

产壳聚糖酶菌株发酵条件优化及壳聚糖酶的分离纯化研究

段妍¹, 韩宝芹², 董文², 杨艳², 常菁², 刘万顺²

(1.中山大学 神经与认知科技创新平台, 广东 广州 510080; 2.中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 从土壤中筛选得到一株产壳聚糖酶菌株P003, 对其进行了发酵条件优化。结果表明其最适发酵培养条件为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0%, 粉末壳聚糖 1.0%, 葡萄糖 0.1%, K_2HPO_4 0.07%, KH_2PO_4 0.03%, NaCl 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 酵母提取物 0.3%, 调pH至 5.0; 2.0%接种量, 500 mL三角瓶装液量为 150 mL, 32 °C下 150 r/min摇床培养 96 h, 在此条件下菌株发酵液的壳聚糖酶活力达 108 U/mL。采用硫酸铵分级盐析、离子交换层析和凝胶过滤层析等方法, 从菌株的发酵液中分离出了分子质量为 30.5 ku的壳聚糖酶。

关键词: 壳聚糖酶; 发酵条件; 分离纯化

中图分类号: Q814.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2009) 01-0001-07

壳聚糖是几丁质脱去部分乙酰基的产物, 具有良好的生物相容性、生物降解性、无毒性以及易成膜性, 因而在众多领域得到了广泛应用。但壳聚糖分子质量较大, 水溶性差, 在人体内不易吸收, 使其应用受到一定限制^[1]。

壳寡糖是壳聚糖的降解产物, 是聚合度为 2~20 的低聚糖, 具有水溶性好、易吸收等优点以及许多独特的生理活性和功能^[2,3]。如能提高机体免疫力、抑制肿瘤细胞生长、活化增殖人体肠道内双歧杆菌, 同时还具有抗菌防腐^[4,5]、保水保湿等功能, 在医药、食品、化妆品等领域的应用前景备受瞩目。壳寡糖的制备可分为化学降解法、物理降解法和酶降解法^[6,7], 与目前常用的化学降解法相比, 酶法生产壳寡糖的反应条件温和易控, 寡糖得率高、功能性更强, 不易造成环境污染, 是壳寡糖制备的主要研究方向。因此, 对壳聚糖酶的研究已成为几丁质和壳聚糖研究领域较为活跃的分支之一。

中国海洋大学海洋生物活性物质与生物材料实验室在几丁质酶, 壳聚糖酶方面做了部分工作, 先后从土壤中分离到了产几丁质酶和壳聚糖酶的菌株^[8~11], 在这些工作的基础上, 作者从土壤中筛选得到一株产壳聚糖酶活力很高的菌株, 并对其进行了发酵条件优化和酶的分离纯化研究。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 菌种

从土壤中筛选得到一株产壳聚糖酶的细菌 P003^[12,13]。

1.1.2 培养基

种子培养基: 蛋白胨 0.5%, K_2HPO_4 0.07%, KH_2PO_4 0.03%, 葡萄糖 0.1%, 酵母粉 0.3%, NaCl 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 粉末壳聚糖 1.0%, pH 值为 6.3。

发酵基础培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0%, K_2HPO_4 0.07%, KH_2PO_4 0.03%, NaCl 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 葡萄糖 0.1%, 酵母粉 0.3%, 粉末壳聚糖 1.0%, pH 值为 6.3。

1.1.3 主要生化试剂

蛋白电泳成套试剂购自上海生物工程公司; Q-Sepharose Fast Flow 购自 Amersham 公司; Sephadex-G75 为 Pharmacia 公司; 粉末壳聚糖购自

收稿日期: 2005-12-12; 修回日期: 2008-10-30

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目 (2001BA708B04-07)

作者简介: 段妍 (1981-), 女, 湖南益阳人, 硕士, 主要从事生物化学方面的研究, E-mail: duanyan1813@126.com; 韩宝芹, 通讯作者, 电话: 0532-82032105, E-mail: baoqinh@mail.ouqd.edu.cn



青岛海汇公司(脱乙酰度 90%);其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 发酵培养条件研究

1.2.1.1 菌株培养

从新鲜斜面挑取一环菌体接入种子培养基中, 30 °C, 150 r/min下摇床培养 16 h (菌体密度 2.3×10^{13} 个/mL), 以 4%的接种量接入发酵培养基中, 30 °C, 150 r/min下摇床培养 72 h。

1.2.1.2 最适氮源的筛选

在发酵基础培养基中,将氮源分别替换成 0.5% 硝酸钾, 0.5% 牛肉膏, 0.5% 蛋白胨, 0.5% 硫酸铵, 1.0% 硫酸铵, 0.5% 硝酸铵和 1.0% 硝酸铵, 对菌株进行发酵培养并测定发酵上清液的酶活力, 试验不同氮源对菌株产酶的影响。

1.2.1.3 最适碳源的筛选

在最适氮源条件下, 分别以 1.0% 胶体壳聚糖, 1.0% 粉末几丁质, 1.0% 可溶性淀粉, 1.0% 粉末壳聚糖, 1.0% 粉末壳聚糖加 0.1% 葡萄糖, 1.0% 葡萄糖, 1.0% 羧甲基纤维素钠作为碳源, 对菌株进行发酵培养, 测定发酵液的酶活力, 试验不同碳源对菌株产酶的影响。

1.2.1.4 培养基最适起始 pH 值实验

在上述优化条件下, 将培养基起始 pH 值分别调至 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 对菌株进行发酵培养, 测定发酵液的酶活力, 试验培养基起始 pH 值对菌株产酶的影响。

1.2.1.5 最适培养温度实验

在上述优化条件下, 分别选择 26, 28, 30, 32, 34, 37 °C 作为菌株发酵培养温度, 测定发酵液的酶活力, 研究温度对菌株产酶的影响。

1.2.1.6 最适接种量实验

在优化条件下, 将菌株的种子培养液分别按照 0.2%, 0.5%, 1.0%, 2.0%, 4.0%, 6.0% 的接种量接入发酵培养基, 对菌株进行发酵培养并测定发酵液酶活力, 研究接种量对产酶的影响。

1.2.1.7 最适装瓶量实验

在优化条件下, 统一型号的 500 mL 锥形瓶的培养基装液量分别设为 50, 100, 150, 200, 250 mL, 对菌株进行发酵培养, 研究培养基装瓶量对发酵液酶活力的影响。

1.2.1.8 最适碳氮比研究

在优化条件下, 将培养基中硫酸铵的浓度分别设为 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%, 对

菌株进行发酵培养, 试验不同碳氮比对菌株产酶的影响。

1.2.1.9 壳聚糖的脱乙酰度对产酶的影响

在优化条件下, 用本实验室自制的脱乙酰度分别为 55%, 65%, 75%, 80%, 95% 的粉末壳聚糖作为诱导物, 进行发酵实验, 研究壳聚糖脱乙酰度对菌株产酶的影响。

1.2.1.10 最适发酵时间实验

在优化条件下, 分别以 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 216, 264 h 作为菌株发酵培养时间, 测定发酵液的酶活力, 试验发酵时间对菌株产酶的影响。

1.2.2 壳聚糖酶的分离纯化

1.2.2.1 壳聚糖酶粗品的制备

在优化条件下对 P003 进行发酵培养, 所得发酵液在 4 °C 下 6 000 r/min 离心去除菌体, 然后于 4 °C 下采用 70% 饱和度的硫酸铵盐析, 沉淀物经透析脱盐、冷冻干燥即得到壳聚糖酶粗品。

1.2.2.2 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析

上样缓冲液为 0.02 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液, pH 6.0; 梯度洗脱液为含 0~1.0 mol/L 的 NaCl 梯度的上样缓冲液。用 3 倍体积的上样缓冲液平衡柱子 ($\phi 2.2 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$), 流速 0.5 mL/min, 然后取粗酶粉 0.1 g 溶于 4 mL 上样缓冲液, 上样, 洗涤 2~3 个柱体积后开始进行梯度洗脱, 总洗脱体积 400 mL。层析结束后收集有酶活力的部分。

1.2.2.3 Sephadex-G75 凝胶过滤层析

上样缓冲液为 0.02 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液, pH 7.0。用上样缓冲液平衡柱子 ($\phi 1.6 \text{ cm} \times 80 \text{ cm}$) 4 个柱体积。将上一步纯化后的酶液对该缓冲液充分透析, 再用 PEG20000 浓缩, 取 2 mL 浓缩后的酶液上样, 流速 0.2 mL/min, 层析后收集有酶活力的部分。

1.2.2.4 SDS-PAGE 检测壳聚糖酶的纯度及分子质量

采用不连续垂直板电泳系统, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 10%, 采用 pH 8.8 的 Tris-HCl 缓冲体系, 电泳后用考马斯亮兰 R250 染色^[14]。

1.2.3 壳聚糖酶活力测定方法

发酵液离心, 取上清(必要时作适当稀释) 0.1 mL 加入 0.02 mol/L, pH 5.6 的 HAc-NaAc 缓冲液 1 mL, pH 5.6, 1% 粉末壳聚糖的 HAc 溶液 0.9 mL, 50 °C 水浴 15 min 后加 DNS 试剂 1.5 mL 终止反应, 沸水浴 5 min 显色, 冷却后定容至 25 mL, 离心, 取上清液测 520 nm 处吸光值。等量煮沸灭活的发酵液

作为空白对照。酶活力单位定义为上述条件下，每毫升发酵液每分钟下释放生成的微摩尔还原糖数。

1.2.4 蛋白质浓度测定

按Bradford法，以牛血清白蛋白作为标准^[15]。

2 结果

2.1 培养条件的优化

最适氮源实验结果表明，铵盐作为氮源时发酵液酶活力较高（图 1），其中 1.0% (NH₄)₂SO₄为氮源时，产酶效果最好，发酵液的酶活力为 3.4 U/mL，0.5% (NH₄)₂SO₄作为氮源时产酶效果次之。

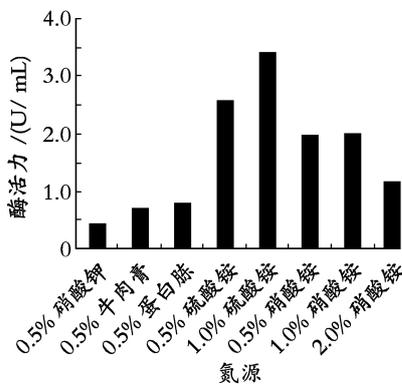


图 1 不同氮源对菌株产酶的影响

Fig. 1 Effects of different nitrogenous sources on chitinase production

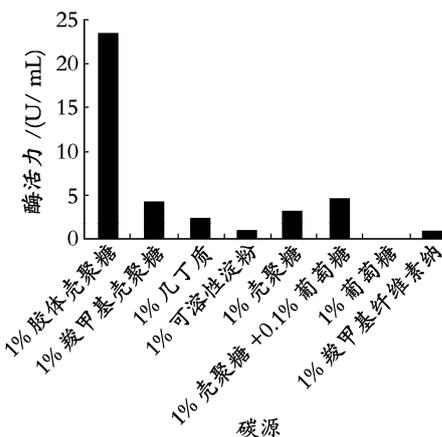


图 2 不同碳源对菌株产酶的影响

Fig. 2 Effects of different various carbon sources on chitinase production

碳源对菌株产酶的影响如图 2，胶体壳聚糖为碳源时发酵液酶活力显著高于其它各种碳源，其次为 1% 粉末状壳聚糖加 0.1% 葡萄糖的复合碳源，

酶活力为 4.7 U/mL。

培养基最适起始 pH 值实验结果表明，当培养基起始 pH 值为 5.0 时，该菌株具有最高的产酶能力（图 3），发酵液的酶活力为 36.7 U/mL。起始 pH 值高于或低于此值，酶活力均显著下降。

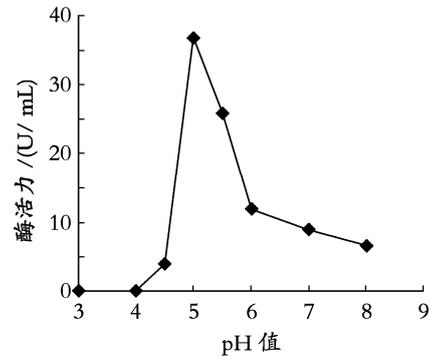


图 3 培养基起始 pH 对菌株产酶的影响

Fig.3 Effects of initial pH of medium on chitinase production

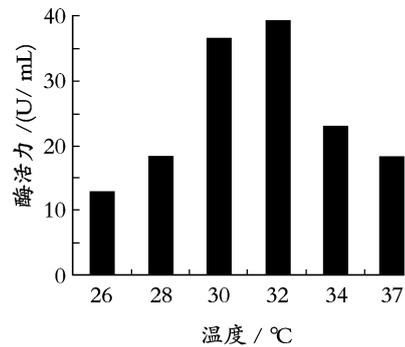


图 4 培养温度对菌株产酶的影响

Fig.4 Effects of culture temperature on chitinase production

培养温度对菌株产酶的影响如图 4，该菌株在 32 °C 培养时，发酵液酶活力最高，为 39.3 U/mL。温度低于 30 °C 或高于 32 °C 时，发酵液的酶活力明显下降。

最适接种量实验结果见图 5，当接种量在 2% 以上时，菌株具有最高的产酶能力，发酵液中酶活力为 37.6 U/mL，继续增加接种量时发酵液的酶活力不再增加。

培养基装瓶量对发酵液酶活力影响也较为明显。由图 6 可知，当 500 mL 锥形瓶中装有 150 mL

培养基时菌株发酵液的酶活力最高，为 51.1 U/mL。

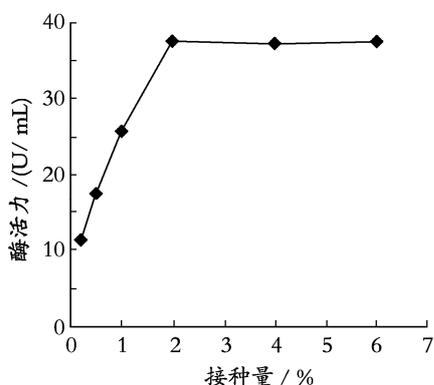


图 5 接种量对菌株产酶的影响

Fig.5 Effects of inoculation on chitosanase production

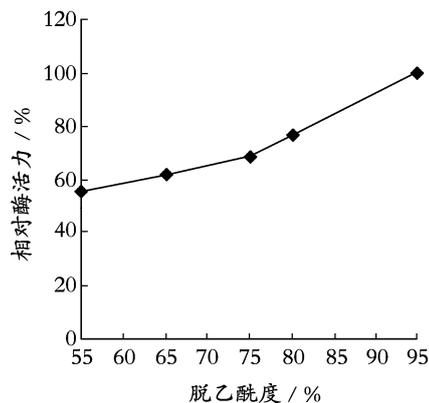


图 7 壳聚糖脱乙酰度对发酵酶活力的影响

Fig.7 Effects of degree of deacetylation of chitosan on chitosanase production

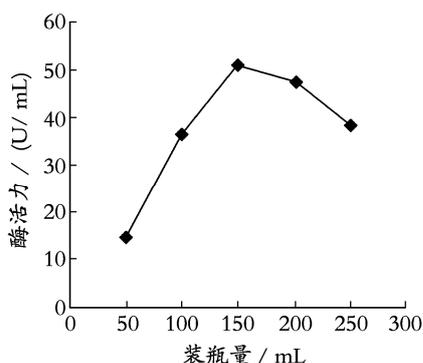


图 6 装瓶量对菌株产酶的影响

Fig. 6 Effects of liquid volumes on chitosanase production

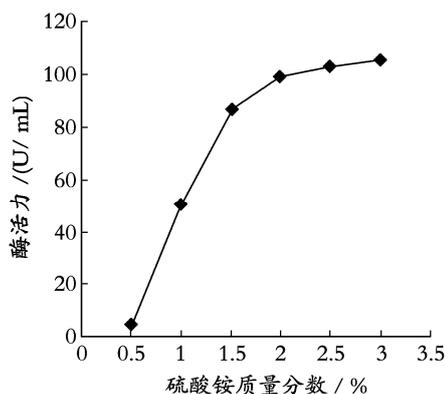


图 8 硫酸铵质量分数对菌株产酶的影响

Fig.8 Effects of concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on chitosanase production

研究壳聚糖脱乙酰度对发酵酶活力的影响发现，壳聚糖脱乙酰度为 95% 时，发酵液酶活力最高（图 7）。表明壳聚糖脱乙酰度越高，越有利于该菌株产酶。

最适碳氮比研究结果如图 8，当培养基的硫酸铵质量分数由 1% 增至 2% 时，发酵液的酶活力提高了 1 倍，继续加大浓度酶活力无明显上升，因此将培养基硫酸铵浓度定为 2%。

培养时间对产酶影响的结果表明，发酵液中酶活力的升高主要集中在培养的前 72 h（图 9），当发酵时间为 120 h 时发酵液的酶活力最高且不再上升。考虑到培养 120 h 与培养 96 h 时酶活力相差不大，确定了 96 h 作为菌株的最适发酵培养时间。

上述研究结果表明菌株 P003 的最适发酵产酶条件为： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0%，粉末壳聚糖 1.0%，葡萄糖 0.1%， K_2HPO_4 0.07%， KH_2PO_4 0.03%，NaCl 0.5%， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%，酵母提取物 0.3%，调 pH 至 5.0；接种量 2.0%，500 mL 三角瓶装瓶量为 150 mL，32 °C 下 150 r/min 摇床培养 96 h。在此条件下菌株发酵液的壳聚糖酶可达 108 U/mL。

2.2 壳聚糖酶的分离纯化

经过盐析，透析后的酶液进行 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析时，采用 0~1 mol/L NaCl 进行梯度洗脱，洗脱下来的蛋白峰中只有一个蛋白峰具有壳聚糖酶的活力，收集相应酶液。洗脱完以后改用 2 mol/L 的 NaCl 溶液继续洗脱，洗脱液中未检

测到酶活力。壳聚糖酶的 Q-Sephrose FF 柱析层结果如图 10 所示 (图 10 中 A 为光密度)。

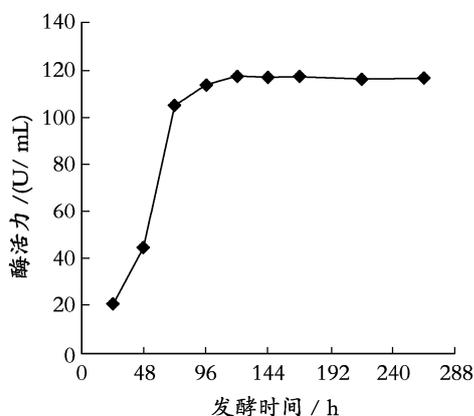


图 9 培养时间对产酶的影响

Fig.9 Effects of culture time on chitosanase production

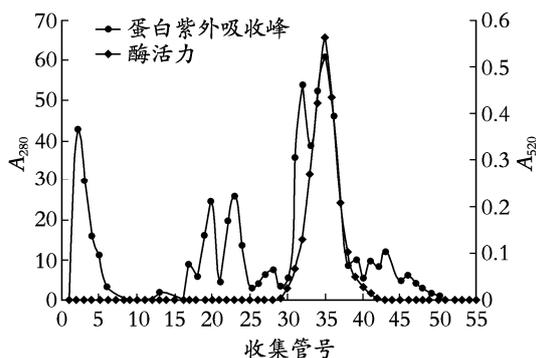


图 10 壳聚糖酶的 Q-Sephrose FF 柱层析图

Fig.10 Chromatogram of chitosanase on Q-Sephrose FF column

经上一步纯化的酶液进行 Sephadex G75 凝胶过滤层析时 (图 11), 分离出两个蛋白峰, 其中第二个蛋白峰中检测到壳聚糖酶活力, 收集相应的酶液并采用 SDS-PAGE 检验其纯度。纯化后的酶液在电泳图 (图 12) 上显示为单一的色带, 说明 P003 所产壳聚糖酶为单一酶组分, 纯度达到电泳纯。主要纯化步骤见表 1。

2.3 壳聚糖酶的分子质量测定

采用 SDS-PAGE 检测壳聚糖酶分子质量, 将样品蛋白质相对迁移距离与标准蛋白样品的相对迁移距离相对照, 得出该壳聚糖酶相对分子质量约为 30.5 ku。

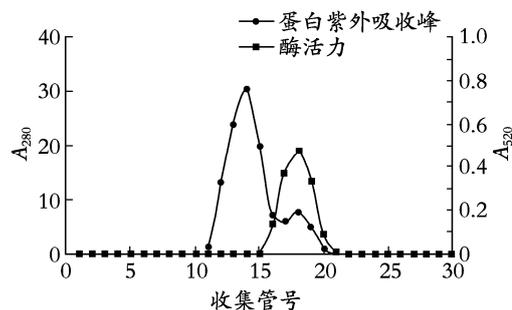


图 11 壳聚糖酶的 Sephadex-G75 柱层析图

Fig.11 Chromatogram of chitosanase on Sephadex G75 column

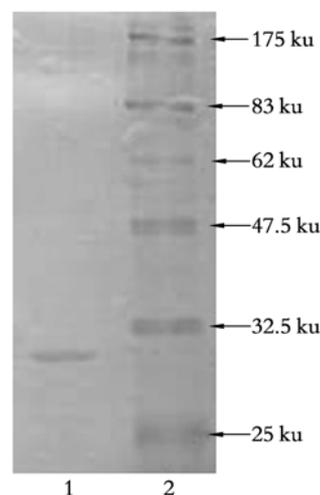


图 12 壳聚糖酶电泳图

Fig.12 SDS- PAGE pattern of chitosanase

1.经 Sephadex-G75 纯化后的酶液; 2.标准蛋白样品

1. Sephadex-G75 purification; 2. protein mark

3 讨论

微生物产生的壳聚糖酶有组成型和诱导型之分, 其中多数为诱导型。本研究从土壤中筛选得到一株野生型产壳聚糖酶的细菌, 对其进行发酵条件优化表明该菌所产的壳聚糖酶是一种诱导酶, 只有以壳聚糖为碳源才能产酶, 而又以胶体壳聚糖作为碳源时, 产酶效果最好, 当以 1.0%粉末状壳聚糖+0.1%葡萄糖为复合碳源时, 产酶效果次之。考虑到胶体壳聚糖的制作成本, 故选用后者作为其发酵碳源。

表 1 壳聚糖酶的纯化结果

Tab.1 Purification of the chitosanase

纯化步骤	总活力 (U)	总蛋白质量 (mg)	比活力 (U/mg)	纯化倍数 (%)	收率 (%)
发酵上清液	83769.7	452.8	185.0	1	100
硫酸铵盐析、透析	62072.8	290.4	213.7	1.2	74.1
离子交换层析	35434.6	73.9	479.5	2.6	42.3
凝胶过滤层析	23120.4	10.1	2289.1	12.4	27.6

研究中发现诱导物壳聚糖的脱乙酰度对产酶的影响较为明显,壳聚糖脱乙酰度越高越有利于产酶,分析其原因可能与该菌株所产的壳聚糖酶酶切位点有关,具体机理尚需更深入的研究。pH 值对该菌株酶活力影响很大,最适产酶 pH 值为 5,当低于或高于 5 时,发酵液中的酶活力迅速下降。

对于壳聚糖酶的分离纯化,本研究采用了常用的硫酸铵分级盐析、离子交换层析和凝胶过滤层析等方法,先后采用 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析和 Sephadex-G75 凝胶过滤层析,得到了较纯的壳聚糖酶,经 SDS-PAGE 电泳呈单一色带,分子质量约为 30.5 ku。

目前,酶法降解壳聚糖制备壳寡糖大多数还处在实验室研究阶段,关键问题是难以获得大量的专一性的高活性壳聚糖酶制剂,使壳聚糖酶的生产成本过高,价格昂贵,难以实现商业化应用。因此,要采用酶解的方法实现壳寡糖的规模化生产,除了利用基因工程或诱变手段提高现有壳聚糖酶产量外,寻求新的专一性的高活性壳聚糖酶来源也具有重要的意义。与已报道的其它产壳聚糖酶菌株相比^[16,17],P003 在优化条件下产酶能力相当高,其发酵液的酶活力可达 108.09 U/mL,该壳聚糖酶在酶法降解壳聚糖制备壳寡糖的研究工作,以及壳寡糖的规模化生产中有很高的应用前景。

由于条件所限,作者未对菌株 P003 进行分类鉴定,其具体种属尚需进一步研究确定。

参考文献:

[1] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2003. 7-18.
 [2] Yol J J, Shanidi F, Kim S K. Preparation of chitin and chitosan chito-oligosacchrides and their applications in physiological functional foods[J]. *Food Reviews Interna-*

tional, 2000,16(2):159-176.

[3] Khan W, Prithiviraj B, Smith D L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves[J]. *Plant Physiol*, 2003, 160(8):859-63.
 [4] Jeon Y J, Kim S K. Production of chitoooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity[J]. *Carbohydr Polym*, 2000, 41(2):133-141.
 [5] Tsai G J, Wu Z Y, Su W H. Antibacterial activity of a chitoooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation[J]. *Food Prot*, 2000, 63(6):747-52.
 [6] 王扬, 娄永江, 杨文鹤. 酶法制备几丁寡糖和壳聚糖研究现状与进展[J]. 东海海洋, 2001, 19(4): 40-44.
 [7] 夏文水. 酶法改性壳聚糖的研究进展[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(5): 550-554.
 [8] 李智盈, 韩宝芹, 贾志良, 等. 海洋弧菌 Z010 产几丁质酶的发酵条件研究[J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 1999, 29(4): 643-648.
 [9] 韩宝芹, 余长纓, 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.
 [10] 余长纓, 韩宝芹, 李静, 等. 海洋弧菌几丁质酶的产酶条件及分离纯化研究[J]. 高技术通讯, 2002, 9: 70-73.
 [11] 逢玉娟, 韩宝芹, 刘万顺, 等. 高产壳聚糖酶菌株的筛选与发酵条件研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2005, 35(2): 287-292.
 [12] 郑连英, 隋斯光. 产壳聚糖酶菌株的诱变育种及其产酶条件研究[J]. 浙江大学学报(工学版), 2004, 38(8): 1 039-1 042.
 [13] 王钦宏, 蔡静平. 壳聚糖酶生产菌的筛选、鉴定及其

- 产酶培养条件的研究[J]. 工业微生物, 2000, 30 (4): 1990. 57-59.
32-36.
- [14] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2003. 123-146.
- [15] 李如亮. 生物化学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1990. 57-59.
- [16] 吴潇钰. 高产壳聚糖酶菌株的筛选、鉴定及发酵产物的研究 [D].浙江: 浙江大学, 2002.
- [17] 陈小娥, 夏文水, 余晓斌. 壳聚糖酶高产菌株选育及发酵条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(3): 66-69.

Study on optimal fermentation conditions of a chitosanase-producing bacterium and purification of the chitosanase

DUAN Yan¹, HAN Bao-qin², DONG Wen², YANG Yan², CHANG Jing²,
LIU Wan-shun²

(1.Neuroscience and Cognition Research Center, Sun Yet-sen University, Guangzhou 510080,China; 2.College of Marine Life Sciences, Ocean University of China,Qingdao 266003,China)

Received:Dec.,12,2005

Key words: chitosanase; fermentation conditions; purification

Abstract: A strain with chitosanase activity was isolated from soil samples. The optimal compositions of the medium for P003 strain producing chitosanase were as follows(W/V): powder chitosan 1.0%, glucose 0.1%, (NH₄)₂SO₄ 2.0%, yeast extract 0.3%, K₂HPO₄0.07%, KH₂PO₄0.03%, NaCl 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, the initial pH5.0. The optimal cultivation conditions for P003 producing chitosanase were 500 mL flask containing 150 mL medium, 2.0% (V/V) amount of inoculation, 32°C incubating temperature and shaking cultivation at 150 r/min for 96 h. The chitosanase activity of the fermented broth is 108 U/mL when P003 was incubated under aforementioned conditions. The chitosanase of the fermented broth was extracted by ammonium sulfate precipitation, and purified by ion-exchange chromatography and gel filtration, and the molecular weight of the chitosanase was estimated to be 30.5 ku.

(本文编辑: 刘珊珊)