

产壳聚糖酶菌株的筛选、鉴定及酶学特性分析

王艳君^{1*} 卓少玲¹ 陈盛¹ 杨谦²

(1. 福建师范大学 福清分校生化系 福建 福清 350300)

(2. 哈尔滨工业大学 生命科学与工程系 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:【目的】利用筛选培养基,从福建沿海潮间带泥样中分离筛选产壳聚糖酶的菌株,并研究菌株的产酶特性。【方法】通过形态学观察,结合 26S rDNA 序列进行分类鉴定,采用 DNS 法测定酶活力。【结果】筛选得到产壳聚糖酶的菌株 KQ-1002 与草酸青霉 (*Penicillium oxalicum*) 的同源性为 99%,并初步鉴定为青霉属的一种。发酵培养的最适温度为 30 °C,最适碳源为 1.0% 水溶性壳聚糖,最适氮源为 1.87% (NH₄)₂SO₄,最适 pH 为 6.0。该菌株液体发酵培养 72 h 产壳聚糖酶活性最高,经优化后最高产酶量为 18 U/mL。纯化后的壳聚糖酶经 SDS-PAGE 分析其分子量约 40 kD。酶促反应最适 pH 为 5.0,最适反应温度为 55 °C, *K_m* 值为 1.293 g/L。在离子浓度为 1.0×10⁻³ mol/L 时,金属离子 Cu²⁺、Hg²⁺、Ag⁺ 对酶的活性均有强烈的抑制作用。壳聚糖酶对不同底物及脱乙酰度的壳聚糖具有不同的降解作用。【结论】筛选获得产壳聚糖酶的真菌菌株 KQ-1002 的壳聚糖酶活力经优化后提高了约 7 倍,是一株具有研究和应用潜力的产壳聚糖酶菌株。

关键词: 壳聚糖酶, 26S rDNA 鉴定, 产酶条件, 酶学特性

Screening, identification and enzymatic properties of chitosanase-producing strain

WANG Yan-Jun^{1*} ZHUO Shao-Ling¹ CHEN Sheng¹ YANG Qian²

(1. Fuqing Branch of Fujian Normal University, Fuqing, Fujian 350300, China)

(2. Department of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

基金项目: 福建省自然科学基金项目(No. 2010J05056); 福建省教育厅科技项目(No. JB10201)

*通讯作者: ✉: biotech0455@139.com

收稿日期: 2012-03-12; 接受日期: 2012-07-03

Abstract: [Objective] By screening of chitosanase strains in mud samples from the Fujian coastal intertidal with screening medium, studied the characteristics of the strains for enzyme production. **[Methods]** Through morphological observation, combined with 26S rDNA sequences were classified and identified, DNS method was use for the determination of enzyme activity. **[Results]** The conclusion showed a 99% similarity between the chitosanase strain KQ-1002 and *Penicillium oxalicum*. The strain was tentatively identified as a species of *Penicillium* fungus. The optimal fermentation temperature was 30 °C, the optimum carbon source was the 1.0% soluble chitosan, the optimal nitrogen source was 1.87% (NH₄)₂SO₄, and the optimum pH was 6.0. Cultured for 72 h under liquid fermentation on the strains, the chitosanase-producing activity reached the maximum, and the maximum of enzyme production had been optimized to 18 U/mL. The molecular masses of purified enzymes was 40 kD which analyzed by SDS-PAGE. Enzymatic reactions' optimum pH was 5.0, the optimum temperature was 55 °C, and K_m was 1.293 g/L. When ion concentration reached 1.0×10^{-3} mol/L, metal ions of Cu²⁺, Hg²⁺, Ag⁺ would strongly inhibit the enzyme' activity. There was a different degradation of chitosanase on various substrates and deacetylation of chitosan. **[Conclusion]** Through screening, the chitosanase activity of chitosanase-producing fungal strains KQ-1002 which had been optimized boosted by approximately 7 times, and it is a chitosanase-producing strains of research and potential applications.

Keywords: Chitosanase, 26S rDNA, Fermentation conditions, Enzymatic properties

壳聚糖(Chitosan)是由 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)和葡萄糖胺(GlcN)通过 β -1,4 糖苷键相连接的多糖,与甲壳素、壳寡糖均被称为甲壳素类物质,被誉为继糖类、蛋白质、脂肪、维生素等生命元素之外的第六大生命物质。将壳聚糖进一步降解为可溶于水的生物小分子就是壳寡糖,壳寡糖由于其生物相容性好、易于被人体吸收等优势,其商业产品已遍布各个领域,主要涉及功能性食品、药品、环保、化工等^[1-6];通过化学方法降解壳聚糖制备壳寡糖的方法具有污染环境、产物不均一等缺点,逐渐被生物酶法取代。壳聚糖酶(Chitosanase, EC3.2.1.132)就是专一性降解壳聚糖为壳寡糖的水解酶类,根据其作用的方式不同,可将壳聚糖酶分为 3 个亚型,亚型 I 壳聚糖酶水解 GlcNAc-GlcN 和 GlcN-GlcN 之间的糖苷键;亚型 II 壳聚糖酶水解 GlcN-GlcN 之间的糖苷

键;亚型 III 壳聚糖酶水解 GlcN-GlcNAc 和 GlcN-GlcN 之间的糖苷键^[7]。利用生物酶法制备壳寡糖虽然具有条件温和、不污染环境、产物相对较均一等优势;但壳聚糖酶的活性及其效率直接影响到工业化生产过程中的产值及成本,因此,获得高产量、高活性的壳聚糖酶产生菌株为工业化生产提供新酶源的意义重大。本研究从福建沿海潮间带泥样中筛选得到一株产壳聚糖酶活性较高的菌株,并对其产酶特性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 样品及试剂

样品取自福建东壁岛沿海潮间带泥样;水溶性壳聚糖(脱乙酰度大于 90%),浙江金壳制品有限公司;其他试剂均为国产分析纯。真菌基因组

DNA 抽提试剂盒购自上海生工; *rTaq* 酶、胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; 引物合成及测序由上海生工完成。

1.2 产壳聚糖酶菌株的分离

初筛培养基: 水溶性壳聚糖 1.0%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%、酵母提取物 (Yeast extract) 0.1%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%、NaCl 0.5%、琼脂 2.0%, 调整 pH 为 6.5。

液体诱导培养基(复筛): 水溶性壳聚糖 1.0%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.87%、酵母提取物 0.3%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.14%、 KH_2PO_4 0.03%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.13%、NaCl 0.5%、葡萄糖 0.1%, 调整 pH 为 6.5。培养基灭菌条件: 1×10^5 Pa, 20 min; 壳聚糖单独灭菌: 1×10^5 Pa, 15 min。

称取土样 10 g, 放于盛 90 mL 无菌水并带有玻璃珠的三角烧瓶中, 振荡约 20 min, 使土样与水充分混合, 将样品打散, 将土壤稀释液依次制成不同浓度后涂布于初筛培养基制备的平板上, 放于 28°C – 30°C 恒温培养 3–5 d, 观察平板上长出的菌落情况及菌落周围是否出现透明圈。测量各菌落直径(d)和透明圈直径(D), 以 D/d 比值和 d 值作为菌株产壳聚糖酶能力的指标, 挑选比值较大且生长速度较快的菌株进行分离纯化, 并于斜面培养基上保存, 供复筛用。将初筛菌种接入液体发酵培养基(装液量为 50/250 mL), 于 28°C – 30°C 、150 r/min 摇床条件下摇瓶培养 72 h, 取出发酵液于 4 000 r/min 低温离心 20 min, 取上清液即粗酶液, 并检测其酶活性。

1.3 菌株鉴定

(1) 形态学观察: 参考真菌分类学鉴定手册^[8], 从孢子形态及真菌产孢类型、孢子梗的大小及分枝等方面进行初步分类鉴定。(2) 菌株的 26S rDNA 鉴定: 扩增真菌基因组 26S D1/D2 区。其中正向引物 26s-F: 5'-GCATATCAATAAGCGG AGGAAA AG-3'; 反向引物 26s-R: 5'-GGTCCGT

GTTTCAAGACGG-3'。反应条件为: 98°C 5 min; 95°C 35 s, 55°C 35 s, 72°C 40 s, 共 35 个循环; 72°C 8 min。将扩增条带胶回收后, 送交上海生工公司测序。测序后所得序列提交 GenBank 中进行 BLASTn 比对, 用 ClustalX 1.8 进行多序列比对分析, 利用 MEGA 4.0 软件 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.4 壳聚糖酶活力的测定

壳聚糖酶活力的测定采用 DNS 法^[9]。取粗酶液 0.1 mL 加入 0.9 mL 1%的壳聚糖溶液和 1 mL pH 为 5.6 的醋酸缓冲溶液, 在 50°C 保温 10 min, 加入 1.5 mL DNS 终止酶促反应, 沸水浴显色 5 min, 冷却后取上清液测 520 nm 处的吸光度值。用相同方法处理煮沸灭活的粗酶液作为对照, 并绘制氨基葡萄糖标准曲线, 计算反应液中的还原糖含量, 换算壳聚糖酶的酶活力。酶活定义为: 每毫升酶液每分钟产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酶活力单位(U)。

1.5 发酵产酶条件的研究

1.5.1 单因素条件对发酵产酶的影响: (1) 最佳发酵时间的确定: 将菌株接入液体发酵培养基中, 培养 60–144 h, 每隔 12 h 取样一次, 并测定酶活力, 装液量为 50/250 mL, 培养基初始 pH 为 6.0, 培养温度为 30°C , 150 r/min 振荡培养; (2) 初始 pH 对产酶的影响: 设定液体发酵培养基的初始 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5, 培养温度为 30°C , 装液量为 50/250 mL, 150 r/min 振荡培养 72 h; (3) 发酵温度对产酶的影响: 设定菌株的摇瓶培养温度分别为 25°C 、 28°C 、 30°C 、 32°C 、 35°C 、 37°C , 装液量为 50/250 mL, 150 r/min 振荡培养 72 h; (4) 碳源对产酶的影响: 分别以 1%蔗糖、乳糖、麦芽糖、可溶性淀粉替代液体培养基中的 1%水溶性壳聚糖, 在 30°C 条件下 150 r/min 振荡培养 72 h, 装液量为 50/250 mL, 培养基初始 pH 为 6.0; (5) 氮源对产酶的影响: 分

别以 NH_4NO_3 、 KNO_3 、胰蛋白胨、尿素、牛肉膏替代液体发酵培养基中的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，装液量为 50/250 mL，培养基初始 pH 为 6.0，在 30 °C 条件下 150 r/min 振荡培养 72 h；(6) 装液量对产酶的影响：将 250 mL 的三角烧瓶中分别装入 30、50、70、90、110 mL 液体发酵培养基，培养基的初始 pH 为 6.0，在 30 °C 条件下 150 r/min 振荡培养 72 h，取样测定酶活性，分别测定单因素条件对产酶活力的影响。

1.5.2 发酵条件优化：采用正交法得出 KQ-1002 菌株产壳聚糖酶的最佳条件。选择最佳碳源、最佳氮源、培养温度、装液量、接种量、培养时间和初始 pH 为 7 个因素，每个因素取 3 个水平。选用 $\text{L}_{18}(3^7)$ 正交设计，测定壳聚糖酶活力，每个试验 3 次重复。

1.6 壳聚糖酶的初级纯化及 SDS-PAGE 分析

将菌株接种于产酶培养基中(装液量为 50/250 mL)，150 r/min、28 °C–30 °C 下摇瓶培养 72 h 后于 4 000 r/min 离心 20 min。取上清液加入 20% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，4 °C 静置 2 h 后，于 10 000 r/min 下离心 10 min，取上清液缓缓加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 80% 饱和度，4 °C 下静置 12 h，10 000 r/min 离心收集沉淀，将沉淀装入透析袋中并加入 NaAc-HAc 缓冲液透析 24 h，每隔 8 h 换一次缓冲液，用 PEG20000 吸水浓缩。进行 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析，确定目的蛋白的分子量，并检测样品的纯化情况。分别测定纯化前后溶液中酶活性及蛋白含量，计算

纯化倍数、比活性及回收率。

1.7 壳聚糖酶的酶学特性分析

(1) 酶促反应最适温度的测定：将加入醋酸缓冲液的 KQ-1002 壳聚糖酶分别置于 40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C 水浴恒温 10 min 后，加入 1.5 mL DNS，沸水浴 5 min，显色。冷却后测 520 nm 处的 OD 值，计算壳聚糖酶活力。(2) 酶促反应最适 pH 的测定：将 pH 范围设定为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的醋酸缓冲液中加入 KQ-1002 壳聚糖酶液，作用于底物水溶性壳聚糖，按照 1.4 方法测定壳聚糖酶活力，以下同。(3) 金属离子对壳聚糖酶活力的影响：KQ-1002 壳聚糖酶液缓冲体系中，加入金属离子的浓度为 1.0×10^{-3} mol/L。(4) 壳聚糖酶的底物特异性分析：分别以水溶性壳聚糖、粉末状壳聚糖、固体甲壳素、DEAE 纤维素、羧甲基纤维素为底物测定壳聚糖酶活力。(5) 底物壳聚糖的脱乙酰度对酶活力的影响：壳聚糖的脱乙酰度分别为 78%、83%、89%、92%、96%。(6) 酶促反应米氏常数的测定：壳聚糖浓度分别为 2、5、10、30、40 g/L，与 KQ-1002 壳聚糖酶液作用，测定壳聚糖酶活力。

2 结果

2.1 菌株筛选结果

将所取样品在初筛平板上涂布培养 3–4 d，观察菌株周围的水解圈情况，水解圈与菌落直径的比值见表 1，其中水解圈较大且生长速度较快的一株真菌如图 1 所示，菌丝呈绿色，产孢后迅

表 1 产壳聚糖酶菌落水解圈直径和菌落直径的比值 Table 1 D/d values of the chitosanase-producing strains				
序号 Number	水解圈直径 Hydrolysis zone diameter (D, cm)	菌落直径 Colony growth diameter (d, cm)	D/d	酶活力 Enzyme activity (U/mL)
M-1	1.18	0.45	2.6	2.668±0.090
M-2 (KQ-1002)	1.74	0.53	3.3	6.784±0.124
M-3	1.78	0.49	3.6	6.402±0.116
M-4	1.61	0.69	2.3	4.992±0.083

速扩展至整个平板, 形成大范围的水解圈, 可将初筛平板全部水解; 取少许菌丝于光镜下观察其孢子梗及产孢情况如图 2 所示, 孢囊梗有分枝, 参考真菌分类鉴定手册, 初步确定该菌株属于青霉属。

2.2 菌株分子生物学鉴定

通过 26S rDNA 序列分析, 对该菌株进行分类鉴定, 经 PCR 扩增得到一条大小为 715 bp 的 DNA 序列, 并提交 NCBI 数据库进行 BLASTn 比

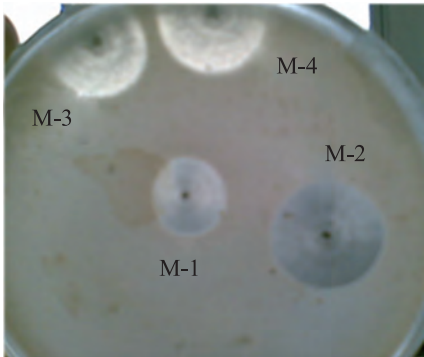


图 1 产壳聚糖酶菌株的平板筛选结果
Fig. 1 Screening plate results of chitosanase-producing strains

对, 构建进化树, 结果如图 3 所示, 从建立的系统发育树中可以看出, 菌株 KQ-1002 与青霉属 (*Penicillium* sp.) 的亲缘关系最近, 故将该菌株命名为 *Penicillium* sp. KQ-1002。

2.3 发酵产酶条件的优化

2.3.1 发酵时间对产酶活力的影响: 发酵培养不同时间测定菌株的产酶活性, 结果如图 4A 所示, 曲线呈现双峰, 其中第 72 小时产酶活性最高, 第二个产酶高峰出现在第 132 小时, 生长曲线呈现



图 2 KQ-1002 菌株的显微结构观察(400×)
Fig. 2 Microstructure of KQ-1002 strain (400×)

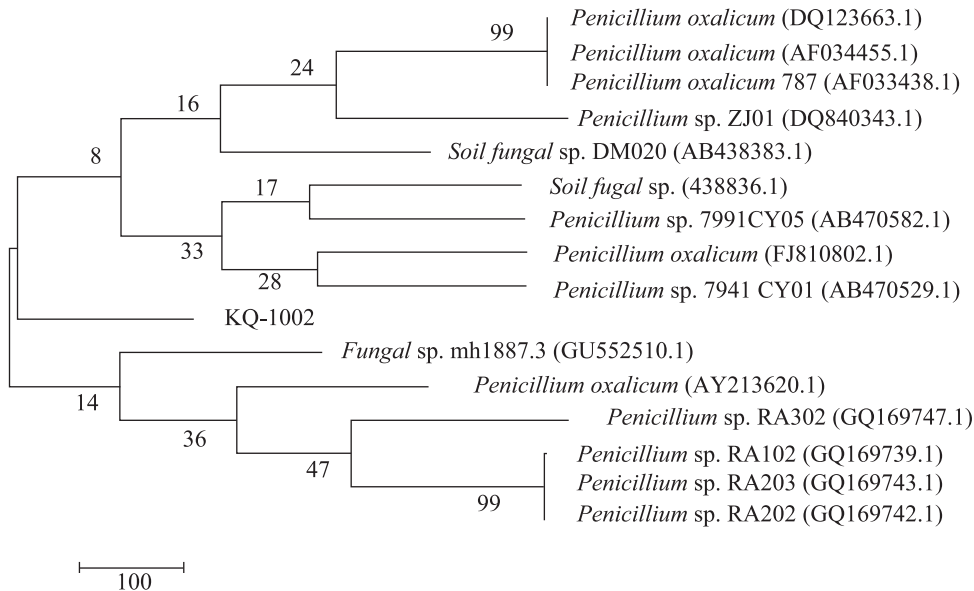


图 3 菌株 KQ-1002 部分 26S rDNA 序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the strain KQ-1002 based on 26S rDNA sequences

注: 括号中的序号代表序列 GenBank 中登录号; 分支点数字代表步长值; 标尺代表序列间分歧度。
Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on neighbor-joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 100 represents sequence divergence.

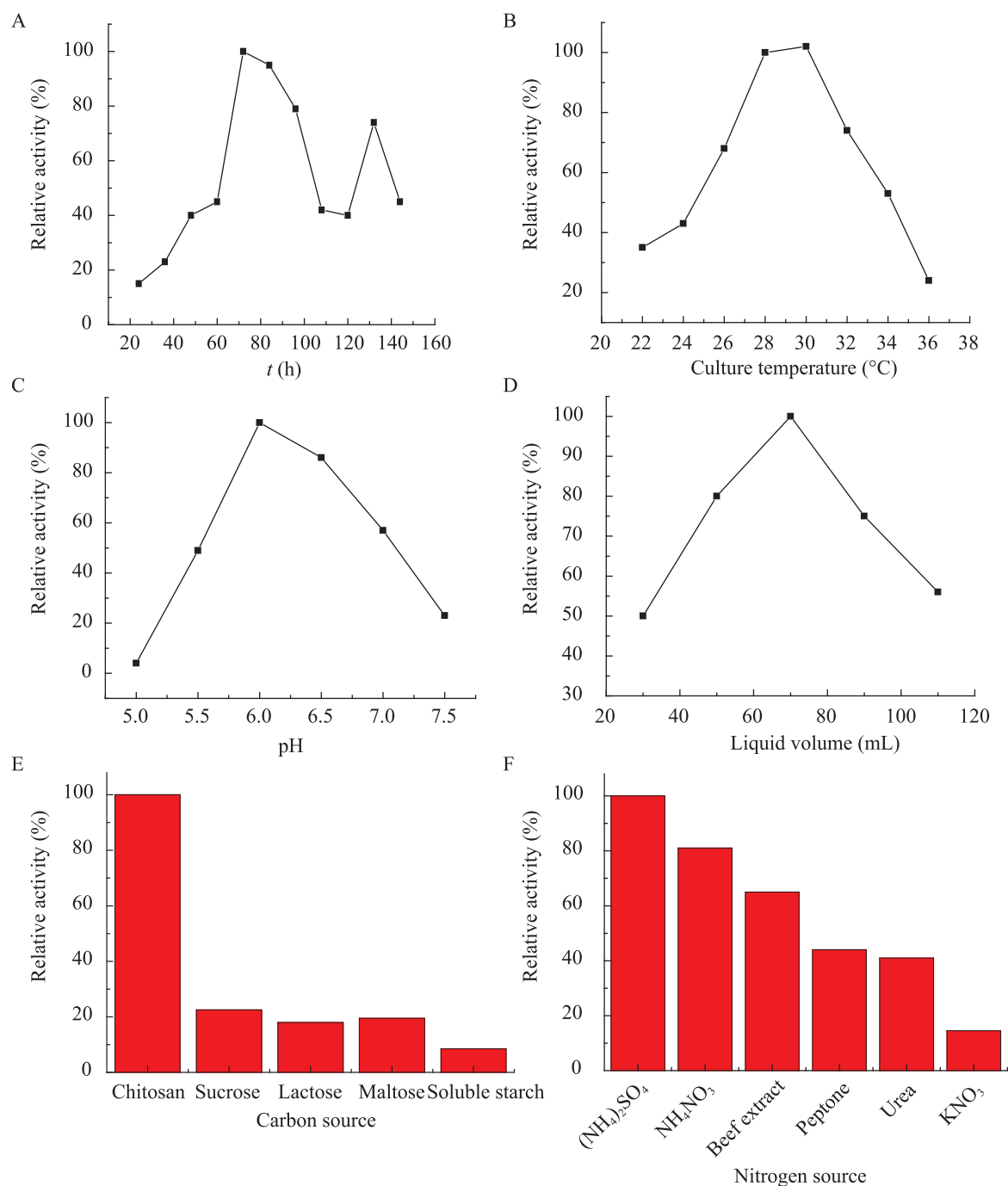


图 4 不同发酵条件对产酶活力的影响

Fig. 4 The impact of different fermentation conditions on the enzyme activity

注: A: KQ-1002 生长曲线; B: 温度对酶活力的影响; C: 初始 pH 对酶活的影响; D: 装液量对酶活的影响; E: 最适碳源的测定; F: 最适氮源的测定。

Note: A: Growth curve of strain KQ-1002; B: Effect of temperature on enzyme activity; C: Effect of initial pH on enzyme activity; D: Effect of liquid volume on enzyme activity; E: Determination of the optimum carbon source; F: Determination of the optimum nitrogen source.

双峰的原因推测为随着培养时间的延长, 菌体出现自溶现象, 菌体生长趋于衰退, 发酵液 pH 的变化引起酶的生物合成受阻。因此, 确定菌体旺盛生长的最佳产酶时间为 72 h。

2.3.2 最适培养温度对产酶活力的影响: 在不同的培养温度下测定 KQ-1002 菌株产壳聚糖酶的活力, 结果如图 4B 所示, 最适培养温度范围为 28 °C–32 °C, 当培养温度超过 30 °C 时, 产酶活力有所下降。

2.3.3 初始 pH 对产酶活力的影响: 培养基的初始 pH 对产酶活力的影响结果如图 4C 所示, pH 为 6.0–6.5 时酶活力较高; pH 为 6.0 时酶活力达到最高值。因此, 确定该菌株培养的最佳初始 pH 为 6.0。

2.3.4 装液量对产酶活力的影响: 装液量对产酶活力的影响如图 4D 所示, 250 mL 三角烧瓶的装液量为 70 mL 时, KQ-1002 菌株产壳聚糖酶活力最高。因此, 确定最佳装液量为 70/250 mL。

2.3.5 不同碳源对产酶活力的影响: 在产酶培养基中分别加入 5 种不同的碳源, 对该菌株产壳聚糖酶的活力进行测定, 结果由图 4E 可知, 以壳聚糖为碳源有利于该菌株产酶, 推测该菌株所产壳聚糖酶是一种诱导酶。

2.3.6 不同氮源对产酶活力的影响: 由图 4F 可知, 试验所用的 6 种氮源中, 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源的培养基产酶活力最高, NH_4NO_3 次之, 以 KNO_3 为氮源的培养基中产壳聚糖酶活力最低。因此, 确定该菌株诱导培养产壳聚糖酶的最适氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

2.3.7 发酵条件优化: 综合上述单因素试验结果, 采用正交法得出 KQ-1002 菌株产酶的最佳条件。由表 2 可知, 在试验的 7 个因素中, 培养温度、硫酸铵浓度、壳聚糖浓度和初始 pH 的 R 值

较大; 培养时间、装液量和接种量的 R 值较小。由各个因素或因素之间交互作用的极差(R)大小, 可以确定对菌体产酶活力的 4 个主要影响因素依次为: 培养温度、硫酸铵、壳聚糖、初始 pH。确定 KQ-1002 菌株的最佳发酵条件为: 壳聚糖 1.0%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.87%、调 pH 至 6.5、接种量 4%、装液量为 70/250 mL, 30 °C 下 150 r/min 摇床培养 72 h。在最适产酶培养条件下, 菌株 KQ-1002 发酵液的壳聚糖酶活力可达到 18 U/mL。

2.4 酶的初级纯化及分子量测定

经 PEG20000 浓缩, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀, 透析后获得的酶液经 SDS-PAGE 分析, 结果如图 5 所示, 壳聚糖酶蛋白的分子量约为 40 kD, 分别测定溶液中酶活及蛋白含量, 得出初级纯化倍数。比酶活及回收率如表 3 所示: 初级纯化倍数为 3.4 倍, 其回收率达到 60%。

2.5 壳聚糖酶的酶学特性分析

2.5.1 pH 对酶活性的影响: pH 对壳聚糖酶活性的影响结果如图 6 所示, 在 pH 为 5.0 时壳聚糖酶活性最大, 在 pH 为 4.0 及 6.0 时, 残余的壳聚糖酶活性分别为 95% 和 88%; pH 为 7.0 时, 残余酶活力为 82%; pH 为 8.0 时, 残余酶活力为 75%。说明该壳聚糖酶在较宽的 pH 范围(3–8)内仍具有较高活性。

2.5.2 酶促反应最适温度的测定: 将 KQ-1002 壳聚糖酶分别置于 40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C 水浴中作用于底物壳聚糖溶液, 测定酶活性。结果如图 7 所示, 该壳聚糖酶酶促反应的最适温度为 55 °C。

2.5.3 金属离子对酶活性的影响: 在离子浓度为 1.0×10^{-3} mol/L 时(表 4), 金属离子 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 与 Ag^+ 对壳聚糖酶均有不同程度的抑制作用, 酶活力分别下降了 60%、65% 和 69%。

表 2 $L_{18}(3^7)$ 正交实验结果分析
Table 2 Design and analysis of orthogonal test

序号 Number	壳聚糖 Chitosan	硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄	时间 Time (h)	培养温度 Temperature (°C)	初始 pH 值 Initial pH	装液量 Liquid volume (mL/250 mL)	接种量 Inoculation volume	酶活力 Enzyme activity (U/mL)
1	1(0.50%)	1(1.37%)	1(72)	1(28)	1(5.5)	1(60)	1(3%)	2.401
2	1(0.50%)	2(1.87%)	2(66)	2(32)	2(6.0)	2(70)	2(4%)	3.430
3	1(0.50%)	3(2.37%)	3(78)	3(30)	3(6.5)	3(80)	3(5%)	2.382
4	2(1.50%)	1(1.37%)	1(72)	2(32)	2(6.0)	3(80)	3(5%)	3.906
5	2(1.50%)	2(1.87%)	2(66)	3(30)	3(6.5)	1(60)	1(3%)	5.621
6	2(1.50%)	3(2.37%)	3(78)	1(28)	1(5.5)	2(70)	2(4%)	3.163
7	3(1.00%)	1(1.37%)	2(66)	1(28)	3(6.5)	2(70)	3(5%)	3.430
8	3(1.00%)	2(1.87%)	3(78)	2(32)	1(5.5)	3(80)	1(3%)	1.715
9	3(1.00%)	3(2.37%)	1(72)	3(30)	2(6.0)	1(60)	2(4%)	3.316
10	1(0.50%)	1(1.37%)	3(78)	3(30)	2(6.0)	2(70)	1(3%)	3.106
11	1(0.50%)	2(1.87%)	1(72)	1(28)	3(6.5)	3(80)	2(4%)	2.877
12	1(0.50%)	3(2.37%)	2(66)	2(32)	1(5.5)	1(60)	3(5%)	1.963
13	2(1.50%)	1(1.37%)	2(66)	3(30)	1(5.5)	3(80)	2(4%)	3.144
14	2(1.50%)	2(1.87%)	3(78)	1(28)	2(6.0)	1(60)	3(5%)	2.820
15	2(1.50%)	3(2.37%)	1(72)	2(32)	3(6.5)	2(70)	1(3%)	3.182
16	3(1.00%)	1(1.37%)	3(78)	2(32)	3(6.5)	1(60)	2(4%)	4.935
17	3(1.00%)	2(1.87%)	1(72)	3(30)	1(5.5)	2(70)	3(5%)	6.193
18	3(1.00%)	3(2.37%)	2(66)	1(28)	2(6.0)	3(80)	1(3%)	2.744
k ₁	16.159	20.922	21.875	17.435	18.579	21.056	18.769	
k ₂	18.655	22.657	20.332	19.131	19.322	22.504	20.865	
k ₃	19.589	16.749	18.121	23.762	22.428	16.768	20.694	
R	3.430	5.907	1.543	6.327	3.106	1.448	0.171	
最优方案 Optimal scheme	壳聚糖 Chitosan 1.0%	硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄ 1.87%	时间 Time (h) 72 h	培养温度 Temperature 30 °C	初始 pH Initial pH 6.5	装液量 Liquid volume 70/250 mL	接种量 Inoculation volume 4%	酶活力 Enzyme activity (U/mL) 18

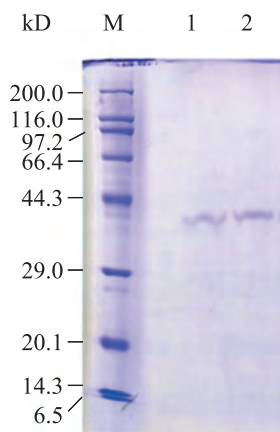


图 5 蛋白纯化结果

Fig. 5 The purification result of protein

注: M: 蛋白 Marker; 1, 2: 纯化后的壳聚糖酶蛋白样品.

Note: M: Marker; 1, 2: Chitosanase purified protein sample.

2.5.4 酶的底物特异性: 该酶对水溶性壳聚糖具

有较好的水解作用, 结果见表 5, 以粉末壳聚糖为底物的相对酶活性为 39%, 对固体甲壳素、羧甲基纤维素、DEAE 纤维素没有降解作用, 表现出该壳聚糖酶具有底物专一性。

2.5.5 底物壳聚糖的脱乙酰度对酶活力的影响: 在酶反应体系中加入不同脱乙酰度的水溶性壳聚糖, 于 55 ℃、pH 5.0 条件下测定其酶活力, 以灭活处理的酶液为对照, 结果如图 8 所示, 壳聚糖的脱乙酰度对酶活力影响较大, 酶活随着壳聚糖脱乙酰度的升高而增强。当壳聚糖的脱乙酰度为 78%时, 壳聚糖酶的活力相对较低, 而当壳聚糖的脱乙酰度大于 83%后, 壳聚糖酶的活力为 80%, 而当壳聚糖的脱乙酰度超过 96%后, 其相对酶活力最高。

表 3 壳聚糖酶的纯化			
Table 3 The purification of chitosanase			
纯化步骤 Purification steps	比酶活 Specific enzyme activity (U/mg)	纯化倍数 Purification of multiples	回收率 Recovery rate (%)
浓缩粗酶液 Concentrated liquid crude enzyme	29.82	1.0	100
20%–80% (NH ₄) ₂ SO ₄ 分级沉淀透析浓缩 Fractional precipitation	100.27	3.4	60

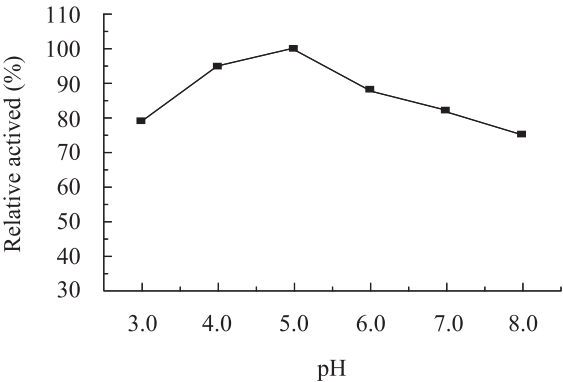


图 6 pH 对 KQ-1002 壳聚糖酶活性的影响

Fig. 6 Influence of pH on the activity of KQ-1002 chitosanase

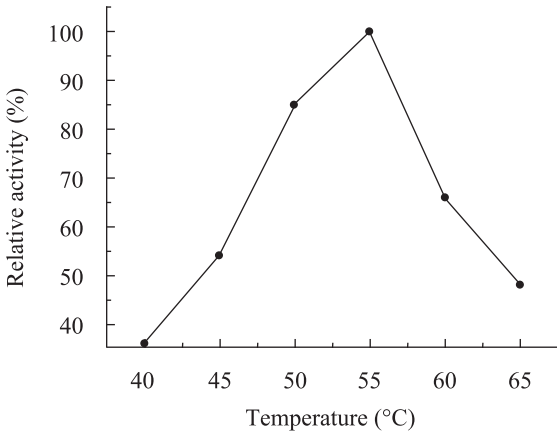


图 7 温度对 KQ-1002 壳聚糖酶活性的影响

Fig. 7 Influence of temperature on the activity of KQ-1002 chitosanase

表 4 不同金属离子对酶活性的影响
Table 4 Influence of ions on KQ-1002 chitosanase activity

金属离子 Metal ions	相对酶活力 Relative activity (%)
Na ⁺	104
K ⁺	101
Mg ²⁺	102
Ca ²⁺	102
Cu ²⁺	40
Hg ²⁺	35
Ag ⁺	31

表 5 酶的底物特异性
Table 5 Substrate specificity of KQ-1002 chitosanase

底物 Substrate	相对酶活 Relative activity (%)
Water soluble chitosan	100
Powder of chitosan	39
Solid chitin	0
Carboxymethyl cellulose	0
DEAE-cellulose	0

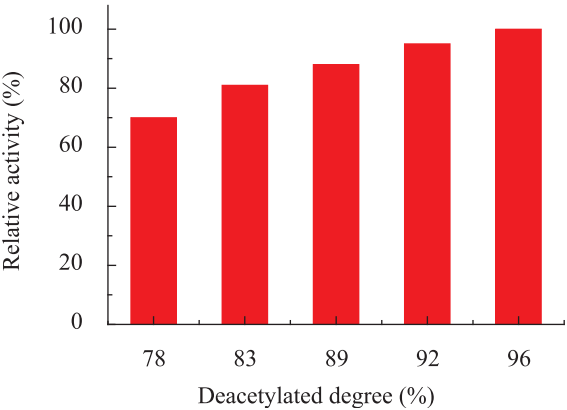


图 8 脱乙酰度对 KQ-1002 壳聚糖酶活力的影响
Fig. 8 Influence of deacetylated degree of chitosan on KQ-1002 chitosanase activity

2.5.6 酶促反应的米氏常数测定: 配制不同底物浓度壳聚糖(DD=90%)溶液, 并使其倒数 $1/[S]$ 成等差级数, 依次为 2–40 g/L 的壳聚糖溶液, 将壳聚糖酶与不同浓度壳聚糖溶液在温度为 50 °C、pH 为 5.0 条件下测定其壳聚糖酶活力, 采用双倒

数作图法(Lineweaver-Burk)来测定壳聚糖米氏常数的 K_m , 即以壳聚糖溶液的浓度的倒数 $1/[S]$ 为横坐标, 反应速度的倒数 $1/V$ 为纵坐标作图, 求出 K_m 。通过 Lineweaver-Burk 作图(图 9), 确定其动力学参数 K_m 值为 1.293 g/L。

3 讨论

本研究分离得到一株产壳聚糖酶的菌株, 通过形态学观察及 26S rDNA 确定是青霉属的一种; 并对该菌株发酵产酶条件进行了初步研究, 在最适产酶条件下, 该菌株发酵液中壳聚糖酶活力最高可达 18 U/mL, 较之未优化前提高约 7 倍。目前国内外已报道的产壳聚糖酶的微生物, 主要包括: 青霉属^[10]、芽孢杆菌属^[11–13]、假单胞菌属^[14–15]、曲霉属^[16]、球孢白僵菌^[17–18]、微杆菌属^[19]、镰孢霉属^[20]等。对壳聚糖酶活性的检测方法主要有铁氰化钾和 DNS 两种, 筛选产壳聚糖酶菌株所用的碳源大多为壳聚糖, 尤其是以自制的胶体壳聚糖为诱导物的研究居多, 王健鑫等^[21]以胶体壳聚糖为碳源筛选得到一株节杆菌属的细菌, DNS 法测定其酶活性为 0.414 U; 孙金凤等^[11]筛选得到一株芽孢杆菌属的细菌, 用铁氰化钾方

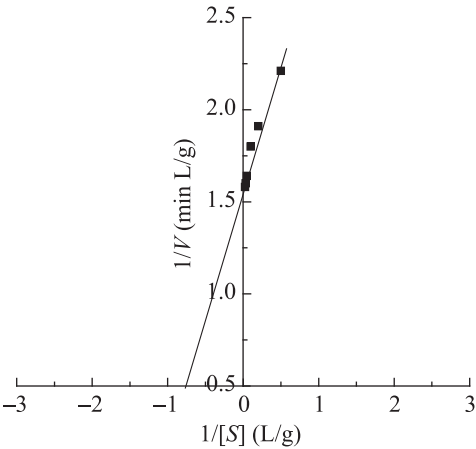


图 9 壳聚糖底物浓度与反应速度的关系
Fig. 9 The relation between chitosan substrate concentration and reaction rate

法测定的壳聚糖酶活性为 0.59 U; 叶淑红等^[22]筛选得到 6 株产壳聚糖酶菌株经 DNS 法测定壳聚糖酶活性最高的一株活性为 0.72 U; 黄益等^[23]筛选得到一株产壳聚糖酶活性为 0.325 U; 王艳等^[14]筛选得到的假单胞菌菌株 Y8, 经铁氰化钾法测定最高酶活性为 0.5 U; 王钦宏等^[15]筛选的假单胞菌产壳聚糖酶活性为 0.4 U。本研究筛选得到的能够产壳聚糖酶的菌株活性相对较高, 该酶具有较好的研究价值和工业化应用的潜力。重金属离子对壳聚糖酶具有抑制作用, 由于壳聚糖与重金属离子的螯合作用, 从而干扰壳聚糖酶对底物的降解, 导致酶活性降低。金属离子 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 强烈地抑制了壳聚糖酶的活性, 这与来源于 *Bacillus subtilis* TKU007^[24]、*Bacillus cereus* D-11^[25] 和 *Bacillus* sp. KCTC0337BP^[26] 的研究结果是类似的。本研究中 Ag^+ 抑制了壳聚糖酶的活性, 这与 *Sphingomonas* sp. CJ-5^[27] 的结果是一致的, 也有研究表明 Ag^+ 对壳聚糖酶活性具有明显的促进作用^[28]。因此, 在对酶制剂进行实际应用时, 应考虑周围环境中的金属离子的存在状况及浓度, 才能更大限度发挥酶制剂的作用。

本研究发现 *Penicillium* sp. KQ-1002 菌株所产壳聚糖酶具有较宽的 pH 范围, 在偏酸或偏碱的范围内仍能保持较高的酶活性(相对酶活性在 75% 以上), 环境 pH 对该酶的活性中心的必需基团的影响较小, 或者该酶的活性中心在某种特定的条件下受到了保护, 需要进一步深入研究。

Alfonso 等^[29]的研究结果表明, *Mucorrouxii* ChA 和 *Mucorrouxii* ChB 的壳聚糖酶的米氏常数分别为 8.13 g/L 和 8.65 g/L; Uchida 和 Ohtakara 等^[30]研究来自 *Bacillus* sp. No.7-M 的壳聚糖酶的米氏常数分别为 33 g/L; 曾嘉等^[9]通过研究来源于 *Penicillium* sp. 的壳聚糖酶米氏常数为 2.601 g/L。对于不同来源的壳聚糖酶或不同的作用底物而言, K_m 值存在较大的差异, 本文获得的

KQ-1002 菌株在以水溶性壳聚糖为底物的条件下产壳聚糖酶的米氏常数较小(1.293 g/L), 从一定程度上反映出该酶与底物具有较高的亲和力。该酶只能断裂壳聚糖链的 β -1,4-糖苷键, 而不能断裂纤维素和几丁质中的相同糖苷键, 其原因可能是壳聚糖酶活性中心的重要氨基酸只与氨基葡萄糖的氨基形成数量较多的氢键, 从而使该酶只对壳聚糖具有较高的亲和力, 而对其他多聚物的亲和力则较低, 以致不能有效地结合在酶的活性位点上^[31-32]。

本研究在进行粗酶液初级纯化过程中, 采用 PEG20000 浓缩、20%–80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、透析后得到具有单一条带的壳聚糖酶, 说明该青霉菌株在以水溶性壳聚糖为碳源诱导产生的壳聚糖酶被大量分泌到胞外, 胞内壳聚糖酶含量较少(另文报道), 本研究以期今后的工业化生产壳聚糖酶及其在农业方面的应用提供新的候选菌株。

参 考 文 献

- [1] Han KN, Kwon IK, Lohakare JD, et al. Chito-oligosaccharides as an alternative to antimicrobials in improving performance, digestibility and microbial ecology of the gut in weanling pigs[J]. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 2007, 20(4): 55–56.
- [2] 王秀武, 杜昱光, 白雪芳, 等. 壳寡糖对肉仔鸡肠道主要菌群、小肠微绒毛密度、免疫功能及生产性能的影响[J]. 动物营养学报, 2003, 15(4): 32–35.
- [3] 杜昱光, 白雪芳, 金宗濂, 等. 壳寡糖抑制肿瘤作用的研究[J]. 中国海洋药物, 2002(2): 18–21.
- [4] 王鑫, 林强, 田平芳, 等. 低分子量壳寡糖改善 II 型糖尿病大鼠症状及其作用机制研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 529–532.
- [5] 马镛, 吴元华, 赵秀香. 壳寡糖的制备、分离分析方法及在农业上的应用[J]. 现代农药, 2007, 6(2): 1–5.
- [6] 郭红莲, 李丹, 白雪芳, 等. 壳寡糖对烟草 TMV

- 病毒的诱导抗性研究[J]. 中国烟草科学, 2002, 23(4): 2-4.
- [7] Zhang J, Sun Y. Molecular cloning, expression and characterization of a chitosanase from *Microbacterium* sp.[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(8): 1221-1225.
- [8] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [9] 曾嘉, 郑连英. 通过酶促反应制备壳寡糖[J]. 食品与发酵工业, 2002, 27(10): 1-4.
- [10] 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): 1039-1042.
- [11] 孙金凤, 吴薇, 潘翔. 产壳聚糖酶菌株的分离筛选及其诱变育种[J]. 工业微生物, 2008, 38(2): 56-59.
- [12] 李剑峰, 刘必谦, 洪松柏, 等. 高产壳聚糖酶菌株的筛选及其产酶条件的优化[J]. 水生态学杂志, 2010, 3(3): 127-130.
- [13] 孙玉英, 张继泉, 王淑军, 等. 壳聚糖酶高产菌株的筛选、鉴定及发酵条件的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(15): 164-168.
- [14] 王艳, 周培根, 俞剑森, 等. 产壳聚糖酶菌株选育及培养条件优化[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2005, 35(2): 293-296.
- [15] 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): 32-36.
- [16] 陈小娥, 夏文水, 余晓斌. 壳聚糖酶高产菌株的筛选及酶解产物的定性[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2): 57-61.
- [17] 杜昱光, 方祥年, 白雪芳, 等. 高产壳聚糖酶菌株的筛选及其降解壳聚糖反应初探[J]. 中国海洋药物杂志, 1999(2): 24-27.
- [18] 方祥年, 杜昱光, 黄秀梨, 等. 球孢白僵菌胞外壳聚糖酶的纯化和性质[J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 77-83.
- [19] 孙玉英, 韩宝芹, 刘万顺. 壳聚糖酶高产菌株的筛选和发酵条件的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(2): 266-272.
- [20] 李风平, 何潇, 鲍晓明. 壳聚糖酶产生菌的筛选及其酶解产物的初步研究[J]. 山东大学学报: 理学版, 2003, 38(1): 96-98.
- [21] 王健鑫, 王文波, 戴秋萍. 壳聚糖酶产生菌株的筛选和鉴定[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(8): 1862-1865.
- [22] 叶淑红, 孙浩, 陈丽. 产壳聚糖酶菌株的筛选及壳寡糖性质的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(1): 23-26.
- [23] 黄益, 吕淑霞, 马镒, 等. 产壳聚糖酶菌株的筛选及酶解产物壳寡糖性质的研究[J]. 食品科技, 2008, 33(3): 26-30.
- [24] Wang SL, Yeh PY. Purification and characterization of a chitosanase from a nattokinase producing strain *Bacillus subtilis* TKU007[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(2): 132-138.
- [25] Gao XA, Juw T, Jung WJ, et al. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus cereus* D-11[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72(3): 513-520.
- [26] Choi YJ, Kim EJ, Piao Z, et al. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4522-4531.
- [27] Zhu XF, Zhou Y, Feng JL. Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2007, 8(11): 831-838.
- [28] Park JK, Shimono K, Ochiai N, et al. Purification, characterization and gene annlysis of a chitosanase (ChoA) from *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(21): 6642-6649.
- [29] Alfonso C, Martínez MJ, Reyes F. Purification and properties of two endochitosanases from *Mucor rouxii* implicated in its cell wall degradation[J]. FEMS Microbiology Letters, 1992, 95(2/3): 187-194.
- [30] Uchida Y, Ohtakara A. Chitosanase from *Bacillus* species[J]. Methods in Enzymology, 1988, 161: 501-505.
- [31] 季更生, 陈爱春. 微生物壳聚糖酶的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 297-301.
- [32] Adachi W, Sakihama Y, Shimizu S, et al. Crystal structure of family GH-8 chitosanase with subclass II specificity from *Bacillus* sp. K17[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 343(3): 785-795.