

细链格孢菌拮抗细菌枯草芽孢杆菌 XL12 菌株 发酵产抗菌蛋白条件研究

陈爱香

(临沂大学图书馆, 山东 临沂 276005)

摘要:为了提高细链格孢菌 [*Alternaria alternate* (Fr) Keissler] 拮抗细菌枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) XL12 菌株的发酵产抗菌蛋白量, 采用单因素法对 XL12 菌株的培养条件进行了优化, 最终确定 XL12 最适宜的发酶条件为: 基础培养基碳源和氮源(摩尔比)的比例为 30:1, 接种量为 0.5%, 配制后灭菌前, 培养液的 pH 调节在 6.95~7.05, 发酶温度为 30~35℃, 220 r·min⁻¹ 摇床振荡培养 72 h, 用 70% 硫酸铵对 XL12 菌株发酶液上清液进行盐析, 可以沉淀最多的抗菌蛋白。

关键词:细链格孢菌; 拮抗细菌; 枯草芽孢杆菌 XL12 菌株; 抗菌蛋白; 发酶优化

中图分类号: S432.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2011)09-0042-03

细链格孢 [*Alternaria alternate* (Fr) Keissler] 引发的黑斑病是冬枣果实的一种主要病害, 常造成严重的产量及经济损失^[1]。冬枣是我国稀有的优质晚熟鲜食品种, 由于它含有 19 种氨基酸及多种维生素, VC 含量高达 3.5~6.5 g·kg⁻¹^[2], 果实清脆可口, 素有“百果王”“活维生素丸”之称, 深受人们的青睐。但冬枣病害目前已成为制约冬枣产业化发展的瓶颈, 人们通常采用化学药剂来达到防治的目的, 但由于农药残留及病菌耐药性的不断提高, 防治效果降低, 且果品质量下降^[3]。随着绿色农业、有机农业的兴起, 以及微生物防治的特殊作用机制, 生物防治冬枣黑斑病备受人们关注, 也被认为是最具有发展潜力的重要防治方法之一^[4]。

该试验在分离筛选得到细链格孢菌拮抗细菌 XL12 菌株的基础上, 进一步对其影响 XL12 菌株产生抗菌物质的因素进行了研究, 旨在为制备抗菌物质及工业化生产提供依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株

供试病原菌细链格孢菌, 由青岛农业大学山东省重点学科植物病理学实验室保存。枯草芽孢杆菌 XL12 菌株, 拮抗细菌, 同一实验室分离保存。

1.2 培养基

AYDA 斜面培养基: 牛肉膏 12 g·mL⁻¹、葡萄糖 20 g·mL⁻¹、琼脂 15 g·mL⁻¹。基础培养基: 牛肉膏 0.5 g·mL⁻¹、葡萄糖 20 g·mL⁻¹、蛋白胨 15 g·mL⁻¹、琼脂 20 g·mL⁻¹、氯化钠 5 g·mL⁻¹。

1.3 方 法

1.3.1 不同因素对拮抗菌株 XL12 产生抗菌物质的影响 将拮抗菌株 XL12 在 AYDA 斜面培养基上培养, 48 h 后移于 AYD 培养液中, 30℃、240 r·min⁻¹ 恒温摇床振荡培养, 3 次重复。不同培养时间以 12、24、48、72、96 h 取样于 AYD 培养液; 温度设 15~20℃、20~25℃、25~30℃、30~35℃、35~40℃ 5 个培养温度范围; 初始 pH 设置为 6.35~6.65(降低)、6.65~6.95(原始)、6.95~7.05、7.05~7.25、7.25~7.50、7.50~7.80; 不同通气量通过改变摇床转速来调节, 设置 60、120、220、280、360 r·min⁻¹ 5 个发酶转速处理。接种量设置 0.25%、0.50%、0.75%、1.00%、1.50% 5 个发酶接种量处理。碳氮比对蛋白组分生成量的影响: 将基础培养基中的碳源和氮源, 按照不同的 C/N(摩尔比), 设置葡萄糖/酵母膏的添加量(%) 分别为: 2/0.6、2/0.5、2/0.4、2/0.3、2/0.2 共 5 个处理, 每个处理设 3 次重复。通过测定确定这 5 个处理的 C/N(摩尔比) 分别为: 3:1、30:1、48:1、144:1、258:1。发酶 72 h 后, 测定其蛋白组分的含量, 以确定出培养基中最佳碳氮比量。

1.3.2 菌量的测定 取发酶液 1 mL 在 Beckman DU7500 紫外/可见光光度计中测定菌液 600 nm 处的吸光度。

收稿日期: 2011-05-04

作者简介: 陈爱香(1978-), 女, 山东省青岛市人, 硕士, 副教授, 从事植物保护教学和科研工作。E-mail: aixiangchen03@163.com。

2 结果与分析

根据前期试验结果表明^[5], 70% 硫酸铵盐析出的蛋白抑菌活性最高。该试验均采用 70% 的硫酸铵沉淀抗菌蛋白。

2.1 最适发酵时间

发酵时间对枯草芽孢杆菌 XL12 菌株发酵产抗菌蛋白影响的结果表明(见图 1), 发酵产物的形成与菌体的生长部分相伴随, 在 12~72 h 期间, 粗蛋白产量随菌体数量的增加而增加, 而后期 96~120 h 期间, 菌体数量继续增长, 但粗蛋白产量却降低。在基本营养基质、发酵温度和摇床转速固定的情况下, 确定出最佳发酵时间为 72 h, 粗蛋白产量最高。

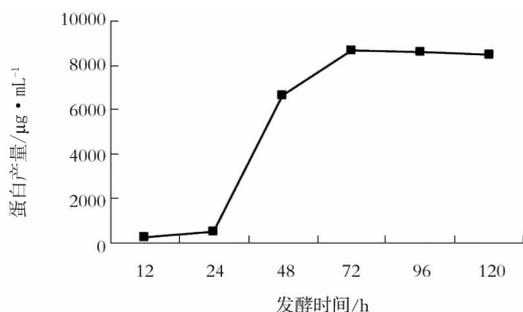


图 1 发酵时间对 XL12 菌株产抗菌蛋白的影响

2.2 最适碳氮比

由图 2 可知, 基础培养基中的碳源和氮源, 按照 C/N(摩尔比)30:1 发酵 72 h, 测定其蛋白组分的含量最高, 确定为培养基中最佳碳氮比量。

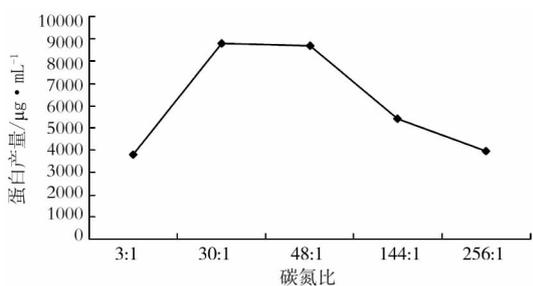


图 2 碳氮比对 XL12 菌株产抗菌蛋白的影响

2.3 最适发酵温度

发酵温度对枯草芽孢杆菌 XL12 菌株发酵产抗菌蛋白影响的结果表明(见图 3), 当发酵温度 $< 30^{\circ}\text{C}$ 时, 随着发酵温度的升高, 粗蛋白产量增加; 当发酵温度 $> 30^{\circ}\text{C}$ 时, 随着发酵温度的升高, 粗蛋白产量降低; 当发酵温度在 $30 \sim 35^{\circ}\text{C}$ 时, 粗蛋白产量最高。

2.4 最适通气量

XL12 菌株产抗菌蛋白是好氧性发酵过程,

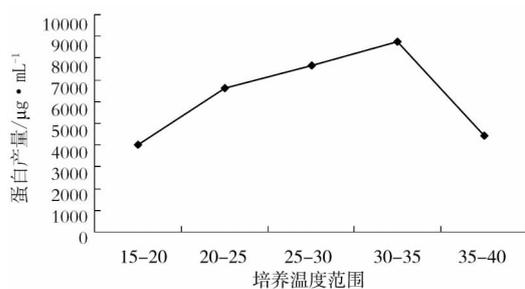


图 3 发酵温度对 XL12 菌株产抗菌蛋白的影响

通过改变摇床转速来调节通气量。由图 4 可知, 随着摇床转速的提高, 产抗菌蛋白的产量也在发生变化。转速小时, 通气量小, 不利于菌体生长; 但摇床转速太大, 会引起菌体过早自溶, 使得生物量减少, 抗菌活性物质相应减少。在摇床转速为 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 粗蛋白产量最高。

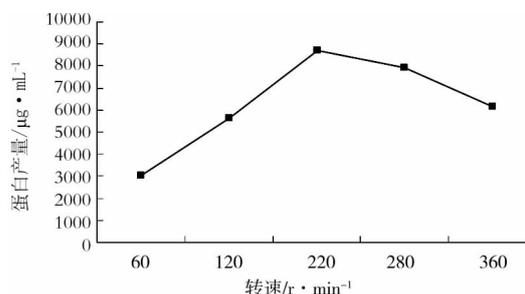


图 4 发酵转速对 XL12 菌株产抗菌蛋白的影响

2.5 最适接种量

由图 5 可知, 适宜的接种量为 0.5%, 此时培养种子液的浊度为 $\text{OD}_{600} = 0.159 / \text{干重}(\text{cell}) \cdot \text{L}^{-1}$ (培养液)。

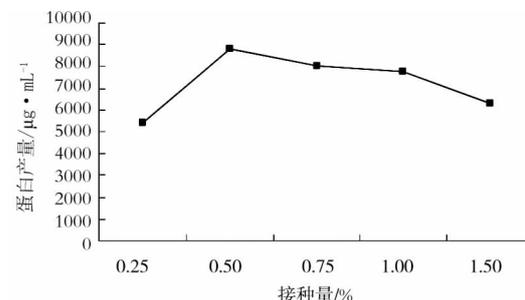


图 5 接种量对 XL12 菌株产抗菌蛋白的影响

2.6 最适 pH

由图 6、图 7 可知, 配制后灭菌前, pH 调节在 $6.95 \sim 7.05$, 粗蛋白的效价最高。在发酵过程中 pH 随发酵产物的消耗呈周期性变化, 随着培养基的消耗, 菌体数量的增多, pH 从 7.0 升到 7.18, 随后, pH 开始下降, 最后降低到起始值以下。

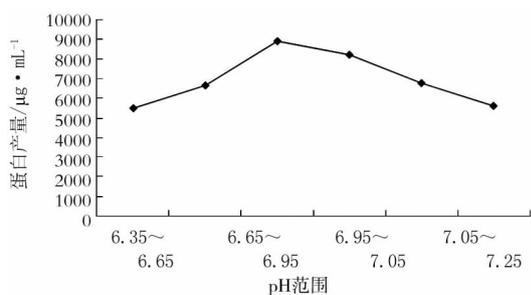


图6 灭菌前培养液 pH 对 XL12 菌株产抗菌蛋白的影响

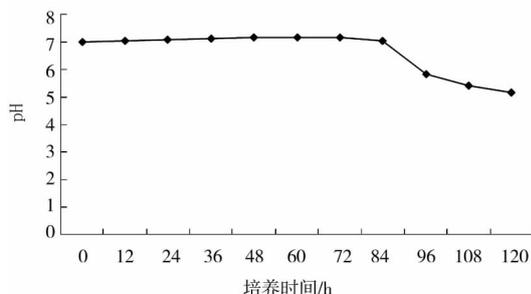


图7 发酵过程中 pH 的变化

3 结论与讨论

通过对枯草芽孢杆菌 XL12 菌株产生抗菌蛋白的生物特性进行了初步研究,发现产生抗菌蛋白组分最经济的发酵时间为 72 h,最适宜的碳源和氮源(摩尔比)比为 30:1,最适宜的发酵温度为 30~35℃,摇床转速为 220 r·min⁻¹,最适宜的种量为 0.5%,配制后灭菌前,培养液的 pH 调节在 6.95~7.05,发酵产物中蛋白组分的产生量最大。

在枯草芽孢杆菌 XL12 菌株的发酵产抗菌蛋白条件的优化试验中,发酵培养基的初始 pH、发酵温度与发酵时间、接种量、通气量与碳/氮比对产抗菌蛋白量的影响,均呈现先增大,当增大到某一个极大值后,又逐渐减小的趋势。这主要是由于在

不同条件下形成有活性的抗菌蛋白量不同所导致的。比如发酵培养基的最适初始 pH 为 6.95~7.05,当 pH 大于或小于 6.95~7.05 时,都不利于菌体形成抗菌蛋白,从而导致抗菌蛋白产量的降低;同理,发酵温度对产抗菌蛋白的影响也是如此;但发酵时间对产抗菌蛋白量的影响方式则不同,经过测定该试验的最适发酵时间为 72 h,当发酵时间在 0~72 h 时,随着时间延长,抗菌蛋白量逐渐积累,当到达 72 h 时,抗菌蛋白量达到最大值,但随着时间的继续延长,由于发酵液中的营养物质消耗殆尽,菌体生长停止,代谢活动降低,蛋白合成减少,菌体裂解释放出各种蛋白酶,以及在其它理化因素的影响下,导致抗菌蛋白加速降解,当抗菌蛋白的降解速度大于其合成速度,就会导致抗菌蛋白的总量下降。因此,在对发酵培养基各种因素的选择时,必须是最佳取值,最大程度保证抗菌蛋白的产量。

XL12 拮抗菌株产生抗菌蛋白的生物学特性相关参数的确定,为今后发酵扩大技术推广和产业化生产提供了一定的理论依据和试验基础。

参考文献:

- [1] 王军,辛玉成. 冬枣黑斑病病原的分离与鉴定[J]. 青岛农业大学学报, 2007, 24(1): 21-23.
- [2] 王绪芬. 提高冬枣产量和品质的关键技术[J]. 北方园艺, 2008(9): 91-92.
- [3] 常慧红,刘俊展,张路生. 冬枣病害的发生及防治措施[J]. 植物保护, 2011(2): 159-160.
- [4] 牛贻光,王清海,刘幸红,等. 三种拮抗放线菌对冬枣黑斑病防治效果的研究[J]. 山东林业科技, 2007(4): 36-37.
- [5] 王军,陈爱香,辛玉成. 枯草芽孢杆菌 XL12 发酵液蛋白对冬枣黑斑病病原的抑制效果[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(2): 114-116.

Fermentation Conditions of Antagonistic Strain XL12 against *Alternaria alternata*

CHEN Ai-xiang

(Library of Linyi University, Linyi, Shandong 276005)

Abstract: In order to increase the quantity of antifungal protein from *Bacillus subtilis* XL12, the strain was cultured under different conditions. The optimization of fermentation factors, such as the C/N proportion of basic medium, inoculation amount, initial pH, fermentation temperature and fermentation time, was made by single factor experiments. The result showed that the optimal fermentation condition was initial pH 6.95~7.05 and shaking flask in 220 r·min⁻¹ speed, fermentation temperature was 30~35℃ for 72 hours, premise of which the C/N ration is 30:1, inoculation amount is 0.5%, under the conditions, the most quantity of antifungal protein was obtained by the 70% (NH₄)₂SO₄ salting out supernatant fluid of strain XL12 fermentation.

Key words: *Alternaria alternata*; antagonistic bacteria; strain XL12 of *Bacillus subtilis*; antifungal protein; fermentation optimization