

混合发酵产甲壳素酶发酵条件优化及粗酶部分性质研究

屈宁, 韩宝芹, 刘万顺, 解卉

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 利用甲壳素作为唯一碳源从土壤中筛得的真菌 d, 与细菌 s 混合发酵, 对其最适产酶条件、所产甲壳素粗酶的制取以及粗酶性质进行初步研究。结果表明, 混合发酵产酶的能力与单独发酵相比显著提高, 混合发酵最适培养基组分为 ($\times 10^{-2}$ g/mL): 尿素 1.0, K_2HPO_4 0.07, KH_2PO_4 0.03, $MgSO_4$ 0.05, 酵母粉 0.5, 甲壳素 1.0, pH 5.5, 接种量 2% (体积分数), 32°C, 130 r/min 培养 72 h, 500 mL 锥形瓶培养基装量为 100 mL。经过优化, 发酵液中甲壳素酶活力从 0.73 U/mL 提升到 1.19 U/mL。通过对粗酶性质初步的研究, 发现该酶有较好的稳定性。

关键词: 甲壳素酶; 酶活力; 培养条件优化; 酶学性质

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)10-0035-04

甲壳素是由 2-脱氧-2-乙酰氨基-D-葡聚糖通过 β -(1,4)-糖苷键连接起来的天然碱性多糖, 大量存在于自然界中^[1]。在甲壳素研究领域酶学研究是一个重要的分支, 同甲壳素广泛存在于自然界一样, 甲壳素酶也广泛存在于动物、植物和微生物 (包括细菌、真菌、黏菌、原生动物、藻类等) 中^[2~3]。选择合适的生物酶降解甲壳素, 可以特异性地、选择性地切断甲壳素糖链上的 β -1, 4 糖苷键, 而得到特异的寡糖, 降解过程容易控制, 易于得到所需分子质量范围的低聚糖产品, 条件温和, 环境污染少, 但缺点是现有的酶活性低, 酶解时间长, 难于工业化生产, 因此采用高活性甲壳素酶法降解甲壳素已经成为国内外寡糖研究的热点^[4~9]。本工作从产甲壳素酶的真菌 d 和细菌 s 出发, 对其混合发酵条件进行优化, 确定了较适合的产酶培养条件; 发酵液经过冷冻离心, 硫酸铵分级盐析, 收集活力区间内的蛋白进行透析, 冷冻干燥, 制得粗酶, 并对粗酶的部分性质进行研究, 确定了最适反应条件。

1 材料和方法

1.1 菌株的来源

菌株 s 和 d 由实验室筛选。

1.2 培养基

斜面种子培养基组分 ($\times 10^{-2}$ g/mL):

$(NH_4)_2SO_4$ 1.0, NaCl 0.5, K_2HPO_4 0.07, KH_2PO_4 0.03, $MgSO_4$ 0.05, 酵母粉 0.5, 胶体甲壳素 0.1, 琼脂 2, pH 5.5。

液体发酵培养基组分 ($\times 10^{-2}$ g/mL):

$(NH_4)_2SO_4$ 1.0, NaCl 0.5, K_2HPO_4 0.07, KH_2PO_4 0.03, $MgSO_4$ 0.05, 酵母粉 0.5, 胶体甲壳素 0.1, pH 5.5。

1.3 酶活力的测定

0.2 mL 待测酶液加入含 0.2 g 的甲壳素底物的 1.8 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 5.6, 0.2 mol/L), 50°C 保温 10 min, 用沸水浴灭活 5 min 的酶液作为对照, 用 DNS 法^[10]测定还原糖含量。酶活力单位定义为在 50°C, pH 5.6 条件下 1 mL 酶液每分钟催化产生 1 μ mol 还原糖 (以 N-乙酰氨基葡萄糖计) 所需要的酶量 (U)。

1.4 发酵条件的优化

将菌株 s 和 d 接种于 100 mL 发酵培养基 (500 mL 三角瓶) 中, 经过 12 h 的活化后作为种子液, 除非特定说明外, 培养温度为 32°C, 时间为 72 h, 摇床转速为 130 r/min, 接种量为 2% (体积分数), 500 mL 三角瓶装液量为 100 mL, 每组试验重复 3 次, 每次试验 3 组平行样, 优化结果都用于以后试验。

1.4.1 不同氮源对产酶的影响

在发酵培养基中, 氮源分别为尿素、 NH_4NO_3 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、蛋白胨、牛肉膏、 KNO_3 , 质量浓度为 0.01 g/mL, 培养后测定发酵液酶活力, 试验不同氮源对产酶的影响。

1.4.2 不同碳源对产酶的影响

在发酵培养基中, 碳源分别为葡萄糖、蔗糖、壳聚糖、淀粉、甲壳素、纤维素, 质量浓度为 0.01 g/mL, 培养后测定发酵液酶活力, 试验不同碳源对产酶的影响。

1.4.3 培养基起始 pH 对产酶的影响

将发酵培养基的起始 pH 分别调至 3.5、4.0、

收稿日期: 2008-03-28; 修回日期: 2008-04-29

作者简介: 屈宁 (1982-), 男, 山东鱼台人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋微生物, E-mail: dayuan2002@sohu.com; 韩宝芹, 通讯作者, 教授, 硕士生导师, E-mail: baoqinh@ouc.edu.cn

4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5, 培养后测定发酵液酶活力, 试验培养基起始 pH 对产酶的影响。

1.4.4 接种量对产酶的影响

在发酵培养基中, 分别按 1%、2%、3%、4%、5%、6% (体积分数) 的接种量接种菌液, 培养后测定发酵液酶活力, 试验接种量对产酶的影响。

1.4.5 通气量对产酶的影响

分别在 500 mL 三角瓶中装入 50、100、150、200、250 mL 发酵培养基, 培养后测定发酵液酶活力, 试验培养基通气量对产酶的影响。

1.5 甲壳素酶粗酶的制备

1.5.1 发酵培养

利用优化后的发酵条件进行混合发酵, 72 h 后将所得发酵液在 4℃ 下, 6 000 r/min 离心 40 min, 取发酵上清液。如无特别说明所有纯化步骤均在 4℃ 进行。

1.5.2 硫酸铵分级盐析曲线的测定

取离心后的发酵上清液, 冰浴, 在磁力搅拌器搅拌下加入粉末硫酸铵至硫酸铵饱和度达到 10%, 4℃ 静置过夜, 6 000 r/min 冷冻离心 40 min, 收集沉淀, 并用少量冷却的蒸馏水溶解, 透析除盐; 再向离心后的上清液中加入硫酸铵至终饱和度到 20%, 重复上述步骤。同法分别调硫酸铵饱和度为 30%~100% 进行实验。分别测定不同饱和度透析液的酶活力和蛋白质浓度, 计算比活力, 由此确定甲壳素酶分段盐析所需要的硫酸铵的饱和度。

1.5.3 粗酶粉的制备

根据盐析曲线收集活性区间的沉淀, 将其充分透析脱盐后, 经冷冻干燥即可制得甲壳素酶的粗酶粉。

1.6 甲壳素粗酶酶学性质初步研究

取冷冻干燥所得甲壳素酶粗品, 溶于去离子水配制成 0.01 g/mL 的酶溶液, 保存于 4℃ 中, 作为研究其基本酶学性质的初始酶液。

1.6.1 温度对酶反应活性的影响

分别选取不同温度 (30、40、50、60、70、80℃) 作为酶反应的作用温度, 测定酶活力, 以确定该甲壳素酶的最适反应温度。

1.6.2 温度对酶稳定性的影响

将酶液在不同温度 (30、40、50、60、70、80℃) 的水浴中静置 30 min, 取出后测定酶活力, 以确定不同温度对甲壳素酶稳定性的影响。

1.6.3 pH 对酶反应活性的影响

分别配制 pH 4.0、4.5、5.0、5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液 (0.2 mol/L), pH 6.0、6.5、7.0 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (0.2 mol/L), pH 7.5、8.0、8.5 的 Tris-盐酸缓冲液 (0.2 mol/L) 和 pH 9.0 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (0.05 mol/L), 取不同 pH 的缓冲液 1.8 mL, 作为反应时所用的缓冲液, DNS 法测定酶活力 (同 1.3), 以确定该甲壳素酶的最适反应 pH。

1.6.4 pH 对酶稳定性的影响

用不同 pH 缓冲液 (同 1.6.3) 配制质量浓度为 0.01 g/mL 的酶溶液, 4℃ 静置 12 h 后, 分别取 0.2 mL 的混合液作为待测酶液, DNS 法测定方法 (同 1.3) 测定残存酶活力, 以确定不同 pH 对甲壳素酶稳定性的影响。

2 结果与讨论

2.1 菌株 d、菌株 s 及两种菌混合培养生长曲线和产酶过程

图 1 为菌株 d 和菌株 s 的单独培养和混合培养的比较。可以看出, 菌株 s 单独培养时, 生长缓慢, 且几乎不表现出酶活力, 产酶能力弱; 菌株 d 单独培养时, 生长良好, 不过其酶活力较低, 产酶能力不高; 菌株 s、d 混合培养时, 菌体密度与单独培养相差无几, 但发酵液表现出较高的酶活力且培养 72 h 酶活力最高。用混合发酵的方法产甲壳素酶, 目前文献未有此类的报道。二者的具体相互作用机制有待于进一步的探讨。

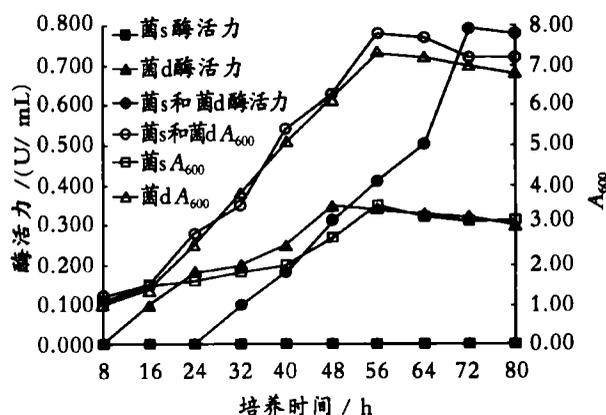


图 1 菌株 d 和菌株 s 的单独培养和混合培养的比较
Fig. 1 Time course of growth and enzyme of s, d and s+d

2.2 发酵条件的优化

2.2.1 不同氮源对产酶的影响

图 2 为不同氮源对产酶的影响。图 2 表明, 在这些不同形式的氮源中尿素最有利于产酶, 酶活力最高, NH_4NO_3 和 KNO_3 次之, 尿素为最适氮源。

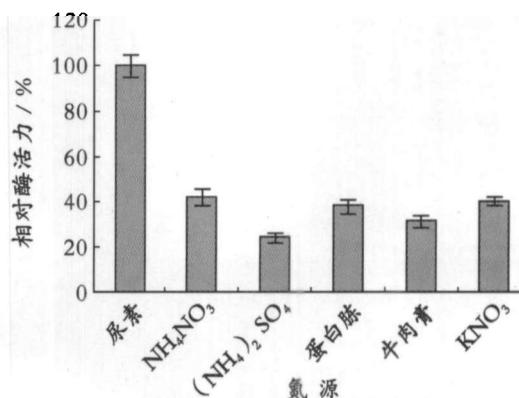


图 2 不同氮源对产酶的影响
Fig. 2 Effects of different nitrogenous sources on chitinase production

2.2.2 不同碳源对产酶的影响

表 1 为不同碳源对产酶的影响。表 1 表明,在这些不同形式的碳源中粉末甲壳素最有利于产酶,为最适碳源。

表 1 不同碳源对产酶的影响

Tab. 1 Effects of different various carbon sources on chitinase production

碳源	酶活力(U/mL)
葡萄糖	0.00
蔗糖	0.00
壳聚糖	0.30
淀粉	0.00
甲壳素	0.95
纤维素	0.00

2.2.3 培养基起始 pH 对产酶的影响

图 3 表明,pH 为 5.0~6.5 酶活力较高,pH 5.5 时产酶能力最强。当起始 pH 低于 5.0 或高于 6.5 时,产酶能力均明显下降。最适的产酶 pH 5.5。

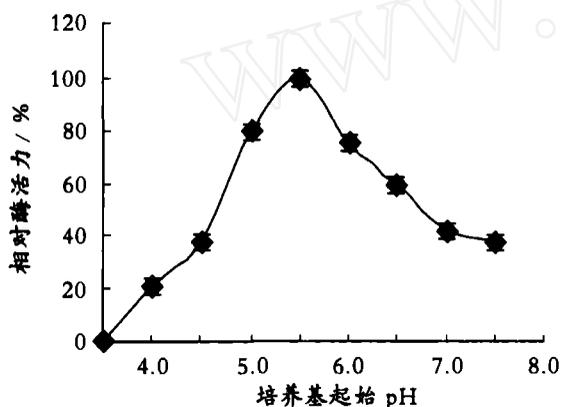


图 3 培养基起始不同 pH 对产酶的影响

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

2.2.4 接种量对产酶的影响

图 4 为接种量对产酶的影响。图 4 表明液体发酵培养基的接种量为 2% (体积分数),发酵液酶活力最高,但当接种量超过 2% 时酶活力降低,2% 的接种量为最适。

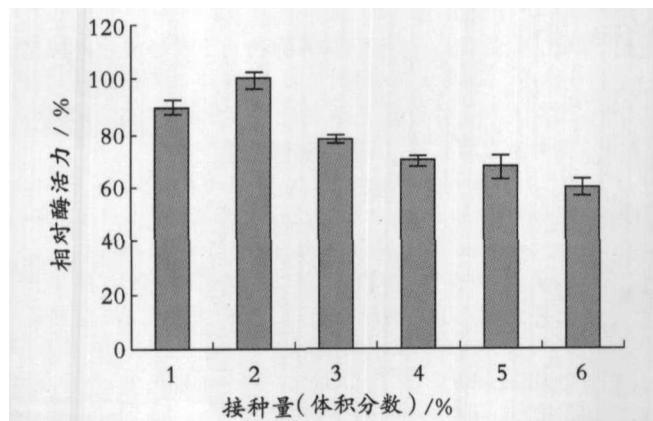


图 4 接种量对产酶的影响

Fig. 4 Effects of inoculation on chitinase production

2.2.5 通气量对产酶的影响

图 5 为通气量对产酶的影响。图 5 表明培养基装瓶量对产酶的影响很明显,适宜的装瓶量为 100 mL,说明菌株的生长对溶氧有较高要求。装瓶量 50 mL 时,发酵液体积小,挥发对整个发酵体系影响较大,从而导致产酶低下影响发酵。

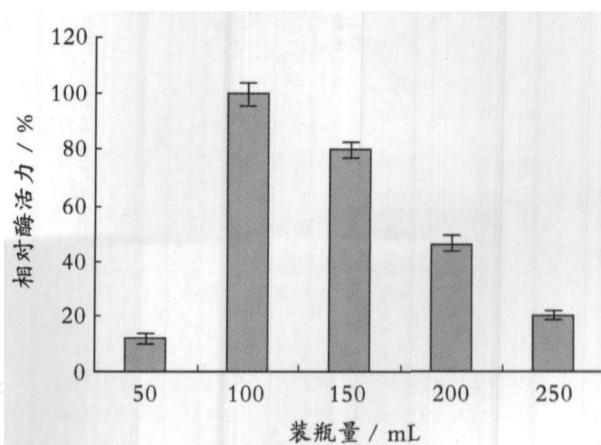


图 5 通气量对产酶的影响

Fig. 5 Effects of ventilation on chitinase production

2.3 甲壳素酶粗酶的制备

分别测定在不同硫酸铵饱和度下析出蛋白的酶活力和蛋白质浓度,计算比活力,得到硫酸铵分级盐析曲线(图 6),在 40%~80% 硫酸铵饱和度区间内的透析液的酶活力较高。因此,盐析后收集此区间内的沉淀,充分透析脱盐后经冷冻干燥即可制得甲壳素粗酶粉。甲壳素酶得到了初步的纯化。处于 0~40% 和 80%~100% 饱和度区间的沉淀蛋白没有酶活力,为杂蛋白。

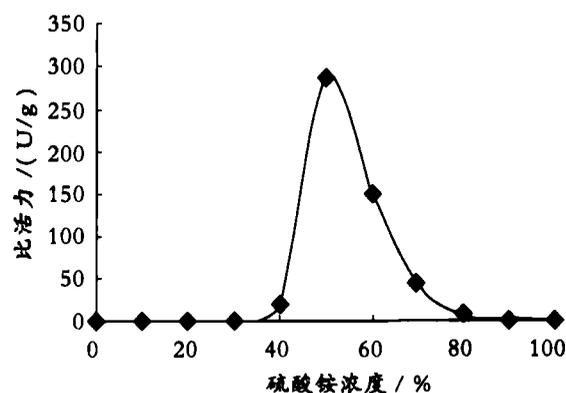


图 6 硫酸铵分级盐析曲线

Fig. 6 Ammonium sulfate fraction precipitation curve

2.4 甲壳素酶基本酶学性质的研究

2.4.1 温度对酶反应活性及稳定性的影响

图 7 为温度对酶活反应活性和酶稳定性的影响。由图 7 酶活力曲线可以看出,在 50~70℃,酶活力高于其他温度。尤其在 60℃ 时的酶活力达到最高。从酶稳定性曲线可以看出 30~90℃,随着温度

的升高,该甲壳素酶活力逐渐降低:低于 30℃,酶活力稳定,温度在 30~60℃,酶的稳定性会受到轻微的影响,酶活力一定程度的降低;当温度高于 60℃,酶的稳定性受到显著影响,当温度高于 90℃时,该酶的稳定性被彻底破坏而导致酶失活。

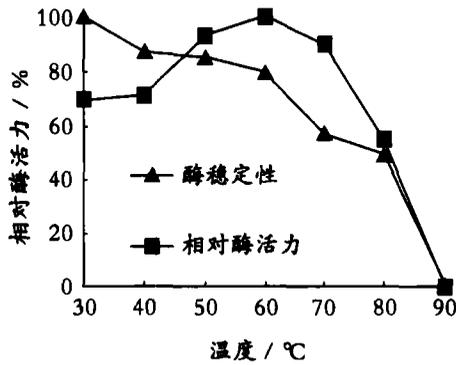


图 7 温度对酶活反应活性和酶稳定性的影响

Fig. 7 Effects of temperature on chitinase activity and chitinase stability

2.4.2 pH 对酶反应活性及稳定性的影响

图 8 为不同 pH 对酶活力和酶稳定性的影响。图 8 中酶活力曲线表明,在 pH5.0 和 pH6.5 时,甲壳素酶活性都很高,推测该酶液中很可能含有 2 种甚至更多种的酶^[11,12]。pH5.0 时酶活力最高。pH 超过 8.0,在碱性的条件下仍有一定的酶活,比较罕见,如枯草杆菌 KH1 (*Bacillus* sp.) 所产甲壳素酶的最适 pH 是 7.5~9.0;有的在中性范围表现最大活性^[13]。酶稳定性曲线表明,pH5.0~7.5,该甲壳素酶活力较稳定。当 pH 低于 5.0 或者高于 7.5 时,该酶的稳定性会受到一定程度的影响。

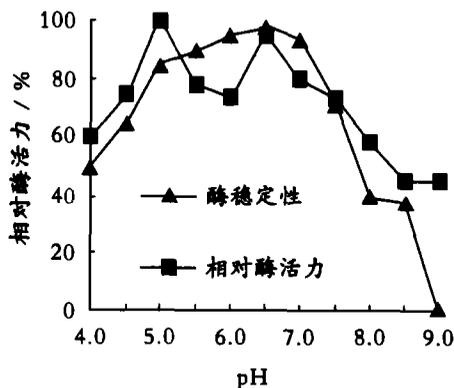


图 8 不同 pH 对酶活力和酶稳定性的影响

Fig. 8 Effects of pH on chitinase activity and chitinase stability

3 结论

通过单因素对两株菌 d 和 s 产甲壳素酶混合发酵条件进行优化表明,较适合的产酶培养基组分为 ($\times 10^{-2}$ g/mL): 尿素 1.0, K_2HPO_4 0.07, KH_2PO_4

0.03, $MgSO_4$ 0.05, 酵母粉 0.5, 甲壳素 1.0, pH 5.5, 接种量 2% (体积分数), 32℃, 130 r/min 培养 72 h, 500 mL 锥形瓶培养基装量为 100 mL。经过优化,发酵液中甲壳素酶活力从 0.73 U/mL 提升到 1.19 U/mL, 提高了 1.63 倍。

通过对粗酶性质初步的研究,很可能存在多种甲壳素酶共同作用,而且从在 pH 7.0 以上仍能保持一定的酶活力推断,该发酵液中很可能存在比较稀少的碱性甲壳素酶。初步研究表明此酶液具有较好的稳定性,为以后酶的分离纯化、产业化生产及活性甲壳素寡糖的开发奠定了基础。同时对于菌株的菌种鉴定和甲壳素酶蛋白分离纯化、结构的分析、酶基因的克隆及序列分析等尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 杜予民. 甲壳素化学与应用的新进展 [J]. 武汉大学学报(自然科学版), 2000, 46(2): 181-186.
- [2] 韩宝芹, 余长缨. 几丁质酶研究现状及展望 [J]. 中国海洋药物, 2001, 5: 41-43.
- [3] 杨承勇, 周世宁. 几丁质酶的研究及应用前景 [J]. 仲恺农业技术学院学报, 1999, 12(1): 64-69.
- [4] Antomia R, Ulrich M, Roland B, et al. Chitinase of *Streptomyces olivaceoviridis* and significance of processing for multiplicity [J]. *J Bacteriol*, 1992, 174(11): 3450-3454.
- [5] Gupta R, Saxena R K, Chaturvedi P. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*, its potential in fungal cell wall lysis [J]. *J Appl Bacteriol*, 1995, 78(4): 378-383.
- [6] Pelletier A, Syguseli J. Purification and characterization of three chitinase activities from *Bacillus megaterium* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(4): 844-848.
- [7] Tetsuya N, Mieho K, Shuzo S. Purification and characterization of two forms of maltotetraose forming amylase from *Pseudomonas srtuterri* [J]. *Agric Biochem*, 1990, 54(3): 737-743.
- [8] 李梅, 陶勇, 严自正. 溜曲霉 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的底物特异性 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1991, 23(4): 284-290.
- [9] 彭仁旺, 黄秀梨. 球孢白僵菌胞内几丁质酶的分离纯化及性质 [J]. 微生物学报, 1995, 35(6): 427-432.
- [10] 北京大学生物教研室. 生物化学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1992.
- [11] Krishnavenis S, Liang GH, Muthukrishnan S, et al. Purification and partial characterization of chitinases from sorghum seeds [J]. *Plant Sci*, 1999, 144(1): 1-7.
- [12] 杨承勇, 周世宁, 周毅频, 等. 海洋细菌 11211 的生长条件及其几丁质酶研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(6): 91-94.
- [13] Omumasaba C A, Yoshida N, Sekiguchi Y, et al. Purification and some properties of a novel chitosanase from *Bacillus subtilis* KH1 [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2000, 46: 19-27.

(下转第 44 页)

(上接第 38 页)

Optimization of the mixed fermentation conditions for chitinase production and some properties of the crude enzyme

QU Ning, HAN Bao-qin, LIU Wan-shun, XIE Hui

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Mar. 28, 2008

Key words: chitinase; activity; optimization of fermentation condition; enzyme characterization

Abstract: As an original chitinase-producing strains and strain d, screening from the soil, the study shows the mixed fermentation we get is a higher chitinase-producing. The optimal compositions of the medium for the strain producing chitinase are as follows ($\times 10^{-2}$ g/mL): $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 1.0, K_2HPO_4 0.07, KH_2PO_4 0.03, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, yeast extract 0.5 and the chitin 1.0 (pH 5.5). The optimal cultivation conditions for the strain producing chitinase were 500 mL flask containing 100mL medium, 2% amount of inoculation, 32°C incubating temperature and shaking cultivation at 130 r/min for 72hours. The most activity of chitinase of fermentation broth is 1.19 U/mL. According to the study, the crude enzyme showed a good stability.

(本文编辑:康亦兼)