

## 一株产壳聚糖酶菌株的培养条件优化

赵玉巧, 徐娜, 杜云建 (淮海工学院, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏连云港 222005)

**摘要** [目的] 优化产壳聚糖酶菌株的培养条件。[方法] 对一株从海洋中筛选的假单胞菌 XK-3 菌株产壳聚糖酶条件进行优化。[结果] 培养基最佳组成: 葡萄糖 30.0 g/L, 牛肉膏为 15.0 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  15.0 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.0 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L,  $\text{NaCl}$  5.0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L。摇瓶培养最佳条件: 培养初始 pH 6.0, 培养温度 28 °C, 装液量 20%。  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  对壳聚糖酶活力有一定的促进作用,  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  对壳聚糖酶活力有一定的抑制作用。摇瓶培养条件优化后得到的壳聚糖酶活力为 3 430 U/L, 优化前壳聚糖酶活力为 1 072 U/L, 优化后是优化前的 3.2 倍。摇瓶培养得到菌体的最适生长时间为 24 h, 发酵于 64 h 后结束。[结论] 优化后的培养条件提高了壳聚糖酶产量, 使该菌株的工业应用成为可能。

**关键词** 壳聚糖酶; 假单胞菌; 培养基; 优化

中图分类号 S18 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)08-0007-03

## Optimization of Culture Conditions of the Strain that Produced Chitosanase

ZHAO Yu-qiao, XU Na, DU Yun-jian (Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, Jiangsu 222005)

**Abstract** [Objective] To optimize culture conditions of the strain that produced chitosanase. [Method] The culture conditions of *Rhodotorula* sp. strain were optimized for the production of trehalose. [Result] The optimum medium consisted of 30.0 g/L sucrose, 15.0 g/L beef extract, 15.0 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.0 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.0 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.0 g/L  $\text{NaCl}$ , 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . The optimum culture conditions were determined as follows: initial pH 6, temperature 28 °C, fluid volume 20%.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  had a certain promoting effect on the activity of enzyme,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  had a certain inhibitory effect on the activity of the enzyme. The yield of the chitosan enzyme was 3 430 U/L through optimized shaking flask culture conditions, the yield of chitosan enzyme was 1 072 U/L before optimization, the optimized result was 3.2 times of that of the former. The optimum growth time was 24 h, and the fermentation time was 64 h. [Conclusion] The culture conditions that were optimized improve the chitosan enzyme production, and make the industrial application of the strains possible.

**Key words** Chitosanase; *Pseudomonas* sp.; Medium; Optimization

壳聚糖是由 D-氨基葡萄糖通过  $\beta$ -1,4-氨基糖苷键连接而成<sup>[1]</sup>, 其基本不溶于水, 影响了其应用范围。壳聚糖酶可使壳聚糖水解释为不同分子量的水解物, 这些水解物大多数水溶性好, 从而使其广泛应用。Harish Prashanth 等<sup>[2]</sup> 研究发现, 壳聚糖能抑制肿瘤血管生成并促进癌细胞凋亡。

壳聚糖酶主要来自于细菌、放线菌、真菌等生物群中<sup>[3]</sup>, 由于一般的壳聚糖酶产生菌产酶活力都较低, 为了得到活力较高的壳聚糖酶, 需要对产壳聚糖酶菌株发酵条件进行优化。涂绍勇等<sup>[4]</sup> 对从土样中分离到的一株产壳聚糖酶菌株的产酶条件进行了优化, 发酵液中酶活力可达 2.16 U/mL。孙菲等<sup>[5]</sup> 对从土样中分离到的 JH01 菌株进行产酶条件优化, 发酵液中壳聚糖酶活力可达 26.03 U/mL。笔者对一株从海洋中筛选的假单胞菌 XK-3 菌株进行培养条件优化, 以提高壳聚糖酶的产量, 使该菌株的工业应用成为可能。

## 1 材料与方

## 1.1 材料

1.1.1 菌种。从海水中筛选的假单胞菌。

1.1.2 培养基。①斜面培养基: 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g,  $\text{NaCl}$  5.0 g, 琼脂 15.0~20.0 g, 补煮沸过滤陈海水至 1 000 mL, pH 7.0~7.2。②种子培养基: 葡萄糖 5.0 g, 蛋白胨 5.0 g, 酵母提取物 5.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g,  $\text{NaCl}$  5.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, 补煮沸过滤陈海水至

1 000 mL, pH 7.0。③基础培养基: 粉末壳聚糖 10.0 g, 葡萄糖 1.0 g, 硫酸铵 5.0 g, 酵母提取物 3.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g,  $\text{NaCl}$  5.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, 补煮沸过滤陈海水至 1 000 mL, pH 6.5。

种子培养条件: 250 mL 三角瓶装 75 mL 培养基, 摇床转速 150 r/min, 28 °C 培养 12 h。摇瓶培养条件: 接种量 2%, 培养时间 72 h, 其余条件与种子培养相同。

## 1.2 方法

1.2.1 培养基优化。①碳源的选择。碳源为淀粉、糊精、壳聚糖水解释物(分子量 50 000)、葡萄糖、壳寡糖、胶体壳聚糖、羧甲基纤维素钠, 加入量均为 10 g/L, 其他成分及条件相同。②氮源的选择。以葡萄糖作为碳源, 氮源为酵母膏、蛋白胨、牛肉膏、硫酸铵、硝酸钾、尿素、豆饼粉, 浓度均为 8 g/L, 其他成分及条件都相同。③碳氮比的选择。以葡萄糖为碳源, 牛肉膏和硫酸铵为氮源, 2 种氮源的比例为 1:1, 采用的碳氮比例及加入量分别为 2:1(10:5、20:10、30:15)、1:1(10:10、20:20、30:30)、1:2(5:10、10:20、15:30) 及 1:3(5:15、7.5:22.5、10:30) (括号中为碳、氮源的加入量之比, 单位为 g/L), 其他成分及条件相同。④金属离子对壳聚糖酶合成的影响。选择  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  共 6 种离子, 其盐加入量均为 0.5 g/L, 用 2.5% 的氯化钠溶于蒸馏水替代海水。

1.2.2 培养条件优化。①初始 pH。采用优化后的最佳培养基, 初始 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5, 其他培养条件: 培养温度 28 °C, 装液量为 250 mL 三角瓶装 75 mL 培养基, 培养时间 72 h。②培养温度: 培养温度选择 25、28、30、32、35 °C, 初始 pH 6.0, 其余条件同 ①。③装液量。在

基金项目 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室研究基金项目(2014HS010)。

作者简介 赵玉巧(1965—), 女, 河南邳州人, 教授, 硕士, 从事生物工程和食品生物技术方面的研究。

收稿日期 2017-01-20

250 mL三角瓶中装液量分别选择 37.5(15%)、50.0(20%)、62.5(25%)、75.0(30%)、87.5(35%)、100.0 mL(40%)，培养温度 28 ℃，其余条件同②。④ 菌体生长及壳聚糖酶产生过程。在 250 mL三角瓶装 50 mL培养基，培养温度 28 ℃，pH 6.0，培养时间 84 h，考察细胞生长量和壳聚糖酶产量，以此来考察参数之间的关联。

**1.3 测定项目与方法** 采用细胞干重法测定细胞生长量；采用 DNS 显色法测定壳聚糖酶活力<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 碳源对壳聚糖酶活力的影响** 由图 1 可知，菌株利用分子量大的多糖产酶能力低。以葡萄糖为碳源有利于该菌株产酶，菌体产酶活力最高，达 1 253 U/L，糊精和壳寡糖次之，故选择葡萄糖作为碳源。

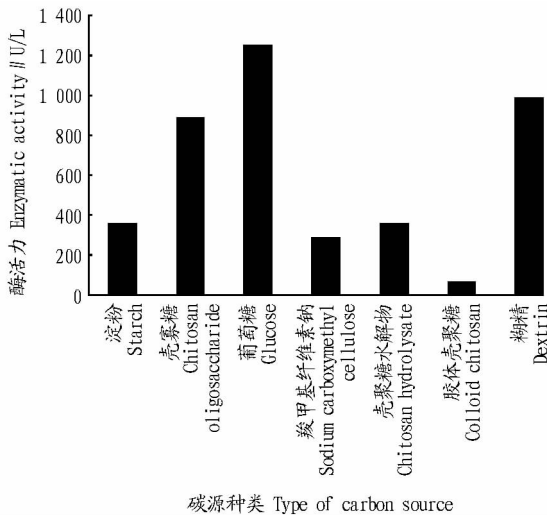


图 1 不同碳源对壳聚糖酶活力的影响

Fig.1 Effect of carbon sources on chitosanase activity

**2.2 氮源对壳聚糖酶活力的影响** 由图 2 可知，在含有尿素的发酵液中，该菌株的产酶能力最低，仅 679 U/L；采用牛肉膏和硫酸铵作为氮源，菌株的产酶活力分别为 2 104 和 2 029 U/L，故选择牛肉膏和硫酸铵作为氮源。

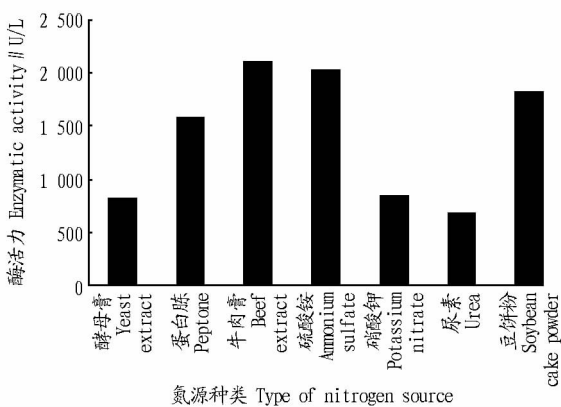


图 2 不同氮源对壳聚糖酶活力的影响

Fig.2 Effect of nitrogen sources on chitosanase activity

**2.3 碳氮比对壳聚糖酶活力的影响** 由表 1 可知，当培养基中碳氮比为 1:1 时，壳聚糖酶活力最高，且碳氮源的加入量越高其酶活力也越高，当碳源与氮源加入量均为 30.0 g/L

时，酶活力达 3 960 U/L，即葡萄糖加入量为 30.0 g/L，牛肉膏和硫酸铵加入量均为 15.0 g/L。

表 1 碳氮比对壳聚糖酶活力的影响

Table 1 Effect of C/N sources concentrations on chitosanase activity

碳氮比 Ratio of C and N	碳源加入量 The amount of C source // g/L	氮源加入量 The amount of N source // g/L	酶活力 Enzymatic activity // U/L
2:1	10.0	5.0	1 862
	20.0	10.0	2 156
	30.0	15.0	2 298
1:1	10.0	10.0	2 087
	20.0	20.0	3 214
	30.0	30.0	3 960
1:2	5.0	10.0	1 640
	10.0	20.0	1 076
	15.0	30.0	3 078
1:3	5.0	15.0	1 826
	7.5	22.5	1 294
	10.0	30.0	1 476

**2.4 无机离子对壳聚糖酶活力的影响** 由图 3 可知，不同离子对壳聚糖酶的影响不同， $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  对菌株产酶有明显促进作用，加入  $Mg^{2+}$  菌株所产壳聚糖酶活力达 3 744 U/L， $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  对酶活力也有一定的促进作用，而  $Fe^{3+}$ 、 $Cu^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  对壳聚糖酶活力有一定的抑制作用。

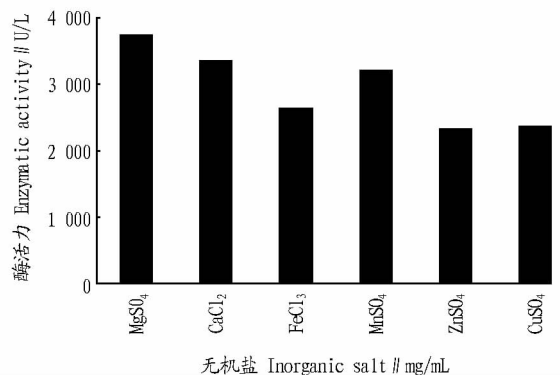


图 3 无机离子对壳聚糖酶活力的影响

Fig.3 Effect of inorganic ions on chitosanase activity

**2.5 初始 pH 对壳聚糖酶活力的影响** 由图 4 可知，当 pH 小于 6.0 时培养基初始 pH 对酶活力的影响较大；pH 在 5.0 ~ 6.0 时酶活力呈上升趋势；当 pH 6.0 ~ 7.5 时，酶活力呈下降趋势；pH 为 6.0 时酶活力最高，为 3 848 U/L。故选择培养基最佳初始 pH 为 6.0。

**2.6 装液量对壳聚糖酶活力的影响** 由图 5 可知，装液量对假单胞菌 XK-3 菌株产壳聚糖酶有一定的影响，20% 的装液量 (250 mL 三角瓶装液量为 50 mL) 酶活力最高，达 3 076 U/L。随着装液量的增加，壳聚糖酶活力逐渐下降。因此，确定最佳装液量为 20% (250 mL 三角瓶装液量为 50 mL)。

**2.7 培养温度对壳聚糖酶活力的影响** 由图 6 可知，假单胞菌 XK-3 菌株在 25 ~ 28 ℃ 培养时，酶活力增长较快，培养温度为 28 ℃ 时，发酵液中酶活力最高，达 3 704 U/L。温度高于 28 ℃ 时，发酵液中酶活力下降较快，30 ~ 35 ℃ 时，酶活

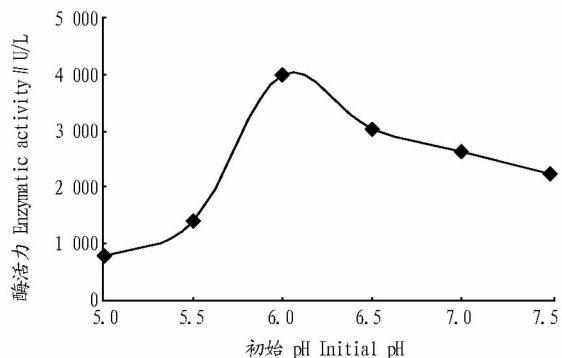


图4 初始 pH 对壳聚糖酶活力的影响  
Fig.4 Effect of pH on chitosanase activity

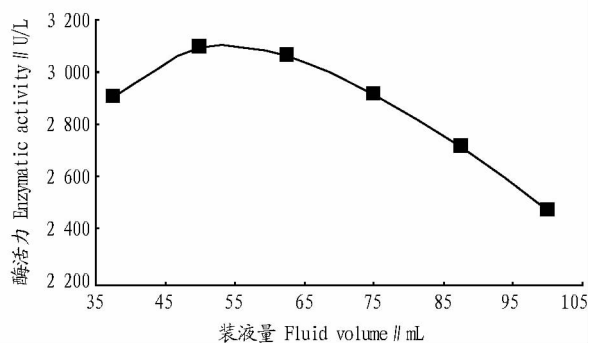


图5 装液量对壳聚糖酶活力的影响

Fig.5 Effect of fluid volume on chitosanase activity

力下降缓慢。菌株 XK-3 产酶温度较低与菌株来自于海洋有一定关系。

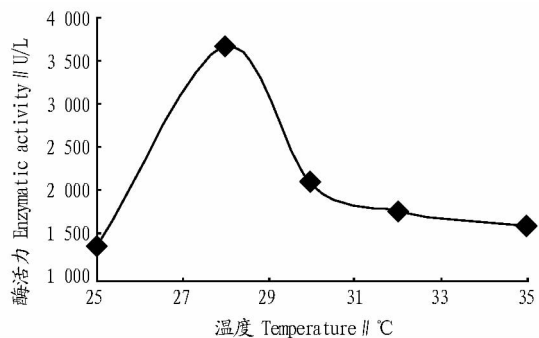


图6 培养温度对壳聚糖酶活力的影响

Fig.6 Effect of temperature on chitosanase activity

**2.8 菌株 XK-3 的生长及产酶情况** 由图 7 可知,0~32 h 菌体生长速度较快,32 h 后生长趋于平缓。酶活力呈逐渐增长的趋势,培养至 60 h 后,酶活力增长趋于稳定,至 64 h 时达到最高,为 3 430 U/L。用优化前的培养基及培养条件培养菌株 XK-3,其壳聚糖酶活力为 1 072 U/L,优化后的结果

是优化前的 3.2 倍。该菌株产酶量逐渐增加可能与所产酶为胞外酶有关,虽然菌体生长量在 34 h 后已不再增加,但胞内的酶逐渐透出细胞及细胞的自溶仍逐渐增加。结合菌株 XK-3 的生长及产酶曲线,确定培养结束时间为 64 h。

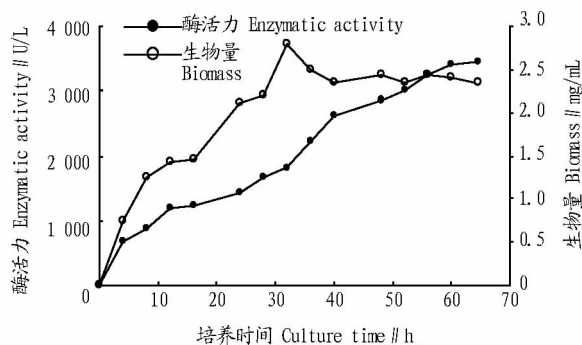


图7 XK-3 菌株生长与产酶情况

Fig.7 XK-3 strain growth and enzyme production

### 3 结论与讨论

该研究结果表明,菌株 XK-3 摇瓶培养最佳培养基:葡萄糖 30.0 g/L,牛肉膏 15.0 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  15.0 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.0 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L, NaCl 5.0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L。当培养基中碳氮比为 1:1 时,壳聚糖酶活力最高,且碳氮源的加入量越高其酶活力也越高,但碳氮源含量过高会使原料利用率降低,并对环境造成污染,故生产中可采取中间补料的方法。 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  对酶活力有一定的促进作用,而  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  对壳聚糖酶活力有一定的抑制作用,其他离子对酶活力无明显作用,而海水中  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  含量很低,说明用海水配制培养基对该菌株的产酶量无影响。

该菌株壳聚糖酶的产生均对初始 pH、溶氧及培养温度敏感,特别是培养温度,低于或高于 28 °C 酶活力均明显下降,这就要求生产过程中对温度的控制要尽量准确。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] HARISH PRASHANTH K V, THARANATHAN R N. Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis[J]. Biochip Biophys Acta,2005,1722(1):22-29.
- [3] FUKUOKA T, SURAKARTA T, DAIKER Y, et al. Specificity of chitinase from *Bacillus pisolis*[J]. Bioethic Biophys Acta,1994,205(2):183-188.
- [4] 涂绍勇,杨爱华,吴柏春,等. 产壳聚糖酶菌株的筛选及其发酵产酶条件的研究[J]. 化学与生物工程,2009,26(9):52-55.
- [5] 孙菲,陈山岭,李宜海,等. 壳聚糖酶高产菌株的筛选、产酶条件的优化及壳聚糖酶的分离纯化[J]. 现代食品科技,2006,22(3):21-27.
- [6] 曾嘉,郑连英. 通过酶促反应制备壳寡糖[J]. 食品与发酵工业,2001,27(10):1-4.