

# 几丁质酶产生菌的筛选及产酶条件的研究\*

邱立友 汪世山\*\* 余功德\*\*\* 吴云汉

(河南农业大学生物工程学院 郑州 450002)

**摘要:** 从 301 株几丁质降解菌包括细菌、放线菌和真菌中, 筛选出一株产几丁质酶活力较高的链霉菌 *A*<sub>048</sub> (*Streptomyces* sp. *A*<sub>048</sub>)。其产酶的适宜条件是, 培养温度 30℃, 培养基 pH7.0~7.5, 碳源几丁质, 氮源  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 体积溶氧系数  $k_d$  值为  $1.56 \times 10^{-6} \text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min} \cdot \text{atm})$ , 振荡培养 120h, 产酶可达 25.1U/mL。

**关键词:** 几丁质酶, 链霉菌, 培养条件

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)04-0270-03

## SCREENING OF CHITINASE FORMING STRAINS AND CONDITIONS FOR ENZYME PRODUCTION

QIU Li-You WANG Shi-Shan YU Gong-De WU Yun-Han

(College of Bioengineering, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

**Abstract:** About 301 strains of microorganisms were screened including bacteria, actinomycetes, and fungi, From these strains the authors screened out a considerable high chitinase producing strain, *Streptomyces* sp. *A*<sub>048</sub>. The optimal conditions for enzyme production were as follows: temperature, 30℃; initial pH of medium 7.0~7.5; C source, chitin; N source,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ;  $k_d$ ,  $1.56 \times 10^{-6} \text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min} \cdot \text{atm})^{-1}$  chitinase activity reached  $25.1 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

**Key words:** Chitinase, *Streptomyces* sp., Cultural conditions

几丁质酶(Chitinase, EC3.3.1.14)能将几丁质降解生成几丁二糖等低聚几丁糖。许多生物, 包括多种细菌、放线菌和真菌以及动植物, 可产生几丁质酶<sup>[1]</sup>。几丁质酶尤其是微生物几丁质酶, 在几丁质生物资源利用<sup>[2]</sup>、SCP 生产<sup>[3]</sup>和植物病虫害的生物防治<sup>[4]</sup>等领域有着广阔的应用前景。我们从土壤和昆虫体表分离得到 301 株几丁质降解菌, 经摇瓶筛选出一株产几丁质酶活力较高的菌株, 并对其产酶条件进行了较系统的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

均为从土壤和昆虫体表分离得到, 包括有

细菌、放线菌和真菌, 共计 301 株<sup>[5]</sup>。

### 1.2 培养基及培养方法

**1.2.1 斜面培养基:** 细菌斜面培养基采用牛肉膏蛋白胨培养基; 放线菌斜面培养基为高氏 1 号培养基; 真菌斜面培养基为 PDA 培养基。

**1.2.2 摇瓶种子培养基和产酶培养基:** 细菌摇瓶种子培养基和产酶培养基参考文献 [6], 放线菌和真菌培养基参考文献 [7]。

**1.2.3 培养方法:** 在 250mL 三角瓶中, 装入 30mL 种子培养基, 接入一环斜面菌种, 28℃

\* 国家科技部九五攻关项目

\*\* 现为华中农业大学研究生

\*\*\* 现在河南省金星啤酒厂工作

收稿日期: 1999-05-10, 修回日期: 1999-08-06

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

180r/min旋转摇床培养 20~30h, 供作种子。在 250mL 三角瓶中, 装入 25mL 产酶培养基, 接种量为 10%(v/v), 28℃ 180r/min 旋转摇床培养 4~6d, 取培养液于 4000r/min 离心 20min, 上清液即为粗酶液, 测定酶活力。

1.3 分析方法

1.3.1 几丁质酶活力测定: 按 Joshi 等<sup>[8]</sup>方法进行。取 0.6mL 发酵上清液加到 1.0mL 含 1% 胶体几丁质的磷酸缓冲液 (pH6.6) 中, 30℃ 保温 1h, 加入 1.5mL 3, 5-二硝基水杨酸试剂终止反应, 并加热 100℃ 10min, 冰浴冷却, 离心后取上清液在波长 530nm 下测吸光度, 计算出产生的 N-乙酰氨基葡萄糖 (NAG) 的含量。

酶活力单位定义: 在上述条件下, 每小时产生 0.5μmol NAG 所需酶量定为 1 个酶活力单位。

1.3.2 体积溶氧系数 kd 的测定: 亚硫酸钠氧化法<sup>[9]</sup>。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

将平板分离得到的 301 株几丁质降解菌, 经摇瓶复筛, 选出 6 株几丁质酶活力较高的菌株, 并进行了初步鉴定。6 株菌中, 链霉菌 (*Streptomyces*) 3 株, 高温单孢菌 (*Thermomonospora*) 1 株, 芽孢杆菌 (*Bacillus*) 2 株 (见表 1)。其中链霉菌 A<sub>048</sub> 酶活力最高, 且稳定性好, 培养液色浅。因此, 选择链霉菌 A<sub>048</sub> 来研究其产酶条件。

表1 6株几丁质酶产生菌酶活力比较

菌株	酶活力 (U/mL)
链霉菌 A <sub>044</sub>	11.4
链霉菌 A <sub>050</sub>	17.2
链霉菌 A <sub>048</sub>	18.4
高温单孢菌 A <sub>021</sub>	13.0
芽孢杆菌 B <sub>103</sub>	10.5
芽孢杆菌 B <sub>015</sub>	13.3

2.2 产酶条件试验

2.2.1 培养基 pH 对产酶的影响: 用 HCl 和 NaOH 溶液将放线菌产酶培养基起始 pH 值分

别调成 6.5, 7.0, 7.5 和 8.0, 另设一处理在培养过程中控制 pH 值为 7.2。培养结束, 测定酶活力, 结果列于表 2。从表 2 可以看出, 当培养基起始 pH 值为 6.5 时, 酶活力较低; pH7.0~7.5 时, 酶活力较高; 控制发酵过程 pH 为 7.2 时, 酶活力最高, 达到 24.0U/mL; 培养基起始 pH 为 8.0 时, 酶活力最低。所以, 培养基起始 pH7.0~7.5 或发酵过程控制 pH7.2 较为适宜。

表2 培养基pH对产酶的影响

培养基pH	酶活力 (U/mL)
起始pH6.5	17.1
起始pH7.0	20.2
起始pH7.5	20.3
起始pH8.0	15.5
控制pH7.2	24.0

2.2.2 产酶时程: 在 pH7.5 的产酶培养基中, 接入链霉菌 A<sub>048</sub> 液体种子, 振荡培养, 间隔 12~24h 取样测定酶活力。链霉菌 A<sub>048</sub> 自培养 24h 开始产酶, 120h 酶活力达到最高, 超过 120h 酶活力明显下降。

2.2.3 培养温度对产酶的影响: pH7.5 的产酶培养基接种后, 分别置于 25℃、30℃、35℃ 和 40℃ 下振荡培养, 培养 120h 取样测定酶活力。结果表明在 30℃ 时酶活力最高达 21.4U/mL, 低于 30℃ 或高于 30℃ 酶活力均较低。

2.2.4 体积溶氧系数 kd 对产酶的影响: 在 500mL 三角瓶中, 分别装入不同体积的 pH7.5 产酶培养基, 30℃ 下 180r/min 振荡培养 120h, 取样测定酶活力, 并用亚硫酸钠氧化法测定不同发酵条件下的 kd 值, 结果列于表 3。由表 3

表3 体积溶氧系数kd对链霉菌A<sub>048</sub>产几丁质酶的影响

kd [mol/(mL · min · atm)] × 10 <sup>-6</sup>	酶活力 (U/mL)
8.76	16.0
2.28	16.4
1.56	20.5
0.96	17.2

可见, 链霉菌 A<sub>048</sub> 产几丁质酶需要适宜的 kd 值。在 500mL 三角瓶中装入 75mL 培养液, 振荡培

养,  $k_d$  值为  $1.56 \times 10^{-6} \text{ mol} / (\text{mL} \cdot \text{min} \cdot \text{atm})$  时, 酶活力最高。当  $k_d$  值过大或偏小时, 都不利于产酶。

**2.2.5 不同形态几丁质对产酶的影响:** 作为几丁质酶的诱导物, 选用胶体几丁质代替产酶培养基中的粉碎几丁质, 比较胶体几丁质和粉碎几丁质对产酶的影响, 并考察适宜的用量, 结果见表 4。由表 4 可以看出, 作为诱导物, 几丁质显著优于胶体几丁质。几丁质的不同用量对产酶亦有较大的影响, 用量为 1% 时, 酶活力最高。

表4 不同形态几丁质对链霉菌  
*A<sub>048</sub>* 产几丁质酶的影响

诱导物浓度 (%)		酶活力 (U/mL)
几丁质	0.5	14.5
	1.0	21.0
	2.0	17.6
胶体几丁质	0.5	8.8
	1.0	12.2
	2.0	9.4

**2.2.6 氮源对产酶的影响:** 分别以不同的氮源代替产酶培养基中的氮源, 进行产酶实验。结果表明, 无机氮优于有机氮, 无机氮中以  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  为佳, 酶活力最高, 达到 25.1 U/mL, 其原因可能是  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  既含有硝态氮, 又含有氨态氮, 发酵过

表5 不同氮源对链霉菌 *A<sub>048</sub>*  
产几丁质酶的影响

氮源	浓度 (%)	酶活力 (U/mL)
蛋白胨	0.5	11.6
牛肉膏	0.5	14.8
酵母膏	0.5	16.4
尿素	0.3	17.2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.3	17.9
$\text{NaNO}_3$	0.3	18.2
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.3	25.1

程中对 pH 值的变化影响较小有关 (见表 5)。

## 参 考 文 献

- [1] 邱立友. 微生物学杂志, 1994, 14 (1): 66~70.
- [2] Lgnacio G C. J Food Sci, 1982, 47:901~905.
- [3] Vgas P, Deshpande M. J Gen Appl Microbiol, 1991, 37:267~275.
- [4] 邱立友, 赵柏叶, 顾溯海等. 武汉大学学报 (杀虫微生物专刊), 1998, 133~134.
- [5] 邱立友, 贾新成, 朱义彬等. 土壤肥料, 1994, (6): 37~39.
- [6] Morita J. Cand J Microbiol, 1969, 15:689~696.
- [7] Morita T. J Biochem, 1978, 83:893~903.
- [8] Joshi S, Kozlowski M, Richens S *et al.* Enzyme Microb Technol, 1989, 11:289~296.
- [9] Cooper C M. Indust Engin chem, 1944, 36:505.