

产内切菊粉酶的海洋放线菌菌株的 筛选与鉴定

宫 颖,于基成*,刘 秋

(大连民族学院生命科学学院,辽宁大连 116600)

摘 要:获得高活性内切菊粉酶微生物菌株是以菊粉生产低聚果糖的基础。本研究采用以菊粉为唯一碳源的选择培养基从鸭绿江滨海湿地海泥样品中筛选获得 14 株产菊粉酶菌株。通过摇瓶复筛,获得 3 株产较高活力内切菊粉酶的放线菌菌株,其酶活力分别为 14.13、18.24、28.52 U/mL。通过 16S rRNA 测序分析和形态观察确定该 3 株菌分别为孔雀石褐链霉菌(*Streptomyces malachitofuscus*)、棘孢小单孢菌(*Micromonospora echinospora*)、锂链霉菌(*Streptomyces carpaticu*)。其产酶活性均高于目前已报道产内切菊粉酶放线菌菌株,为内切菊粉酶工业化生产提供了依据。
关键词:内切菊粉酶,海洋放线菌,筛选,鉴定

Screening and identification of marine actinomycetes producing endoinulinase

GONG Ying, YU Ji-cheng*, LIU Qiu

(College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

Abstract: Fructooligosaccharides are produced by the inulin cut with endoinulinase and microorganism is the main sources for endoinulinase. In present work, 14 strains microorganism producing inulinase were acquired from Yalu River seacoast wetland samples with selective medium containing inulin as a sole carbon source. Meanwhile, three strains with high endoinulinase activity were obtained, and their enzyme activities were 14.13, 18.24 and 28.52 U/mL, respectively. Through morphological and analysis of the 16S rRNA revealed that the strain S502, S503 and S505 identified as *Streptomyces malachitofuscus*, *Micromonospora echinospora* and *Streptomyces carpaticus*, respectively. The endoinulinase activity by actinomycete is higher than that reported in the literatures. Furthermore, as a new potential candidate for industrial endoinulinase production.

Key words: endoinulinase; marine actinomycetes; screen; identification

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2014)21-0171-04
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.21.029

菊粉又称菊糖,是由 D-呋喃果糖分子经 β -2,1 糖苷键脱水聚合而成的线性直链多糖^[1-2]。菊粉酶是一种催化水解菊粉中 β -2,1 果糖糖苷键的水解酶,可根据对底物作用方式的不同分为外切菊粉酶和内切菊粉酶^[3],外切菊粉酶水解菊粉用于生产高果糖浆,内切菊粉酶水解菊粉则用于生产低聚果糖^[4-5],研究表明菊粉酶的生产为微生物菌株发酵获

得^[6]。目前,关于产菊粉酶微生物菌株报道较多,主要集中在曲霉属和酵母菌属^[7-8],也有少部分的细菌和极少的放线菌^[9]。报道的各种微生物菌株的菊粉酶产量不一,酶活力一般在 14.6~20.15 U/mL,大多表现为外切菊粉酶活性^[10]。因此获得高效产内切菊粉酶微生物菌株具有潜在和重要的工业化应用意义。本研究目的则是从特殊生境—鸭绿江滨海湿地样品中筛选获得产内切菊粉酶菌株,以期获得产高活性内切菊粉酶湿地放线菌菌株,为进一步开展产内切菊粉酶海洋微生物菌株研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

菊粉 鞍山生物技术有限公司,纯度 >95%;3,

收稿日期:2014-03-24

作者简介:宫颖(1986-),女,硕士研究生,研究方向:食品质量与安全控制专业。

*通讯作者:于基成(1968-),男,博士,教授,研究方向:食品质量与安全控制。

基金项目:国家自然科学基金(31270057,31311140255)。

[28] Lauren C S, James A I. Alkyl Hydroperoxide Reductase Is the Primary Scavenger of Endogenous Hydrogen Peroxide in *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 2001, 183(24): 7173-7181.

[29] Lauren C S, James A I. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 2001, 183(24): 7182-7189.

5-二硝基水杨酸(DNS) 国药集团化学试剂有限公司,化学纯;L-天门冬酰胺 北京奥博星生物技术责任有限公司;琼脂 日本进口分装;酵母提取物 北京希凯创新科技有限公司;甘油 天津市瑞金特化学品有限公司;乙酸、乙酸钠、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、 KNO_3 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 均为天津市科密欧化学试剂有限公司,所有分析用试剂均为分析纯;海水 取自黄海。

UV-2600 紫外可见分光光度计 日本岛津公司;S-4800 扫描电子显微镜 日本日电;HYG-3 多功能摇床 金坛市杰瑞尔电器有限公司;DNP-9082 电热恒温培养箱 上海精宏实验设备有限公司;H-1850R离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基 初筛培养基 ISP5(g/L):酵母提取物 5g, L-天门冬酰胺 1g, 甘油 10mL, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.01g, KNO_3 1g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 0.01g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, 琼脂 20g, pH7.2, 海水 500mL, 去离子水 500mL, 121℃ 高压灭菌 20min。

选择培养基(g/L):菊粉 20g, KNO_3 1g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, 琼脂 20g, pH7.2, 海水 500mL, 去离子水 500mL, 112℃ 高压灭菌 20min。

发酵培养基(g/L):菊粉 20g, KNO_3 1g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, 海水 500mL, 去离子水 500mL, 112℃ 高压灭菌 20min。

1.2.2 菌株的筛选 取新鲜海泥样品 5.0g 置于 45mL 无菌水中充分混匀,梯度稀释到 10^{-4} 后涂布到 ISP5 培养基上,28℃ 培养 5~7d。用接种环挑取典型单菌落在以菊粉为唯一碳源的选择培养基上分区划线,28℃ 培养。

1.2.3 孢子菌悬液的制备 将菌种划线于平板上,28℃ 培养 3~5d,用无菌小铲子将孢子轻轻刮下,置于无菌水中稀释至孢子悬液浓度为 10^{-6} cfu/mL,然后以 4% 接种量接入发酵培养基摇瓶培养 3d,采用 DNS 法测定其酶活性。

1.3 DNS 法测定菊粉酶的活力

根据苟亚峰等人^[11]和 Trivedi 等人^[12]报道方法并适当改良。发酵液于 4℃, 8000 × g 离心 20min。取上清液 1.0mL,加入 4.0mL 2% 菊粉溶液(0.2mol/L, pH5.0 醋酸缓冲溶液配制)中,50℃ 反应 30min。取反应液 1.0mL 加入 1.5mL DNS 混合后沸水浴 5min,立即取出流水冷却至室温,加蒸馏水定容至 25.0mL,混匀后静置 30min,于 540nm 处测定其吸光度值。取 3 次平行实验平均值,根据果糖标准曲线计算样品中还原糖含量。

菊粉酶酶活力定义为 1min 转化生成 1μmol 还原糖所需的酶量为一个菊粉酶酶活力单位,表示为 I 值;同理,以 4mL 2% 蔗糖溶液(0.2mol/L, pH5.0 醋酸缓冲溶液配制)替代菊粉溶液进行测定,以 1min 水解 1μmol 蔗糖所需的酶量为一个蔗糖酶酶活力单位,以 S 值表示。

由于许多微生物有菊粉酶活性的同时也伴随着有蔗糖酶活性,通常用 I/S 比来描述其催化活力,因此,用 I/S 比值来描述酶的特征;I/S > 10 时表现为内切菊粉酶活性, I/S < 10 时表现为外切菊粉酶活性^[13-14]。

$$\text{酶活性} = \frac{C \times 25 \times 1000}{180 \times t} \times \frac{1}{V}$$

式中, C: 还原糖含量 (mg/mL); t: 反应时间 (min); V: 反应酶液体积 (mL)。

1.4 果糖标准曲线的制备

依照曹泽虹等^[15]报道的方法绘制果糖标准曲线。分别取果糖标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6mL 于 25.0mL 刻度试管中,以蒸馏水补足至 2.0mL,再分别加入 DNS 溶液 1.5mL,充分混匀后沸水 5min,迅速流水冷却并静置回复至室温,蒸馏水定容 25.0mL。于 540nm 处测其吸光值,以果糖含量为横坐标,以各果糖浓度对应的吸光度 (Abs) 为纵坐标,绘制果糖标准曲线。

1.5 菌株鉴定

1.5.1 培养形态观察 将纯化的菌株接种于固体培养基平板上 28℃ 培养 2~7d 观察菌落生长特征。

1.5.2 菌丝形态观察 将菌株接种于固体培养基上,将硅片 (3mm × 10mm, 121℃ 高压灭菌 30min) 45° 插入平板划线处,28℃ 培养 5d。将硅片取出后置入 25% 戊二醛溶液中,于 4℃ 冰箱中过夜固定,然后分别用 40%、70%、90% 和 100% 的乙醇脱水 4 次后,用醋酸正戊酯置换乙醇。镀金处理后于电子显微镜下观察。

1.5.3 构建系统进化树 采用徐平等^[16]人报道的微波法快速提取放线菌基因组 DNA。设计引物进行 PCR 扩增,对 PCR 产物纯化及测序,用 MEGA5.0 软件进行拼接,提交到 EzBioCloud 网站上搜索相近菌株序列,采用 MEGA5.0 软件中的 CLUSTAL-W 进行比对,构建系统进化树,确定菌株的分类地位。

2 结果与讨论

2.1 果糖标准曲线

图 1 为果糖标准曲线,通过线性回归分析,得到回归方程 $y = 0.2058x - 0.0038$, 其相关系数 $R^2 = 0.9996$ 。

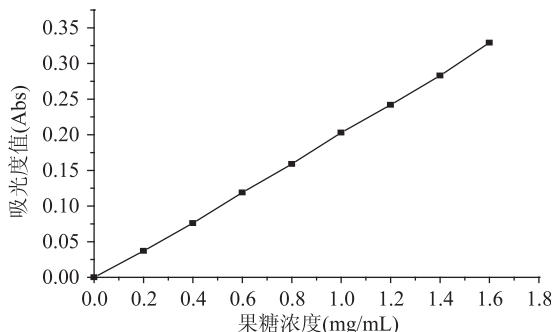


图 1 果糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of fructose

2.2 产内切菊粉酶菌株的筛选

以 ISP5 作为初筛培养基,经复筛实验获得产菊粉

酶菌株 14 株,产酶活力及其酶活特征见表 1。其中菊粉酶活力为 3.46~28.52U/mL,有 11 株菌 I/S <10,表现为外切菊粉酶活性,菌株 S511 酶活力(7.74U/mL)最高。而菌株 S502、S503 和 S505,I/S 值均大于 10,表现为内切菊粉酶活性,菊粉酶活力分别为 14.13、18.24、28.52U/mL。与已报道的来源于土壤样品中产菊粉酶的放线菌属菌株 *Streptomyces* sp. CP01 (1.6U/mL)^[17], *Streptomyces* sp. ALKC4 (0.524U/mL)^[13], *Streptomyces* sp.GNDU 1 (0.552U/mL)^[18] 产酶活力相比,该 3 株海洋放线菌具有较高内切菊粉酶活力。

表 1 产菊粉酶活力及酶特征(n=3)

Table 1 Inulinase activity and the enzyme characteristics(n=3)			
序号	菌株编号	菊粉酶活力 (U/mL)	I/S 值
1	S502	14.13 ± 0.45	19.67 ± 0.33
2	S503	18.24 ± 0.29	29.00 ± 0.15
3	S505	28.52 ± 0.92	15.38 ± 0.60
4	S504	5.26 ± 0.15	8.60 ± 0.22
5	S506	7.06 ± 0.55	3.47 ± 0.6
6	S507	3.46 ± 0.22	3.86 ± 0.29
7	S508	5.71 ± 0.34	3.62 ± 0.23
8	S509	5.49 ± 0.39	5.00 ± 0.20
9	S510	7.63 ± 0.34	3.56 ± 0.33
10	S511	7.74 ± 0.29	1.08 ± 0.04
11	S512	6.16 ± 0.40	3.21 ± 0.18
12	S513	5.15 ± 0.34	5.25 ± 0.38
13	S514	3.80 ± 0.45	0.48 ± 0.05
14	S515	4.48 ± 0.15	6.00 ± 0.25

2.3 产内切菊粉酶菌株形态观察

菌株 S502、S503 和 S505 培养形态分别如图 2 所示,菌丝和孢子形态分别如图 3 所示。表 2 详细描述了待鉴定菌株 S502、S503 和 S505 于 28℃ 培养 3d 后的菌落形态特征,并在扫描电镜下观察其培养 5d 的菌丝与孢子形态特征。

2.4 系统进化树分析

筛选获得的产内切菊粉酶菌株 S502、S503 和 S505,通过 16S rRNA 序列分析,利用 MEGA5.0 软件建树(图 4、图 5 和图 6),确定了其菌株分类地位。菌株 S502、S503、S505 与 *Streptomyces malachitofuscus* NBRC 13059T (AB184282)、*Micromonospora echinospora* ATCC 15837T (U58532)、*Streptomyces carpaticus* NBRC 15390T (AB184641) 相似度分别为

表 2 产内切菊粉酶菌株培养形态、菌丝和孢子形态

Table 2 Culture morphology, mycelia and spore characters of the strain producing endoinulinase		
菌株编号	培养形态	菌丝与孢子形态
S502	培养 3d 时,基内菌丝呈浅黄色,孢子丝无色,菌落表面白色粉状,单菌落圆形	培养 5d 后,菌体孢子呈球形,串生,表面光滑。
S503	培养 3d 时,培养基表面致密,呈白色,干燥,单菌落表面光滑,圆形	培养 5d 时的菌体菌丝纤细,多分枝小梗,顶端着生 1~2 个孢子或簇生
S505	2d 时,菌落呈黄色,3d 后菌落逐渐变橘黄色,表面干燥致密	培养 5d 后,菌体孢子串生,圆形,表面褶皱

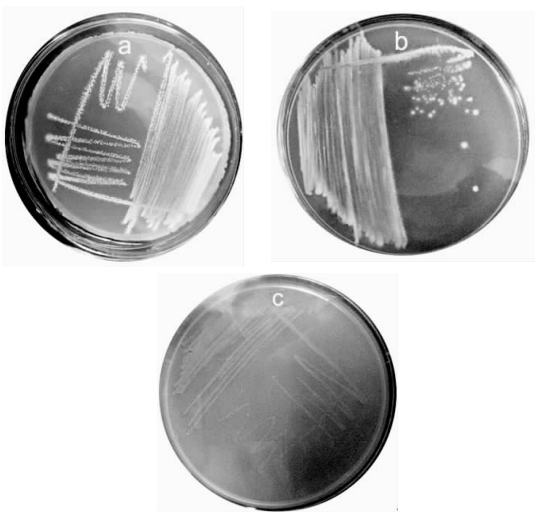


图 2 菌株培养形态

Fig.2 The colony morphology of strain

注:a:菌株 S502,b:菌株 S503,c:菌株 S505,图 3 同。

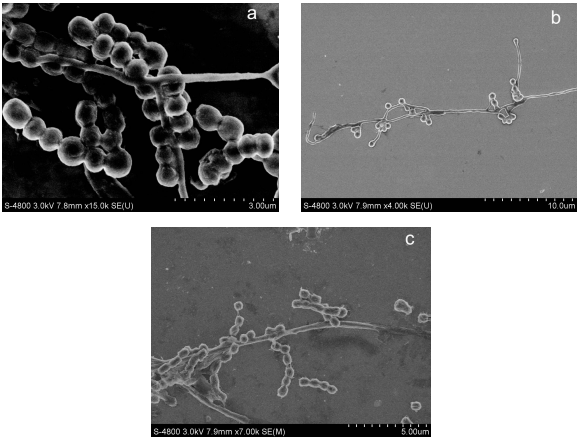


图 3 菌株 S502、S503 和 S505 的菌丝和孢子形态

Fig.3 The morphological of mycelia and spore of strain S502,S503 and S505

99.227%、99.146% 和 99.859%。综合菌株形态特征,最终将菌株 S502、S503 和 S505 鉴定为孔雀石褐链霉菌 *Streptomyces malachitofuscus*、棘孢小单孢菌 *Micromonospora echinospora* 和锂链霉菌 *Streptomyces carpaticus*。

3 结论与讨论

本研究从鸭绿江滨海湿地海泥样品中初筛获得 14 株产菊粉酶菌株,复筛获得 3 株(S502、S503 和 S505)产内切菊粉酶放线菌菌株,其酶活力分别为

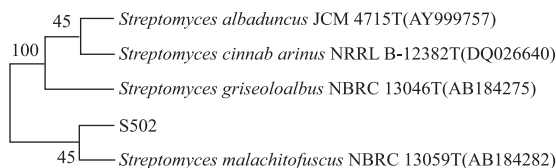


图4 菌株 S502 系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of strain S502 based on 16S rRNA sequence

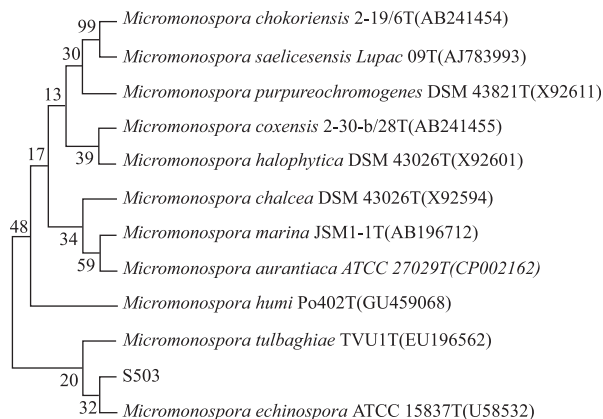


图5 菌株 S503 系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of strain S503 based on 16S rRNA sequence

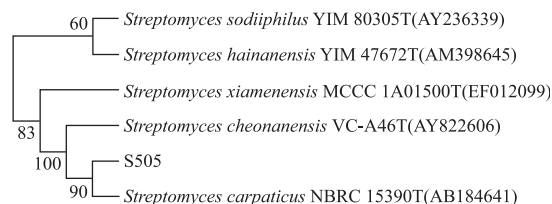


图6 菌株 S505 系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of strain S505 based on 16S rRNA sequence

14.13、18.24、28.52U/mL, 且其 I/S 值分别为 19.67、29.00、15.38。经形态观察和 16S rRNA 测序及构建系统进化树分析, 确定其分类地位分别为孔雀石褐链霉菌 *Streptomyces malachitofuscus*、棘孢小单孢菌 *Micromonospora echinospora* 和锂链霉菌 *Streptomyces carpaticus*。目前报道产菊粉酶的放线菌仅有链霉菌属, 但大多表现为外切菊粉酶活性且产酶活力较低, 本文所筛选的放线菌不仅产酶活力高, 而且种类不一, 丰富了我国产内切菊粉酶菌株的种类。此外, 这 3 株菌为海洋放线菌, 培养基中添加了一半的海水, 全球有 71% 的海洋区域, 如果将来能作为工业酶制剂的生产原料, 那么大规模的工业发酵消耗的就是大量的海水, 从而节约了淡水资源, 这为进一步研究 3 株放线菌产内切菊粉酶特性和商品绿色化生产及应用奠定了基础。

参考文献

[1] Wang G Y, Chi Z, Song B, et al. High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22

[J]. Bioresour Technol, 2012, 124(2): 77-82.

[2] Dilipkumar M, Rajamohan N, Rajasimman M. Nulinase production in a packed bed reactor by solid state fermentation [J]. Carbohydr Polym, 2013, 96(1): 196-199.

[3] 魏微, 刘兆普, 王琳, 等. 青霉菌 B01 产菊粉酶特性的研究及菊粉酶系分析[J]. 食品科学, 2009, 30(5): 179-183.

[4] Sharma A D, Gill P K. Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. [J]. J Food Eng, 2007, 79(4): 1172-1178.

[5] Neagu Bonciu C, Constantin O, Bahrim G. Increase in extracellular inulinase production for a new *Rhizoctonia* ssp. strain by using buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) flour as a single carbon source [J]. Appl Microbiol, 2012, 55(3): 195-201.

[6] 黄玉玲, 王桂峰, 隆小华, 等. 产菊粉酶菌株的筛选及产酶条件优化[J]. 食品工业科技, 2012, 21(33): 160-163.

[7] Chen H Q, Chen X M, Chen T X, et al. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 using response surface methodology [J]. Carbohydr Polym, 2011, 86(1): 249-254.

[8] Mazutti M, Bender J P, Treichel H, et al. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate [J]. Enzyme Microb Technol, 2006, 39(1): 56-59.

[9] Kobayashi T, Uchimura K, Deguchi S, et al. Cloning and Sequencing of Inulinase and β -Fructofuranosidase Genes of a Deep-Sea *Microbulbifer* Species and Properties of Recombinant Enzymes [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(7): 2493-2495.

[10] 王静, 金征宇. 微生物菊粉酶的研究进展[J]. 生物技术, 2002, 12(2): 42-45.

[11] 苟亚峰, 王丹, 孙丹, 等. 一株产内切菊粉酶菌株培养条件的响应面优化[J]. 食品工业科技, 2013, 19(34): 135-140.

[12] Trivedi S, Divech J, Shah A. Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates [J]. Carbohydr Polym, 2012, 90(1): 483-490.

[13] Sharma A D, Kainth S, Gill P K. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. [J]. J Food Eng, 2006, 77(3): 486-491.

[14] Wang J, Jin Z, Jiang B, et al. Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum* [J]. Process Biochemistry, 2003, 39(1): 5-11.

[15] 李环, 陆佳平, 王登进. DNS 法测定山楂片中还原糖含量的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 18(34): 75-77.

[16] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA [J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82-84.

[17] Laowklom N, Chantanaphan R, Pinphanichakarn P. Production, Purification and Characterization of Inulinase from a Newly Isolated *Streptomyces* sp. CP01 [J]. Nat Resour, 2012, 3(3): 137-144.

[18] Gill P K, Sharma A D, Harchand, P K, et al. Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain [J]. Bioresour Technol, 2003, 87(3): 359-362.