

文章编号:1009-038X(2004)05-0066-03

# 假单胞菌 Y8 产壳聚糖酶的培养条件

王艳, 周培根, 王平平, 戚晓玉, 陶圣诞, 杨辉

(上海水产大学 食品学院, 上海 200090)

**摘要:**对假单胞菌 Y8 产壳聚糖酶培养条件进行研究,得到一个比较优化的培养条件为:pH 值 6.5, 温度 32 ℃, 壳聚糖 3 g/L, 酵母膏质量分数 0.3%, 培养时间 3 d. 不同金属离子及不同诱导物对酶合成的影响表明:Fe<sup>2+</sup> 激活作用显著,而 Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> 则具有一定的抑制作用,壳聚糖和氨基葡萄糖对壳聚糖酶的产生都有较好的诱导作用.

**关键词:**假单胞菌 Y8; 壳聚糖酶; 诱导物

中图分类号:Q 55

文献标识码:A

## Cultural Conditions of Chitosanase Produced by *Pseudomonas* Y8

WANG Yan, ZHOU Pei-gen, WANG Ping-ping, QI Xiao-yu, TAO Sheng-dan, YANG Hui  
(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** The cultural conditions of chitosanase produced by *Pseudomonas* Migula Y8 were investigated. The optimal conditions for chitosanase produced by *Pseudomonas* Migula Y8 were as follows: pH 6.5, temperature 32 ℃, Chitosan 3 g/L, yeast extract 0.3%, and fermentation for 3 days. Fe<sup>2+</sup> can activate the Chitosanase's production, while Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> inhibit the production. The better inducer was Chitosan and GlcN.

**Key words:** *Pseudomonas* Y8; chitosanase; inducer

1973年 Monaghan 在研究细菌和真菌过程中,首先提出壳聚糖酶(chitosanase)是一种不同于几丁质酶的新酶,这种酶对胶态几丁质不水解,但是能够水解完全脱乙酰化的壳聚糖,所以它被认为是线性的壳聚糖具有水解专一性的一种酶. 1984年国际酶学命名会议上,几丁质酶(Chitinase, EC 3.2.1.14)被系统命名,1992年壳聚糖酶(Chitosanase, EC 3.2.2.99)也被系统命名<sup>[1]</sup>.

壳聚糖酶主要存在于真菌和细菌细胞中,在单子叶和双子叶植物的不同组织中也发现有该酶

活性.近年来,国外对壳聚糖酶进行了大量的研究,发现壳聚糖酶在农业上可作为生物防治剂,在生物技术中可用于原生质分离、细胞化学定位和生产单细胞蛋白;而水解产物壳低聚糖则具有独特的生理活性和功能性质<sup>[2]</sup>:可提高机体免疫力、抑制肿瘤细胞生长、在人体肠道内能活化增殖双歧杆菌、降低血压等生理活性,同时还具有抗菌防腐、保水保湿等功能性质,其在医药、食品、化妆品等工业中有广阔的应用前景受到人们的普遍关注.目前壳低聚糖的制备方法主要有化学法和酶

收稿日期:2003-12-04; 修回日期:2004-06-03.

作者简介:王艳(1973-),女,湖北汉川人,海洋生物资源利用博士研究生.  
万方数据

法. 化学法简便易行, 适于工业化生产, 但对环境污染较大; 同时, 由于化学法是非特异性降解, 水解较难控制, 产物转化率低, 其产品多在四糖以下, 而且化学反应条件十分苛刻. 酶法降解可特异性地、选择性地切断壳聚糖的  $\beta$ -1, 4 糖苷键, 降解过程和降解产物的相对分子质量分布容易便利地被控制, 易于得到所需相对分子质量范围的低聚糖产品, 反应专一性强, 不会引起结构的破坏. 而且酶法降解是在较温和的条件下进行的, 降解过程不需要加入大量的反应试剂, 产物的安全性高<sup>[3-5]</sup>. 因此, 寻找一种专一性的降解酶意义重大.

至今, 国外对壳聚糖酶的研究已深入到基因分子水平<sup>[6]</sup>, 国内的研究也已开始<sup>[5]</sup>. 作者对假单胞菌 Y8 产壳聚糖酶的培养条件进行了研究, 现予报道.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 作者所在实验室分离保存的假单胞菌 *Pseudomonas* Y8.

#### 1.1.2 培养基

1) 斜面培养基成分 组分(g/L): 蛋白胨 2, 酵母膏 1, 葡萄糖 2, 琼脂 2, 自然 pH 值.

2) 种子培养基: 同 1), 不加琼脂.

3) 发酵培养基成分 组分(g/L): 壳聚糖 3, NaCl 0.5, 酵母膏 0.3,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.8.

### 1.2 方法

1.2.1 壳聚糖酶活力测定 1 mL 1 g/L 的胶体壳聚糖 (pH 值 5.6) 加入 1 mL 用乙酸缓冲液适当稀释的酶液, 37 °C 保温 10 min, 沸水浴 5 min 终止反应, 加入 1 mL 0.25 mol/L NaOH 使未完全反应的壳聚糖沉淀, 离心; 去沉淀, 取上清液, 加入 2 mL  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6\text{-Na}_2\text{CO}_3$  试剂, 沸水浴 15 min, 冷却后于 420 nm 测定  $A_{420}$  值. 在上述条件下, 1 个酶活力单位定义为每分钟释放相当于 1  $\mu\text{mol}$  GlcN-HCL 还原糖的酶量<sup>[7,8]</sup>.

1.2.2 胶体壳聚糖的制备 壳聚糖 3 g, 溶解于 0.2 mol/L 的 HCl 200 mL 中, 溶液放在韦林氏搅拌器中搅拌, 开始用 1 mol/L NaOH, 最后用 0.1 mol/L NaOH, 溶液被中和到碱性, pH 9.0. 得到的沉淀在 1 000 r/min 下离心 20 min, 并用水重复洗涤, 直到上清液的 pH 呈中性. 洗涤后的沉淀悬浮于蒸馏水中, 且悬浮液的 pH 值调整到 6.2, 最后的质量浓度为 1.0 g/dL<sup>[9,10]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养时间对产壳聚糖酶的影响

测定培养时间对产壳聚糖酶的影响结果见图 1. 培养 2 d 后, 菌株具有较强的酶活力, 第 3 天达到最大值, 此后随着培养时间增加, 酶活力逐渐降低. 所以, 培养时间以 3 d 为最佳.

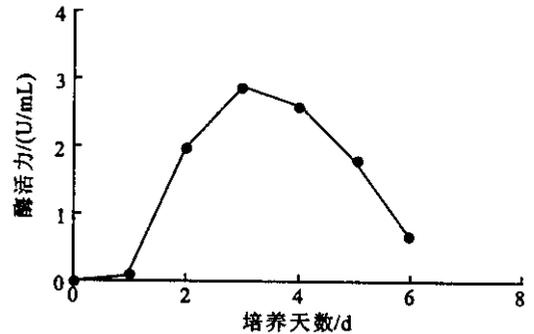


图 1 培养时间对产壳聚糖酶的影响

Fig.1 Effect of culture time on chitinase's production

### 2.2 培养 pH 值对产壳聚糖酶的影响

分别在不同起始 pH 值培养条件下测定产壳聚糖酶的酶活力, 结果见图 2. 培养 pH 值在 6.5 时, 假单胞菌 Y8 产壳聚糖酶的酶活力最高.

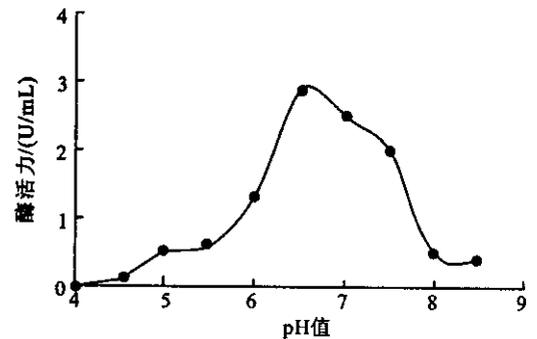


图 2 培养 pH 值对产壳聚糖酶的影响

Fig.2 Effect of pH on chitinase's production

### 2.3 培养温度对产壳聚糖酶的影响

在不同温度下培养相同时间后测定酶活力, 结果见图 3. 菌株 Y8 在 28 ~ 32 °C 培养, 酶活力都较好, 32 °C 最佳, 低于 28 °C 或高于 32 °C, 酶活力下降均很快.

### 2.4 添加碳源对产壳聚糖酶的影响

2.4.1 添加不同碳源对产壳聚糖酶的影响 采用质量浓度为 3 g/L 的不同碳源进行发酵培养, 最后测定其酶活力, 结果见表 1. 氨基葡萄糖和壳聚糖对壳聚糖酶的产生都有较好的诱导作用, 以壳聚糖为碳源酶活力最大.

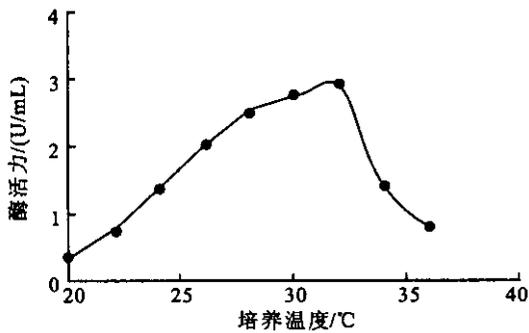


图3 培养温度对产壳聚糖酶的影响

Fig.3 Effect of temperature on chitinase's production

表1 添加不同碳源对产壳聚糖酶的影响

Tab.1 Effect of different carbon source on chitinase's production

碳源	活力/(U/mL)
葡萄糖	1.5
蔗糖	1.8
麦芽糖	2.0
乳糖	2.1
氨基葡萄糖	2.7
CMC	2.3
壳聚糖酶	2.8

2.4.2 添加不同质量浓度壳聚糖对产壳聚糖酶的影响 添加不同质量浓度壳聚糖对产壳聚糖酶的影响见图4.添加3 g/L以下的壳聚糖对产酶有一定促进作用,超过5 g/L抑制显著.

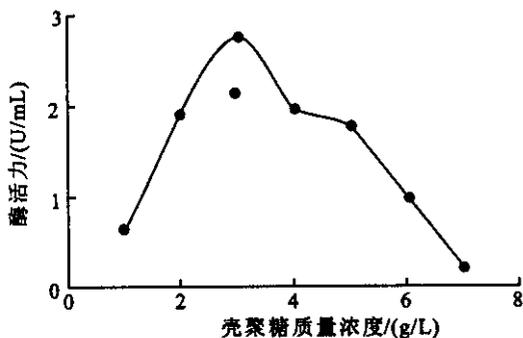


图4 不同质量浓度壳聚糖对产壳聚糖酶的影响

Fig.4 Effect of different concentration of chitosan on chitinase's production

## 2.5 添加不同氮源对产壳聚糖酶的影响

添加质量浓度为0.3 g/L的不同氮源进行发酵培养,最后测定其酶活力,结果见表2.添加有机氮源蛋白胨、酵母膏对产壳聚糖酶有较好的促进作用,而添加无机氮源则不利于产酶.

表2 添加不同氮源对产壳聚糖酶的影响

Tab.2 Effect of different nitrogen source on chitinase's production

氮源	酶活力/(U/mL)
尿素	0.1
KNO <sub>3</sub>	0.2
硫酸铵	2.0
硝酸铵	2.1
蛋白胨	2.5
酵母膏	2.8

## 2.6 不同金属离子对产壳聚糖酶的影响

向培养基中分别加入 $50 \times 10^{-6}$  g/mL的FeSO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>、CaCO<sub>3</sub>、KCl、MnCl<sub>2</sub>等金属离子,结果见表3. Fe<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>对该酶的产生具有一定的激活作用;K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>作用不显著;Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>具有一定的抑制作用.

表3 金属离子对产壳聚糖酶的影响

Tab.3 Effect of different iron on chitinase's production

金属离子	相对酶活力/%
Fe <sup>2+</sup>	+30
Mg <sup>2+</sup>	+20
Zn <sup>2+</sup>	-20
Cu <sup>2+</sup>	-10
Ca <sup>2+</sup>	0
K <sup>+</sup>	0
Mn <sup>2+</sup>	-30

## 3 结论

壳聚糖酶是一种诱导酶<sup>[11]</sup>,一定质量浓度的可溶性壳聚糖能诱导假单胞菌Y8大量合成壳聚糖酶;另外,氨基葡萄糖对诱导产酶也有一定作用.添加氮源,特别是有机氮源蛋白胨、酵母膏对产酶有促进作用.添加碳源和氮源对同一菌种的不同菌株产酶影响有所差异.本试验菌产酶最好的碳源为壳聚糖,有别于王钦宏等报道的假单胞菌VIII39产酶的最佳碳源氨基葡萄糖;另外,王钦宏等研究的假单胞菌VIII39添加氮源结果为有机氮源均不利于产酶,NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>则有促进作用.而本试验菌添加有机氮源有利于产酶,添加无机氮源效果没有有机氮源好,这与王钦宏等研究的结果有很大不同.

(下转第73页)

- [ 11 ] Richards F M. Titration of amino groups released during the digestion of ribonuclease by subtilisin[ J ]. **C R Trav Lab Carlsberg ser Chim** ,1956 ,29 :322 - 328.
- [ 12 ] Fruton J S. Proteinase-catalyzed synthesis of peptide bonds[ J ]. **Adv Enzymol** ,1982 ,53 :239 - 306.
- [ 13 ] You-shang Z. Enzymatic synthesis of proteins and peptides[ J ]. **Trends Biochem Sci** ,1983 ( 1 ) :16 - 17.
- [ 14 ] Townsend A A , Nakai S. Relationship between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins[ J ]. **J Food Sci** , 1983 ,48 ( 2 ) :588 - 594.
- [ 15 ] Das K P , Kinsella J E. Stability of food emulsions : Physicochemical role of protein and nonprotein emulsifiers[ J ]. **Advances in Food and Nutrition Res** ,1990 ,1 34.
- [ 16 ] Jones L J , Tung M A. Functional properties of modified oilseed protein concentrates and isolates[ J ]. **Can Inst Food Sci Technol J** ,1983 ,16 ( 1 ) 57 - 62.

( 责任编辑 杨 萌 )

( 上接第 68 页 )

金属离子的作用 , $Fe^{2+}$  , $Mg^{2+}$  对该酶的产生具  $Zn^{2+}$  , $Mn^{2+}$  具有一定的抑制作用。  
有一定的激活作用 ; $K^+$  , $Ca^{2+}$  作用不显著 ; $Cu^{2+}$  ,

## 参考文献 :

- [ 1 ] Yamami J , Tanigawa M , Ishiguro M. Chitin , chitosan and enzymes[ J ]. **Biosci Biochem** ,1998 ( 4 ) 825 - 828.
- [ 2 ] Muraki E , Yaku F , Kojirna H. Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 5-8[ J ]. **Carbohydr Res** ,1993 ( 239 ) 226 - 230.
- [ 3 ] 王扬 娄永江 杨文鸽. 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.
- [ 4 ] Charnley A K , St. Leger R J. The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals[ M ]. New York : Plenum , 1991. 267 - 286.
- [ 5 ] 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.
- [ 6 ] Yol Jin-Jeon , Shanidi F , Kim Se-Kwon. Preparation of chitin and chitosan chitoooligosacchrides and their applications in physiological functional foods[ J ]. **Food Reviews International** 2000 ,16( 2 ) :159 - 176.
- [ 7 ] Zhang H. Preparation of chitoooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme[ J ]. **Carbohydr Res** ,1999 ,320( 3 ~ 4 ) : 257 - 260.
- [ 8 ] Omumasaba CA , Yoshida N , Sekiguchi Y. Purification and some properties of a novel chitosanase from *Bacillus subtilis* KH1 [ J ]. **Journal-of-General-and-Applied-Microbiology** ,2000 ,46 ( 1 ) 19 - 27.
- [ 9 ] Yamashita. Effect of chitosan-deacetylation degree on the production of chitoooligosaccharides by *Bacillus* sp. Chitosanas[ J ]. **Kichin Kitosan Kenkyu** ,1999 ,5( 2 ) :148 - 189.
- [ 10 ] Saito-J , Kita-A , Higuchi-Y. Crystal structure of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1 at 1.6-angstrom resolution and its substrate recognition mechanism[ J ]. **Journal of Biological Chemistry** ,1999 ,( 43 ) :30818 - 30825.
- [ 11 ] Hutadilok N , Mochimasu T. The effect of N-substitution on the hydrolysis of chitonsan by an endo-chitosanas[ J ]. **Carbohydr Res** ,1995 ( 6 ) :128 - 143.

( 责任编辑 杨 萌 )