

# 高产几丁质酶高温紫链霉菌的筛选和发酵条件优化

杨绍青<sup>1</sup> 张舒平<sup>1</sup> 闫巧娟<sup>2</sup> 付星<sup>1</sup> 江正强<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083;

2. 中国农业大学 工学院,北京 100083)

**摘要** 从土壤中筛选得到1株高产耐热几丁质酶的嗜热菌株 Z16,对其进行鉴定及产酶发酵条件优化研究。采用分子生物学结合形态学方法鉴定该菌为高温紫链霉菌(*Streptomyces thermoviolaceus*)。通过发酵培养基组分及培养条件的优化,得到了最佳发酵产酶培养基:胶体几丁质 5 g/L,粉末几丁质 10 g/L,酵母浸粉 1.25 g/L,黄豆粉 3.75 g/L,吐温 20 4 g/L。最佳培养条件为:接种量 5%,45 °C 培养 60 h。在优化后的发酵条件下,该菌株最大产酶水平达 5.5 U/mL,比优化前产酶量提高了 4.2 倍,较高的产酶量为进一步研究该菌所产几丁质酶的纯化和性质提供了基础。该菌具有较好的应用前景。

**关键词** 高温紫链霉菌; 菌种鉴定; 几丁质酶; 优化

**中图分类号** S 816.79; S 852.2

**文章编号** 1007-4333(2013)02-0167-07

**文献标志码** A

## Screening of high chitinase-production strain, *Streptomyces thermoviolaceus* and optimization of fermentation condition

YANG Shao-qing<sup>1</sup>, ZHANG Shu-ping<sup>1</sup>, YAN Qiao-juan<sup>2</sup>, FU Xing<sup>1</sup>, JIANG Zheng-qiang<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract** A thermophilic *Streptomyces* strain capable of secreting thermostable chitinase was isolated from soil sample, and its fermentation conditions for chitinase production were optimized. The strain was identified as *Streptomyces thermoviolaceus* based on its biochemical characteristics and 16S rDNA sequence. After optimizing its fermentation medium and fermentation conditions, the optimal medium was obtained as: colloidal chitin 5 g/L, chitin powder 10 g/L, yeast extracts 1.25 g/L, soybean power 3.75 g/L, Tween 20 4 g/L, and the optimum fermentation condition was 45 °C and cultured for 60 h with 5% of inoculation. Under the optimized fermentation conditions, the highest chitinase activity of 5.5 U/mL was achieved, which is 4.2-fold of the initial chitinase production. The relative high enzyme activity was helpful for further study on the purification and characterization of chitinase from this strain.

**Key words** *Streptomyces thermoviolaceus*; identification; chitinase; optimization

几丁质(chitin)又称甲壳素、甲壳质,是一类以 $\beta$ -1,4-N-乙酰-D-氨基葡萄糖为基本单元连接起来的直链多聚物。它在自然界中的含量非常丰富,主要分布于昆虫表皮、真菌细胞壁以及虾、蟹壳废弃物等中<sup>[1-2]</sup>。几丁质酶(chitinase EC 3.2.1.14)是催化几丁质水解产生 N-乙酰氨基葡萄糖及低分子量

几丁寡糖的水解酶<sup>[2]</sup>。几丁寡糖具有很多的生物学活性,目前已被广泛应用于医药、食品、化妆品、饲料、环保等行业<sup>[3]</sup>。几丁质酶由于在制备几丁寡糖、处理海洋废弃物以及农业生物防治等方面具有巨大的应用潜力而备受关注。

目前,几丁质酶在实际生产中的应用程度还比

收稿日期:2012-06-28

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31172239)

第一作者:杨绍青,副教授,博士,主要从事酶与发酵工程研究,E-mail:ysq9926@163.com

通讯作者:江正强,教授,主要从事食品生物技术研究,E-mail:zhqjiang@cau.edu.cn

较低,主要原因是现有产酶菌株产酶水平不高,致使生产效率很低,很难降低酶的使用成本;此外,现有生产菌株多为常温菌<sup>[4-5]</sup>,所产几丁质酶热稳定性不好,且耐储藏和运输性能差,这些客观因素制约了几丁质酶在工业生产中的应用。耐热酶由于热稳定性好,可以在高温下反应从而加快反应速度,同时高温条件还可以减少环境微生物的污染,更适合于工业生产和应用。由于嗜热微生物是耐热酶的主要来源<sup>[6]</sup>,因此筛选在高温下产几丁质酶的菌株,提高几丁质酶的产酶水平和性能已成为几丁质酶研究的热点。

迄今,国际上已有许多几丁质酶的相关研究报道<sup>[7-8]</sup>。然而关于嗜热菌株产几丁质酶的研究报道相对较少,主要集中在嗜热古菌、嗜热细菌及少数的嗜热真菌。如古细菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1<sup>[9]</sup>、嗜热细菌 *Bacillus licheniformis* Mb-2<sup>[10]</sup>、*Ralstonia* sp. A-471<sup>[11]</sup>、嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* SY2<sup>[2]</sup>。1993年 Tsujibo 等<sup>[12]</sup>从高温紫链霉菌 OPC-520 中分离出了耐热几丁质酶 ST chitinase,但由于菌株酶活力低下(1.13 U/mL),使得后来的分离纯化过程十分繁琐。国内关于几丁质酶的研究主要集中在常温菌株的筛选,王东海等<sup>[1]</sup>在 32 °C 下筛选出一株嗜水气单胞菌,经过发酵条件优化,几丁质酶酶活为 0.39 U/mL;孙菽蔚等<sup>[4]</sup>在海泥样品中筛选出的假交替单胞菌 SS01 产几丁质酶最佳发酵温度为 24 °C,发酵液中几丁质酶酶活力约为 0.022 U/mL。张海涛等<sup>[5]</sup>从土壤样品中筛选出一株烟曲霉菌株 *Aspergillus fumigatus* C65-2,在最佳发酵条件下,换算后酶活力约为 1.3 U/mL。关于高温菌株的筛选,仅见郭润芳等<sup>[2]</sup>筛选出的一株疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*) SY2,通过优化产酶条件,在以 0.1% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 为氮源、1.5% 胶体几丁质、培养基初始 pH 5.5 的条件下,50 °C 摇瓶培养 4vd 后,几丁质酶酶活力为 2.8 U/mL,仍相对较低,但具有独特的酶学特征,表现出对热、pH 的稳定性。所以,筛选出能够高产几丁质酶的嗜热菌株具有较大的研究和现实意义。

本研究旨在筛选能够高产几丁质酶的嗜热菌株,并通过优化产酶条件,提高产酶水平,以期耐热几丁质酶的生产提供基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料、试剂及仪器

土壤样品采集自全国各地;制备培养基用粉末

几丁质购自山东潍坊科海甲壳素有限公司;酵母浸粉、胰蛋白胨购自英国 Oxoid;制备底物用的粉末几丁质购自美国 Sigma 公司;黄豆粉为普通市售产品;胶体几丁质为参照 Lee 等<sup>[13]</sup>的方法自制;如无特殊说明其他试剂均为国产分析纯。TU-1800PC 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;GL-20B 高速冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;HZQ-F160 恒温振荡培养箱,哈尔滨东联电子技术开发有限公司。

### 1.2 培养基组成

筛选培养基(g/L):胶体几丁质 5,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01,琼脂 15;培养基 pH 为自然。

摇瓶发酵培养基(g/L):粉末几丁质 10,酵母浸粉 5,蛋白胨 5,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01;pH 自然。

种子培养基:同摇瓶发酵培养基。

种子液的制备:将 1-2 环菌种接入到装有 50 mL 发酵培养基的三角瓶中(250 mL),50 °C,200 r/min 振荡培养 18 h,即为发酵优化接种用种子液。

### 1.3 菌株筛选及鉴定

将土壤样品用无菌水稀释后涂布于筛选平板上,于 50 °C 培养箱中高温培养,挑选出形成透明圈的菌落,进一步划线纯化。将纯化后的菌种接入摇瓶发酵培养基中进行产酶复筛,50 °C 下 200 r/min 恒温摇床中振荡培养,细菌培养 48 h,真菌培养 72 h。发酵结束后,取发酵上清液,50 °C 下测定酶活力。将酶活力较高的菌株保存菌种,并进行菌种鉴定。

菌种鉴定采用分子生物学和生理生化鉴定相结合的方式。将筛选出的目标菌株提取 DNA 后,利用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,扩增结果委托上海生工(北京公司)进行测序。测序结果在 NCBI 数据库上进行基因比对。根据比对结果,利用 ClustalX 和 MEGA 软件构建菌株系统发育树。根据分子生物学的鉴定结果,结合《链霉菌鉴定手册》<sup>[14]</sup>及其他参考文献<sup>[15-16]</sup>中的方法对试验菌株进行培养特征和生理生化鉴定。

### 1.4 酶活力及蛋白质质量浓度测定

参照费凡等<sup>[17]</sup>的方法测定几丁质酶酶活力,并稍加改动。取 100 μL 处理好的胶体几丁质溶液(1%)于 1.5 mL 离心管中,50 °C 恒温水浴中预热 10 min,然后向离心管中加入 100 μL 适当稀释的酶

液。50 ℃ 反应 30 min 后加入 300 μL DNS 试剂终止反应,并在沸水中显色 10 min。待反应体系冷却至室温后,加入 250 μL 的去离子水,9 720g 离心 5 min,取上清液于 540 nm 处测定吸光值,以高温灭活的酶液作为空白对照。酶活力单位(U)定义为:在上述反应条件下每分钟释放 1 μmol N-乙酰氨基葡萄糖所需要的酶量。同时以 N-乙酰氨基葡萄糖做标准曲线。

蛋白质浓度的测定采用 Lowry 法<sup>[18]</sup>,以牛血清蛋白作为标准。

### 1.5 产几丁质酶培养基组成的优化

试验采用单因素优化的方法对产几丁质酶的培养基组成进行优化,包括碳源、氮源、初始 pH 值以及表面活性剂。分别选取 10 g/L 葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、粉末几丁质、胶体几丁质、粉末壳聚糖、羧甲基纤维素(CMC)为碳源,以考察不同碳源对发酵产酶的影响。最佳碳源确定后,考察碳源不同添加量(2.5、5、10、20、25 g/L)对产酶的影响;在碳源优化的基础上进一步考察氮源对产酶的影响,分别选取 10 g/L 酵母浸粉、胰蛋白胨、牛肉蛋白胨、大豆蛋白胨、酪蛋白、黄豆粉、尿素、硝酸铵、氯化铵为氮源,考察不同氮源对产酶的影响。确定氮源后,考察不同添加量(2.5、5、10、20、25 g/L)对产酶的影响;最后考察发酵液初始 pH、表面活性剂的种类及其添加量对产酶的影响。

### 1.6 产几丁质酶培养条件的优化

试验同样采用单因素优化的方法对产几丁质酶的培养条件包括接种量、发酵温度和培养时间进行了优化研究。分别在不同接种量(1%~6%)和温度

(30~60 ℃)下发酵产几丁质酶以考察接种量和温度对产酶的影响;最后在优化后的最佳培养条件下培养菌株,考察产酶历程,确定最佳发酵时间。

### 1.7 数据分析

试验数据采用 Excel 软件进行分析,试验中各发酵条件的优化均做 3 次平行,结果取 3 次结果的平均值。

### 1.8 粗酶液热稳定性研究

最适反应温度:将粗酶液用 pH 5.0 的柠檬酸缓冲溶液稀释适当倍数后,在不同温度下(30~90 ℃)测定酶活力,以酶活力最高的为 100%。

温度稳定性:将酶液分别在 30~90 ℃ 下处理 30 min,冰水浴冷却 30 min 后,在 50 ℃ 下按照标准方法测定残余酶活力,以未热处理(稀释相同倍数后,4 ℃ 存放)酶液的酶活力作为 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 产酶菌株的筛选及鉴定

经过分离、筛选和纯化,从华南植物园土壤样品中筛选出多株具有明显透明圈的菌株。通过对产透明圈菌株进行复筛,发现放线菌菌株 Z16 产几丁质酶能力最强,初始酶活力达到 1.3 U/mL,且产酶情况稳定。故以此菌株为进一步试验的菌株。

将菌株 Z16 的 16S rDNA 测序结果在 NCBI 数据库中比对,结果显示其基因序列与高温紫链霉菌(*Streptomyces thermoviolaceus*)的同源性为 99%,系统发育树显示该菌株属于链霉菌属,与高温紫链霉菌的菌株同属一个分支(图 1)。菌株的培养特征(表 1)及生理生化特征(表 2)与《链霉菌鉴定手册》<sup>[14]</sup>

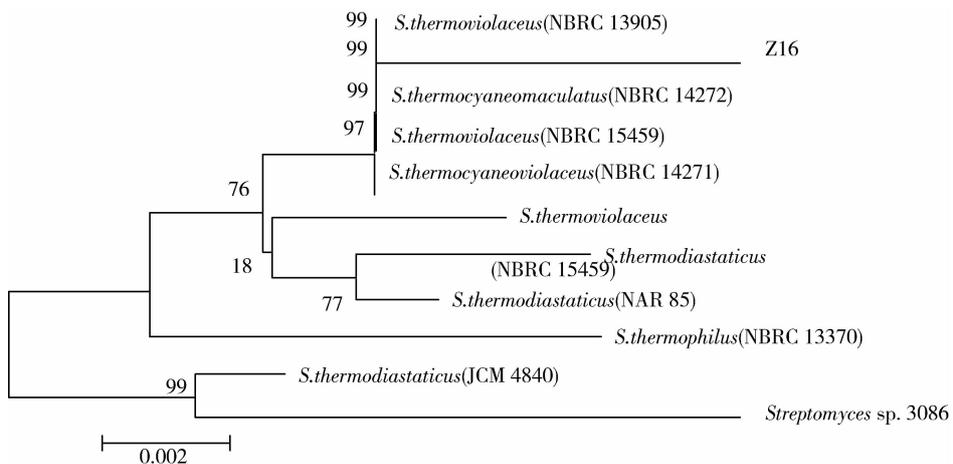


图 1 菌株 Z16 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain Z16

表1 菌株 Z16 培养特征

Table 1 Cultural characteristics of strain Z16

培养基 Culture media	Z16			标准菌株 Type strain		
	气生菌丝 Aerial mycelia	基内菌丝 Substrate mycelia	色素 Pigment	气生菌丝 Aerial mycelia	基内菌丝 Substrate mycelia	色素 Pigment
	葡萄糖天门冬素琼脂 Glucose Asparagine Agar	棕色 Brown	黄褐色 Tawny	无 No	灰色 Gray	微褐色 Tiny brown
蔗糖查氏 Sucrose Czapek's Agar	黄白色 Yellow and white	微黄 Tiny yellow	无 No	灰白 Gray	污黄 Deep yellow	无 No
淀粉琼脂 Starch Agar	灰色 Gray	黄色 Yellow	无 No	灰色 Gray	黄或褐色 Yellow or brown	无 No
土豆培养基 Potato Dextrose Agar	灰色 Gray	褐色 Yellow	棕色 Brown	灰色 Gray	褐色 Brown	略染桂皮棕 Cassia-like brown
高氏合成一号 Gause's Synthetic Agar	灰色 Gray	黄色 Yellow	无 No	灰色 Gray	黄或褐色 Yellow or brown	无 No

表2 菌株 Z16 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain Z16

特征 Characteristics	对比结果 Comparison results	
	Z16	标准菌株 Type strain
	葡萄糖 Glucose	-
果糖 Fructose	+	
木糖 Xylose	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+
棉籽糖 Rafinose	+	+
鼠李糖 Rhamnose	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	+	+
肌醇 Inositol	+	+
甘露醇 Mannitol	+	-
牛奶胨化 Milk peptonization	+	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	-
纤维素生长 Utilization of cellulose	+	+
酪氨酸反应 Tyrosine reaction	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-

中高温紫链霉菌的描述基本相符合。综合以上结果,故鉴定该菌株为高温紫链霉菌,命名为 *Streptomyces thermoviolaceus* Z16。

## 2.2 高温紫链霉菌 Z16 产几丁质酶培养基组成的优化

### 2.2.1 碳源对高温紫链霉菌 Z16 发酵产几丁质酶的影响

不同种类的单糖、二糖及多糖等碳源对菌株 Z16 产几丁质酶的影响见图 2。以胶体几丁质为碳源时产酶最高,为 1.5 U/mL,其次为粉末几丁质(1.3 U/mL)和 CMC(1.0 U/mL)。葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉几乎不能诱导几丁质酶的分泌。进一步改变胶体几丁质的添加量以考察质量浓度对产酶的影响。结果表明,胶体几丁质添加量为 5 g/L 时,酶活力最高,达到 1.7 U/mL,当添加量为 10 和 20 g/L 时,培养基粘度增大,影响菌体生长,产酶能力下降。

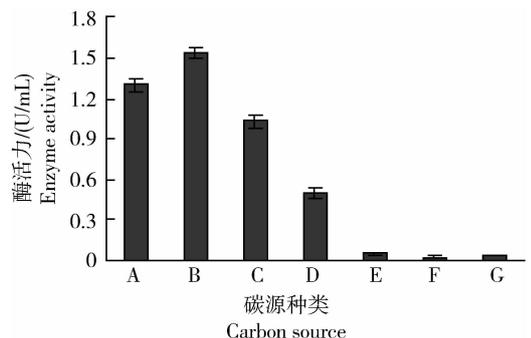


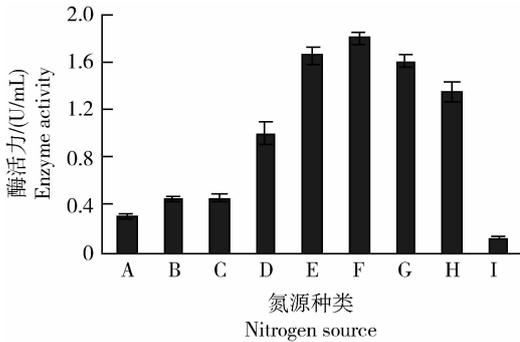
图2 不同碳源对产几丁质酶的影响  
A. 粉末几丁质 Chitin powder; B. 胶体几丁质 Colloidal chitin; C. CMC; D. 粉末壳聚糖 Chitosan powder; E. 葡萄糖 Glucose; F. 蔗糖 Sucrose; G. 可溶性淀粉 Soluble starch.

图2 不同碳源对产几丁质酶的影响  
Fig. 2 Effect of carbon source on chitinase production

考虑到 5 g/L 胶体几丁质的添加量作为碳源时浓度偏低,所以尝试添加粉末几丁质提供碳源及诱导产酶,添加量分别为 5、10、20 g/L。结果表明,添加粉末几丁质对产几丁质酶有促进作用,当添加量为 10 g/L 时,酶活力最高,达到 2.0 U/mL (数据未列出)。综合上述实验结果,选择 5 g/L 胶体几丁质和 10 g/L 的粉末几丁质复配作为碳源。

**2.2.2 氮源对高温紫链霉菌发酵产几丁质酶的影响**

在已优化碳源的基础上改变发酵氮源,以考察不同氮源对 *S. thermoviolaceus* Z16 产酶能力的影响。结果表明当以黄豆粉作为氮源时酶活力最高,达到 2.2 U/mL,酵母浸粉次之(图 3)。该菌株也能利用无机氮源产几丁质酶,以硝酸铵和氯化铵为氮源时,酶活力也能达到较高水平(1.65 和 1.96 U/mL)。由于采用单一氮源发酵时营养成分可能不全,因此选用产酶较高的两种氮源进行复配。结果表明氮源复配之后产酶能力强于单种氮源(数据未列出)。



A. 胰蛋白胨 Tryptone; B. 牛肉蛋白胨 Beef peptone; C. 酪蛋白 Soya bean peptone; D. 大豆蛋白胨 Casein; E. 酵母浸粉 Yeast extract; F. 黄豆粉 Soya bean powder; G. 氯化铵 NH<sub>4</sub>Cl; H. 硝酸铵 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; I. 尿素 Urea

图 3 不同氮源对产几丁质酶的影响

Fig. 3 Effect of nitrogen sources on the chitinase production

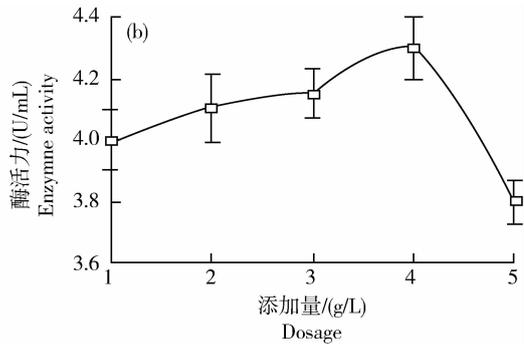
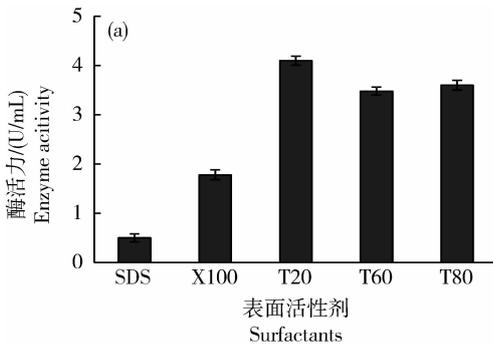


图 5 表面活性剂的种类 (a) 和添加量 (b) 对产几丁质酶的影响

Fig. 5 Effect of surfactants and their dosages on chitinase production

当黄豆粉与酵母浸粉以质量比 3 : 1 进行复配时,产酶能力最高,此时发酵液酶活力提高至 3.1 U/mL。进一步改变氮源的添加量以考察氮源浓度对产酶的影响。结果表明当氮源质量浓度为 5 g/L 时酶活力达到最高,此时酶活力为 3.4 U/mL。

**2.2.3 培养基初始 pH 对产酶的影响**

在优化碳源和氮源的基础上,考察培养基初始 pH 对 *S. thermoviolaceus* Z16 发酵产几丁质酶的影响。结果表明当培养基的初始 pH 在自然条件下时产酶最高(图 4),此时 pH 为 6.8 左右。且从图中可以看出,培养基初始 pH 在 6.5~7.5 之间变动时,pH 对发酵产几丁质酶的影响不大,都保持在较高水平,因此可将培养基的初始 pH 值设定在自然条件。

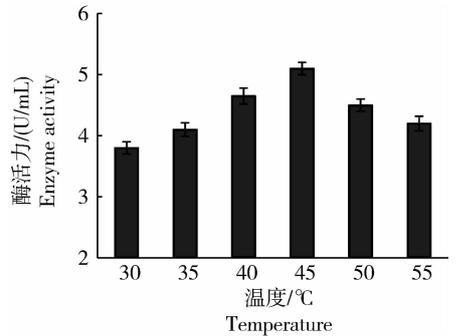


图 4 培养基初始 pH 对产几丁质酶的影响

Fig. 4 Effect of culture pH on chitinase production

**2.2.4 表面活性剂对高温紫链霉菌 Z16 发酵产几丁质酶的影响**

在已优化培养基的基础之上,添加不同的表面活性剂,进行产酶试验,结果见图 5。添加吐温类表面活性剂对产酶有明显的促进作用,其中吐温 20 的作用最为明显,而 SDS 严重抑制几丁质酶的产生。调节吐温 20 的添加量,当质量浓度为 4 g/L 时,产酶最高,此时几丁质酶酶活力达到 4.3 U/mL。

## 2.3 高温紫链霉菌 Z16 产几丁质酶培养条件的优化

### 2.3.1 接种量对高温紫链霉菌 Z16 发酵产酶的影响

考察 1%~6% 的接种量对 *S. thermoviolaceus* Z16 发酵产酶的影响。结果表明,当接种量为 5% 时,所产的几丁质酶活力最高,为 4.5 U/mL,提高或者降低接种量,酶活力均降低,因此选取 5% 的接种量。

### 2.3.2 发酵温度对高温紫链霉菌 Z16 发酵产酶的影响

分别在不同温度下发酵 *S. thermoviolaceus* Z16 以考察发酵温度对产酶的影响。结果表明,该菌株产几丁质酶的最佳发酵温度为 45 °C,此时几丁质酶酶活力达到 5.1 U/mL(图 6)。该菌株能在较高温度下高效生产几丁质酶,有利于生产过程中减少杂菌污染。

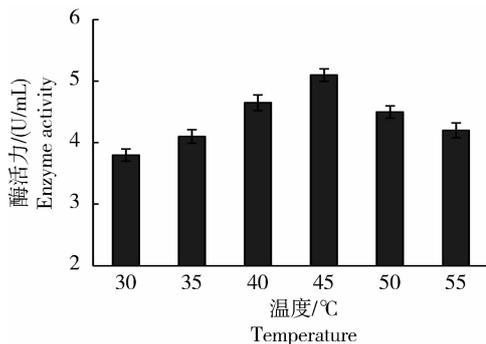


图 6 发酵温度对产几丁质酶的影响

Fig. 6 Effect of temperature on chitinase production

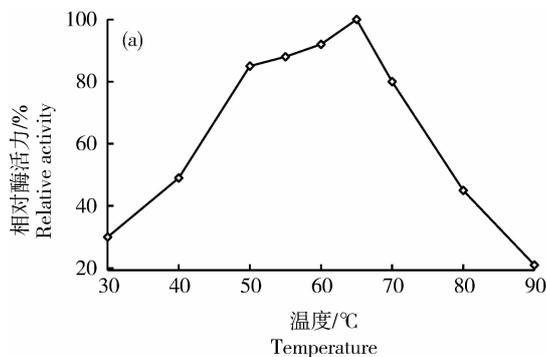


图 8 几丁质酶粗酶液的最适反应温度(a)和温度稳定性(b)

Fig. 8 Optimal temperature (a) and thermal stability (b) of crude chitinase

## 3 讨论

本研究采用单因素优化方法探讨了影响 *S. thermoviolaceus* Z16 发酵产几丁质酶的培养基组分和培养条件。碳源是影响微生物发酵的最主要因素之一。本研究发现胶体几丁质是诱导 *S.*

### 2.3.3 高温紫链霉菌 Z16 的发酵产酶曲线

在优化培养基组分及培养条件的基础上,对菌株 *S. thermoviolaceus* Z16 产几丁质酶的过程进行研究,结果见图 7。该菌株在培养 24 h 后开始大量产酶,直至 60 h 时达到产酶高峰,此时酶活力达到 5.5 U/mL。随着时间的延长,酶活力开始下降,这与培养基中营养物质的消耗及代谢产物的积累有关。同时,胞外蛋白质质量浓度的变化趋势与酶活力的变化趋势相近。

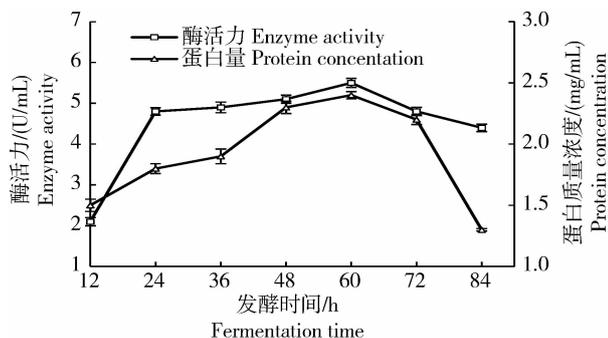
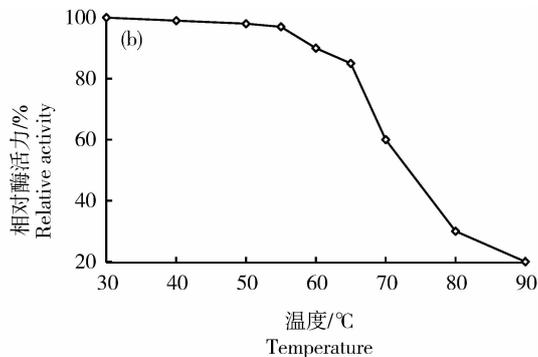


图 7 发酵时间对产几丁质酶的影响

Fig. 7 Effect of fermentation time on chitinase production

## 2.4 几丁质酶粗酶液热稳定性研究

本研究中几丁质酶粗酶液的最适反应温度为 65 °C(图 8(a)),在 65 °C 下保温 30 min,残余酶活力保持在 80% 以上,具有较好的热稳定性。



*thermoviolaceus* Z16 产几丁质酶的最佳碳源,这跟大多数几丁质酶为诱导酶有关。粉末几丁质诱导产酶能力不及胶体几丁质,这可能由于其在培养基中分散不如胶体几丁质均匀,不利于诱导产几丁质酶。纤维素在组成结构上与几丁质有很大的相似性,故也能诱导产酶<sup>[19]</sup>。但本研究中胶体几丁质的添加

量为 5 g/L 时,浓度偏低,故考虑添加次好的粉末几丁质以提供碳源及诱导产酶。葡萄糖和几丁质降解产物作为碳源时不利于几丁质酶分泌的,这一结果与王海东等<sup>[1,4]</sup>的研究结果相似。

常用氮源中,有机氮源优于无机氮源,有机氮源中又以黄豆粉和酵母浸粉最佳,2 种氮源复配之后产酶能力大幅度提高,这可能因为复配之后提供的氮源营养更为全面。但不同微生物发酵产几丁质酶对氮源和碳源的利用有所不同,如链霉菌 A408<sup>[19]</sup>利于无机氮源优于有机氮源,粉末几丁质产酶效果优于胶体几丁质。

培养基中添加表面活性剂可以提高原生质膜对几丁质酶的通透性,增加胞内几丁质酶的分泌,从而提高酶活力。但是不同微生物菌株对表面活性剂的类型需求不同。本研究中吐温 20 对产酶促进作用最为明显,而 SDS 对产酶有严重抑制作用,这与王子坚等<sup>[20]</sup>的研究结果相似。

本研究中,接种量的高低会影响 *S. thermoviolaceus* Z16 发酵产几丁质酶。当接种量较低时,菌体量偏少,影响产酶能力;接种量过高时瓶内菌体大量繁殖,过快消耗碳源和氮源,使得在本应产酶的时间里由于碳源耗尽,菌体停止合成分泌几丁质酶甚至死亡,这与尹璐等<sup>[21]</sup>的研究相似。而在王海东等<sup>[1]</sup>的研究中,接种量对嗜水气单胞菌 SWCH-6 发酵产几丁质酶没有明显影响。

从产酶历程看,*S. thermoviolaceus* Z16 从 24 h 开始大量分泌几丁质酶,在 60 h 时达到产酶高峰,与以往文献报道几丁质酶活力高峰一般出现在 4~8 d 相比<sup>[4,21]</sup>产酶高峰大大提前,提高了产酶效率。目前,国际上关于嗜热微生物产几丁质酶的研究报道较少,且产酶水平参差不齐<sup>[10-11]</sup>(0.35 U/mL, 15 U/mL)。国内仅见郭润芳等<sup>[2]</sup>筛选出 1 株疏松状嗜热丝孢菌 SY2,优化发酵条件后,50 °C 下产耐热几丁质酶酶活力为 2.8 U/mL。本研究中 *S. thermoviolaceus* Z16 发酵条件优化后,在 45 °C 下最高产酶水平为 5.5 U/mL,在嗜热菌株产几丁质酶的研究中处于领先水平。该菌株所产几丁质酶粗酶液最适反应温度为 65 °C,在 65 °C 下热稳定性良好,表现出了较好的应用前景。

## 参 考 文 献

[1] 王海东,陈飏,伦镜盛,等.产几丁质酶菌株 SWCH-6 的筛选、

- 鉴定及其产酶条件的优化研究[J].微生物学通报,2008,35(5):705-711
- [2] 郭润芳,史小琴,李多川,等.一种耐热几丁质酶的产生及其稳定性研究[J].微生物学通报,2008,35(4):481-485
- [3] 杨雪松,李丽,刘红全.海洋微生物几丁质酶的研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(16):9481-9485
- [4] 孙菽蔚,王子峰,岳海东,等.一株海洋几丁质酶产生菌的筛选及其产酶条件的初步研究[J].海洋科学,2007,31(5):10-15
- [5] 张海涛,王婷,田园,等.几丁质酶产生菌筛选鉴定及产酶性能研究[J].中国生物工程杂志,2010,30(8):82-87
- [6] Demirijian D, Moris-Varas F, Cassidy C S. Enzymes from extremophiles[J]. Curr Opin Chem Biol,2001,5(2):144-151
- [7] Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta R K. Bacterial chitinases: properties and potential[J]. Crit Rev Biotechnol,2007,27(1):21-28
- [8] Li D C. Review of fungal chitinases[J]. Mycopathologia,2006,161(6):345-360
- [9] Tanaka T, Fukui T, Atomi H, et al. Characterization of an exo-beta-D-glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1[J]. J Bacteriol,2003,185(17):5175-5181
- [10] Toharisman A, Suhartono M T, Barth M S, et al. Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2[J]. World J Microbiol Biotechnol,2005,21(5):733-738
- [11] Sutrisno A, Ueda M, Abe Y, et al. Purification and characterization of chitinase B from moderately thermophilic bacterium *Ralstonia* sp. A-471[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2005,69(4):842-844
- [12] Tsujibo H, Minoura K, Hatano N, et al. Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520[J]. Appl Environ Microbiol,1993,59(2):620-622
- [13] Lee G Y, Chung K C, Wi S G, et al. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp LYG0704 [J]. Protein Expression Purif,2009,65(2):244-250
- [14] 中国科学院微生物研究所放线菌分组.链霉菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1975:1725
- [15] 卢运玉,阎逊初.嗜热放线菌类群分类的研究:嗜热链霉菌的分类鉴定(二)[J].微生物学报,1988,21(4):414-420
- [16] Shirling E B, Gottlieb D. Cooperative description of type strains of *Streptomyces* [J]. Int J Systematic Bacteriol,1972,23:263-394
- [17] 费凡,闫巧娟,江正强,等.膜荚黄芪种子中 2 种几丁质酶的分纯化及活性测定[J].西北植物学报,2009,29(12):2521-2526
- [18] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem,1951,193:265-275
- [19] 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
- [20] 王子坚,曾巧英,殷宏,等.一株产几丁质酶绿僵菌的筛选及其产酶特性[J].贵州农业科学,2010,38(3):87-89
- [21] 尹璐,祖国仁,孙浩,等.一株海洋细菌产几丁质酶培养条件研究[J].中国酿造,2010(9):101-105