

温 钢,刘海燕,杨 梅.壳聚糖酶产生菌的选育及产酶能力研究[J].江苏农业科学,2014,42(1):347-349.

壳聚糖酶产生菌的选育及产酶能力研究

温 钢,刘海燕,杨 梅

(吉林化工学院环境与生物工程学院,吉林吉林 132022)

摘要:从某水产市场附近土壤中分离筛选出 4 株具壳聚糖酶能力的微生物菌株,其中菌株 S03 具有较高的产酶能力,经鉴定属于毛霉属(*Mucor* sp.)。试验条件下该菌株培养 3 d 时,发酵液中壳聚糖酶活性最高。并进一步证明该菌株所产壳聚糖酶属于诱导型壳聚糖酶,适量添加葡萄糖有助于壳聚糖酶的产生。

关键词:壳聚糖酶;酶活力;鉴定

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0347-02

壳聚糖(chitosan)别称甲壳胺,是甲壳质脱去部分乙酰基的产物,是一类由 2-氨基-2-脱氧-葡萄糖和 2-乙酰氨基-2-脱氧-葡萄糖(<40%)单体通过 β -1,4 糖苷键连接而成的直链多糖^[1]。壳聚糖是自然界中唯一的天然阳离子高聚物,其特殊的化学结构决定了这种高聚物有着独特的生物活性。壳聚糖具有提高人体免疫力、促进伤口愈合、降血脂、降血压等保健作用,是一种有广泛应用前景的医疗保健材料^[2]。另外,壳聚糖还有很好的杀菌、抑菌作用。但是由于壳聚糖分子量大,不溶于水,不易被人体吸收,从而限制了这种物质作为医疗保健品的应用。利用壳聚糖降解得到壳低聚糖,不但容易被人体吸收,而且某些壳寡聚糖还有许多新颖的生物活性,在治疗癌症和提高人体免疫力方面有很好的试验效果^[3]。目前降解壳聚糖的方法主要有化学降解法和酶降解法,其中酶降解法以降解过程容易控制、反应条件温和以及对环境没有污染等优点成为壳聚糖降解的首选途径^[4],因此进一步选育壳聚糖酶产生菌株就显得尤为重要。本研究选育出具有一定产壳聚糖酶能力的菌株,并初步考察了其产酶能力,以期为后续壳聚糖酶发酵生产及应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

壳聚糖和氨基葡萄糖购于国药集团化学试剂有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

胶体壳聚糖:取 5 g 壳聚糖加入 100 mL 0.4 mol/L HCl 溶液中,50 ℃ 搅拌至壳聚糖完全溶解,加入 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 5.0,得 5% 胶体壳聚糖。

1.2 培养基

胶体壳聚糖液体培养基:A 液:1% 胶体壳聚糖;B 液:0.4% $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.2% KH_2PO_4 , 0.14% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% NaCl, 0.1% KCl, 0.02% $CaCl_2$, 0.1% 酵母粉, 3% 琼脂, pH 值 7.2;将 A 液、B 液分别灭菌后等体积混合。

壳聚糖粉末培养基:1% 壳聚糖粉末, 0.07% $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.03% KH_2PO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.03% 蛋白

胨, 0.03% 酵母粉, pH 值 7.2。

1.3 方法

1.3.1 菌株初筛 将采集土样加入适量蒸馏水摇匀,梯度稀释后,涂布于胶体壳聚糖固体培养基平板上,30 ℃ 培养 3~5 d,逐一挑取平板上生长状况良好且能够形成水解圈的菌株,再次接种于胶体壳聚糖固体培养基平板,测定菌落直径和透明圈直径,进一步比较菌株利用壳聚糖的能力。将分离所得菌株分别编号,进一步参考相关文献^[5]进行菌种鉴定。

1.3.2 菌株降解能力考察 将菌株接种于壳聚糖液体培养基中,接种后于 150 r/min、30 ℃ 振荡培养,定时取样,12 000 r/min 离心 10 min 后得粗酶液,采用 DNS 法测定壳聚糖酶活性^[6]。具体方法为:在 0.5 mL 粗酶液中加入磷酸缓冲液(pH 值 7.2)1.0 mL 和 1% 胶体壳聚糖 0.5 mL,混匀后于 46 ℃ 保温 30 min,沸水浴 10 min。4 000 r/min 离心 5 min 后,取 2 mL 上清液与 1 mL DNS 试剂混合,沸水浴中反应 5 min 后冷却至室温,加入 4 mL 去离子水,混匀后于 540 nm 处测定吸光度,并根据氨基葡萄糖标准曲线计算壳聚糖酶活性。

酶活性单位的定义:pH 值 7.2、温度 46 ℃ 时,1 mL 样品 1 min 催化生成 1 μ mol 氨基葡萄糖的还原糖量所需的酶量为 1 个酶活单位(U/mL)。

1.3.3 菌株生长曲线的测定 将菌株接入液体培养基中培养,定时取样,测定菌体干重和发酵液酶活性,考察菌株生长曲线和酶活性随时间变化的规律。

1.3.4 其他影响菌株产酶能力因素的考察

1.3.4.1 不同碳源对产酶诱导的影响 在液体培养基中,分别以 1% 壳聚糖粉末、1% 胶体壳聚糖、1% 甲壳质、1% 可溶性淀粉、1% 葡萄糖、1% 蔗糖、1% 壳聚糖粉末 + 0.1% 葡萄糖、2% 壳聚糖粉末 + 0.1% 葡萄糖、5% 壳聚糖粉末 + 0.1% 葡萄糖、1% 壳聚糖粉末 + 1% 葡萄糖作为碳源,接入菌种后 150 r/min、30 ℃ 振荡培养 72 h,测定壳聚糖酶活性,考察碳源对菌株产酶能力的影响。

1.3.4.2 培养温度对产酶的影响 将菌株接入装有 100 mL 壳聚糖粉末液体培养基的 250 mL 三角瓶中,分别在 25、28、30、35、37 ℃ 下 150 r/min 振荡培养 3 d 后,测定发酵液酶活性,考察培养温度对菌株产酶的影响。

1.3.4.3 培养基起始 pH 值对产酶的影响 将菌株接入装有 100 mL 壳聚糖粉末液体培养基的 250 mL 三角瓶中,将培

收稿日期:2013-05-07

作者简介:温 钢(1976—),男,吉林四平人,硕士,讲师,研究方向为应用微生物。E-mail:315554062@qq.com。

培养基起始 pH 值分别调至 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5,150 r/min 振荡培养 72 h 后,测定发酵液酶活性,考察培养基起始 pH 值对菌株产酶的影响。

2 结果与分析

2.1 菌株初筛

经富集培养、反复划线分离与纯化,得到 4 株能在胶体壳聚糖固体培养基上生长并形成水解圈的菌株,分别编号为 S01、S02、S03、S04。挑取纯化菌株接种于 PHBV 胶体壳聚糖固体平板培养基,30 ℃ 培养 72 h 后测量菌落直径(*d*)、水解圈直径(*D*),结果见表 1。

表 1 壳聚糖酶产菌的菌落直径及水解圈直径

菌株编号	水解圈直径 <i>D</i> (mm)	菌落直径 <i>d</i> (mm)	<i>D/d</i>
S01	6.2	2.5	2.48
S02	6.7	2.9	2.31
S03	8.5	3.0	2.83
S04	11.1	4.2	2.64

通过水解圈直径与菌落直径的比值(*D/d*)可以判断菌株降解能力的强弱。从表 1 可以看出,菌株 *D/d* 由大到小的排列顺序为 S03>S04>S01>S02。说明菌株 S03 降解能力最强,因此选择 S03 作为试验对象进行后续研究。

2.2 菌株 S03 的分类鉴定

菌株 S03 的菌落形态不定型,培养初期菌丝呈白色,后转为灰白色至黑色,菌丝在培养基内外能广泛蔓延,无假根或匍匐菌丝。菌丝无隔、多核、分枝状,成熟菌丝体上直接生出单生、总状分枝或假轴状分枝的孢囊梗。各分枝顶端着生球形孢子囊,孢囊孢子呈球形。这些性质与毛霉属(*Mucor*)微生物菌株的基本性质一致,依据 Ainsworth 分类系统初步鉴定菌株 S03 属于毛霉属。

2.3 菌株 S03 生长曲线及培养时间对其产酶能力的影响

在微生物液体发酵过程中,为了高度积累目的产物,常须要掌握发酵代谢和酶活性的最旺盛时期,该时期也是高效积累产物的时期。微生物各生长阶段对目的产物都有重要影响,因此必须根据不同微生物生长特点,把其控制在有利于增加目的产物的最适条件下培养。由图 1 可知,从菌株 S03 的生长曲线和产酶时程来看,在培养 1~6 d 时菌株稳定生长,产酶高峰出现在培养 3 d,此时壳聚糖酶活性达到 1.37 U/mL。

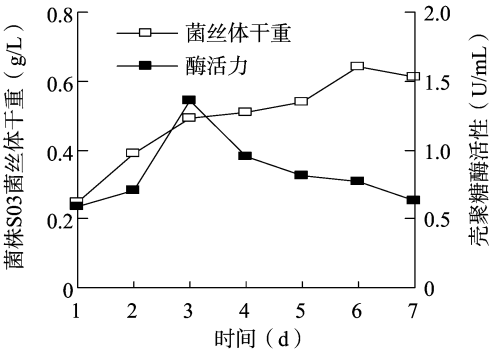


图1 菌株 S03 生长曲线及培养时间对其产酶能力的影响

2.4 不同碳源对菌株 S03 产壳聚糖酶的影响

不同碳源对菌株 S03 产酶的影响见表 2。壳聚糖酶包括

组成型和诱导型,其中多数为诱导型。本研究中只有以壳聚糖或与其结构类似物作为碳源时才能诱导产酶,仅以蔗糖或葡萄糖为碳源菌株虽能生长良好却不能诱导产酶^[7]。添加葡萄糖促进了酶活性的增长,说明菌株 S03 产生的壳聚糖酶也属于诱导型壳聚糖酶;但葡萄糖添加过多,并不利于壳聚糖酶的产生。试验还发现,菌株 S03 在以甲壳质和壳聚糖为诱导物的培养基中产酶能力差别较大,表明该菌株为较专一的产壳聚糖酶菌株。

表 2 不同碳源对菌株 S03 产酶能力的影响

碳源	酶活性(U/mL)
1% 粉末壳聚糖	0.96
1% 胶体壳聚糖	1.39
1% 甲壳质	0.50
1% 葡萄糖	0.00
1% 蔗糖	0.00
1% 粉末壳聚糖+0.1% 葡萄糖	1.93
2% 粉末壳聚糖+0.1% 葡萄糖	2.17
5% 粉末壳聚糖+0.1% 葡萄糖	2.27
1% 粉末壳聚糖+1% 葡萄糖	0.40

2.5 温度、pH 值等发酵条件对产酶的影响

由图 2 可见,培养温度为 28~30 ℃ 时,菌株 S03 产壳聚糖酶能力较高。

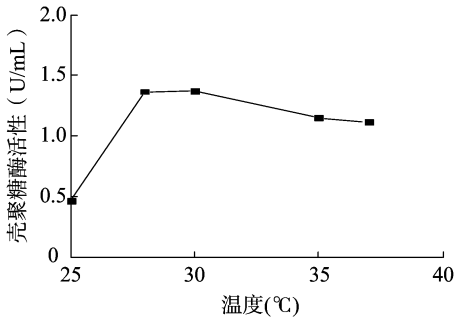


图2 培养温度对菌株S03产壳聚糖酶的影响

由图 3 可见,培养基起始 pH 值对产酶的影响比较明显,当 pH 值为 5.5~6.5 时菌株 S03 产酶能力较高,pH 值为 6.0 时该菌产酶能力最强,酶活性最高。

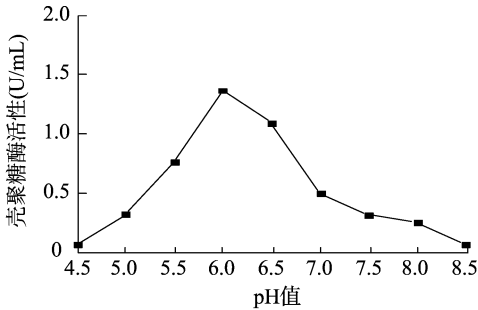


图3 培养基起始pH值对菌株S03产壳聚糖酶的影响

3 结论

本研究通过平板划线分离法筛选到 4 株产酶能力较强的菌株,在以壳聚糖为唯一碳源的培养基上均可产生明显的水解透明圈,其中菌株 S03 产酶能力较强,系统分离鉴定表明

张红,沈永龙,黄金田,等. 几种池塘养殖模式对水体叶绿素 a 含量周年变化的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):349-350.

几种池塘养殖模式对水体叶绿素 a 含量周年变化的影响

张红¹, 沈永龙^{1,2,3}, 黄金田¹, 孙益奎³, 刘海³, 郭海宏³

(1. 盐城工学院海洋技术系/江苏省池塘养殖生态重点实验室, 江苏盐城 224051;

2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214000; 3. 江苏省盐城市银宝盐业有限公司, 江苏盐城 224051)

摘要:通过热乙醇萃取分光光度法对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)主养模式、异育银鲫(*Allogynogenetic crucian*)主养模式、多品种混养模式池塘水体叶绿素 a 含量进行测定,探讨池塘养殖模式对水体环境叶绿素 a 含量周年变化的影响。结果表明:几种池塘养殖模式水体叶绿素 a 含量周年变化规律基本相似;异育银鲫主养模式下水体全年叶绿素 a 含量偏高,多品种混养模式下水体叶绿素 a 含量稍低,黄颡鱼主养模式下水体叶绿素 a 含量最低;养殖池塘中的水体叶绿素 a 含量变化规律与自然界水体的叶绿素 a 含量变化规律基本一致。

关键词:叶绿素 a; 养殖模式; 水质

中图分类号: S945.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0349-02

水质好坏直接影响鱼类生长^[1-3],水体叶绿素 a 含量可以直接反映水质好坏。当叶绿素 a 平均含量低于 10 μg/L 时,夏季、秋季水体交换弱的水体中 pH 值、DO 值与叶绿素 a 含量无明显相关甚至无相关;夏季、秋季水体交换强的水体中 pH 值与叶绿素 a 含量呈显著正相关,DO 值与叶绿素 a 含量可能呈显著正相关或无相关^[4]。黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)隶属于鲇形目鲿科黄颡鱼属,生长速度较慢,重 200~300 g,其肉质细嫩、味道鲜美。异育银鲫(*Allogynogenetic crucian*)生长速度快、抗病力强、肉味鲜嫩,深受消费者的喜爱。关于叶绿素 a 与理化因子相关性研究已有少量报道^[5],但都是以富营养海域、湖泊为研究对象。本研究针对黄颡鱼主养模式、异育银鲫主养模式、多品种混养模式等几种常见的

池塘养殖模式,探讨池塘水体叶绿素 a 含量的周年变化规律,旨在为池塘养殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 采样时间及地点

2011 年 5 月至 2012 年 4 月每月中旬对江苏省银宝盐业有限公司射阳盐场黄颡鱼主养模式、异育银鲫主养模式、多品种混养模式的各池塘采集水样,测定水体中叶绿素 a 含量的周年变化。整个采样过程参照 DB 45/T 524—2008《养殖业无公害农产品产地水质采样技术规范》规定的方法进行。

1.2 采样池塘养殖情况

各采样池塘基本信息及投苗情况见表 1。

1.3 叶绿素 a 含量的测定

1.3.1 水样的处理和保存 根据金相灿等^[6]、章宗涉等^[7]的方法,取 300 mL 水样经微孔滤膜过滤后,将带样品的滤膜剪碎放入 10 mL 离心管中-20℃静置保存 24 h。

1.3.2 热乙醇萃取分光光度法(乙醇法)步骤 将冷冻的带样滤膜迅速用 90% 热乙醇(80℃)于 80℃热水浴中萃取 2 min,用 KS-1200 型超声波破碎机超声(300 W,3、5、50 s)振荡处理 2 min,于室温暗处静置萃取 4~6 h,离心得上清液

收稿日期:2013-05-27

基金项目:江苏省水产三项工程(编号:PJ2010-59);江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室课题(编号:JLCBE07009)。

作者简介:张红(1978—),女,江苏扬州人,讲师,从事植物生理学研究。E-mail:yezhhong@126.com。

通信作者:黄金田,教授,从事水产养殖、水产动物疾病研究。E-mail:hjt@ycit.cn。

其属于毛霉属。在试验条件下菌株 S03 产酶高峰出现在培养 3 d 时,在以粉末壳聚糖作为碳源的培养基中适量添加葡萄糖可以促进菌体增殖从而更利于产酶,说明该菌株产生的壳聚糖酶属于诱导酶。本研究为进一步开发利用微生物壳聚糖酶资源奠定了基础。

参考文献:

- [1]戴芸,朱旭芬. 微生物壳聚糖酶的研究概况[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2004,30(2):229-236.
- [2]陈小娥,夏文水,余晓斌. 微生物壳聚糖酶研究进展[J]. 海洋科学,2004,28(3):72-76.
- [3]Tanaka T, Fujiwara S, Nishikori S, et al. A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermo-

philic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(12):5338-5344.

- [4]Sugita A, Sugii A, Sato K, et al. Cloning and characterization of a gene coding for a major extracellular chitosanase from the koji mold *Aspergillus oryzae*[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2012, 76(1):193-195.

- [5]魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:58-91.

- [6]张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化试验方法和技术[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,1997:1-2.

- [7]Dhillon G S, Brar S K, Valero J R, et al. Bioproduction of hydrolytic enzymes using Apple pomace waste by *A. niger*: applications in bio-control formulations and hydrolysis of chitin/chitosan[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2011, 34(8):1017-1026.