

壳聚糖酶生产菌的产酶工艺条件研究

李和生, 裘迪红, 吴汉民, 王鸿飞, 孙玉喜

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 宁波 315211)

摘要: 壳聚糖是自然界中唯一一种带阳离子的能生物降解的高分子材料, 已广泛应用于农业、医药、食品等领域。其降解产物甲壳低聚糖具有比壳聚糖更好的溶解性和生理活性, 采用酶法降解具有反应条件易于控制、产物安全性高和环境污染少等独特的优越性, 因此, 筛选壳聚糖降解酶的方法和条件有重要意义。对壳聚糖酶生产菌所产壳聚糖酶的培养条件进行了初步研究, 并对测定壳聚糖酶活力的 DNS 法进行了研究。结果表明, DNS 法的最大吸收波长在 495 nm。该实验所用菌种产壳聚糖酶的培养条件以培养时间为 60 h, 初始 pH 值为 5.0, 装液量为 50 mL 比较适宜。

关键词: 壳聚糖; 酶解; 工艺条件; 培养

中图分类号: TS201.25; Q539

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2004)04-0208-04

0 引言

壳聚糖是甲壳素的脱乙酰化产物, 是存在于自然界中唯一一种带阳离子的能生物降解的高分子材料, 在自然界中储量丰富。其具有安全、无毒、成膜、抑菌、可食用、可降解等多种特性, 且具有提高人体免疫力、促进伤口愈合和降血脂、降血压等独特的生理活性而备受关注^[1]。已被广泛应用于农业、医药、食品、饲料、环保等多个领域。近年来, 壳聚糖在果蔬保鲜方面的开发应用受到高度重视, 在猕猴桃、番茄、苹果和桃、草莓、辣椒和黄瓜等果蔬上已得到应用^[2,3], 可一定程度上延缓果实衰老, 减少腐烂, 保持果蔬品质, 延长果蔬的贮藏寿命。

然而, 一般甲壳素脱乙酰化制得的壳聚糖分子量很大, 并有紧密的晶体结构, 溶解性能差, 只能在某些酸性介质中溶解, 使壳聚糖的应用受到极大限制; 此外, 分子量对壳聚糖的性质有很大影响, 不同分子量的壳聚糖性质差异很大, 有时甚至表现出截然相反的特性。甲壳低聚糖是壳聚糖降解的产物, 具有较低的分子量, 良好的水溶性。壳聚糖的许多独特功能只有在分子量降解到一定程度时才表现出来, 如抗肿瘤作用、增殖人体肠道双歧杆菌作用、抗菌抑菌作用等等^[4,5]。在农业上, 壳聚糖的降解产物甲壳低聚糖可作为植物功能调节剂, 调节植物抗性基团的关闭与开放, 激活植物的防御反应, 启动抗病基因的表达^[6-8]。因此, 选择适当的方法对壳聚糖进行降解就显得尤为重要^[9,10]。

目前, 降解壳聚糖的方法主要有化学降解法和酶降解法两种^[11,12]。采用化学法降解产物得率低, 反应过程较难控制, 分离困难, 对环境污染严重; 而酶降解法以其降解过程容易控制、反应条件温和以及对环境污染小、产物安全性好等优点已引起人们的关注^[13]。几种专一性和非专一酶在壳聚糖或甲壳素的生物降解中已有一

些研究尝试^[14-16], 取得了阶段性结果, 但是与理想的结果相比还有一定的差距, 所以筛选合适的壳聚糖降解酶就成为酶法降解壳聚糖、高效利用壳聚糖的关键点。本文试图对壳聚糖酶生产菌产酶条件进行一些初步的研究, 并对 DNS 法测定壳聚糖酶活力的一些条件进行研究, 为酶法制备甲壳低聚糖奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

采用壳聚糖酶生产菌, 为本校食品科学与工程研究所保藏, 保存在 PDA 斜面上。

1.2 主要材料和试剂

壳聚糖: 脱乙酰度为 90.46%, 灰分 0.81%, 由本校食品科学与工程研究所提供。

DNS 试剂: 称取 5 g 3,5-二硝基水杨酸, 溶于蒸馏水中, 加入 10 g NaOH, 100 g 酒石酸钾钠, 加蒸馏水 250 mL, 升温溶解后, 加入苯酚 1 g, 无水亚硫酸钠 0.25 g, 加热搅拌, 待全溶后, 定容至 500 mL, 贮于棕色瓶中, 室温保藏 7 d 后使用。

柠檬酸缓冲液: pH 4.8—0.1M 柠檬酸 507 mL + 0.2M 磷酸氢二钠 493 mL; pH 4.6—0.1M 柠檬酸 532.5 mL + 0.2M 磷酸氢二钠 467.5 mL。

醋酸缓冲液: 取无水 NaAc 83 g, 冰醋酸 60 mL, 定容到 1000 mL, pH 为 4.66。

1% 壳聚糖溶液: 称取壳聚糖 1.00 g, 用 pH 4.66 醋酸缓冲液定容至 100 mL。

盐酸氨基葡萄糖(B. R.), 中国医药集团上海化学试剂公司。

除 3,5-二硝基水杨酸(C. P.), 蛋白胨(B. R.), 吐温 80(C. P.), 麦芽糖(B. R.) 外; (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, MgSO₄ · 7H₂O, FeSO₄ · 7H₂O, ZnSO₄ · 7H₂O, 尿素, CaCl₂, MnSO₄ · H₂O, CoCl₂ · 5H₂O, NaOH, 苯酚, 酒石酸钾钠, 蔗糖, 葡萄糖, 乳糖等其它试剂均为 AR 级。

1.3 培养基

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 10 g, 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 5 g, NaCl 5 g, 琼脂 20 g, 水 1000 mL,

收稿日期: 2003-07-16 修订日期: 2004-05-10

基金项目: 宁波市科技局攻关项目(01N40100-65)

作者简介: 李和生, 副教授, 副院长, 主要从事食品化学与分析的教学和研究。浙江省宁波市 宁波大学生命科学与生物工程学院, 315211。Email: lihesheng@nbu.edu.cn

pH 自然。马铃薯去皮后,切碎煮沸 30 min,然后用纱布过滤,再加入葡萄糖及琼脂,溶化后补足水至 1000 mL。

生长培养基(g/L): 葡萄糖 10, 蛋白胨 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4, 尿素 0.3, KH_2PO_4 2.0, CaCl_2 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, 吐温 80 1.0, 微量元素 1 mL, pH 值用柠檬酸缓冲液调至 4.8。

微量元素(g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4, $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3.7。

产酶培养基(g/L): KH_2PO_4 2.0, CaCl_2 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, 吐温 80 1~2, 微量元素 1 mL, pH 用 1 mol/L 醋酸缓冲液调节至 4.8。

以上培养基都在 121 °C 下灭菌 30 min。

1.4 主要仪器

低速大容量离心机, DL-5, 上海安亭科学仪器厂; 电热鼓风干燥箱, CS101-1AB, 重庆银河试验仪器有限公司; 自动电位滴定仪, ZD-2, 上海精密科学仪器有限公司; 恒温恒湿培养箱, LRH-190-S, 广东省医疗器械厂; 气浴恒温振荡器, THZ-82B, 江苏省金坛市医疗器械厂; 可见分光光度计, 722, 上海精密科学仪器有限公司; 电子天平, AB104-N 型, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 电热手提式压力蒸汽消毒器, YXQ, SG41.280, 宁波医疗器械厂; 电热恒温水浴锅, DK-S24, 上海精密实验设备有限公司。

1.5 实验方法

1.5.1 菌种保存

保存在 PDA 斜面上。每月转接一次, 30 °C 培养 7 d, 再放入冰箱 4 °C 保存。

1.5.2 菌种的扩大培养

将斜面菌种制成孢子悬液(柠檬酸缓冲液), 再接入 250 mL 锥形瓶中(生长培养基), 28 °C 摇床培养(180 r/min) 60 h, 然后转入产酶培养基。

1.5.3 壳聚糖酶活力的测定

采用 DNS 法。取 5 mL 发酵液, 离心后取上清液 2 mL (粗酶液) 与 2 mL 1% 的壳聚糖溶液混合, 30 °C 保温 30 min, 用 5 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 8.0, 离心去除絮状沉淀。取上清液 1 mL 于 25 mL 比色管中, 加水 1 mL、DNS 试剂 1.5 mL, 混匀后, 在沸水中反应 5 min, 立即冷却后定容至 25 mL, 在最大吸收波长下, 测其吸光度值。同时配制标准曲线, 从标准曲线上查出酶液的氨基葡萄糖含量, 计算在各种培养条件下该壳聚糖酶的酶活力。

在 30 °C 下, 水解壳聚糖每分钟产生 1 μmol 氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量为一个壳聚糖酶活力单位(U)。

2 结果与讨论

2.1 DNS 法测定还原糖含量的条件确定

2.1.1 最大吸收波长的确定

由于 DNS 法测定还原糖所采用的波长有各种报道^[17], 如 490、520、540、550 nm。各波长下, DNS 法

的灵敏度有较大差异。且一般文献中 DNS 法测还原糖量时, 用葡萄糖做标准曲线, 而壳聚糖水解的最终产物为氨基葡萄糖, 因此, 分别测量了葡萄糖和氨基葡萄糖在不同波长下的吸光度, 测得结果如图 1。由图 1 可知, 具有还原性的葡萄糖和氨基葡萄糖在 470~610 nm 范围内均在 495 nm 处产生最大吸收峰。因此, 两者将 3, 5-二硝基水杨酸(DNS)还原为棕红色的显色基团是相同的, 但氨基葡萄糖与 DNS 反应的灵敏度高于葡萄糖。选择在吸收波长较高的位于 495 nm 左右的 500 nm 作为测量用的吸收波长。在 500 nm 处测定, 方法的灵敏度高且稳定。其它文献中选在 520、540、550 nm 测定, 与最大吸收峰偏离较大, 相对灵敏度较低, OD 值易波动。因此, 选取 500 nm 作为测定波长是比较合适的。

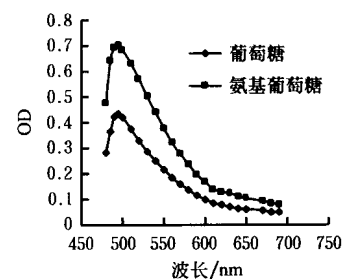


图 1 吸收光谱

Fig 1 Absorption spectrum

2.1.2 标准曲线的绘制

在 500 nm 的波长下分别测定了不同氨基葡萄糖含量与 DNS 试剂反应后的溶液光密度 OD 值, 以糖量为横坐标, 以 OD 值为纵坐标绘制曲线(图 2)。

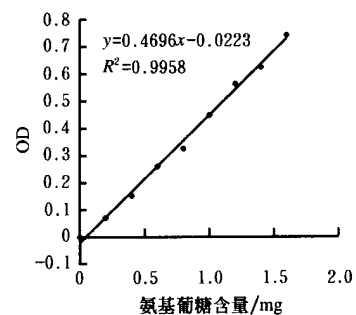


图 2 标准曲线

Fig 2 Standard curve

对标准曲线进行了多次重复实验, 其回归方程及相关系数如表 1 所示。

表 1 回归方程及相关系数表

Table 1 Regression equations and their coefficients

编号	回归方程	相关系数 (R^2)
1	$y = 0.4832x - 0.0309$	0.9912
2	$y = 0.5048x - 0.011$	0.9978
3	$y = 0.519x - 0.0158$	0.9978
4	$y = 0.486x - 0.02$	0.9955
5	$y = 0.5022x - 0.0135$	0.9911
6	$y = 0.4664x - 0.0198$	0.9903
7	$y = 0.4986x - 0.0249$	0.9910

结果表明,标准曲线的相关系数均在 0.99 以上,经显著性检验,吸光度与氨基葡萄糖含量高度线性相关,说明了该方法的可靠性与稳定性。

2.2 培养时间对产酶的影响

在产酶基础培养基中加入可溶性壳聚糖(脱乙酰度 90.46%) 20 g/L,作为诱导壳聚糖酶的底物,并提供碳源。250 mL 锥形瓶中产酶培养基的装液量为 150 mL,从生长培养基中取 5 mL 移入产酶培养基,与 28 °C, 180 r/min 摇床中培养,每 12 h 取样测酶活力。结果如图 3 所示。

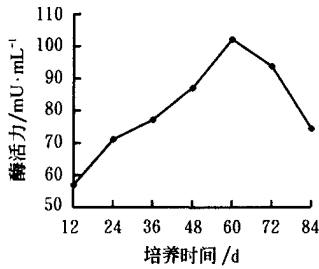


图3 培养时间对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of incubation time on enzyme activity

由图 3 可知,培养初期,随着时间的延长,酶活力增强;60 h 以后,随着时间的延长,酶活力降低。60 h 左右酶活力达到最大。

2.3 培养起始 pH 值对产酶的影响

保持碳源、装液量及生长培养基中的取液量不变,调产酶培养基的 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。在 60 h 处分别测酶活力。结果如图 4。

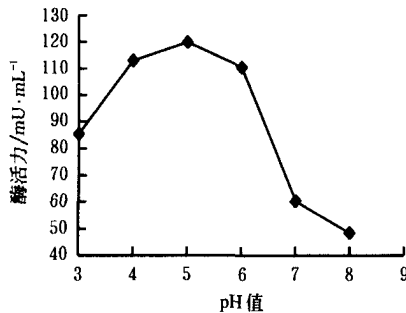


图4 pH 值对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of pH value on enzyme activity

由图 4 可知,产酶培养基初始 pH 值为 4.0~6.0 左右时酶活力较高。偏酸偏碱都将抑制酶活力,在 pH 值大于 6.0 时酶活力下降明显。所以宜选用酶活力为最高的 pH 5.0 为产酶的最佳 pH 值。

2.4 培养基装液量对产酶的影响

保持碳源不变,将产酶培养基的 pH 值调至 pH 5.0 处,分别在 250 mL 锥形瓶中装入 25、50、75、100、125 mL 的产酶培养基,然后按比例分别接入 2.5、5、7.5、10、12.5 mL 的生长培养基以保持各产酶培养基中菌种浓度相同。在 60 h 处分别测酶活力。结果如图 5。

由图 5 可知,装液量越小,酶活力越高。本研究的霉为好氧性微生物,而装液量影响菌种与氧气接触的充分性。装液量越少,则菌与氧气的接触越充分。实验证明随着装液量的增大,酶活力减小。因为实验中选取摇床

的转速为 180 r/min,转速快,也使与通氧量增大。这使得装液量成为并不唯一决定通氧量的因素,所以造成在 25 mL 到 100 mL 的范围内,装液量对酶活力的影响并不明显。但在装液量为 125 mL 处,酶活力有明显的下降。兼顾锥形瓶容积的利用率和产酶能力两个因素,选定将 50 mL 作为优化后的装液量。

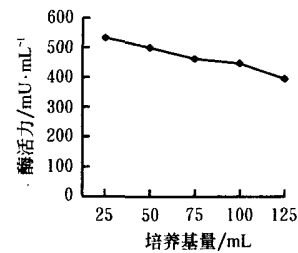


图5 培养基量对酶活力的影响

Fig. 5 Effect of medium volume on enzyme activity

3 结论

本实验研究了用来测定还原糖含量以确定酶活力的 DNS 法,包括测量波长的确定和标准曲线的绘制。也初步研究了培养时间,培养基初始 pH 值,装液量等培养条件对壳聚糖酶生产菌产酶能力的影响。结果表明,DNS 与氨基葡萄糖和葡萄糖反应后均在 495 nm 处有最大吸收,但氨基葡萄糖的灵敏度更高。因此,在 495 nm 左右测定,DNS 法的灵敏度和稳定性较高,溶液颜色的深浅(OD 值)与氨基葡萄糖的含量呈极显著线性正相关,相关系数大于 0.99。实验所用菌种的最佳产酶条件为产酶时间 60 h,产酶培养基初始 pH 值 5.0,装液量 50 mL。

参考文献

- [1] Sandford P, Hutchings G P. Yalpani (Ed), Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications [M], Elsevier, Amsterdam, 1987, 363- 376
- [2] 陈天,张皓冰,叶秀莲.壳聚糖常温保鲜猕猴桃的研究[J].食品科学,1991,(10): 37- 40
- [3] 周春华,韦军,王莉.壳聚糖在果品贮藏中的应用[J].保鲜与加工,2003,(2): 6- 9
- [4] You-jin-jeon, Shahidi F, Kim se-kwon. Preparation of chitin and chitosan chito oligosaccharides and their applications in physiological functional foods [J]. Food Reviews International, 2000, 16(2): 159- 176
- [5] You-Jin Jeon, Pyo-Jam Park, Se-Kwon Kim. Antimicrobial effect of chito oligo saccharides produced by bioreactor [J]. Carbohydrate Polymers 2001, 44: 71- 76
- [6] M atahira Y, Kawaguchi M. Chito san and chitin oligosaccharides as synergistic plant growth stimulators and protectants [P]. J P: 09143013, 1997.
- [7] Roby D, Gabelle A, Toppan A. Chitin oligo saccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987, 143(3): 885
- [8] 杜昱光,白雪芳,虞星炬,等.寡聚糖类物质生理活性的研

- 究[J]. 中国生化药物杂志, 1997, 18(5): 268- 271.
- [9] Einosuke Euraki, Fumiko Yaku, Hiroyuki Kojima Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 6 - 8 [J]. Carbohydrate Research, 1993, 239: 227- 237.
- [10] Farooqahamed S. Kittur, Acharya B. Vishu Kumar, Rudrapatnam N. Tharanathan Low molecular weight chitosans preparation by depolymerization with *Aspergillus niger* pectinase, and characterization [J]. Carbohydrate Research, 2003, 338: 1283- 1290.
- [11] 裘迪红, 张芝芬 甲壳低聚糖制备的研究[J]. 食品与机械, 2001, (3): 29- 30.
- [12] 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.
- [13] 杜昱光, 张铭俊, 张虎, 等 海洋寡糖工程药物——壳寡糖制备分离新工艺及其抗癌活性研究[J]. 中国微生物学杂志, 2001, 13(1): 5- 7.
- [14] 朱江峰, 郑连英 产壳聚糖酶菌种的选育和产酶条件的优化[J]. 化工学报, 2000, 12(51): 219- 222.
- [15] 郑连英, 曾嘉 几丁质固定化纤维素酶降解壳聚糖的研究[J]. 化学反应工程与工艺, 2001, (4): 344- 347.
- [16] 周桂, 谭学才 胰蛋白酶对壳聚糖的降解研究[J]. 广西农业生物科学, 2002, (3): 50- 53.
- [17] 王琳, 刘国生, 王林嵩, 等 DNS法测定纤维素酶活力最适条件研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 1998, 26(3): 66- 69.

Primary study on technological conditions for chitosanase-producing microorganism

Li Hesheng, Qiu Dihong, Wu Hanmin, Wang Hongfei, Sun Yuxi

(Institute of Life Science and Bioengineering, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

Abstract Chitosan is a high polymer and a cation exists only in nature, which can be biologically degraded and applied in the field of agriculture, medicine and food, etc. Low weight molecular of chitosan has better solubility and physiological functions than chitosan. The enzymic hydrolysis has some advantages of easy-controllable reaction, high security of products and less environmental pollution. Thus, the method and conditions for enzymic hydrolysis of chitosan are important. This paper deals with the incubation conditions for chitosanase producing microorganism basically and DNS method for measuring enzyme activity of chitosanase. The results showed that the maximum absorption wavelength of DNS method was 495 nm. The optimum incubation conditions for producing chitosanase were 60 h of the incubation time, 4.5 of the initial pH value and 50 mL of medium volume.

Key words: chitosan; enzymic hydrolysis; technological condition; incubation