

姚炎,李菁菁,张雨萌,等.溜曲霉 M3b 产壳聚糖酶的固体发酵工艺优化及酶学性质[J].华中农业大学学报,2022,41(5):215-222.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.05.026

溜曲霉 M3b 产壳聚糖酶的固体发酵 工艺优化及酶学性质

姚炎¹,李菁菁²,张雨萌¹,赵南鹏¹,丁德征¹,苏淑慧¹,付星¹

1. 华中农业大学食品科学技术学院/国家蛋品加工技术研究中心,武汉 430070;
2. 湖北省农产品质量安全检测中心,武汉 430070

摘要 为挖掘专一性壳聚糖酶,从多地土壤中筛选出1株高壳聚糖酶活力的真菌 M3b,对其进行了形态学观察和18S rDNA 序列鉴定,采用单因素试验和正交试验优化固体发酵工艺,研究纯酶的酶学性质。结果显示,菌株 M3b 为溜曲霉,其最佳产酶发酵条件为:以水为100%计,1% 胶体壳聚糖+1% 葡萄糖、0.5% 硫酸铵、麸皮:豆粕=6:10、接种量为10%、发酵6 d、初始发酵 pH 7.0、发酵温度 32℃。在此条件下酶活力达到 20.56 U/mL,是初始发酵条件的 221.3%。SDS-PAGE 和酶谱分析发现该菌株只产1种壳聚糖酶,分子质量为 40 ku。该酶的酶促反应最适 pH 值为 5.5,最适温度为 60℃,水解产物聚合度 ≥ 2 。结果表明,采用溜曲霉进行固体发酵可以显著提高壳聚糖酶的酶活力,降低生产成本,纯化后的壳聚糖酶 AtChito40 酶学性质稳定,耐酸碱,且能有效地降解壳聚糖。

关键词 溜曲霉;壳聚糖酶;壳寡糖;固体发酵;酶活力;纯化

中图分类号 TQ925 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)05-0215-08

壳聚糖酶(chitosanase, EC 3.2.1.132)是一类催化壳聚糖中氨基葡萄糖间的 β -1,4-糖苷键断裂,并水解释放壳寡糖的糖苷水解酶^[1]。壳聚糖酶水解而形成的壳寡糖具有良好的水溶性、易于被生物体吸收利用等优点^[2],广泛应用于农业、食品、生物医药等多个领域。壳聚糖酶来源广泛,近年来已从细菌、真菌等微生物中筛选到具有潜在应用能力的壳聚糖酶发酵菌株^[3]。与细菌来源的壳聚糖酶相比,真菌壳聚糖酶具有高效性和相容性,生产成本更低,适合工业化生产。在生产中,菌株发酵产酶可分为液体发酵和固体发酵,固体发酵可以使用廉价的农业残留物,如麦麸、豆粕、虾副产品为培养基质,从而减少工业废水排放,降低生产成本。此外,固体发酵体系含水量低,不含自由水,更利于水分活度要求低的真菌生长。目前,对壳聚糖酶来源的真菌菌株固体发酵研究报道较少,多数集中在液体发酵上,并且真菌菌株产壳聚糖酶活力普遍较低。针对高效产壳聚糖酶原始真菌菌株少、壳聚糖酶普遍活力低、纯酶价格昂贵

等问题,有必要挖掘产酶活力高、稳定性强的真菌菌株,并强化其固体发酵条件。

溜曲霉与米曲霉有近缘关系,常用来处理农业纤维类废弃物,开发生物蛋白资源,具有较好的生物利用度和安全性。到目前为止,尚未见到溜曲霉产壳聚糖酶的相关报道。因此,本研究从多地土壤中分离出产壳聚糖酶活力较高的溜曲霉,采用固体发酵手段以提高壳聚糖酶的产量和活力。随后,对壳聚糖酶酶学性质进行研究,进一步验证壳聚糖酶的稳定性,以为壳聚糖酶工业化生产和应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

微生物筛选自浙江、河南、湖北、海南、山东等省份的土壤;壳聚糖购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;酵母浸粉购于安琪酵母股份有限公司;豆粕、麸皮购于武汉农贸市场;蛋白质 Marker 试剂盒购

收稿日期:2022-04-07

基金项目:国家自然科学基金项目(32072158);国家级大学生创新创业训练计划(S202110504232)

姚炎,E-mail:1784736219@qq.com

通信作者:付星,E-mail:fuxing@mail.hzau.edu.cn

于Solarbio(中国北京)。

1.2 培养基

1)富集培养基。A液:胶体壳聚糖1%、pH 5.5~6.0;B液:KH₂PO₄ 0.2%、酵母粉0.2%、无水MgSO₄ 0.1%、NaCl 1%、(NH₄)₂SO₄ 1%。

2)液体发酵培养基。A液:胶体壳聚糖溶液1%、pH 5.5~6.0;B液:KH₂PO₄ 0.22%、Na₂HPO₄ 0.1%、KCl 0.15%、MgSO₄·7H₂O 0.15%、CaCl₂ 0.02%、NH₄Cl 0.5%、酵母浸粉0.3%。

3)初筛培养基。在液体发酵培养基的基础上添加2%琼脂。

4)固体发酵培养基。在液体发酵培养基的基础上添加:麸皮0.8%、豆粕0.8%;A液10 mL、B液20 mL。

1.3 菌株的分离筛选

称取土壤样品10 g,加90 mL无菌生理盐水,搅拌土壤悬浮液。吸取上层清液5 mL至50 mL富集培养基中,培养2 d。富集液进行10⁻¹~10⁻⁷梯度稀释,分别取3个连续梯度稀释液0.1 mL至初筛培养基平板,培养3~5 d。观察是否有透明圈产生,记录测量透明圈直径(*D*)以及菌落直径(*d*)大小,计算*D/d*值。将产生透明圈的菌株进行平板划线培养,菌株接入50 mL液体发酵培养基的三角瓶中,180 r/min、37 °C培养3 d。取发酵液在4 °C下10 000 r/min离心10 min,收集上清液,用DNS法测定上清液中壳聚糖酶的活力,将壳聚糖酶活力较高的菌株保存并鉴定。

1.4 固态发酵粗酶液的制备

取灭菌好的固体发酵培养基,加入10 mL灭菌营养液、20 mL 1%胶体壳聚糖和3 mL液体发酵液,37 °C培养4 d。取培养好的固体曲,加入120 mL 0.2 mol/L醋酸缓冲液(pH 5.6),粉碎,4 °C低速搅拌2 h。经多层纱布过滤,滤液于4 °C下10 000 r/min离心10 min,收集上层清液为粗酶液,4 °C冰箱内保存。

1.5 菌株形态学和分子生物学的鉴定

肉眼观察菌株的菌落形态、颜色等。采用插片法培养真菌,乳酸石炭酸棉蓝染料染色15 min制片,显微镜下观察,进行初步鉴定。菌株送到生工生物工程(上海)股份有限公司进行18S rDNA序列测序,结合NCBI数据库建立系统发育树,进行菌株鉴定。

1.6 壳聚糖酶活力及蛋白质含量的测定

根据张馨月等^[4]的方法,从粗酶液中取出部分稀释,4 °C下10 000 r/min离心10 min。取上层清液0.15 mL,加入含0.45 mL 1%胶体壳聚糖及0.4 mL醋酸缓冲液(pH 5.6)的试管中(试管提前50 °C水浴

保温20 min),振荡均匀,50 °C水浴30 min,加入0.75 mL的DNS终止反应,沸水浴5 min显色。用冰水冷却至室温,12 000 r/min离心10 min,取上清液1 mL,加入微量比色皿,测定540 nm下OD值。以等量煮沸灭活的酶液作空白对照。根据氨基葡萄糖盐酸盐标准曲线,计算出还原糖的量,换算壳聚糖酶的酶活力(酶活性)。

酶活力单位定义:在上述条件下,每毫升粗酶液每分钟产生1 μmol还原糖(以氨基葡萄糖计算)所需的酶量为1个酶活力单位(U)。相对酶活力是以同组试验的最高酶活力为100%,其他酶活力与最高酶活力的比值^[5]。剩余酶活力是经过一定处理后的酶活力与原来的酶活力的比值。

按照Bradford法,以牛血清白蛋白作为标准蛋白样品,测定蛋白质含量。

1.7 产壳聚糖酶的固体发酵工艺的单因素试验和正交试验设计

除了豆粕和麸皮、酵母浸粉,分别采用不同碳源:1%胶体壳聚糖+1%葡萄糖、1%胶体壳聚糖+1%蔗糖、1%胶体壳聚糖+1%淀粉、1%胶体壳聚糖、1%粉末壳聚糖、1%胶体几丁质、1%粉末几丁质、1%葡萄糖、1%蔗糖、1%淀粉,考察碳源对菌株发酵产酶的影响。

在最佳碳源下分别添加相同质量的不同氮源(NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄、NaNO₃、蛋白胨和牛肉膏),不同比例的麸皮和豆粕(14:2、12:4、10:6、8:8、6:10、4:12、2:14),不同接种量的液体发酵液(1、2、3、4、5 mL),按照不同发酵时间(3、4、5、6、7 d),设置不同起始pH值(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0),不同温度(27、32、37、42、47 °C),分别研究各因素对菌株产壳聚糖酶活力的影响,以确定各单因素的最佳参数。在单因素试验基础上,选取固体发酵的温度、时间、起始pH,设计三因素三水平的L₉(3³)正交试验。

1.8 壳聚糖酶的纯化

将发酵浸提的粗酶液缓慢搅拌加入干燥的硫酸铵固体粉末,达到80%的饱和度,冰水浴30 min,4 °C下10 000 r/min离心10 min,收集沉淀^[6]。用0.2 mol/L、pH 5.6的HAc-NaAc缓冲液溶解,透析过夜。上载到Q SFF离子交换柱,采用20 mmol/L pH 7.2磷酸盐缓冲液洗脱,收集洗脱液,测定酶活力。

1.9 SDS-PAGE电泳、酶谱和生物质谱分析

采用12%分离胶和5%的浓缩胶进行SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝G-250染色观察目标蛋白

质,并使用蛋白质 Marked 试剂盒(Solarbio,中国北京)分析该壳聚糖酶的分子质量。酶谱分析参照本实验室之前的研究^[4],在电泳分离胶中加入 100 mg/L 乙二醇壳聚糖进行酶谱分析。将分离胶放置在紫外灯下观察,壳聚糖酶活性带显示为蓝色暗带。

蛋白进行 SDS-PAGE 后采用电喷雾-四级杆-飞行时间串联质谱(ESI-Q-TOF2)鉴定蛋白质肽段序列^[7],通过 Peptide sequencing 软件分析得到 3 个肽段序列,将肽段序列在 NCBI 数据库中进行比对分析。

1.10 壳聚糖酶 AtChito40 的酶活力测定

采用乙酸-乙酸钠(pH 3.0~6.0)、 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 6.0~7.5)、Tris-HCl(pH 7.5~9.0)、甘氨酸-氢氧化钠(pH 9.0~10.0)缓冲液体系(50 mmol/L)溶解底物,将纯酶液适当稀释,测定壳聚糖酶活力,以壳聚糖酶活力最大值为 100%,确定最适反应 pH。考察酶的 pH 稳定性,将壳聚糖酶在 pH 3.0~10.0 处理 30 min,在标准条件下测定剩余酶活力。在最适 pH 下,不同温度(30~90 °C)测定酶活力,以最大壳聚糖酶活力值为 100%,分别计算各温度下的相对酶活^[8]。将壳聚糖酶液置于不同温度(30~90 °C)水浴保温 30 min,放入冰水浴中冷却 30 min。按上述方法在最适温度和最适 pH 条件下测定剩余酶活力^[9]。

1.11 壳聚糖酶 AtChito40 水解壳聚糖试验

壳聚糖酶与 1% 胶体壳聚糖在 50 °C 下搅拌 8 h 进行水解反应,不同时间点取样,煮沸 20 min 后灭活,12 000 r/min 离心 10 min,取上层清液,经 0.22 μm 滤膜过滤。采用薄层层析法(TLC)分析壳聚糖酶液的降解产物^[10]。展开剂配方为正丁醇:冰醋酸:水:氨水=10:5:5:1(体积比),显色剂配方为硫酸:甲醇=1:9(体积比)。

1.12 数据处理与分析

本试验所有样品均重复测定 3 次,取平均值,采用 Excel 2016 软件进行数据处理,用 Origin 2018 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 产壳聚糖酶菌株的筛选

通过富集培养,利用胶体壳聚糖作为唯一碳源筛选和分离产壳聚糖酶的菌株,分别测量透明圈和菌落的直径,计算两者的比值,初步判定菌株降解能力大小,测定结果见表 1,可见菌株 M3b 比值最大,且产壳聚糖酶能力较强,初始酶活力达到 11.60 U/mL,产酶稳定。因此,选取菌株 M3b 进行后续研究。

表 1 产壳聚糖酶菌株的生物降解能力

菌株 Strain	透明圈直径/cm Diameter of transparent ring	菌落直径/cm Colony diameter	D/d	酶活力/ (U/mL) Enzyme activity
M3b	4.2	2.8	1.5	8.32±0.13
HZAU.11	3.9	2.9	1.3	5.28±0.05
X3	1.9	1.4	1.4	6.34±0.07
B3b	4.5	3.4	1.3	6.54±0.06
M7a	3.6	3.0	1.2	5.90±0.06
D2a	3.5	2.5	1.4	7.02±0.09

2.2 菌株 M3b 的鉴定

菌株 M3b 菌落形态和透明圈大小如图 1A 所示,可见菌落结构较疏松,中部呈絮状,菌落中心呈暗黄绿色。由图 1B 油镜镜检结果可知,分生孢子头呈球形,分生孢子梗大多有隔,顶囊近球形至烧瓶形,产孢结构双层,梗基有足细胞,分生孢子较大,多为近球形和卵圆形。有单层梗基由乳酸石炭酸棉蓝染成浅蓝色,因此,将菌株 M3b 归为曲霉属。

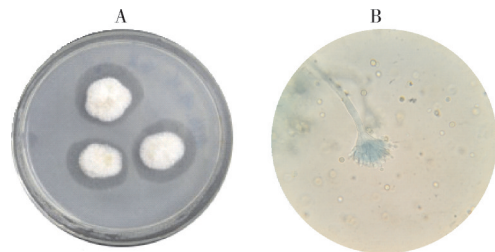


图 1 M3b 菌株的菌落特征(A)和孢子结构的油镜图(100 ×)(B)

Fig. 1 The colony characteristics(A) and oil immersion lens picture of spore structure(100 ×) of M3b(B)

菌株 M3b 测序结果显示 18S rDNA 序列长度为 1 298 bp,通过 GenBank 数据库的序列比对,构建系统发育进化树(图 2)。相似度比较结果显示,菌株 M3b 与溜曲霉(*Aspergillus tamarii*)的同源关系最近,相似度最高(99%)。因此,确定菌株 M3b 为溜曲霉。

2.3 产酶条件的优化

由图 3A 可知,添加胶体壳聚糖和葡萄糖溜曲霉菌株 M3b 产壳聚糖酶活力最高为 10.3 U/mL,其次是添加胶体壳聚糖(9.29 U/mL)、胶体壳聚糖和蔗糖(9.30 U/mL)、胶体壳聚糖和淀粉(9.32 U/mL),而添加淀粉、葡萄糖、蔗糖时,菌株 M3b 产酶活力最低。

如图 3B 所示,当添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时,菌株 M3b 所产酶活力最高,为 11.99 U/mL。其他依次为 NH_4Cl (10.77 U/mL)、 NaNO_3 (7.97 U/mL)。

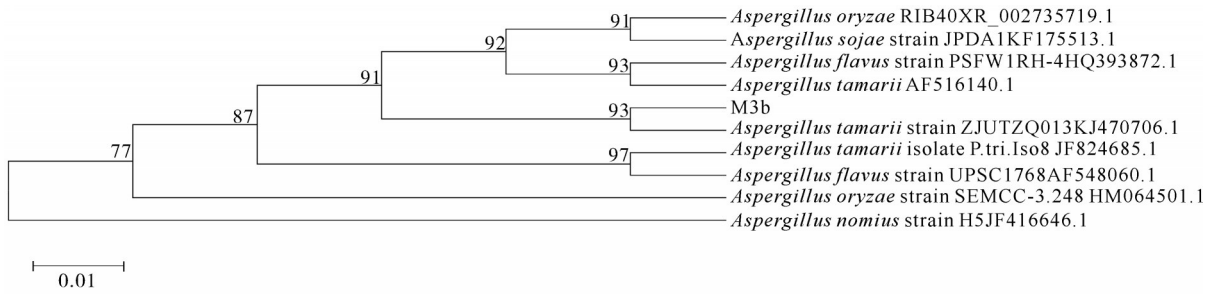
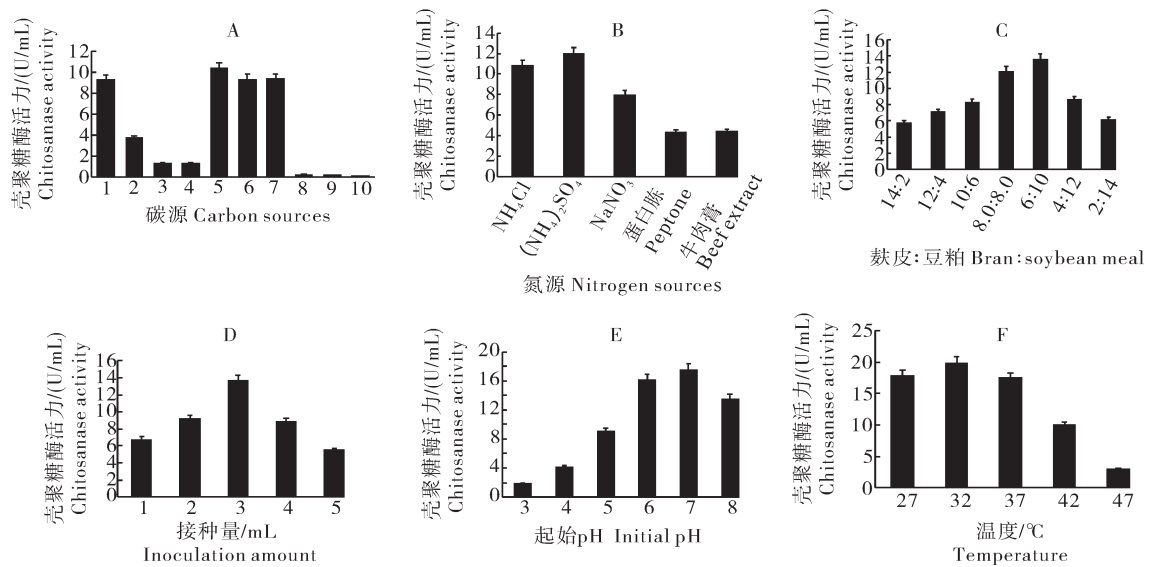


图2 基于18S rDNA序列的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 18S rDNA sequences of selected strains



图A中1为胶体壳聚糖,2为粉末壳聚糖,3为胶体几丁质,4为粉末几丁质,5为胶体壳聚糖+葡萄糖,6为胶体壳聚糖+蔗糖,7为胶体壳聚糖+可溶性淀粉,8为葡萄糖,9为蔗糖,10为可溶性淀粉。In Fig. A, 1: Colloidal chitosan; 2: Powder chitosan; 3: Colloidal chitin; 4: Powder chitin; 5: Colloidal chitosan glucose; 6: Sucrose; 7: Colloidal chitosan soluble starch; 8: Glucose; 9: Sucrose; 10: Soluble starch.

图3 碳源(A)、氮源(B)、麸皮豆粕质量比(C)、接种量(D)、起始pH(E)、发酵温度(F)对溜曲霉M3b产壳聚糖酶的影响

Fig.3 Effect of carbon sources (A), nitrogen sources (B), bran soybean meal ratio (C), inoculation amount (D), pH (E), and temperature (F) on chitosanase production by *Aspergillus tamarii* M3b

在最佳碳氮源的基础上,改变麸皮豆粕的质量比,结果如图3C所示,麸皮与豆粕的质量比为6:10,菌株M3b产酶活力最高为13.56 U/mL。

接种不同量的液体发酵液培养发酵,结果如图3D所示,当接种液体发酵液的量为3 mL时,溜曲霉菌株M3b产壳聚糖酶活力最高,为13.68 U/mL。

由图3E可见,当培养基的初始pH为7.0时,溜曲霉M3b所产酶活力最高为17.48 U/mL。当液体培养基B液初始pH在6.0~8.0时,溜曲霉M3b受pH影响不大,都保持在较高产壳聚糖酶水平,分别达到最高值的92.3%和76.9%。当液体培养基B液初始pH低于3.0时,溜曲霉M3b所产壳聚糖酶的活力迅速降低,一般真菌菌株最适合生长的pH值在5.0~8.0。因此,以pH 7.0为最佳初始pH。

如图3F所示,当发酵培养温度为32 °C时,菌株M3b所产壳聚糖酶的酶活力最高为19.88 U/mL,是初始固体发酵培养的215.2%。当温度为27 °C和37 °C时,菌株仍保持较高的产酶能力,分别为最高值的89.5%和87.9%,当温度高于47 °C时,菌株M3b产酶量明显下降。在一定范围内,生物生长的速率以及化学反应速率在细胞中都随着温度的升高而加快。超出一定的范围,生物机体的重要组成部分,如蛋白质、核酸等,会发生不可逆的破坏。

固体发酵时间对溜曲霉M3b产壳聚糖酶的影响见图4,可以发现发酵到第6天时,菌株M3b产酶活力最高为16.0 U/mL。发酵第1天固体培养基中没有明显的菌落生长,第2天可以观察到白色菌丝,第3天后出现黄棕色孢子,第6、7天后,菌株开始呈现褐

色,由于营养消耗以及菌株代谢产物积累,测定的壳聚糖酶活力和蛋白含量开始下降。

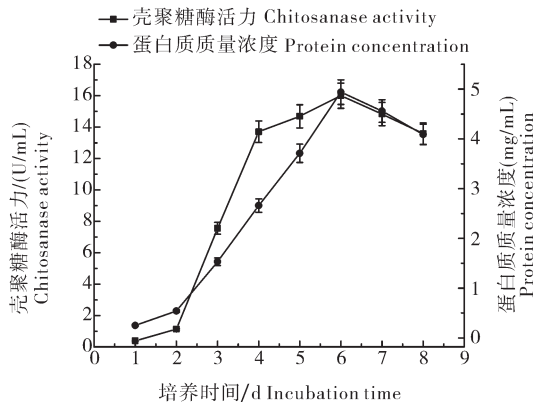


图4 培养时间对溜曲霉M3b产壳聚糖酶的影响

Fig. 4 Effect of fermentation time on chitosanase production by *Aspergillus tamarii* M3b

正交试验结果发现,发酵时间对于酶活力的影响最大,其次是发酵温度、起始pH。最优组合为发酵温度32℃、起始pH7.0、发酵时间6d,此条件下进行发酵,产酶活力达到20.56 U/mL,是初始固体发酵培养的221.3%。

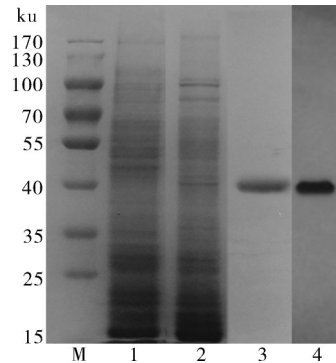
2.4 壳聚糖酶AtChito40的纯化

固体发酵培养基经缓冲液浸提的粗酶液,经硫酸铵沉淀、QSF 阴离子交换层析纯化后得到电泳单一带。图5显示酶谱中仅出现1条暗带,说明该菌株产生的壳聚糖酶只有1种,对应蛋白的分子质量为40 ku。通过SDS-PAGE电泳图和酶谱分析,发现该壳聚糖酶达到电泳级纯度,并将蛋白命名为AtChito40。

蛋白纯化结果(表2)显示,该壳聚糖酶酶活回收率为27.5%,纯化倍数为10.7倍。

2.5 壳聚糖酶AtChito40质谱鉴定

在NCBI数据库中3个肽段分别都存在同源性的100%的壳聚糖酶肽段。肽段MDVDCDG与*Aspergillus nidulans* FGSC A4 (gi 259480859)、*Aspergillus niger* (gi 966763517)及*Penicillium digitatum*



M: 170 Marker; 1: 固体发酵粗酶液; 2: 硫酸铵沉淀; 3: 纯酶液; 4: 壳聚糖酶酶谱。M : 170 Marker; 1: Solid fermentation crude enzyme solution; 2: Ammonium sulfate precipitation; 3: Purified AtChito40; 4: Enzymogram of chitosanase.

图5 溜曲霉M3b菌株产壳聚糖酶纯化的SDS-PAGE电泳图谱

Fig.5 SDS-PAGE electrophoresis of chitosanase purified from *Aspergillus tamarii* M3b strain

Pd1 (gi 953382223)壳聚糖酶对应的氨基酸残基肽段序列同源性为100%。而肽段EVTGEASWLMAR与*Aspergillus nidulans* FGSC A4 (gi 259480859)、*Aspergillus fumigatus* Af293 (gi 146223521)以及*Microcystis aeruginosa* (gi 754187083)来源的壳聚糖酶肽段序列同源性为100%。肽段EVTGEASWLMAR则与*Penicillium oxalicum* 114-2 (gi 146323521)、*Aspergillus nidulans* FGSC A4 (gi 259480859)和*Aspergillus fumigatus* Af293 (gi 146323521)等来源的壳聚糖酶氨基酸残基肽段序列同源性达100%。结合以上的纯化过程和结果,可以证明该蛋白为壳聚糖酶。值得注意的是,质谱显示的其他众多片段在数据库与其他蛋白质序列比对的同源性较低,表明AtChito40可能较为新颖。

2.6 pH和温度对壳聚糖酶AtChito40活性和稳定性的影响

菌株M3b产壳聚糖酶的最适温度结果见图6A,最适温度为60℃,但该酶在60℃保温30 min,剩余酶

表2 溜曲霉M3b壳聚糖酶的纯化结果

Table 2 Purification of chitosanase from *Aspergillus tamarii* M3b

纯化步骤 Purification step	总酶活/U Total activity	蛋白含量/mg Protein	比酶活/(U/mg) Specific activity	纯化倍数 Purification fold	回收率/% Recovery
粗酶液 Crude culture	1 868.60	988.01	1.89	1.00	100
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate precipitation	1 297.10	541.20	2.40	1.24	69.42
Q-SFF 阴离子交换柱 Q-Sepharose fast flow	513.80	25.33	20.30	10.70	27.50

活力只有50%左右,在该条件下稳定性很差。该酶在50℃以下具有很好的稳定性,剩余酶活力在98%以上,在55℃条件下保温30 min,仍有66.3%的酶活力。

如图6B所示,菌株M3b产壳聚糖酶的最适pH

为5.5。当pH在5.5~6.0时,壳聚糖酶保持较高的酶活力,pH在4.0~6.0的范围内,保持70%的酶活力,在6.0~7.5的范围内,保持50%的酶活力,菌株M3b壳聚糖酶在较广的pH范围内(3.0~9.0)保持相对稳定。

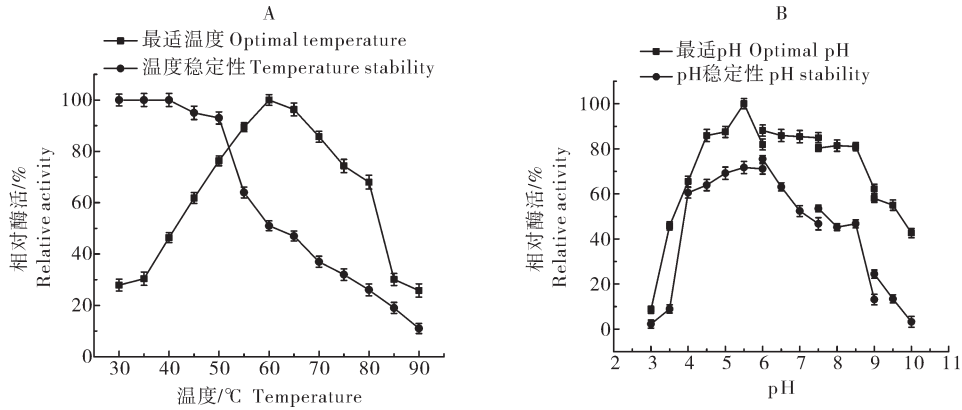


图6 不同温度(A)和pH(B)对壳聚糖酶AtChito40活力和稳定性的影响

Fig.6 Effect of temperature (A) and pH (B) on activity and stability of AtChito40

2.7 壳聚糖酶AtChito40水解特性及产物

以胶体壳聚糖为底物,测定了壳聚糖酶AtChito40的水解产物及特性。如图7所示,壳聚糖酶将壳聚糖裂解成以(GlcN)₂、(GlcN)₃、(GlcN)₄为主要产物的GlcN低聚物的混合物,其分子质量在300~1 200 u^[11]。在前2 h水解初始阶段,酶将壳聚糖裂解为聚合度大于3的低聚糖,2 h后(GlcN)₂的含量逐渐增加,但没有单体生成,表明壳聚糖酶AtChito40不会降解(GlcN)₂。

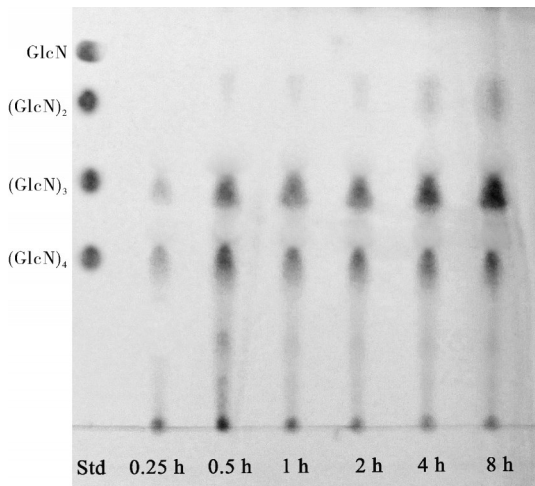


图7 溜曲霉M3b产壳聚糖酶水解胶体壳聚糖产物的TLC分析

Fig.7 TLC analysis of hydrolysis products from colloidal chitosan hydrolyzed by chitosanase production by *Aspergillus tamarii* M3b

3 讨论

壳聚糖酶是高效、特异降解壳聚糖的酶,利用酶法降解壳聚糖的研究还处在实验室研究阶段,仅少数实现工业化生产,高产壳聚糖酶菌株的缺乏是制约壳寡糖规模化生产的瓶颈。本研究成功筛选出1株产壳聚糖酶活力较高的溜曲霉菌株M3b,从单因素试验结果可见,溜曲霉菌株M3b壳聚糖酶的产生需要壳聚糖诱导并且粉末壳聚糖对菌株M3b产壳聚糖酶的诱导作用低于胶体壳聚糖;在以壳聚糖为碳源的基础上添加少量葡萄糖要优于以胶体壳聚糖为唯一碳源,可能与葡萄糖利于菌株M3b的生长代谢有关;同时几丁质也有一定的诱导能力;仅添加淀粉、葡萄糖或者蔗糖,菌株M3b不产壳聚糖酶。这与冯志彬等^[12]研究的结果一致,酶生物合成的调节类型有底物诱导、分解后产生代谢物的阻遏和反馈阻遏,在大多数真菌中壳聚糖酶的合成调节是碳源诱导型。同时发现溜曲霉M3b利用无机氮源比有机氮源更利于产酶,其中硫酸铵为最佳氮源。采用固体发酵方法,充分利用豆粕、麸皮为固体培养基原材料,一方面绿色环保,可减少农业废弃物对环境的不良影响,降低生产成本;另一方面,提高了菌株M3b产壳聚糖的能力,麸皮可以增加固体发酵基质的蓬松透气性,增加与氧气的接触,提高固体基质的利用率,利于散热,促进菌株生长,增加产酶量^[13]。此外,接种量也是影响溜曲霉产壳聚糖酶的重要因素,当

接种量太低,菌的浓度低,生长缓慢,酶活力低;接种量太高,造成固体发酵基质含水量高,自由水含量高,培养瓶底部堆积,减少固体基质内气体含量和气体交换,影响散热,不利于菌株的生长。一般固体发酵初始含水量在30%~70%。

本研究在单因素试验基础上,对固体发酵的温度、时间、起始pH进行了优化,结果显示,最优组合为发酵温度32℃、起始pH 7.0、发酵时间6 d,在此条件下M3b产壳聚糖酶水平达到20.56 U/mL。这与采用固体发酵产壳聚糖酶鹿皮曲霉(8.26 U/mL)^[14]、木霉属菌株 *T. harzianum*(1.40 U/mL)、*T. koningii*(1.20 U/mL)、*T. viride*(1.02 U/mL)和 *T. olyporum*(0.61 U/mL)^[15]相比,表明溜曲霉 M3b 固体发酵产壳聚糖酶活力更高且具有优势。

不同菌株产壳聚糖酶的最适温度不同。本研究中菌株M3b产壳聚糖酶的最适温度为60℃。一般来说,真菌壳聚糖酶的最适温度在50~55℃,*Fusarium solani*最适温度为40℃,*Penicillium stlandicum*最适温度为45℃,*Aspergillus oryzae* IAM2660最适温度为50℃^[16]。自然界中大部分壳聚糖酶不耐热。因此,溜曲霉壳聚糖酶相对于其他真菌壳聚糖酶更适合工业生产。菌株M3b产壳聚糖酶的最适pH为5.5,这与之前报道的托球菌属JG^[17]和曲霉QD-2^[18]产壳聚糖酶在pH 5.6时酶活力最高相一致。海洋真菌MF-08最适pH 5.2,但pH在4.0~6.0才相对稳定^[5]。*Aspergillus* sp. CJ22-326产生的壳聚糖酶的最适pH 4.0,pH在3.5~7.5的范围内保持稳定^[19]。一般情况下,真菌较细菌的稳定范围小,而溜曲霉产真菌壳聚糖酶在较广的pH范围(3.0~9.0)保持相对稳定,宽泛的酸碱适应范围使其具备优异的工业化发酵优势。壳聚糖酶AtChito40水解壳聚糖最后得到产物的聚合度 ≥ 2 ,最小酶解产物为壳二糖。这与类芽孢杆菌TKU047^[20]产壳聚糖酶的水解产物在反应初期仅产生聚合度大于2的壳寡糖但没有氨基葡萄糖(GlcN)的结果一致,表明壳聚糖酶AtChito40是一种内切酶,能更加有效地降解壳聚糖。

参考文献 References

[1] PANG Y, YANG J, CHEN X, et al. An antifungal chitosanase from *Bacillus subtilis* Sh21[J]. *Molecules*, 2021, 26(7):1-14.
[2] KANG B R, SONG Y S, JUNG W J. Differential expression of bio-active metabolites produced by chitosan polymers-based *Bacillus amyloliquefaciens* fermentation[J/OL]. *Carbohydrate polymers*, 2021, 260: 117799[2022-04-07]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117799>.

[3] GUO N, SUN J N, WANG W, et al. Cloning, expression and characterization of a novel chitosanase from *Streptomyces albolongus* ATCC 27414[J]. *Food chemistry*, 2019, 286:696-702.
[4] 张馨月,岳晓洁,李铮峥,等.淡紫紫孢菌的筛选、鉴定及产壳聚糖酶固体发酵条件优化[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(4):160-169. ZHANG X Y, YUE X J, LI Z Z, et al. Isolation and identification of *Purpureocillium lilacinum* and optimization of its solid fermentation conditions for producing chitosanase[J]. *Journal of Chinese institute of food science and technology*, 2020, 20(4):160-169(in Chinese with English abstract).
[5] 李佳茵,王慧敏,祖国仁.海洋真菌MF-08产壳聚糖酶诱导条件及酶学性质分析[J]. *湖北农业科学*, 2016, 55(7):1778-1781. LI J Y, WANG H M, ZU G R. Study on the inducing conditions and enzyme characteristics of a strain marine fungal MF-08 producing chitosanase[J]. *Hubei agricultural sciences*, 2016, 55(7):1778-1781(in Chinese with English abstract).
[6] 曹永强,余志坚,陈超,等.一株嗜热链球菌乳糖酶的分离纯化及酶学特性研究[J]. *食品科学技术学报*, 2018, 36(2):42-51. CAO Y Q, YU Z J, CHEN C, et al. Isolation, purification and enzyme characteristics of lactase produced by a *Streptococcus thermophilus* strain[J]. *Journal of food science and technology*, 2018, 36(2):42-51(in Chinese with English abstract).
[7] FU X, GUO Y X, JIN Y G, et al. Bioconversion of chitin waste using a cold-adapted chitinase to produce chitin oligosaccharides[J/OL]. *LWT*, 2020, 133: 109863 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109863>.
[8] JIANG Z Q, MA S A, GUAN LY, et al. Biochemical characterization of a novel bifunctional chitosanase from *Paenibacillus barengoltzii* for chitoooligosaccharide production[J/OL]. *World journal of microbiology and biotechnology*, 2021, 37(5):1-13 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03051-0>.
[9] DOAN C T, TRAN T N, NGUYEN V B, et al. Production of a thermostable chitosanase from shrimp heads via *Paenibacillus mucilaginosus* TKU032 conversion and its application in the preparation of bioactive chitosan oligosaccharides[J/OL]. *Marine drugs*, 2019, 17(4):217[2022-04-07]. <https://doi.org/10.3390/md17040217>.
[10] DING M, ZHANG T, SUN C, et al. A Chitosanase mutant from *Streptomyces* sp. N174 prefers to produce functional chitopentasaccharide[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2020, 151:1091-1098.
[11] EMBABY A M, MELIKA R R, HUSSEIN A, et al. Biosynthesis of chitosan-oligosaccharides (COS) by non-aflatoxigenic *Aspergillus* sp. strain EGY1 DSM 101520: a robust biotechnological approach[J]. *Process biochemistry*, 2018, 64:16-30.
[12] 冯志彬,薛钰,陈国忠,等.1株产壳聚糖酶细菌的分离、鉴定和发酵条件优化[J]. *食品科学*, 2016, 37(19):171-176. FENG Z B, XUE Y, CHEN G Z, et al. Isolation, identification of *Bacillus mojavensis* amy P216 and optimization of its fermentation conditions for enhanced chitosanase production[J]. *Food science*, 2016, 37(19):171-176(in Chinese with English abstract).
[13] ZHANG H, ZHANG W. Induction and optimization of chitosanase production by *Aspergillus fumigatus* YT-1 using response surface methodology[J]. *Chemical & biochemical engineering*

- quarterly, 2013, 27(3):335-345.
- [14] 章晔敏, 邵一凡, 熊妍妍, 等. 响应面法优化鹿皮曲霉 ZJOU-AC1 产壳聚糖酶的发酵条件[J]. 中国酿造, 2016, 35(11):93-98. ZHANG Y M, SHAO Y F, XIONG Y Y, et al. Optimization of fermentation conditions of chitosanase-producing *Aspergillus cervinus* ZJOU-AC1 by response surface methodology[J]. China brewing, 2016, 35(11):93-98 (in Chinese with English abstract).
- [15] DA SILVA L C A, HONORATO T L, CAVALCANTE R S, et al. Effect of pH and temperature on enzyme activity of chitosanase produced under solid stated fermentation by *Trichoderma* spp.[J]. Indian journal of microbiology, 2012, 52(1):60-65.
- [16] 龚香艺, 吴静, 邬敏辰. 真菌壳聚糖酶研究进展[J]. 食品科学, 2012, 38(17):308-311. GONG X Y, WU J, WU M C. Research progress of fungal chitosanase[J]. Food science, 2012, 38(17):308-311(in Chinese with English abstract).
- [17] ZHOU W, YUAN H, WANG J, et al. Production, purification and characterization of chitosanase produced by *Gongronella* sp. JG[J]. Letters in applied microbiology, 2008, 46(1):49-54.
- [18] ZHANG H, SANG Q, ZHANG W H. Statistical optimization of chitosanase production by *Aspergillus* sp. QD-2 in submerged fermentation[J]. Annals of microbiology, 2012, 62(1):193-201.
- [19] CHEN X, XIA W, YU X. Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus* sp. CJ22-326 [J]. Food research international, 2005, 38(3):315-322.
- [20] WANG S L, YU H T, TSAI M H, et al. Conversion of squid pens to chitosanases and dye adsorbents via *Bacillus cereus* [J]. Research on chemical intermediates, 2018, 44(8):4903-4911.

Optimizing solid fermentation process for chitosanase produced by *Aspergillus tamarii* M3b and enzymatic properties of chitosanase

YAO Yan¹, LI Jingjing², ZHANG Yumeng¹, ZHAO Nanpeng¹, DING Dezheng¹, SU Shuhui¹, FU Xing¹

1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University/
National Research and Development Center for Egg Processing, Wuhan 430070, China;
2. Hubei Agricultural Product Quality and Safety Testing Center, Wuhan 430070, China

Abstract A novel fungus strain M3b with high chitosanase activity was screened from the soil of many places to study the specific chitosanase. The morphological observation and 18S rDNA sequence identification of strain M3b were carried out. The single-factor and orthogonal experiments were used to optimize the solid fermentation process for chitosanase produced by M3b. The enzymatic properties of chitosanase purified were investigated. The results showed that strain M3b was *Aspergillus tamarii*. The optimized fermentation conditions for producing chitosanase produced by M3b based on water as 100% were as follows: 1% colloidal chitosan+1% glucose, 0.5% ammonium sulfate, bran:soybean meal=6:10, inoculation amount 10%, incubation for 6 d, the initial pH 7.0, and the fermentation temperature 32 °C. Under these conditions, the activity of chitosanase reached 20.56 U/mL, which was 221.3% of the initial fermentation condition. The results of SDS-PAGE and enzyme profiling showed that the strain M3b produced only one chitosanase with a molecular weight of 40 ku. The optimum pH and temperature for the enzymatic reaction of this enzyme was 5.5 and 60 °C, with the degree of polymerizing the final product obtained by hydrolysis of chitosan \geq 2. It is indicated that producing chitosanase by solid fermentation of *Aspergillus tamarii* can significantly improve the activity of chitosanase and reduce the cost of production. The purified chitosanase AtChito40 has stable enzymatic properties, acid and alkali resistance, and can effectively degrade chitosan. It will provide the theoretical and experimental basis for the enzymatic degradation of chitosan and the preparation of chitosan oligosaccharide in industrial production.

Keywords *Aspergillus tamarii*; chitosanase; chitallooligosaccharide; solid fermentation; enzyme activity; purification

(责任编辑:赵琳琳)