTGA CGTTA GCAACA GAA GAA GCAACGGCTAACTCCGTGCCA GCA GCCGCGTAA TACG  
GA GGGTGC GA GCGTAA TCGGAA TTACTGGGCTAAA GC GCA TGCA GGTGGTICA TTAA GTCA GA TGTGAAA GCCCGGGCTAACCTCG  
GAA TGCA TTTGAAA CTGGTGA ACTA GA GTACTGTA GA GGGGGTAA TTTCA GGTGTA GCGGTGAAA TGC GTA GA GA TCTGA GGAA TACC  
AGTGGCGAA GCGGGCCCC TGGACA GA TACTGACACTCA GA TCGAAA GCGTGGGG GCAACA GGA TTA GA TACCTGGTA GTCCA  
CGCCGTAAA TGA TGTCTACTTGA GGTGTGCGCTTGA GCCGTGGCTTTCGGA GCTAACGCGTTAA GTA GACCGCTGGGGG GTACGGT  
CGCAA GA TAAAACTCAA TGAA TTGACGGGGGCCCGCA CAA GCGGTGA GCA TGTGGTTAA TTC GA TGCAAC GCGAA GAACTTACC  
TACTCTTGA CA TCCA GA GAA GCCA GCGGA GACGCA GGTGTGCC TCCGGGA GCTCTGA GACA GGTGCTGA TGGCTGTCTGTA GCTCTGT  
GTTGTGAA TGTGGGTTAA GTCCGCAACGA GCGCAACCTTA TCTTGTTCGCTGCA GTAA TGTGCGGAAC TCCA GGGGA GACTGCCG  
GTGA TAAACCGGA GGAA GGTGGGGACGACGTCAA GTCA TCA TGGCCCTTACGA GTA GGGCTACACACGTGTACAA TGGCGCA TACA G  
AGGGCTGCGA ACTTGC GA GA GTAA GCGAA TCCAAAAA GTGCGTCTGTA GTCCGGA TTGA GTC TCAACTCGACTCCA TGAA GTGCGAA  
TCGCTA GTAA TCGTA GA TCA GAA TGC TACGGTGA TACGTTCGGGCTTGTA CACACC GCCCGTCA CACCA TGGGA GTGGGCTGCAA  
AA GAA GTGGGTA GTTTAACTTCGGGA GGA CGCTCACC ACTTTGTGTCA TGACTGGGGTGA GTCGTAA CAA GGTAACC