

文章编号: 1000-5013(2011)01-0067-05

黏质沙雷氏菌产几丁质酶二步发酵工艺的优化

施腾鑫, 贺淹才, 刘嘉, 舒静波, 周娟

(华侨大学 工业生物技术研究所, 福建 泉州 362021)

摘要: 采用二步发酵法, 研究黏质沙雷氏菌的产几丁质酶发酵条件. 在二步发酵产酶的过程中, 通过单因素法优化得到二步发酵培养基中最适碳源、氮源的质量分数和菌龄, 同时选取发酵时间、初始 pH 值、接种菌体量和装液量 4 个因子进行正交试验. 最终得到的最优条件: 胶体几丁质质量分数为 0.8%, 酵母粉质量分数为 1.0%, 菌龄为 12 h, 发酵时间为 72 h, 初始 pH 值为 8.5, 菌体干质量为 90 mg, 装液量为 20 mL. 在此条件下, 酶活力可达 $17.020 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$. 另外, 在二步发酵工艺中添加 0.1% 纤维素, 酶活力可提高至 $18.804 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 比一步发酵提高 1.27 倍.

关键词: 黏质沙雷氏菌; 几丁质酶; 二步发酵; 一步发酵; 优化

中图分类号: Q 814.1; TQ 920.6

文献标识码: A

几丁质酶(Chitinase, EC3.2.1.14)是一种可催化水解几丁质的诱导酶^[1]. 其来源广泛, 应用前景广阔, 在农业、环保、食品、化妆品和生物技术等领域均有涉及^[2-7]. 但是, 由于所选菌株产酶能力低, 几丁质酶和几丁寡糖的工业化生产及广泛应用受到制约. 由于构建几丁质酶基因工程高产菌技术至今尚未取得突破性进展^[8], 因此, 寻找合适的发酵工艺条件, 仍然是提高微生物菌株产酶水平的重要手段之一^[9]. 传统的一步发酵法是将活化的种子液接入培养基中诱导产酶, 进而对产酶的一系列条件进行优化^[10-13]. 但该方法的产酶效率有限. 二步发酵是将菌体生长阶段和诱导产酶阶段分开, 从而降低产物对产酶的抑制作用并用并提高菌体浓度^[14], 提高产酶效果. 本文从减少反馈抑制的思路出发, 利用单因素考察和正交设计法, 对一株黏质沙雷氏菌的二步发酵产酶工艺条件进行优化.

1 材料与方法

1.1 供试菌株

黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens* ATCC14041), 购于中科院微生物研究所.

1.2 试剂及仪器

几丁质(美国 Sigma 公司), 蛋白胨、酵母粉(英国 Oxoid 公司); 羧甲基纤维素(CMC, 中国医药集团), 其他试剂均为分析纯. HYG-II 型恒温调速摇瓶柜(上海欣蕊自动化设备有限公司), Micromax RF 小型冷冻离心机(美国 Thermo 公司), 4K15 大型冷冻离心机(美国 Sigma 公司).

1.3 培养基

LB 培养基(质量分数): 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 1% NaCl, pH 值自然; 已优化的一步发酵培养基(质量分数): 0.5% 胶体几丁质, 1.2% 酵母粉, 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.095% K_2HPO_4 , 0.03% KH_2PO_4 , 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 值为 7.0~7.2.

1.4 几丁质酶活力测定

参照 Nawani 法^[15], 把 0.5 mL 胶体几丁质与适当稀释的 0.5 mL 酶液置于 50 °C 水浴中反应 1 h, 用 DNS 法^[16]测定. 酶活力单位(kat)定义: 在 50 °C 下, 每分钟释放出相当于 1 μmol 的 N-乙酰葡萄糖

收稿日期: 2009-12-27

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)

胺(NAG)所需要的酶量.

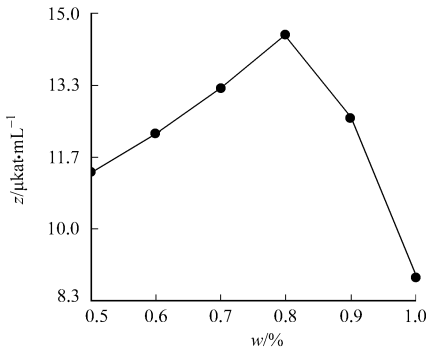
1.5 二步发酵法

将活化的黏质沙雷氏菌液体种子接种到 LB 培养基,菌体细胞扩增培养 12 h 后,于 4 ℃,10 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,弃上清. 将菌体沉淀用生理盐水(0.9%的 NaCl 溶液) 洗涤两次后,接种到产酶培养基中,于 30 ℃,200 r · min⁻¹ 下诱导产酶. 菌体干质量定义:一定体积的发酵液经离心后收集菌体,将菌体烘干至恒质量,所得质量即为菌体干质量.

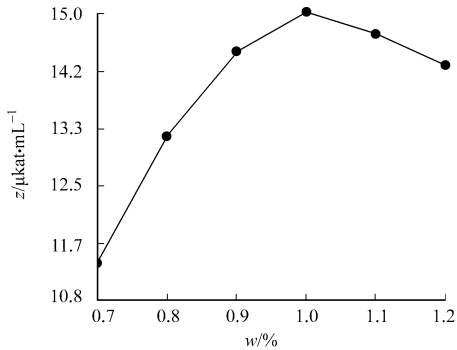
2 结果与分析

2.1 碳源和氮源优化

实验中发现,在菌体接入产酶培养基后进行诱导产酶尚有一段过渡期,适量添加氮源会收到更好的效果. 与一步发酵相比,二步发酵在接种量和菌体生长环境上存在较大差异,因此对一步发酵培养基的碳氮源进一步优化. 以不同质量分数(w) 胶体几丁质和酵母粉为碳源和氮源,其产酶进程分别如图 1 (a),(b)所示.



(a) 几丁质



(b) 酵母粉

图 1 几丁质和酵母粉对黏质沙雷氏菌产酶影响

Fig. 1 Effects of chitin and yeast powder on chitinase production by *Serratia marcescens*

由图 1 可看出,二步发酵产酶培养基胶体几丁质和酵母粉的最佳质量分数分别为 0.8% 和 1.0%. 碳源质量分数比一步发酵培养基提高了 0.3%. 由于接种菌体量比一步发酵大大增加,诱导产酶所需的几丁质质量分数偏高,而这又会导致溶氧量不足;氮源质量分数比原培养基降低 0.2%,可能是由于菌体细胞在 LB 培养基中已经得到良好生长,在诱导产酶期所需的营养物减少.

2.2 二步发酵产酶曲线

培养时间(t_1)对二步发酵产酶的影响,如图 2 所示. 黏质沙雷氏菌在接种到产酶培养基后,于 30 ℃,200 r · min⁻¹,接种龄 24 h 下振荡培养,第 48 h 酶活力达到顶峰,之后下降进入平台期. 菌株从接种后约 24 h 开始产酶,增幅明显. 可见,在菌体生长和诱导产酶之间尚有一个过渡期,培养时间是影响该菌产几丁质酶的一个重要因素.

2.3 接种龄对产酶的影响

接种龄的大小,直接影响生产效率. 接种龄太小达不到前期生长的目的,接种龄过大则导致菌体细胞衰老影响产酶效率. 考察接种龄(t_2)对产酶的影响,结果如图 3 所示.

从图 3 可知,当培养至 48 h 时,各菌龄产酶曲线均有明显峰值出现,之后趋于平缓. 其中以 12 h 的菌龄酶活力最高且出现时间最早,表明 12 h 菌龄的菌体细胞产酶活力最强,故选取培养 12 h 的菌体作为最佳接种龄.

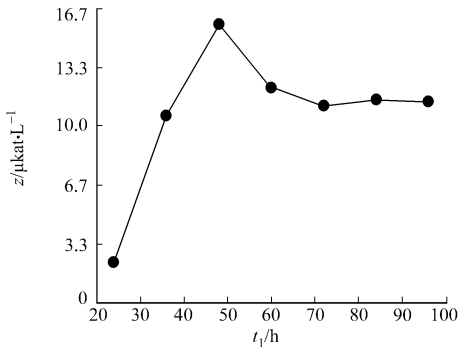


图 2 二步发酵产酶曲线

Fig. 2 Curves of chitinase production by two-step fermentation

2.4 接种菌体量对产酶的影响

考察接种的菌体干质量对产酶的影响,结果如图 4 所示. 随着接种菌体量的增加,产酶呈现下降趋势. 由于该黏质沙雷氏菌为对溶氧要求高,接种菌体量过大易导致溶氧恶化,不利于提高产酶效果.

2.5 初始 pH 对产酶影响

发酵过程中的 pH 变化难以控制. 初始 pH 值对产酶的影响,如图 5 所示. 黏质沙雷氏菌在初始 pH 值为 8.5 时,其产酶达到最高峰,较一步发酵的最适产酶 pH 值低 0.5 个单位. 二步发酵比一步发酵所需的最适 pH 值偏低,可能是因为菌体细胞在 LB 培养基中已经得到良好生长,接入产酶培养基后减少了代谢产物的积累所致.

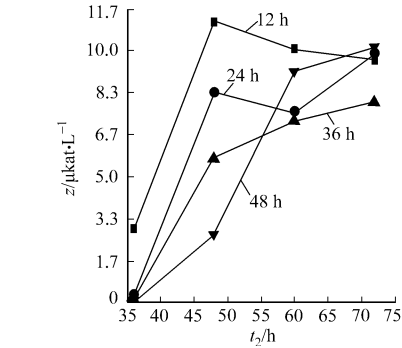


图 3 接种龄对产酶的影响
Fig. 3 Effect of bacteria age on chitinase production

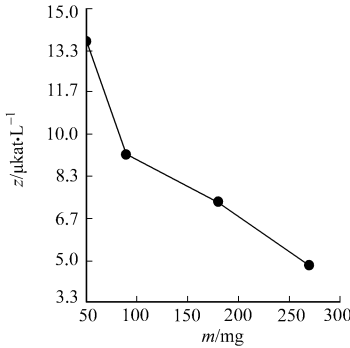


图 4 接种菌体量对产酶的影响
Fig. 4 Effect of bacteria dry weight on chitinase production

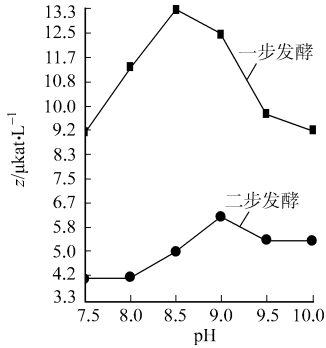


图 5 初始 pH 值对产酶的影响
Fig. 5 Effect of initial pH value on chitinase production

2.6 正交实验

选择产酶时间(A)、接种菌体量(B)、初始 pH 值(C)和装液量(D)4 个因素,按 $L_9(3^4)$ 表进行正交实验. 优化处理后的试验结果及分析,如表 1 所示.

从表 1 的极差 R 可以看出,所考察 4 个因素中初始 pH 值的影响最为显著. 各因素对试验结果影响力大小顺序: $D>A>C>B$,其最优水平组合为 $A_3B_2C_1D_3$. 即发酵时间为 72 h,接种菌体干质量为 90 mg,250 mL 三角瓶的装液量为 20 mL,初始 pH 值为 8.5. 实验重复 3 次后,酶活力可达 $(17.02 \pm 0.50) \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$

2.7 一步发酵与二步发酵产酶过程比较

为了考察优化后的二步发酵工艺的产酶效果,将一步发酵和二步发酵产酶过程进行比较,如图 6 所示. 二者均在各自的最优条件下进行(一步发酵条件为 $30\text{ }^\circ\text{C}$, $200\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 初始 pH 值为 9.0).

从图 6 可以看出,虽然优化后的二步发酵产酶过程的峰值出现时间比一步发酵略有滞后,但酶活力却比一步发酵提高了 1.05 倍,且产酶稳定性大为改善.

2.8 几丁质和纤维素协同诱导产酶

考察作为协同诱导物的羧甲基纤维素(CMC)对黏质沙雷氏菌产几丁质酶的影响(未添加纤维素组为 100%),结果如图 7 所示. 在二步发酵工艺中,添加胶体几丁质的同时添加质量分数为 0.1%~0.5%的 CMC 作为另一诱导物,接种约 90 mg 干质量的黏质沙雷氏菌的菌体进行诱导产酶. 从图 7 可知,添加 0.1%的 CMC 与胶体几丁质协同诱导所产几丁质酶活力最高,可达 $18.804 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$. 通过对比,协同诱导产酶结果比仅添加几丁质作为诱

表 1 二步发酵工艺优化试验数据
Tab. 1 Results of orthogonal test for the optimization of two-step fermentation condition

实验组	因素				$\sigma/\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$
	A/h	B/mg	C	D/mL	
1	48	50	20	7.5	11.769
2	48	90	30	8.0	10.652
3	48	180	50	8.5	11.836
4	60	50	30	8.5	13.853
5	60	90	50	7.5	11.986
6	60	180	20	8.0	0.707
7	72	50	50	8.0	11.069
8	72	90	20	8.5	16.570
9	72	180	30	7.5	14.786
R	0.163	0.050	0.104	0.175	
k_1	0.685	0.734	0.802	0.771	
k_2	0.752	0.784	0.786	0.670	
k_3	0.848	0.768	0.698	0.845	

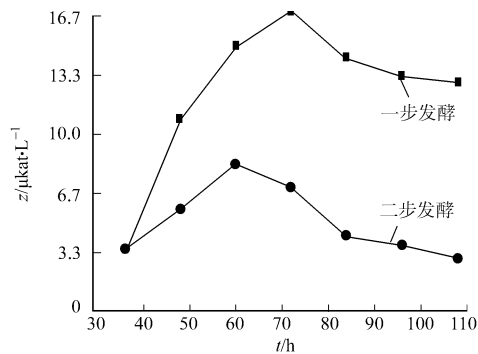


图 6 发酵产酶过程比较

Fig. 6 Comparison of two-step fermentation and one-step fermentation on chitinase production

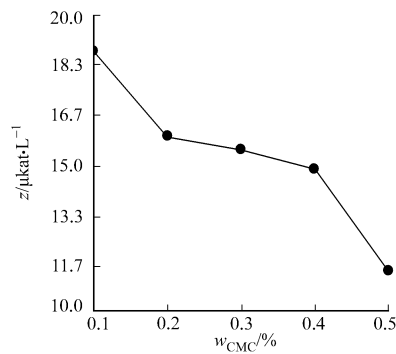


图 7 纤维素对产酶的影响

Fig. 7 Effect of CMC content in culture medium on chitinase production by *Serratia marcescens*

导物的二步发酵酶活力提高了 10.5%，比一步发酵提高了 1.27 倍。

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^[17]。邱立友等^[18]采用纤维素和几丁质协同诱导链霉菌 A048 产几丁质酶，其酶活力比未添加组提高了 4 倍。

然而，本研究却发现，采用纤维素(CMC)和几丁质协同诱导，0.1%的 CMC 添加量只比未添加组提高 10.5%，未达到显著提高黏质沙雷氏菌几丁质酶活力的目的。这可能是由于真菌和细菌在几丁质酶的表达调控体系上的不同所致。此外，由于 CMC 是一种增稠剂，持续添加 CMC 将稠化发酵体系，会造成溶氧减少。

3 讨论

目前，国内关于二步发酵的研究尚在起步，用于产酶的报道也较少见^[18-20]。文中从减少反馈抑制的角度入手，首次采用二步发酵法对黏质沙雷氏菌进行诱导产酶，与采用传统的一步发酵法相比，效果更为显著。研究是在单因素实验的基础上，采用正交设计对工艺参数进一步优化。在此基础上，采用 CMC 与胶体几丁质协同诱导，使该菌株产几丁质酶活力达到 18.804 μkat · L⁻¹，比采用原来的一步发酵法产酶量提高了 1.27 倍，这与邱立友等^[18]的研究结果相仿。

优化得到的二步发酵工艺使该菌株产酶能力达到一些高产菌株的水平^[21]。实验结果表明，采用二步发酵法能较为显著地提高黏质沙雷氏菌的产酶活力。为了在生产应用中进一步提高生产效率，还必须解决菌体的回收利用问题。本研究已尝试使用 PVA(聚乙烯醇)复合海藻酸钠凝胶包埋法，同几丁质一起固定该黏质沙雷氏菌细胞产酶，但产酶提高不明显。究其原因可能是，菌体的包埋增大了传质阻力，而该菌对溶氧量有较高要求。为此可以考虑采用其他固定化工艺如吸附法等手段进行反复发酵，但载体的选择非常关键。

采用二步发酵法生产几丁质酶，比采用传统的一步发酵展现出更大的优势。但是，为了工业化生产的需要，今后还必须设计相应合理的发酵设备并改进相关工艺。

参考文献：

[1] PATIL R S,GHORMADE V,DESHPANDE M V. Chitinolytic enzymes: An exploration[J]. Enzyme Microbiotechnology,2000,26(7):473-483.

[2] ORDENTLICH A, ELAD Y, CHET I. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*[J]. Phytopathology,1988,78:84-88.

[3] SHAPIRA R,ORDENTLICH A,CHET I,et al. Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*[J]. Phytopathology,1989,79:1246-1249.

[4] REVAH-MOISEEV S,CARROD P A. Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single-cell protein[J]. Biotechnol Bioeng,1981,23(5):1067-1078.

[5] VYAS P,DESHPANDE M V. Chitinase production by *Myrothecium verrucaria* and its significance for fungal myce-

lia degradation[J]. J Gen Appl Microbiol, 1989, 35: 343-350.

[6] IZUMEM, OHTAKARRA. Preparation of *D*-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan [J]. Agric Biol Chem, 1987, 51(4): 1189-1191.

[7] 陈少波, 吴根福. 几丁质酶研究进展[J]. 科技通报, 2004, 20(5): 258-262.

[8] MORISSETTE D C, DRISCOLL B T, JABAJI H S. Molecular cloning, characterization and expression of a cDNA encoding an endochitinase gene from mycoparasite *Stachybotryselegans* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2003, 39(3): 276-285.

[9] 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.

[10] 吴绵斌, 夏黎明, 岑沛霖. 绿色木霉合成几丁质酶条件的研究[J]. 化学反应工程与工艺, 1999, 15(2): 179-185.

[11] 张莉, 杨土凤, 陈晓梅, 等. 气单胞菌几丁质酶的产酶条件优化研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(17): 5035-5037, 5039.

[12] NAWANI N N, KAPADNIS B P. Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(2): 651-660.

[13] MADHAVAN N K, BAIJU T V, SANDHYA C, et al. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum* [J]. Process Biochemistry, 2004, 39(11): 1583-1590.

[14] 彭仁旺, 管考梅, 黄秀梨. 球孢白僵菌两种胞外几丁质酶的诱导和纯化[J]. 微生物学报, 1996, 36(2): 103-108.

[15] NAWANI N N, KAPADNIS B P, DAS A D, et al. Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93(6): 965-975.

[16] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 111-116, 165-171.

[17] PEDRAZA-REYES M, GUTIERREZ-CORONA F. The bifunctional enzyme chitosanase-cellulase produced by the gram-negative microorganism *Myxobacter* sp. AL-1 is highly similar to *Bacillus subtilis* endoglucanases [J]. Archives of Microbiology, 1997, 168(4): 321-327.

[18] 邱立友, 王明道, 戚元成, 等. 链霉菌 A048 产几丁质酶最佳发酵工艺研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 58-62.

[19] 孙胜利, 喻子牛, 贾新成. 影响灰褐链霉菌 S1001 产碱性几丁质酶的因素[J]. 中国病毒学, 2000, 15(S1): 258.

[20] 邓毛程, 王瑶, 阳元娥. 蔗糖二步发酵法提高细菌纤维素产量的研究[J]. 甘蔗糖业, 2004(2): 30-32, 47.

[21] 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.

Optimization of Chitinase Production by *Serratia marcescens* with Two-Step Fermentation

SHI Teng-xin, HE Yan-cai, LIU Jia,
SHU Jing-bo, ZHOU Juan

(Institute of Industrial Biotechnology, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: Two-step fermentation was used to investigate the fermentation conditions of chitinase production by *Serratia marcescens*. The optimum bacterial age and the concentrations of carbon source and nitrogen source in the two-step fermentation were obtained through single factor method. At the same time, fermentation time, initial pH value, bacterial dose and loadage were selected as objects with orthogonal design. The chitinase activity reached 17.020 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ under the optimized condition: colloidal chitin 0.8%, yeast extract 1.0%, bacteria age 12 h, incubation time 72 h, initial pH 8.5, bacteria dry weight 90 mg, loadage 20 mL in 250 mL conical flask. By adding 0.1% cellulose to two-step fermentation, activity of chitinase was 18.804 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ that was 1.27 times higher than that of one-step fermentation.

Keywords: *Serratia marcescens*; chitinase; two-step fermentation; one-step fermentation; optimization

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)