

研究报告

脲酶抑制剂产生菌筛选和抑制剂的提取

林新坚 陈济琛 郑时利 韩闽毅 刘中柱

(福建省农业科学院土壤肥料研究所 福州 350013)

摘要 建立了筛选脲酶抑制剂产生菌的模式, 获得三个菌株, 其中代号为 I_{36} 的菌株, 经鉴定为赭曲霉。该菌株产生脲酶抑制剂适宜的培养条件: 培养基为 2% 葡萄糖, 10% 马铃薯, pH 值自然, 28~30℃, 液体静置培养 12d。测定液体培养液(含粗制粉 2.0mg)对灰泥田和黄泥田土壤酶活性的抑制率 4d 分别为 13.5% 和 100%。从赭曲霉代谢产物提取到的其中一种抑酶物质, 经硅胶薄层层析和高效液相色谱鉴定达到均一。

关键词 赭曲霉, 脲酶抑制剂产生菌, 提取

尿素氮肥含氮量高(46%), 是我国农作物的主要氮源之一^[1-3]。但农作物通常对尿素的利用率很低, 在稻田中其损失可达施氮量的一半左右, 甚至更多^[4-6]。造成氮素损失的主要原因, 一部分是由于土壤的脲酶迅速地使尿素水解成氨, 累积后, 随着 pH 值的提高, 以及藻类光合作用释放出大量的氢氧离子, 引起氨的挥发损失^[7-9]。另一部分通过消化与反消化途径以 N_2O 、 N 等形式损失。提高尿素利用率很重要的途径之一是减少氮素的损失。在脲酶抑制剂的研究中^[3, 4, 10-12], Comad 早在 40 年代就提出, 将某些物质施入土壤可以抑制脲酶活性, 从而延长氮肥的肥效^[11]。有的学者试图通过某金属元素取代脲酶活性中心的金属离子 Ni 来改变脲酶活性^[13]。Bremner 等从上百种的化合物中筛选出对脲酶抑制效果较好的酞类有机化合物以及银和汞无机化合物^[14, 15]。然而迄今为止, 国内外从微生物途径筛选脲酶抑制剂产生菌并从中提取抑酶产物的研究甚少。为此, 本文在脲酶产生菌和脲酶活性^[16]及芽孢杆菌脲酶提取研究^[17]的基础上, 通过研究微生物途径筛选脲酶抑制产生菌, 进而从其代谢物中提取脲酶抑制剂, 扩大脲酶抑制剂来源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤脲酶: 黄泥土和灰泥土的土样取自

耕作层(0~15cm), 自然风干过 1mm 筛。其 pH 值、总氮、氧离子交换量(Meq / 100g 土样)、脲酶活性(NH_3 -mg / 15g 土样 24h, 25℃), 分别为 6.30、0.124、9.60、4.79 和 5.02、0.15、6.60、0.81。

1.1.2 菌种: 引自中国科学院微生物研究所 AS.3.1408、AS.3.2060 和 AS3.3930 三株已知菌以及取自不同水稻土, 厩肥、腐木等分离的细菌、霉菌及放线菌等。

1.1.3 培养基: 细菌、霉菌及放线菌用常规培养基。

1.1.4 脲酶抑制剂: 化学抑制剂 NBPT[N-(n-butyl) thiophosphoric triamide, 由澳大利亚 CSIRO 提供。天然脲酶抑制剂粗粉剂 $I_{36}N$, 系由赭曲霉培养原液浓缩冷冻干燥制成的粉剂。抑制剂用量以尿素使用量的百分数计。

1.2 方法

1.2.1 脲酶抑制剂产生菌的分离: 取不同的水稻土, 厩肥样品, 采用稀释法, 25~28℃ 培养。挑取带有培养基的单菌落置水琼脂(含 2% 尿素 + 0.1% 酚红, 18% 琼脂 pH 6.4)上, 每块平板放 10 个(约 0.25cm²), 置于 25℃ 恒温培养, 间隔 30min 观察接种块下琼脂颜色变化情况(黄变红)。将这些菌株分别挑到相应的培养基中培养 2~6d, 测定培养液中的 pH 变化。

1.2.2 赭曲霉的培养和抑制剂的提取:采取上述方法从灰泥田土中分离到一株代号为 I_{36} 的菌株,经中国科学院微生物研究所鉴定为赭曲霉。培养基用马铃薯培养基,28℃ 静止暗培养 12~14d 后用 42# 滤纸过滤,滤液称为原液。原液用旋转蒸发器,在减压 -0.09~0.98MPa, 温度 50~58℃ 条件下,浓缩 1:50 称为浓缩液。

浓缩液 250ml 用等量的乙酸乙酯萃取 15 次,脂相合并浓缩后用 140~200 目硅胶柱层析(柱床体积 3.2cm × 126cm),加样量占柱体积的 10% 洗脱液用乙酸乙酯:石油醚 = 4:1,流速 3ml/min,部分收集 400ml/瓶,测定各部分抑制率。然后将对脲酶活性有抑制的部分收集浓缩,进行二次硅胶柱层析(柱床体积 2.4cm × 80cm),洗脱液用石油醚:乙酸乙酯 = 5:1,流速 2ml/min,收集量 200ml/瓶,减压浓缩成 20ml,室温下自然结晶,通过分级结晶法获得白色针状晶体。

1.2.3 酶活性测定:采用康维皿法和 Orion 氨电极法测定^[17]。尿素残留量采用 Mulvancy 和 Bremner 方法^[18]。抑制率以下式表示:抑制率 (%) = (A - B) / A × 100% 式中, A 表示不加抑制剂的脲酶活性, B 表示添加抑制剂的脲酶活性。

1.2.4 脲酶抑制剂纯度测定:用硅胶层层析法和日本岛津 LC-4A 型高效液相色谱仪。层析溶剂系统为乙酸乙酯:石油醚 = 1:5, 碘缸显色。高效液相色谱条件:柱 Zorba × ODS(4.61D × 250mm) 流动相为 100% 甲醇,流速 1ml/min。检测波长 254nm, 280nm。

2 结果与讨论

2.1 脲酶抑制剂产生菌的筛选

2.1.1 初筛:供试菌经水琼脂法选择无脲酶活的菌株和不产碱的菌株(平板不显红色)。而后采用液体培养法,将 pH 值变动于 5.0~7.0 的 85 个菌株进行分离,纯化以便排除试菌产酸或产碱影响下一部的复筛。

2.1.2 复筛:将初筛结果获得的菌株分别进行

液体培养。为避免菌液颜色干扰,吸 1ml 培养液采用康维皿法测定其对土壤脲酶抑制效果,经筛选获得 5 株抑制率 ≥ 10% 的菌株,然后用测尿素残留方法将这 5 株进一步复筛,结果表明,3 株代号分别为 I_{36} 、 I_{60} 、 I_{53} 的产生菌培养液对土壤脲酶抑制率分别为 19.6%、10.4% 和 14.4%, 培养液的 pH 值分别为 6.7、5.0 和 6.2。

2.2 I_{36} N 粗粉剂对脲酶的抑制效果

I_{36} 菌培养液(含粉剂 2.0mg)不仅对土壤脲酶有抑制作用,而且对黄豆脲酶也有抑制作用,抑制率达 21%。此外,为了进一步证实 I_{36} 原液中存在某种能抑制脲酶的物质,我们又采用尿素残留法比较 I_{36} N 和化学抑制剂对脲酶的抑制效果,从图 1 可以看出, I_{36} N 和 2%NBPT 对二种土壤脲酶均有抑制作用。但随着土壤类型,培养时间的变化,土壤脲酶受抑制的状况有明显的差别。同时不难看出,虽然 NBPT 用量少,前期抑制率高,但持续时间却很短,然而, I_{36} N 对脲酶的抑制率虽低些,但持续时间较长,从而肯定了它的作用效果和潜在的应用前景。

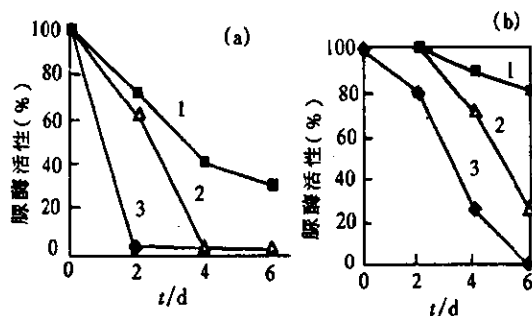


图1 I_{36} N 与 NBPT 2% 对二种土壤脲酶活性的影响

(a) 灰泥田 (b) 黄泥田

1. I_{36} N; 2. NBPT; 3. CK

2.3 I_{36} 菌株培养条件

以 PDA 培养基,培养温度 28℃ 为基础,选择适宜的培养条件,结果以马铃薯 10%,葡萄糖 2%, pH 自然培养基, 500ml 三角瓶装 150ml,接种 2 环,在 28~30℃ 静置暗条件培养 12~14d 为宜,对脲酶抑制剂的抑制率变动于 17%~24%。此外,试验表明察氏培养基不利于 I_{36} 菌株产生脲酶抑制剂。

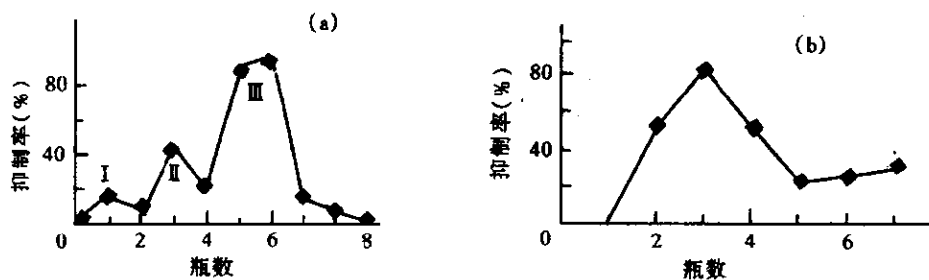


图2 硅胶柱层析

(a) 第一次层析 (b) 第二次层析

2.4 I_{36} 菌株的鉴定

I_{36} 的形态特征: 菌落在察氏培养基上 25℃ 培养 7d 直径 35~40mm, 淡黄褐色, 平坦或中部凸起, 偶现少数不规则皱纹, 边缘气生菌丝较多, 稍内部形成大量分生孢子结构, 淡黄褐色, 近于浅赭褐 (Light Ochraceous Buff, Ridgway SV) 至甘草黄色 (Chamors, Ridgway XXX)。基部菌丝体呈现浅绿赭色或带紫色, 形成菌核, 多少不等, 有的在菌落中央部分较多。中国科学院微生物研究所根据形态特征定为赭曲霉 (*Aspergillus ochraceus*)。然而, 我们从中国科学院引回的赭曲霉 3.1408 和 3.2060 两个菌株与我们分离的菌株对比发现, 3.1408 和 3.2060 菌株在同等条件下, 不仅其原液对黄豆脲酶和土壤脲酶无抑制效果, 而且形态特征上也有一些差别。这些形态和生理代谢上的差异可能与保存方法与保存时间有关。引起这些差异的内因还有待深入研究。

2.5 脲酶抑制剂的提纯及纯度鉴定

2.5.1 抑制剂的提取: 赭曲霉液经过滤, 浓缩, 测定其浓缩液每毫升对脲酶活性的抑制率为 76%。浓缩液用等量的乙酸乙酯萃取, 分别收集萃取后的水相和脂相两溶液, 脂相经减压浓缩除去有机溶剂, 定容至两相溶液体积相等, 测定它们对脲酶的抑制效果。结果表明, 每毫升水溶性、脂溶性溶液对脲酶的抑制率分别为 44.0% 和 57.0%。鉴于后者较前者抑制率高且易于纯化, 将脂溶性溶液进一步提纯, 经 G140-200 硅胶柱层析, 分部收集并测定其对脲酶活性的抑制效果 (图 2-a)。结果表明, 峰 III 对脲酶活性的

抑制率最高, 其次是峰 II。然而, 从收集样 5 和样 6 的硅胶层层析表明, 这两个收集样都含三个斑点, 说明峰 II 仍不是单一组份的物质。因此, 将 3 样品合并, 减压浓缩后二次硅胶过柱, 分部收集见图 2-b, 分别测定其抑制率。在峰 I 中, 收集样 3 较 2 对脲酶的抑制率高。

2.5.2 抑制剂的纯度鉴定: 图 2-b 收集样 3 和样 2 经自然结晶和分级结晶, 获得白色针状晶体。样 3 和样 2 用硅胶薄层层析和高效液相色谱鉴定其纯度。在硅胶板上, 都仅显示一个斑点, 斑点大小一致, 迁移位置相同。高效液相色谱分析只显示单一峰。结果说明两者是均一的单组份物质, 峰 1 应属同一种脲酶抑制剂物质。

参 考 文 献

- [1] Cai G X, Freney J R, Muirhead W A, et al. Soil Biol Biochem, 1989, 21: 137~145.
- [2] Beaton J D. Crop and soil, 1977, 48: 549.
- [3] 周礼恺. 土壤学进展, 1984, 1: 1~9.
- [4] 朱晓燕. 土壤学进展, 1988, 5: 7~13.
- [5] 朱兆良, 蔡贵信, 徐银华等. 土壤学报, 1985, 11(1): 320~363.
- [6] Fillery I R, viek P L G. Fert Res, 1986, 9: 79~98.
- [7] 陈荣业, 朱兆良. 土壤学报, 1982, 19(2): 122~129.
- [8] Sahrawat K Z. plant and Soil, 1980, 57: 335~352.
- [9] 朱兆良. 土壤学进展, 1979, 2: 1~10.
- [10] Ellington A. Fertilizer Research, 1985, 8: 285~296.
- [11] Conrad J P. soil sci, 1940, 50: 119~134.
- [12] Reio J. Naturwiss en shaften, 1977, 64(2): 97~99.
- [13] Robet L, Blackeley N E. Dixon and Burt Zemer, Biochemica et. Biophysica Acta, 1983, 744: 219~229.
- [14] Tomhinos T E. British patent, 1967, 1(94): 802.

- [15] Bremner J M, Douglas L A. Soil Biol, Biochem, 1973, 5: 847~853.
1971, 3: 297.
- [16] 林新坚, 陈济琛, 郑时利等, 福建农学院学报, 1992, 1: 36~40.
- [17] 谢新东, 陈济琛, 林新坚等, 微生物学通报, 1996, 23(2): 81~83.
- [18] Bundy L G, Bremner L J M. Soil Biol Biochem, 1973, 5: 847~853.
- [19] Orion (1983): Instruction Manual for Ammonia Electrode Model, Orion Research Inc 95~12. Cambridge, Mass: 12~15.
- [20] Mulvaney R L, Bremner J M. Commun Soil Sci plant Anal, 1979, 10: 1163~1170.

STUDIES ON THE ISOLATION OF UREASE INHIBITOR PRODUCED BY MICROORGANISM AND EXTRACTION OF UREASE INHIBITOR

Lin Xinjian, Chen Jichen, Zheng Shili, Han Minyi, Liu Zhongzhu

(Institute of Soil and Fertilizer, Fujian Academy of Agriculture Science, Fuzhou 350013)

Abstract The procedure of microorganism producing urease inhibitor was established, 3 strains were obtained from amount of isolates, one was named as I_{36} has been identified as *Aspergillus ochraceus* by Chinese Institute of Microbiology(AS), The results showed that the moderate medium chiefly consisted of 2% glucose and 10% potato, was favourable to produce urease inhibitor in the condition of inoculating amount for 2 loops in the dark at 28~30℃ for 12~14d. When 2mg I_{36} N was added in 15g soil and incubating for 4d, the inhibiting rate of I_{36} N on the urease in grey soil and yellow earth was 13.5% and 100% respectively. The I_{36} N inhibitor was shown as a single spot on the silica plate by TLC and a single peak by ELC.

Key words *Aspergillus ochraceus*, Extraction, Urease inhibitor produced by microorganism