

# 链霉菌 A048 产几丁质酶最佳发酵工艺研究\*

邱立友 王明道 戚元成 袁培林 贾新成

(河南农业大学生命科学学院 郑州 450002)

**摘要:** 将链霉菌 A048 在完全培养基中培养至对数生长末期, 离心洗涤收集菌丝体, 然后接种入发酵产酶培养基中, 进行二步发酵工艺生产几丁质酶, 几丁质酶活力比一步发酵工艺提高 1.1 倍, 发酵周期共 54 h, 比一步发酵工艺缩短 66h; 把菌丝体与几丁质粉共固定化, 接入发酵产酶培养基中培养 36 h, 几丁质酶活力比一步发酵工艺提高 1.8 倍, 发酵周期缩短 54 h; 在二步发酵工艺中另添加 0.4% 纤维素, 几丁质酶活力可提高 4 倍, 比一步发酵工艺提高 10 倍, 酶活力达 18.52 U/mL。采用几丁质和纤维素双因子诱导二步发酵工艺可能是链霉菌 A048 生产几丁质酶的最佳工艺。

**关键词:** 几丁质酶, 链霉菌, 发酵工艺

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0058-05

## Study on the Optimal Fermentation Process for Production Chitinase of *Streptomyces* sp. A048\*

QIU Li-You WANG Ming-Dao QI Yuan-Chen YUAN Pei-Lin JIA Xin-Cheng

(College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

**Abstract:** *Streptomyces* sp. A048 was cultured in a complete medium to the last stage of log phase, the hyphae were washed and collected by centrifugation. Then the hyphae were inoculated in liquid medium for chitinase production using two-step fermentation. Activity of chitinase produced by two-step fermentation was 1.1 times higher than that from one-step fermentation, and ferment cycle was for 54 hours, which was 66 hours shorter than that of one-step fermentation. The hyphae and the powder of chitin were co-immobilized and cultured in liquid medium for 36 hours, activity of chitinase was 1.8 times higher than that from one-step fermentation, and ferment cycle was 54h shorter than that of one-step fermentation. By adding 0.4% cellulose to two-step fermentation, activity of chitinase was 18.52 U/mL that was 4 times higher than that from the control and 10 times higher than that from one-step fermentation. Two step fermentation with chitin and cellulose may be the optimal fermentation process to produce Chitinase from *Streptomyces* sp. A048.

**Key words:** Chitinase, *Streptomyces*, Fermentation process

几丁质酶在很多方面都有着重要的应用。自然界尤其是在海洋, 每年生成的几丁质以亿吨计, 是储量仅次于纤维素的天然聚合物。将几丁质经几丁质酶酶解得到的几丁寡糖用于医疗保健具有降血脂、血糖和抗肿瘤等活性<sup>[1,2]</sup>; 用作植物生长物质, 能刺激植物产生植保素, 诱导病程相关蛋白等, 提高植物抗病抗逆性<sup>[3,4]</sup>。几丁质酶还可以作为增效剂与生物农药一起施用, 显著提高防治植物病虫害的效果<sup>[5]</sup>。

目前, 用于生产几丁质酶的菌株产酶活力不高, 尚未进行几丁质酶的工业化生产。

\* 国家“九五”攻关项目, (No. 96-Cr 01-02-01)

Key Technologies R&D Program in the 9th Five-year Plan of Chinese Nation (No. 96-Cr 01-02-01)

通讯作者 Tel: 0371-63555153, E-mail: qliyou@163.com

收稿日期: 2005-06-20, 修回日期: 2005-07-30

笔者实验室筛选出一株产几丁质酶活力较高的菌株链霉菌 A048, 并对其酶学性质及一步发酵产酶最适条件进行了研究<sup>[6,7]</sup>, 将其几丁质酶用于苏云菌杆菌杀虫剂增效剂防治烟青虫、玉米螟, 取得了良好的效果。本文报道的是应用二步发酵、共固定化发酵等工艺进一步提高链霉菌 A048 产几丁质酶活力的实验结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种: 链霉菌 (*Streptomyces* sp.) A048, 由河南农业大学微生物实验室提供。

1.1.2 斜面菌种培养基: 采用高氏一号培养基。

1.1.3 完全培养基: 葡萄糖 5g, 蛋白胨 5g, 酵母浸出膏 5g,  $K_2HPO_4$  0.5g,  $MgSO_4$  0.5g, KCl 0.5g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01g, 水定容至 1,000mL, pH7.2 ~ 7.3。每 250mL 三角瓶装量 50mL, 8 层纱布扎口。

1.1.4 发酵产酶培养基:  $K_2HPO_4$  0.5g,  $MgSO_4$  0.5g, KCl 0.5g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01g,  $NH_4NO_3$  4g, 几丁质粉 20g, 水定容至 1,000mL, pH7.2 ~ 7.3。每 250mL 三角瓶装量 50mL, 8 层纱布扎口。

### 1.2 方法

1.2.1 用于二步发酵和共固定化发酵的链霉菌 A048 菌丝体制备: 在装有完全培养基的三角瓶中接种一环链霉菌 A048 斜面孢子, 于 28℃ 下振荡 180r/min 培养适当时间, 将发酵液 2,000r/min 离心 20min 收集菌丝体, 用无菌水洗涤两次离心备用。

1.2.2 链霉菌 A048 菌丝体和几丁质共固定化: 将每个摇瓶培养收集到的菌丝体和 75mL 含有 1g 几丁质细粉的 2% 海藻酸钠溶液相混合, 充分搅拌均匀后, 用注射器逐滴滴加于 150mmol/L 的  $CaCl_2$  溶液中, 得到玻璃珠状共固定化球。

1.2.3 几丁质酶活力测定: 按 Imoto (1971) 的方法<sup>[8]</sup>: 取 0.5mL 酶液加入 1.5mL 1% 的胶体几丁质溶液, 在 40℃ 水浴中温浴 20min, 然后加入 4mL 铁氰化钾溶液, 在 100℃ 水浴中显色 10 min。离心或过滤后用分光光度计在 420nm 波长下测其吸光度。

酶活力单位定义为: 在 pH 值为 6.0、40℃ 条件下每分钟水解胶体几丁质产  $1\mu\text{mol}$  N-乙酰葡萄糖胺的酶量为一个酶活力单位。

## 2 结果与分析

### 2.1 链霉菌 A048 产几丁质酶二步发酵工艺

2.1.1 链霉菌 A048 在完全培养基中的生长曲线: 为了制备适当菌龄和菌丝量的菌丝体用于二步发酵和共固定化发酵, 首先测定了链霉菌 A048 在完全培养基中的生长曲线, 结果见图 1。从图 1 可见, 链霉菌 A048 在 0 ~ 12h 菌丝生长量较少, 处于延迟期; 培养 12 ~ 30h 菌丝增加迅速, 为对数生长期; 之后, 进入稳定期 (30 ~ 36h) 和衰亡期 (36 ~ 48h)。

2.1.2 链霉菌 A048 产几丁质酶二步发酵

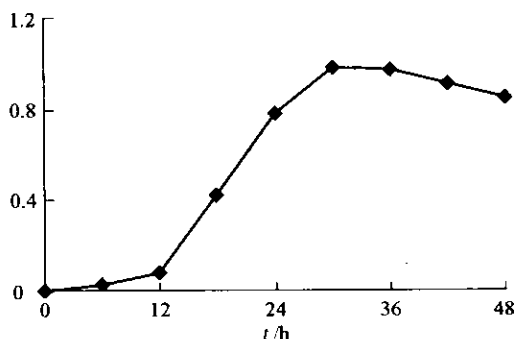


图 1 链霉菌 A048 在完全培养基中的生长曲线

工艺: 将每瓶培养 24h、30h 和 36h 制备的菌丝体分别接入一瓶产酶发酵培养基中, 28℃ 下 180r/min 振荡培养, 间隔 6h 取样测定几丁质酶活力。每个处理重复 3 次。培养不同时间制备的菌丝体接入产酶发酵培养基中, 培养 24h 均到达产酶高峰, 产酶活力最高的是培养 30h 制备的菌丝体, 其次是培养 36h 制备的菌丝体, 培养 24h 制备的菌丝体产酶活力最低 (见图 2)。原因可能是培养 24h 制备的菌丝体量偏少, 而培养 36h 制备的菌丝体菌丝量多, 但生活力有所下降, 产酶量低于培养 30h 的菌丝体。

## 2.2 链霉菌 A048 菌丝体与几丁质共固定化产酶发酵工艺

将培养 30h 菌龄的链霉菌 A048 菌丝体与几丁质共固定化得到的球接入产酶发酵培养基中, 28℃、180r/min 振荡培养, 每隔 6h 取样测定几丁质酶活力。结果表明, 培养至 36h 产酶达到最高峰 (见图 3)。

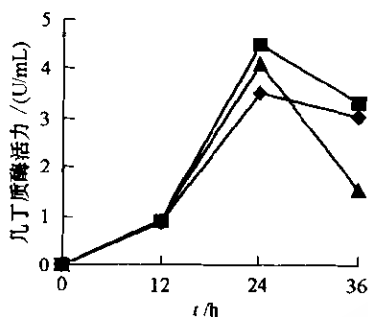


图 2 链霉菌 A048 二步发酵菌丝体菌龄对几丁质酶活力的影响

◆—24h 菌龄, ■—30h 菌龄, ▲—36h 菌龄

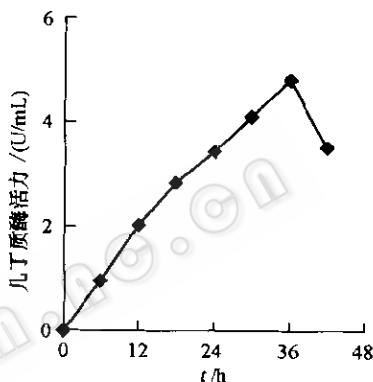


图 3 链霉菌 A048 共固定化发酵产酶曲线

## 2.3 二步发酵工艺、共固定发酵工艺与一步发酵工艺的比较

其它条件保持相同, 进行链霉菌 A048 产几丁质酶一步发酵、二步发酵和共固定化发酵, 分别在各个发酵方法的产酶高峰期, 一步发酵工艺于 120h、二步发酵工艺于发酵 24h 和共固定化发酵于 36h 测酶活力, 对此 3 种工艺的产酶活力进行比较。共固定发酵工艺产酶活力为 4.74U/mL, 比一步发酵工艺高 1.8 倍。二步发酵工艺产酶活力为 3.64U/mL, 比一步发酵工艺高 1.1 倍。共固定发酵工艺酶活力尽管较高, 但距达到实际生产水平仍有较大的差距。

## 2.4 几丁质和纤维素双诱导产酶二步发酵工艺

在二步发酵工艺中添加几丁质的同时添加 0.2% 纤维素作为另一诱导物, 接种制备的链霉菌 A048 的菌丝体进行产酶发酵, 与仅添加几丁质作为诱导物相比, 产酶高峰由后者的 24h 延至第 48h, 产酶活力提高 48.01% (见图 4)。进一步实验比较了纤维素不同添加量对链霉菌 A048 产几丁质酶的影响。添加 0.4% 的纤维素几丁质酶活力最高, 酶活力达 18.52 U/mL, 比不添加纤维素提高 4 倍, 其次是添加 0.6% 的纤维素, 酶活力为 16.24 U/mL, 比不添加纤维素提高 3.4 倍 (见图 5)。

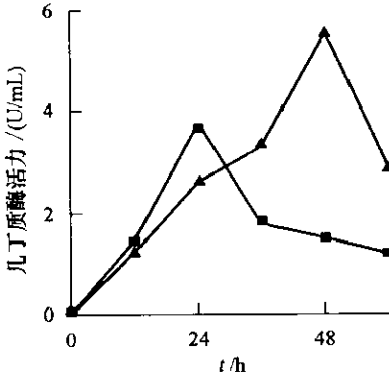


图 4 二步发酵工艺添加纤维素对链霉菌 A048 产几丁质酶的影响  
■ 不添加纤维素, ▲ 添加 0.2% 纤维素

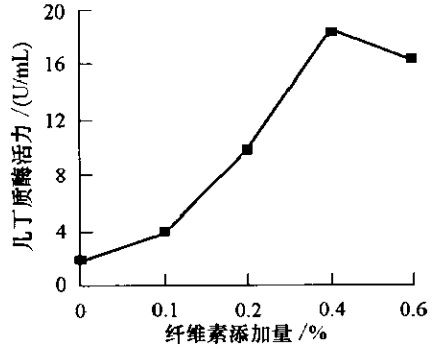


图 5 二步发酵工艺纤维素不同添加量对链霉菌 A048 产酶的影响

3 讨论

彭仁旺等<sup>[9]</sup>报道, 将球孢白僵菌进行二步发酵工艺生产几丁质酶, 几丁质酶产量比一步发酵工艺提高数十倍。认为二步发酵工艺既能使菌丝体生长良好, 又能使几丁质酶被充分诱导。我们的研究发现, 将链霉菌 A048 在完全培养基中培养至对数生长末期, 离心洗涤收集菌丝体, 然后接种入发酵产酶培养基中, 进行二步发酵工艺生产几丁质酶, 几丁质酶活力比一步发酵工艺提高 1.1 倍, 发酵周期共 54 h, 比一步发酵工艺缩短 66h。表明不论是球孢白僵菌, 还是链霉菌 A048, 几丁质酶合成的动力学类型均属于非生长偶联产物形成, 几丁质酶的产量只与菌丝量有关。二步发酵工艺生产周期短, 几丁质酶活力高, 表现出良好的实际应用前景, 但几丁质酶活力提高仅 1.1 倍, 有待进一步提高。

为了解决诱导物是不溶解性的诱导酶的连续或半连续生产, Vasseur<sup>[10]</sup>把细胞和不溶解底物共固定, 运用共固定化技术, 进行小单孢菌几丁质酶的生产, 酶活力比非固定化游离系统高得多。我们的研究表明, 把链霉菌 A048 的菌丝体与几丁质粉共固定化, 接入发酵产酶培养基中培养 36 h, 几丁质酶活力比一步发酵工艺提高 1.8 倍, 发酵周期缩短 54 h。但需要解决的问题是, 由于几丁质粉颗粒较大, 制成的固定化球直径比较大, 影响了球内菌丝体的供氧和酶的分泌, 有待进一步研究。

几丁质酶是诱导酶, 几丁质是有效的诱导物。研究表明, 几丁质酶的诱导是从头合成的, 要经过转录、翻译的过程。所以, 提高几丁质酶的产量, 需提高几丁质酶基因的表达量。Margolles-Clark 等<sup>[11]</sup>将里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 的纤维素酶基因的高效启动子 *cbh1* 与哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 的几丁质酶基因相连, 转入哈茨木霉, 在含纤维素的培养基中, 几丁质酶活力比非转化子高 10 倍, 而非转化子亦有基本水平的几丁质酶活力。说明几丁质酶的表达仅与启动子的表达效率有关, 纤维素亦能诱导哈茨木霉非转化子产生几丁质酶。

Pedraza-Reyes 等<sup>[12]</sup>指出, 由于几丁质和纤维素在组成结构上有很大的相似性, 所

以,几丁质酶和纤维素酶也表现出相当高的序列同源性,如它们的底物结合结构域很相似。但这两种酶基因的启动子序列是否有高的同源性,尚未见报道。我们的研究结果表明,采用几丁质和纤维素双因子诱导二步发酵,链霉菌 A048 产生的几丁质酶活力比只加几丁质诱导可提高 4 倍,其原因有待进一步探讨。

### 参 考 文 献

- [1] Yamami J, Tanigawa M, Ishiguro M, *et al.* Biosci Biochem, 1998, **62** (4): 825 ~ 828.
- [2] Cody R M. Biomass, 1990, **24** (4): 285 ~ 295.
- [3] Ayers A R, Ebel J, Fineli F, *et al.* Plant Physiol, 1976, **57** (2): 751.
- [4] Albershein P, Valens B S. J Cell Biology, 1978, **78** (30): 627.
- [5] 韦新葵, 雷朝亮. 湖北植保, 2002, **1**: 37 ~ 40.
- [6] 邱立友, 汪世山, 余功德, 等. 微生物学通报, 2000, **27** (4): 270 ~ 272.
- [7] 邱立友, 赵柏叶, 顾潮海, 等. 武汉大学学报, (杀虫微生物专刊), 1998, 133 ~ 134.
- [8] Imoto T. Agr Biol Chem, 1971, **35** (2): 289 ~ 296.
- [9] 彭仁旺, 管考梅, 黄秀梨. 微生物学报, 1996, **36** (2): 103 ~ 108.
- [10] Vasseur J. Biotech Letter, 1989, **11** (10): 735 ~ 738.
- [11] Margolies-Clerk E, Harman E G, Penttilä M. Appl Environ Microbial, 1996, **62** (6): 2152 ~ 2155.
- [12] Pedraza-Reyes M, Gutiérrez-Corona F. Arch Microbiol, 1997, **168** (4): 321 ~ 327.