

文章编号: 1000-5013(2010)06 0667-04

黏质沙雷氏菌产几丁质酶的发酵工艺优化

施腾鑫, 刘嘉, 贺淹才

(华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 利用均匀设计法, 优化一株黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)产几丁质酶培养基的组分; 同时, 利用正交设计法优化其摇瓶发酵产酶的条件. 研究结果表明, 最佳培养基组分(质量分数): 0.504% 胶体几丁质, 1.178% 酵母粉, 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.095% K_2HPO_4 , 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005% 山梨醇, 0.030% KH_2PO_4 ; 最佳摇瓶发酵工艺条件: 培养时间为 48 h, 发酵温度为 30 ℃, 初始 pH 值为 9.0, 装液量为 30 mL, 接种量为 1%. 在此优化条件下, 酶活力可达 $9.39 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 比未优化的产酶条件下酶活力提高了 81.6%.

关键词: 黏质沙雷氏菌; 几丁质酶; 均匀设计; 正交设计

中图分类号: TQ 920.6; TQ 929+.2 **文献标识码:** A

几丁寡糖和 N-乙酰氨基葡萄糖用途广泛, 除具有抗肿瘤等药用价值外, 其应用还涉及到工业、农业和环保等领域^[1-2]. 化学方法生产几丁寡糖和 N-乙酰氨基葡萄糖, 面临反应产物难以控制, 易造成环境污染等困难. 因此, 利用几丁质酶(Chitinase, EC3.4.1.14)降解、生产几丁寡糖和 N-乙酰氨基葡萄糖, 越来越引起人们的重视. 几丁质酶在实际中应用程度还比较低, 主要原因之一是所选菌株产酶能力太低. 目前, 仅仅对一些产几丁质酶的基因进行了克隆和序列分析, 因此, 优化微生物产几丁质酶的外部条件, 仍是提高微生物菌株产酶水平的主要方法之一^[3-4]. 采用常规优化法(即单因素法)优化几丁质酶发酵条件的研究已有大量报道, 而利用统计学方法优化几丁质酶生产的报道却比较少见^[5-6]. 本文通过常规优化法对黏质沙雷氏菌的产酶条件进行预试验, 结合均匀设计法和正交设计法, 对该菌的产几丁质酶培养基组分及发酵工艺条件进行优化.

1 材料与方法

1.1 菌株

黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*, ATCC14041), 购于中科院微生物研究所, 在 Eppendorff 管中添加质量分数为 20% 的甘油, 并于-70 ℃下保存.

1.2 试剂与仪器

(1) 试剂. 几丁质粉(美国 Sigma 公司); 蛋白胨、酵母粉(英国 Oxoid 公司); 其他试剂为国产分析纯. (2) 仪器. Micromax (RF) 小型台式(冷冻)离心机(北京博奥恒信生物科技有限公司); HYG-II 恒温调速摇瓶柜(上海欣蕊自动化设备有限公司); SP-2000 型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司).

1.3 培养基

基础培养基(1 L): 含 0.5 g 胶体几丁质, 1.0 g 蛋白胨, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.07 g K_2HPO_4 , 0.03 g KH_2PO_4 , 0.001 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH=7.0~7.2. 胶体几丁质的制法参考文[7].

1.4 粗酶液制备

从-70 ℃冰箱中接取保存于 Eppendorf 管中的菌种, 接种于种子培养基中, 于 30 ℃, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下培养 12 h. 然后, 按 1% 的接种量接种于盛有 50 mL 基础培养基的 250 mL 的三角烧瓶中, 于

收稿日期: 2009-01-04

通信作者: 贺淹才(1949-), 男, 教授, 主要从事生物化学与分子生物学的研究. E-mail: yche@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C04010011)

30 ℃, 180 r · min⁻¹ 的条件下恒温振荡培养. 最后, 于离心机(10 000 r · min⁻¹) 中离心发酵液 15 min, 上清液即为粗酶液.

1.5 几丁质酶活力测定

采用 3, 5 二硝基水杨酸(DNS)法^[8]测定几丁质酶的酶活力. 取发酵液于 4 ℃下离心(10 000 r · min⁻¹) 10 min, 将 0.5 mL 上清液和 1 mL 的 Mcllvaine's 缓冲液与 0.5 mL 胶体几丁质混合; 于 50 ℃ 中水浴反应 1 h, 煮沸 10 min, 离心(10 000 r · min⁻¹) 5 min. 取 0.5 mL 上清液加入 0.5 mL 的 DNS, 煮沸 5 min, 迅速冷却, 加入 4 mL 蒸馏水, 于波长 540 nm 处测光密度值(*D*), 结果为 3 次平行实验的平均值. 酶活力单位定义: 在上述条件下, 每分钟产生 1 μmol 还原糖所需酶量为 1 个酶活力单位.

2 结果与讨论

2.1 产酶曲线

将活化的液体种子接种于产酶培养基, 间隔 12 h 取样测定酶活力, 其产酶曲线图如图 1 所示.

2.2 发酵工艺条件对黏质沙雷氏菌产酶的影响

2.2.1 培养时间 从图 1 可知, 黏质沙雷氏菌培养 12 h 后开始产几丁质酶, 至第 48 h 酶活力达到最高, 以后逐步下降.

2.2.2 碳源 去除产酶培养基中的蛋白胨, 分别以质量分数为 0.5% 的葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、几丁质粉和胶体几丁质作为碳源, 其他成分不变. 培养 48 h 后, 测定几丁质酶的酶活力(*z*), 比较碳源对黏质沙雷氏菌产酶影响, 结果如表 1 所示.

从表 1 可知, 在非几丁质底物作用下, 菌株不产生几丁质酶. 这表明, 该几丁质酶为诱导酶, 且胶体几丁质是该酶的高效诱导物.

2.2.3 氮源 在基础培养基中, 分别以质量分数为 1% 的蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、尿素, (NH₄)₂ SO₄, NH₄ NO₃, KNO₃, NH₄ Cl 作为氮源, 其他成分不变. 培养 48 h 后, 测定几丁质酶活力(*z*), 考察有机氮源和无机氮源对黏质沙雷氏菌产酶影响, 结果如表 1 所示. 从表 1 可知, 有机氮对产酶有一定促进作用且以酵母粉为最佳, 其他无机氮则对产酶具有一定的不利影响.

表 1 碳源与氮源对黏质沙雷氏菌产酶的影响

Tab.1 Effect of carbon and nitrogen sources on chitinase production by *S. marcescens*

碳源 <i>z</i> /μkat · L ⁻¹	葡萄糖		蔗糖		可溶性淀粉		几丁质粉		胶体几丁质	
	-		-		-		0.80		3.62	
氮源 <i>z</i> /μkat · L ⁻¹	蛋白胨	牛肉膏	酵母粉	尿素	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ NO ₃	KNO ₃	NH ₄ Cl		
	2.62	1.45	3.30	0.35	0.40	0.18	4.83	0.25		

2.2.4 表面活性剂 在基础培养基中分别加入质量分数为 0.02% 的 SDS, 液体石蜡, Triton X-100, 吐温-80, 山梨醇, PEG-8000, 其他成分不变. 培养 48 h 后, 测定几丁质酶活力, 考察不同表面活性剂对黏质沙雷氏菌产酶的影响, 结果如图 2 所示.

从图 2 可知, 山梨醇对菌株的产酶水平有较为明显的提高; PEG-8000 对提高产酶的效果不明显; 而 SDS、液体石蜡、Triton X-100 及吐温-80 对该菌产几丁质酶有一定抑制作用. 这可能是, 由于非离子表面活性剂与酶分子之间仅存在氢键和疏水作用, 因而其抑制性较弱, 但不同的表面活性剂间的抑制性仍有差别.

2.2.5 发酵温度 将黏质沙雷氏菌于不同温度环境下培养产酶, 结果如图 3 所示. 从图 3 可以看出, 黏质沙雷氏菌在 28~ 30 ℃时, 产酶能力较为稳定. 其中, 在

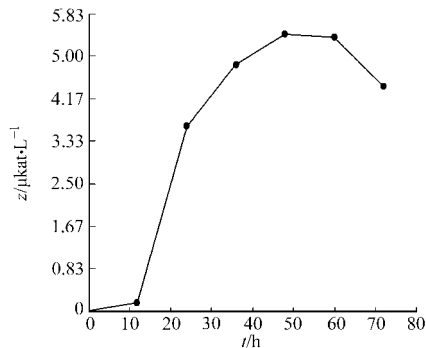


图 1 黏质沙雷氏菌产酶曲线图

Fig.1 Curve of chitinase production output by *S. marcescens*

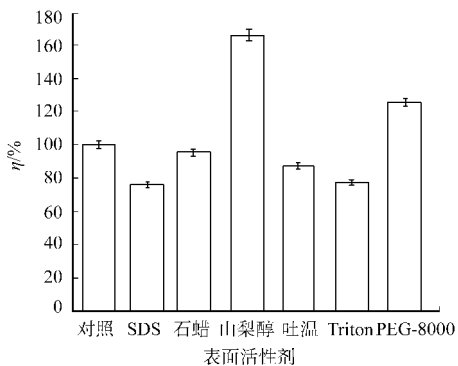


图 2 表面活性剂对黏质沙雷氏菌产酶的影响

Fig.2 Effect of surfactants on chitinase production by *S. marcescens*

30 ℃时的产酶水平最高, 而高于 30 ℃, 酶活力迅速降低.

2.2.6 初始 pH 值 将黏质沙雷氏菌于不同 pH 值环境下培养产酶, 结果如图 4 所示. 从图 4 可知, 当培养基起始 pH 值为 9.0 时, 酶活力最高; 当 pH 值在 8.5~ 11.0 范围内, 该黏质沙雷氏菌产酶稳定; 而当 pH 值低于 8.5 时, 酶活力迅速下降. 该菌耐碱性较好, 但对酸性环境敏感.

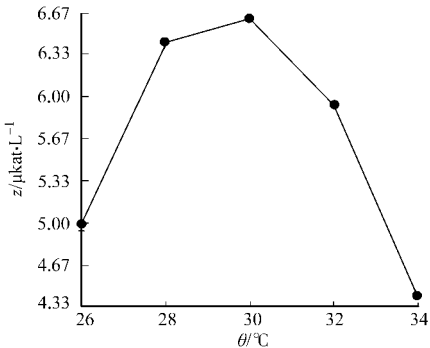


图 3 发酵温度对黏质沙雷氏菌产酶的影响

Fig.3 Effect of incubation temperature on chitinase production by *S. marcescens*

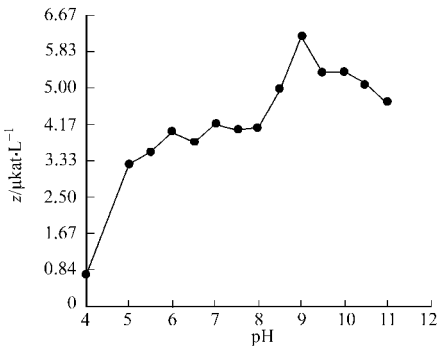


图 4 起始 pH 值对黏质沙雷氏菌产酶的影响

Fig.4 Effect of initial pH on chitinase production by *S. marcescens*

2.3 产酶培养基组分的优化

以培养基中胶体几丁质、酵母粉、山梨醇, MgSO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 为因素, 进行均匀设计. 在 30 ℃, 初始 pH 值为 9.0, $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下振荡培养 48 h 后测定酶活力, 结果如表 2 所示. 表 2 中: $X_1\sim X_6$ 分别为胶体几丁质, 酵母粉, MgSO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , 山梨醇的质量分数; Y 为酶活力. 用 DPS V 7.05 统计软件进行回归分析, 可得回归方程为

$$Y = 0.413 - 3.047X_4 - 0.129X_1X_2 + 3.484X_1X_3 + 19.922X_3X_4 - 194.399X_3X_5 + 209.608X_4X_5 - 98.2X_5X_6.$$

其中, 相关系数 R 为 0.974, 经 F 值检验合格; 显著水平 P 为 0.019(小于 0.05), 已达显著水平.

根据回归方程, 当 X_1 (胶体几丁质) 为 0.504%, X_2 (酵母粉) 为 1.178%, X_3 (MgSO_4) 为 0.025%, X_4 (K_2HPO_4) 为 0.095%, X_5 (KH_2PO_4) 0.030%, X_6 (山梨醇) 0.005% 时, Y 值(酶活力) 达到最大值 $9.30\text{ }\mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$. 3 次重复试验, 酶活力达 $(9.30\pm0.67)\text{ }\mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$, 接近预测值.

表 2 培养基配方均匀设计表

Tab.2 Uniform design table of the culture medium components

实验号	$X_1/\%$	$X_2/\%$	$X_3/\%$	$X_4/\%$	$X_5/\%$	$X_6/\%$	$Y/\mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$
1	1.000	0.800	0.150	0.075	0.025	0.015	7.500
2	0.250	1.200	0.100	0.080	0.020	0.010	5.030
3	0.500	1.000	0.150	0.095	0.005	0.015	9.200
4	1.000	0.200	0.050	0.080	0.005	0.020	7.920
5	0.500	0.600	0.025	0.090	0.015	0.010	5.650
6	0.750	0.400	0.075	0.095	0.020	0.030	7.650
7	0.250	0.800	0.075	0.075	0.010	0.030	5.320
8	0.250	0.200	0.125	0.085	0.030	0.025	3.450
9	0.750	0.400	0.100	0.070	0.010	0.005	7.980
10	0.750	0.800	0.050	0.090	0.030	0.005	7.970
11	1.000	1.200	0.100	0.085	0.015	0.025	7.630
12	0.250	1.000	0.025	0.070	0.025	0.020	7.030

2.4 发酵工艺条件的优化

以培养时间(A)、初始 pH 值(B)、发酵温度(C)、装液量(D) 为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 表进行正交实验, 如表 3 所示. 根据单因素考察接种量的影响, 说明接种量对黏质沙雷氏菌诱导产酶没有明显影响. 这可能是在营养丰富的环境中, 黏质沙雷氏菌迅速增殖, 由接种量不同所带来的影响被很快持平.

由表 3 的极差值 R 可看出, 4 个因素中发酵时间影响最为显著. 各因素对试验结果影响排名依次

为 $A > B > D > C$, 其最优水平组合为: $A2-B3-C2-D1$. 即培养时间为 48 h、起始 pH 值为 9.5、发酵温度为 30 ℃、250 mL 三角瓶装量为 30 mL.

根据试验结果分析选出的最优培养基和培养条件, 进行 3 次摇瓶产酶验证, 均值为 $(9.39 \pm 0.83) \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$. 这说明, 优化后的参数是可靠的, 比优化前酶活力 $(5.15 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1})$ 提高了 81.6% .

3 结束语

采用均匀设计结合正交设计进行发酵条件优化, 所得酶活力最大值为 $9.39 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 说明优化方法是行之有效的. 该黏质沙雷氏菌产酶环境的最适 pH 值为 9.5, 耐碱能力较强, 因此, 利用该菌在盐碱地上进行几丁质废料的降解有着诱人的前景.

参考文献:

[1] SUZUKI K, MIKAMI T, OKAWA Y, et al. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexose and chitohexose[J]. Carbohydr Res, 1986, 151: 403-408.

[2] 韩宝芹, 余长缨, 刘万顺, 等. 几丁质酶研究现状及展望[J]. 中国海洋药物, 2001, 83(5): 41-43.

[3] 孙胜利, 喻子牛, 贾新成. 微生物产几丁质酶的研究和应用进展[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(5): 47-50.

[4] 张荣奎, 贺淹才, 刘爱花, 等. 土壤产几丁质酶菌株的筛选鉴定及产酶条件[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2007, 28(2): 178-181.

[5] 陶勇, 龙章富, 金虹, 等. 均匀设计法对产几丁质酶细菌 C4 发酵条件的优化[J]. 生物技术, 2004, 14(6): 44-46.

[6] 田强, 张彩, 吴子健. 几丁质酶生产菌的诱变育种及摇瓶发酵条件优化[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 405-409.

[7] JEUNIAUX C. Methods in enzymology[M]. New York: Academic Press, 1966: 644-650.

[8] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验技术[M]. 北京: 高教出版社, 1997: 111-116.

Culture Parameter Optimization of Chitinase Production by *Serratia marcescens*

SHI Teng-xin, LIU Jia, HE Yan-cai

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: Chitinase-producing *Serratia marcescens* culture medium components and culture conditions of enzyme production by shake flask fermentation were optimized with uniform-design and orthogonal-design respectively. The results showed that the optimal component concentrations (m/m) were colloid chitin 0.504%, yeast extract 1.178%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, K_2HPO_4 0.095%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, sorbitol 0.005%, KH_2PO_4 0.030%. The optimal culture conditions were incubation time 48 h, temperature 30 ℃, initial pH 9.0, loadage 30 mL per 250 mL flask, inoculation quantity 1%. The activity of chitinase reached $9.39 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ which was increased by 81.6% than that of the unoptimized conditions. .

Keywords: *Serratia marcescens*; chitinase; uniform-design; orthogonal-design

表 3 发酵工艺条件正交实验结果
Tab.3 Orthogonal design result of
the optimal culture conditions

试验号	A/h	B	C/℃	D/mL	$z/\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$
1	36(1)	8.5(1)	28(1)	30(1)	5.93
2	36(1)	9.0(2)	30(2)	50(2)	4.88
3	36(1)	9.5(3)	32(3)	70(3)	5.42
4	48(2)	8.5(1)	30(2)	70(3)	6.58
5	48(2)	9.0(2)	32(3)	30(1)	7.10
6	48(2)	9.5(3)	28(1)	50(2)	6.12
7	60(3)	8.5(1)	32(3)	50(2)	4.07
8	60(3)	9.0(2)	28(1)	70(3)	3.37
9	60(3)	9.5(3)	30(2)	30(1)	6.80
R	0.111 3	0.060 0	0.056 7	0.095 7	
K1	0.973 0	0.995 0	0.925 0	1.190 0	
K2	1.188 0	0.920 0	1.095 0	0.903 0	
K3	0.854 0	1.100 0	0.995 0	0.922 0	

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 陈国华)