蜡样芽孢杆菌 D-11 降解粉末壳聚糖制备水溶性低聚糖的研究

高星爱[1]，张永锋[1]，赵新颖[1]，刘思言[2]，朴鲁东[3]，金荣德[1]
（1. 吉林省农业科学院，吉林长春 1300212）（2. 吉林农业大学生命科学学院，吉林长春 1301183）
（3. 韩国全南大学校应用生物工学部，韩国光州 500757）

摘要：为了省去制备胶状壳聚糖的工艺，能有效降解粉末壳聚糖利用到低聚糖的生产，利用自然环境中筛选得到的产壳聚糖酶菌株蜡样芽孢杆菌 D-11，进行了基质条件优化实验。结果表明，以筛孔分别为 20、40、60、80 目的粉末壳聚糖（3±0.5 cm；脱乙酰度 98.1%）为基质，培养液含有 1%的吐温 60 时，降解粉末壳聚糖的能力比对照提高 12%，当筛孔 60 目的粉末壳聚糖为碳源（浓度 0.6%）时，降解粉末壳聚糖的能力提高 62.5%。随着基质每毫克中酶活性的提高，对粉末壳聚糖的分解率也随之增加。同时利用薄层色谱法分析低聚糖的分布，有效证明了该 D-11 菌株具有降解粉末壳聚糖的能力，且发现壳聚糖酶对基质粉末状态的降解率有选择性。

关键词：粉末壳聚糖；低聚糖；蜡样芽孢杆菌 D-11
文章篇号：1673-9078(2012)9-1149-1152

Preparation of Chito-oligosaccharides by Enzymatic Hydrolysis of Chitosan Powder

GAO Xing-ai[1], ZHANG Yong-feng[1], ZHAO Xin-ying[1], LIU Si-yan[2], PARK Rodong[3], JIN Rong-de[1]
(1.Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)
(2.College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)
(3.Division of Applied Bioscience and Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea)

Abstract: In order to save the process of colloidal chitosan preparation in hydrolysis of chitosan powder to chito-oligosaccharide techniques. Chitosanse producing strains were isolated and identified as *Bacillus cereus* D-11. Twenty, forty, sixty and eighty meshes of powder chitosan (3±0.5 cm；D.D. 98.1%) were used as carbon sources to investigate the optimal culture conditions of this strain. The chitooligosaccharides products were analyzed by Thin Layer Chromatography. Compared to control, the enzymatic activity of *Bacillus cereus* D-11 was increased by 12% and 62.5% in a medium containing 1% Tween 60 or 60 mesh powder chitosan, respectively. The yield of chito-oligosaccharides positively correlated with the enzyme amount. In conclusion, the product of chitosan which was hydrolyzed by chitosanse was determinded as chitooligosaccharides by TLC analysis. The hydrolysis rate of chitoasan by chitosanse was determinded by size of chitosan.

Key words: powder chitosan; chito-oligosaccharide; *Bacillus cereus* D-11

壳聚糖是甲壳素的脱乙酰基产物，是由氨基葡萄糖通过 β-1,4-糖苷键连接而成，因其相对分子质量大，分子内氢键引力较强，不溶于水，不易被人体吸收，从而使其应用受到限制[1]。但是和甲壳素不同，壳聚糖能溶解于乙酸，甲酸，乳酸等稀有机酸[2]。在酸溶液的条件下壳聚糖中的氨基转变成 NH_3^+自由基，因此能提高壳聚糖的溶解性[3]。当前，壳聚糖作为一种新的天然高分子衍生材料受到了全球的广泛关注，国家自然科学基金委员会也资助了重点基础研究项目“天然聚多糖的环境友好材料”，这些活动已推动了我国甲壳素化学的发展[4]。对甲壳素领域研究最多的是日本和美国，已大规模地生产甲壳素和壳聚糖。日本政府编列十年开发计划（1982~1992），拨付 160 亿日元，资助 13 所大学。欧洲甲壳素研究会也于 1992 年成立。1991 年几丁聚糖与蛋白质、脂肪、糖类、维生素、矿物质并列，被誉为人体第六大生命要素[5]。由于壳聚糖粘合性和成纤成膜性能好，且具有无毒、良

收稿日期：2012-06-13
基金项目：吉林省自然科学基金项目（20101570），吉林省留学人员科技创新创业项目
作者简介：高星爱（1978-），女，博士，助研，研究方向：能源微生物的利用与应用研究
通讯作者：金荣德（1978-），男，博士，副研究员，研究方向：农业微生物代谢产物的分析与利用

好的生物相溶性、生物可降解性及可被吸收利用等特点，现已广泛应用到医药、化工、饲料、农业、生物技术与防治等各领域[6~10]。研究表明，壳聚糖降解形成的低聚糖,比天然甲壳素和壳聚糖具有更多、更优良的生物学功能[11~12]。为此，近年来本研究室主要开展了制备壳聚糖的生物技术方面的研究，在自然环境中分离筛选到一株产壳聚糖酶菌株，通过分类学和生化特征，鉴定命名了蜡样芽孢杆菌 D-11[13]，其次通过微生物发酵实验得出菌株的最佳反应条件[14]、微生物代谢产物的生物降解机理[15]及利用粗酶液制备低聚糖方面的研究[16]。这些实验基础上，本文以粉末壳聚糖为原料，研究了高分子壳聚糖的低聚糖转化潜力，探讨利用蜡样芽孢杆菌 D-11 所分泌的酶生产水溶性低聚糖进行生物降解转化的可行性，选择不同的粉末壳聚糖对基质的降解参数优化配置进行了研究，并进一步研究了不同筛孔基质及浓度变化、表面活性剂种类及酶和基质比例等对其酶活性影响的规律，并且研究了酶降解产物低聚糖的分布规律，为工业生产低聚糖减少制备胶状壳聚糖的程序提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌种：从自然环境中筛选得到一株产壳聚糖酶的蜡样芽孢杆菌 D-11[14]。粉末壳聚糖（Powder Chitsosan 简化为P-CTS）：筛孔分别为 20、40、60、80 目的壳聚糖（脱乙酰度 D.D.为 98.1%），购置与 Taehoon Bio（韩国），标准低聚糖 $GlcN_{1\text{-}3}$（$S_{1\text{-}3}$）购置与 Wako 公司（日本）。

1.2 液体培养基组成及粗酶液的制取

培养基中利用的氮源为 1%的酵母（0.25 g），1%的氯化钠（0.25 g），碳源分别为 20、40、60、80 筛孔的粉末壳聚糖，接种量为 1.4×10^9 CFU 的蜡样芽孢杆菌 D-11。培养时间 4 d，取培养液 1 mL，离心分离，即得上层粗酶液。

1.3 发酵液酶活性的测定

利用 DNS 试剂法测粉末壳聚糖为唯一碳源的液体培养基产生壳聚糖酶的能力。各个反应混合物包含 1%的 0.9 mL 水溶性壳聚糖溶液（Soluble chitosan）和 0.1 mL 粗酶液。然后在 37 ℃的水浴摇床上反应 30 min。加入 1 M 0.2 mL NaOH 试剂使未完全反应的壳聚糖沉淀，离心，去沉淀。取上清液 0.5 mL 加入 1.5 mL DNS 试剂[17]，沸水浴加热 5 min，冷却后于 550 nm 测定 A_{550} 值。对照葡萄糖标准曲线的线性公式得出还原糖的量。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 μmol G1cN 还原糖的酶量。

1.4 壳聚糖溶液的制备

配制 1%水溶性壳聚糖(S-CTS)溶液：称取 10 g 粉末状态的壳聚糖，加入 200 mL 蒸馏水，在常温下搅拌几分后加入 90 mL 1M 乙酸溶液后，用磁转搅拌一宿。等到壳聚糖全部被溶解后加入 2 M 醋酸纳溶液调节 pH 为 5.5。最后用 0.1 M 醋酸纳缓冲剂把溶液调整为 1 L。

配制 1%胶体壳聚糖(C-CTS)溶液：称取 10 g 粉末状态的壳聚糖，置入 700 mL 蒸馏水，搅拌 30 min 后，加入 100 mL 浓度为 0.5 M 盐酸溶液并搅拌。在 6000 转速下离心 10 min。把沉淀物质用蒸馏水洗 20 遍，反复操作离心分离，直到最后 pH 为中性为止.加蒸馏水定容至 1L，配成 1%的胶体壳聚糖。

1.5 壳聚糖降解产物的分析

利用薄层色谱分析：移取 10 μL 反应产物，点于硅胶板上，置于用 1-异丙醇:醋酸乙酯:氨水:水（6:3:3:1 *V/V*）预饱和好的展开缸中，上行法展开，直到全部展开为止。取出并烘干。然后在硅胶板上喷洒 0.2%茚三酮显色剂（称取 0.2 g 茚三酮溶解于 100 mL 99%无水乙醇），于 100 ℃烘干 1~2 min[15]。

2 结果与分析

2.1 最佳碳源的选择

蜡状芽孢杆菌在不同碳源的液体培养基上培养 4 天后测定酶活力的结果如图 1 所示。胶状，自然状、80 目筛孔的壳聚糖为碳源培养菌株时，酶的活性表现为 3 U/mL 左右。当筛孔 60 目的粉末壳聚糖为碳源时，壳聚糖酶活性最高达到 5.6 U/mL。说明壳聚糖酶具有降解粉末壳聚糖的能力。

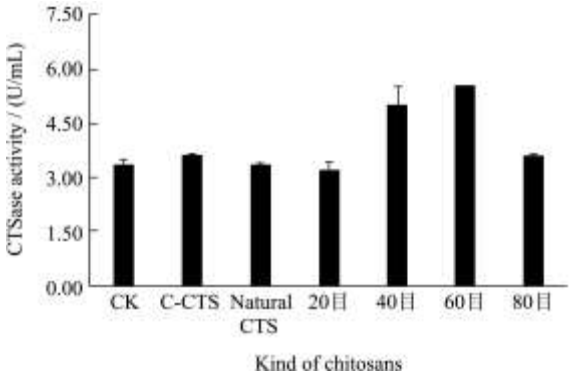


图 1 不同的碳源对壳聚糖酶活性的效果

Fig.1 Effect of carbon sources on the production of chitosanase

注：1%的氯化钠，1%的酵母和 0.5%不同筛孔的壳聚糖为液体培养基组成成分。

2.2 不同的粉末壳聚糖浓度对壳聚糖酶活性的影响

由图 2 可知，不同筛孔的壳聚糖和粉末壳聚糖浓度的对比可以看出，壳聚糖的添加量为 0.6%时，60

目筛孔的粉末壳聚糖对 D-11 菌株的产酶影响显著，发酵液甲壳素酶活力最高，浓度高于或低于 0.6%时，菌株 D-11 产酶能力均会降低。

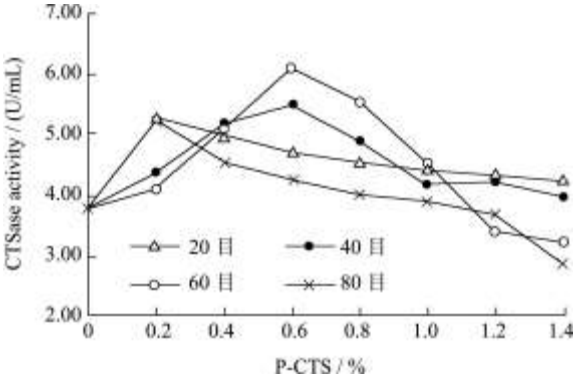


图 2 不同浓度的碳源对壳聚糖酶活性的效果

Fig.2 Effect of concentration of kinds of chitosan powder as a carbon sources on the production of chitosanase

注：1%的氯化钠，1%的酵母和不同浓度的粉末壳聚糖为液体培养基组成成分。

2.3 表面活性剂种类对壳聚糖酶活性的影响

利用表面活性剂吐温 20-80 降解粉末壳聚糖，测定壳聚糖酶活性结果如图 3，结果表明，菌株 D-11 以吐温 60 作为表面活性剂的培养基中产酶能力最强，

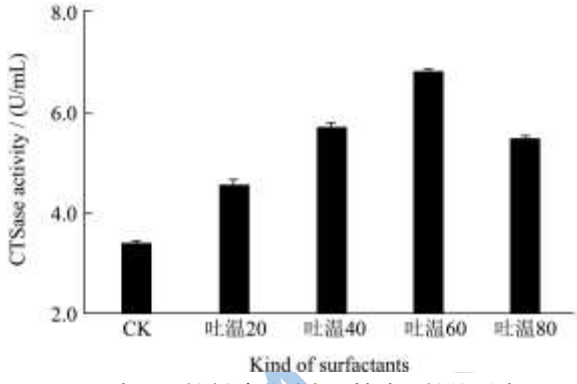


图 3 表面活性剂种类对壳聚糖酶活性的影响

Fig.3 Effect of surfactants on the production of chitosanase.The medium contains 1% NaCl, 1% yeast and 60mesh powder chitosan and kinds of surfactants

注：1%的氯化钠、1%的酵母、0.5%的 60 目筛孔的粉末壳聚糖和不同种类的表面活性剂为液体培养基组成成分。

2.4 酶和基质的比例对壳聚糖酶活性的影响

以不同筛孔粉末壳聚糖为基质，按酶和不同基质的比例，测定粉末壳聚糖降解率结果如图 4 所示，随着基质中酶含量的增加，壳聚糖酶除了对照和自然状态下的粉末壳聚糖不能降解外，降解率成正比。但是酶和基质比例相同的条件下，在不同筛孔的 20 至 80 的粉末壳聚糖的降解中，酶和基质的比例小于 0.4 U/mg 时，筛孔为 80 目的壳聚糖降解率高，比例大于 0.4 U/mg 时，筛孔为 60 目的壳聚糖降解率最高，达到 45%左右。说明壳聚糖酶对基质粉末状态的降解有选择性。

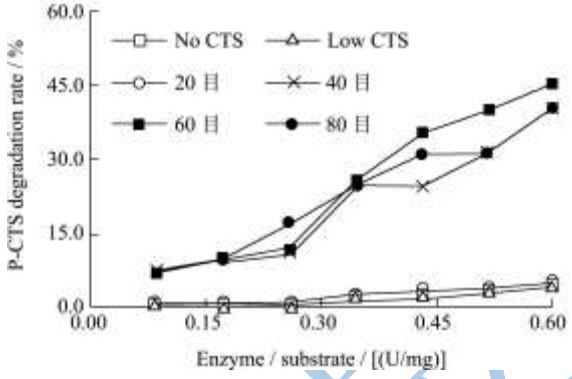


图 4 不同的酶和基质（20, 40, 60, 80 目筛孔）比例对粉末壳聚糖降解率的影响

Fig.4 Effect of oligosaccharide production in the powder chitosan (20 mesh, 40 mehs, 60 mesh and 80 mesh chitosan) with reaction time of 1 h

注：酶和基质的反应时间为 1 h。

2.5 粉末壳聚糖降解产物的分析

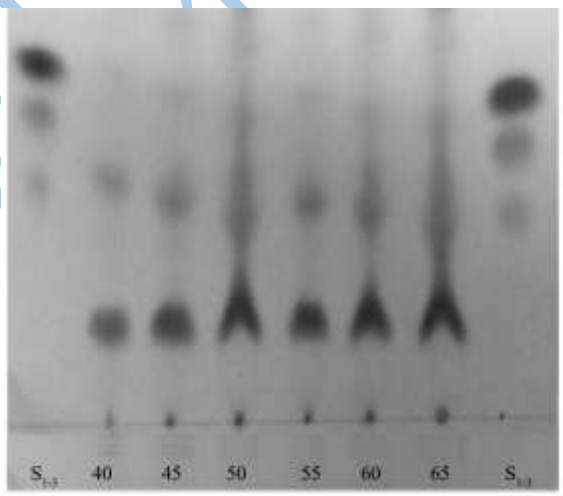


图 5 不同的温度对壳聚糖溶液降解产物的薄层层析图

Fig.5 Effect of temperature on the depolymerization of chitosan by TLC

注：反应时间为 1 h，S_{1-3} 为标准低聚糖。

利用以上的反应数据，选择筛孔为 60 目的壳聚糖，在不同的温度条件下，利用薄层液相层析分析，壳聚糖酶降解产物结果由图 4 所示，随着反应温度从 40 到 65 ℃升高，有 3 聚糖的产生及能清晰看见未被分解的低聚糖。说明壳聚糖酶 D-11 能降解粉末壳聚糖产生低聚糖。

3 结论

利用自然环境中分离的产壳聚糖酶菌株，进行了粉末壳聚糖基质条件优化试验，以筛孔 60 目的粉末壳聚糖为碳源（浓度 0.6%）的培养液中含有 1%的吐温

60 时，降解粉末壳聚糖的能力提高 62.5%。酶与基质比例试验结果表明，随着基质每毫克中酶活性的提高，对粉末壳聚糖的分解率也随之增加。薄层液相层析进一步证明了所产生的低聚糖的分布。这种利用壳聚糖酶，直接降解粉末壳聚糖的方法，省去了制备水溶/胶状性壳聚糖的工艺，为微生物壳聚糖酶的工业化生产提供了有效依据。

参考文献

[1] Su CX, Wang DM, Yao LM, et al. Purification and characterization of gene cloning of a chitosanase from Bacillus species strain S65 [J]. Journal Agricultural Food and Chemistry, 2006, 54: 4208-4214

[2] Liu YL, Jiang SK, ZM, et al. Recombinant expression of a chitosanase and its application in chitosan oligosaccharide production [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344: 815-819

[3] Long DW, Wu GZ. Chen S, et al. Preparation of oligochitosan stabilized silver nanoparticles by gamma irradiation [J]. Radiation Physics and Chemistry, 2007, 76: 1126-1131

[4] 杜予民.甲壳素化学与应用的新进展[J].武汉大学学报,2000,46(2):181-186

[5] 俞威鬼,陈笃慧,甲壳素.壳聚糖的发展历史及改性方法[J].嘉兴学院学报,2003,15:127-130

[6] 翟荣玲,刘艳琴,孙丰林,等.壳聚糖应用研究进展[J].山东畜牧兽医,2008,29(9):36-38

[7] 娄予强,叶燕萍,申章佑,等.壳寡糖及低聚壳聚糖在农业上应用研究综述[J].科技创新导报,2009,22:1-2

[8] 陈晓眠,吴晓萍,邓楚津,等.壳聚糖和茶多酚对罗非鱼冷藏保鲜效果比较[J].现代食品科技,2011,27(3):279-282,320

[9] 袁志,王明力,李霞.纳米 SiO_2 壳聚糖复合膜保鲜草莓的研究[J].现代食品科技,2011,27(1):11-15

[10] 宋聪,宋水山,关军锋.梨采后黑斑病拮抗菌 J18 的鉴定及防治效果的初步研究[J].现代食品科技,2011,27(1):6-11,25

[11] Hirano M, Iwata. Uses and functions of chitin and chitosan oligosaccharide [J]. New Food Industry, 1998, 40: 17-22

[12] Jung YJ, Shahidi F, Kim SK. Preparation of chitin and chitosan oligomers and their application in physiological functional foods [J]. Food Reviews International, 2000, 61: 159-176

[13] Gao XA, Ju WT, Jung WJ, et al. Purification and characterization of chitosanase from Bacillus cereus D-11 [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72: 513-520

[14] Gao XA, Ju WT, Zhang YF, et al. Optimization of the culture condition for the production of chitosanase by Bacillus cereus D-11 and the chitooligosaccharide hydrolysis pattern of its enzyme preparation [J]. Journal of Chitin and Chitosan, 2012 17(1): 14-18

[15] Gao XA, Jung WJ, Kuk JH, et al. Reaction pattern of Bacillus cereus D-11 chitosanase on chito-oligosaccharide alcohols [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009,19: 358-361

[16] Gao XA, Zhang YF, Park RD, et al. Preparation of chitooligosaccharides from chitosan using crude enzyme of Bacillus cereus D-11 [J]. Journal of Applied Biological Chemistry, 2012, 55(1): 13-17

[17] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31: 426-428