

文章编号: 1674-5566(2011)02-0296-07

壳聚糖酶高产菌的筛选、鉴定与发酵产酶初探

魏福卫, 蒋霞云, 陈舜胜, 陈道春, 党培育

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 壳聚糖酶(EC3.2.1.132)能催化壳聚糖分子中 β -1,4-糖苷键的水解,以获得具有特殊生理活性的壳聚寡糖(聚氨基葡萄糖,聚合度2-10)。该酶在细菌、真菌等多种微生物中存在。采用透明圈法,以壳聚糖为唯一碳源,从11份虾蟹壳堆积的土壤中分离出51株能降解壳聚糖的菌株。经平板初筛、摇瓶发酵复筛以及产酶动力学研究,确定 H_2 为产壳聚糖活力高、发酵时间短的优良菌株。根据其形态及培养特征、生理生化特性及16S rDNA序列分析,鉴定该菌株为浅玫瑰色链霉菌,并命名为(*Streptomyces roseolus* DH)。进一步的基本发酵条件研究显示:该菌株发酵最适温度为30℃,发酵液初始pH为7.2,最适碳源为1%胶体壳聚糖,最适氮源为0.5%蛋白胨。此条件下经60h发酵,发酵液中壳聚糖酶活力可达(6.10±0.12)U/mL。此菌株产酶量高,发酵周期短,具有良好的应用潜力。

研究亮点: 以壳聚糖为唯一碳源,经平板初筛、摇瓶发酵复筛,从系列虾蟹壳堆积的土壤中筛选到了一株壳聚糖酶高产菌株。依据形态特征、生理及生化特性和16S rDNA序列分析,鉴定并命名该菌株为浅玫瑰色链霉菌(*Streptomyces roseolus* DH)。基本发酵条件研究显示:此菌株产酶量高,发酵周期短,具有良好的应用潜力。

关键词: 壳聚糖;壳聚糖酶;链霉菌;发酵

中图分类号: TS 201.3

文献标识码: A

壳聚寡糖是聚合度为2~10的聚氨基葡萄糖,水溶性好、易被机体吸收利用,具有特殊的生理活性,在医药、食品、农业等各领域有着广阔的应用前景^[1-3]。目前,应用壳聚糖制备壳聚寡糖主要有化学降解法和酶降解法,后者因专一性强、反应条件温和、过程易控制及环境污染少等特点,具有更高的应用价值和开发潜力。

壳聚糖酶(chitosanase, EC3.2.1.132)能催化壳聚糖分子中 β -1,4-糖苷键的水解,为酶法制备壳聚寡糖的关键要素。它主要来源于真菌、细菌等微生物,性质因其来源而不尽相同。目前,能否获得专一性、高活性的壳聚糖酶制剂是决定性环节,寻找不同微生物来源的壳聚糖酶、筛选优良的壳聚糖酶产生菌便是有效、可行的途径之一。本文以壳聚糖为唯一碳源,从虾蟹壳富集的土壤中筛选得到了一株原始产酶活性高、发酵周期短的菌株,并进行了菌种鉴定和基本发酵条件

的确定,为发酵法生产壳聚寡糖奠定了物质基础,也为后期遗传改造菌株创造了先决条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品

实验土样采集于上海浦东新区东海农场养殖场及毗邻东海区域,主要为养殖场虾蟹壳堆积处、海边及湖边蟹壳腐烂处等,共有11份土壤用于菌种筛选。

1.1.2 主要试剂

壳聚糖(脱乙酰度为90%~95%)及氨基葡萄糖盐酸盐(BR)购自国药集团化学试剂有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒来源于天根生化科技(北京)有限公司;胶体壳聚糖为实验室自制^[4];其余试剂均为国产分析纯或以上纯度。

收稿日期: 2010-09-09 修回日期: 2010-11-26

基金项目: 上海海洋大学博士启动基金项目(080219);上海海洋大学优秀青年教师基金(080236)

作者简介: 魏福卫(1985-),男,硕士研究生,专业方向为水产品加工与贮藏。E-mail: weifuwei2008@163.com

通讯作者: 蒋霞云, Tel: 021-61900362, E-mail: jiangxy@shou.edu.cn

1.1.3 培养基

初筛培养基(平板分离培养基,斜面种子培养基)组分组成(% , W/V): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, K_2HPO_4 0.2, NaCl 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 粉末壳聚糖 1.0, 琼脂 2.0^[5]。

复筛培养基(液体诱导培养基)组分组成(% , W/V): 蛋白胨 0.5, 酵母提取物 0.5, K_2HPO_4 0.07, KH_2PO_4 0.03, NaCl 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 粉末壳聚糖 1.0。

液体种子培养基组分组成(% , W/V): 蛋白胨 0.5, 酵母提取物 0.5, K_2HPO_4 0.07, KH_2PO_4 0.03, NaCl 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 葡萄糖 0.2。

发酵培养基组分组成(% , W/V): 蛋白胨 0.5, 酵母提取物 0.5, K_2HPO_4 0.07, KH_2PO_4 0.03, NaCl 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 粉末壳聚糖 1.0。

1.2 方法

1.2.1 产壳聚糖酶菌株的筛选

初筛:采用透明圈法。将采集土样以无菌水系列稀释后、涂布于初筛培养基平板,30℃培养3~5 d后,观察菌落周围的透明圈,挑取透明圈直径较大者,平板划线分离单菌落,再次点接于初筛培养基平板,30℃培养4~7 d,依据透明圈本身及其与菌落直径比值较大者作为摇瓶发酵复筛的出发菌。

复筛:采用发酵产酶法。将初筛挑出来的菌以2.0%(种子液:发酵液,V/V)的接种量接入复筛培养基中,在30℃、150 r/min培养72 h,4 000 r/min、15 min离心发酵液后,取上清液直接测定壳聚糖酶活力,筛选产酶能力高的菌株。

1.2.2 壳聚糖酶活力的测定

参照文献[5]的方法并作适当调整,以胶体壳聚糖为底物,反应体系为:0.3 mol/L 乙酸缓冲液(pH 5.6)1.0 mL,1%胶体壳聚糖0.5 mL和上清酶液0.5 mL。反应液在46℃水浴30 min后,继而沸水浴10 min终止反应,4 000 r/min、5 min离心后,取上清液与DNS试剂显色反应测定 OD_{520} 。对照组为加入煮沸的上清酶液,其余相同。以每分钟产生相当于1 μmol 氨基葡萄糖的还原糖所需酶量定为1个酶活力单位(U)。

1.2.3 菌种鉴定

形态特征采用光学显微镜和扫描电镜观察和拍照,培养及生理生化特性参照《伯杰细菌分

类手册》^[6-7]和《链霉菌鉴定手册》^[8],结合Sensititre细菌鉴定系统进行鉴定。

16S rDNA序列分析:采用DNA抽提试剂盒、从菌株培养液中抽提基因组总DNA,采用通用引物(F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增,反应体系为25 μL :10 \times PCR buffer(含 MgCl_2)2.5 μL ,模板DNA 1.5 μL ,正、反向引物各1 μL ,2 \times Taq E 0.3 μL ,dNTP 2.5 μL ,ddH₂O 16.2 μL 。PCR过程依次为:95℃预变性3 min,95℃变性1 min,52℃复性1 min,72℃延伸2 min,共30个循环,最后72℃延伸10 min。PCR产物送至上海生工有限公司测序。所得序列进行BLAST比对,选取相似性较高的菌株序列,用Clustal X进行多序列联配分析,用MAGA 4.1构建分子进化树^[9]。

1.2.4 基本发酵条件研究

按2.0%(V/V)的接种量接入发酵培养基进行摇瓶发酵,除非另有说明,发酵条件为:30℃、150 r/min、装液量为100 mL/250 mL,以粉末壳聚糖为基本碳源,蛋白胨为氮源,摇床震荡培养60 h后,测定发酵液的酶活力。

初始pH值:用1 mol/L NaOH或1 mol/L HCl溶液将发酵液的初始pH值分别调至6.5,6.8,7.0,7.2,7.5,7.8,8.0和8.2,进行发酵并测定酶活。

温度:分别在25℃、28℃、30℃、32℃及37℃条件下摇瓶发酵并测定酶活力。

碳源:分别以1.0%(W/V)的粉末壳聚糖、甲壳素、胶体几丁质、可溶性淀粉、蔗糖、羧甲基纤维素钠及0.50%、0.75%、1.0%、1.3%的胶体壳聚糖作为碳源,调节发酵液初始pH至7.2,进行发酵并测定酶活。

氮源:分别以0.5%(W/V)蛋白胨、牛肉膏、 KNO_3 、尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_4Cl 作为氮源,以1.0%胶体壳聚糖作为碳源,调节发酵液初始pH至7.2,进行发酵并测定酶活。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

从东海海边、东海农场虾塘等多处虾蟹壳富集的土壤中采集11份土样,用壳聚糖为唯一碳源,平板分离得到51株透明圈较明显的菌株。

根据透明圈直径的大小从中挑选出 7 株形态各异的菌株作为复筛对象(表 1),分别接种于复筛培养基,摇瓶培养 72 h 后,取上清液测定酶活。结果如表 1 所示,从透明圈直径、透明圈与菌落直径比值,以及摇瓶复筛酶活三方面综合评定,

菌株 H₂ 的发酵液酶活最高,达(0.610 ± 0.005) U/mL,菌株 I₁ 及 D₁ 的发酵液酶活次之,分别为(0.570 ± 0.013)和(0.390 ± 0.017) U/mL,且均显著($P < 0.01$)高于其余菌株。

表 1 待选菌株的筛选结果

Tab.1 Screening results of the isolated strains

菌株编号	菌落直径 (mm)	透明圈直径 (mm)	透明圈直径/菌落直径	发酵液酶活 (U/mL)
A ₁	8.2 ± 0.3	12.3 ± 0.8	1.5 ± 0.1	0.130 ± 0.003
B ₁	8.3 ± 0.3	14.2 ± 0.8	1.7 ± 0.2	0.140 ± 0.002
D ₁	4.7 ± 0.3	14.0 ± 0.9	3.0 ± 0.3	0.390 ± 0.017 *
H ₂	3.5 ± 0.5	15.7 ± 1.0	4.5 ± 0.5	0.610 ± 0.005 *
I ₁	2.5 ± 0.5	11.8 ± 1.0	4.7 ± 0.9	0.570 ± 0.013 *
J ₂	3.8 ± 0.6	10.7 ± 0.8	2.8 ± 0.6	0.120 ± 0.002
K ₂	4.2 ± 0.3	14.3 ± 0.3	3.4 ± 0.6	0.160 ± 0.009

注:发酵液酶活为发酵液未经稀释所得值;*为显著性水平 $P < 0.01$ 。

考虑到各菌株可能存在的生长差异及其产酶随生长的波动,有必要考察以上优势菌株在不同时期的产酶变化趋势。如图 1 所示,H₂、I₁ 和 D₁ 3 株菌株的酶活力都在 60 h 达到最大,尤其是 H₂ 菌株,在 60 ~ 96 h 期间,发酵产酶始终维持在一个高且恒定的状态,即具备持续产酶能力,进一步的生长产酶实验显示该菌株的生长与产酶是同步的。相对于微杆菌属来源的细菌在 96 h 后产酶能力达到最高^[10],菌株 H₂ 具有发酵时间短的优点,故确定 H₂ 为筛选所得产壳聚糖酶的菌株。

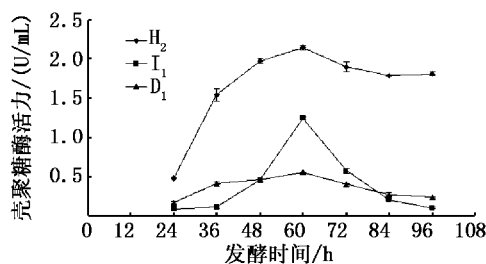


图 1 菌株 H₂、I₁ 及 D₁ 产壳聚糖酶随发酵时间的变化

Fig.1 The changes of chitosanase activities on fermentation periods of the strain H₂, I₁ and D₁

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 菌落形态及生理生化特征

光学显微镜和扫描电镜分析结果显示,菌株 H₂ 菌丝纤细、分支发达(图 2-A),顶端产生直形或柔曲链状孢子丝,孢子壁光滑(图 2-B)。从表 2

可知,该菌株呈革兰氏阳性,在高氏合成一号琼脂、葡萄糖天门冬琼脂等多种培养基中均无扩散性黑色素产生,菌落观察为浅红色,在查氏培养基上生长状况差,表面皱褶,呈凸起状,干燥,不易挑起,符合放线菌的链霉菌属特征,暂称为 *Streptomyces sp.* DH。

2.2.2 16S rDNA 序列分析

进一步对 *Streptomyces sp.* DH 的基因组进行 PCR 扩增,得到约 1.5 kb 的 16S rDNA 片段,所得序列在 NCBI 的数据库中进行 BLAST 比对,结果显示:与其相似性较高(98% ~ 99%)的几乎均为链霉菌属菌株;选取相似度达到 99% 的 10 株菌进行系统发育分析,图 3 表示相关链霉菌之间的分子进化关系,该菌株与浅玫瑰色链霉菌等红色系列的链霉菌有着非常相近的分类关系。综合培养特征及含碳、氮化合物的发酵试验结果(表 2),鉴定该菌株为浅玫瑰色链霉菌,命名为 *Streptomyces roseolus* DH。

2.3 基本发酵条件研究

2.3.1 发酵初始 pH 值

不同初始 pH 发酵液的产壳聚糖酶活变化情况如图 4,由图可知,初始 pH 值对菌株的产酶能力影响较大,培养基最适初始 pH 值为 7.2。实验中还发现:该菌在酸性条件下几乎不生长,发酵过程中发酵液 pH 有不同程度的上升。以往发现的壳聚糖酶产生菌株发酵液初始 pH 一般以 4.0 ~ 6.5 为宜^[10-13],推测该菌株的产酶代谢过程存在较大的差异,原因及机理还有待深入研究。

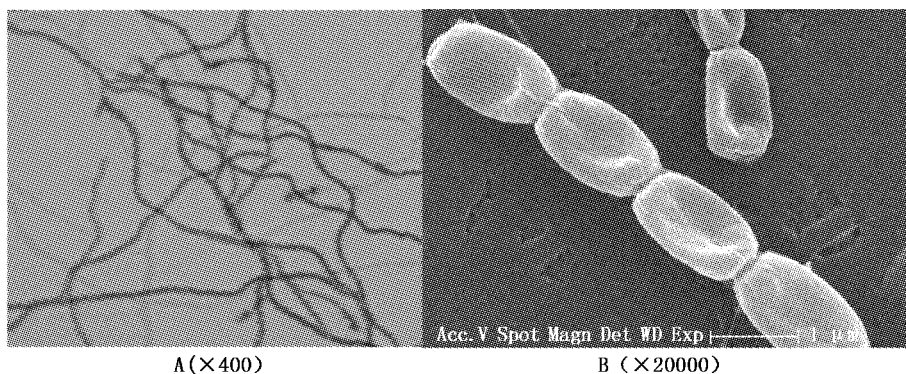


图 2 菌株 H₂ 的孢子丝形态特征

Fig. 2 Morphological characters of strain H₂ spore chains

表 2 菌株 H₂ 的形态、培养、生理及生化特征

Tab. 2 Morphological, cultural, physiological and biological characteristics of strain H₂

	项目	特征	项目	特征
形态特征	大小	0.5 ~ 1.0 μm	革兰氏染色	阳性
	菌落形态	表面皱褶,边缘粗糙,干燥,不易挑起	孢子及孢子丝	链状孢子,孢子丝直或柔曲,表面光滑
培养特征 ¹	高氏合成一号琼脂	淡红色/淡黄褐色/无	土豆浸汁琼脂	淡粉红色/黄褐色/无
	葡萄糖天门冬琼脂	粉红色/无色/无	苹果酸钙琼脂	灰白色/淡黄色/无
	无机盐淀粉琼脂	浅黄色/淡白色/无	燕麦粉琼脂	灰白色/浅黄色/无
	4-MU-β-D-吡喃葡萄糖苷	+	山梨醇	-
含碳化合物的利用 ²	4-MU-β-D-呋喃核苷	-	七叶苷	+
	4-MU-β-D-吡喃甘露糖苷	-	鼠李糖	-
	4-MU-α-D-吡喃葡萄糖苷	+	海藻糖	-
	β-甲基-葡萄糖苷	+	葡萄糖	+
	4-MU-β-D-半乳糖苷	-	蔗糖	-
	4-MU-β-D-葡萄糖酸	-	甘露醇	-
	甘油	-	麦芽糖	-
	7AMC-苏氨酸	+	7AMC-瓜氨酸	+
	7AMC-脯氨酸	+	7AMC-亮氨酸	-
	7AMC-焦谷氨酸	-	尿素	+
含氮化合物的利用 ²	7AMC-甲硫氨酸	+	7AMC-缬氨酸	+
	7AMC-丝氨酸	+	7AMC-酪氨酸	+
	7AMC-鸟氨酸	+	精氨酸	-
	7AMC-半胱氨酸	+	7AMC-丙氨酸	+
	7AMC-D-丙氨酸	+	7AMC-精氨酸	+

注: 1. 结果以气丝颜色/基丝颜色/有无扩散性色素形式表示; 2. Sensititre 系统 GPD 试剂板结果: 4MU, 4-甲基-伞形酮; 7AMC, 7-甲基-香豆素酰胺; +. 阳性; -. 阴性。

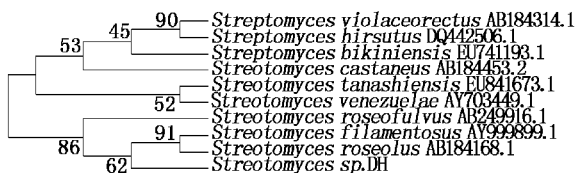


图 3 菌株 Streptomyces sp. DH 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of stain Streptomyces sp DH

2.3.2 发酵温度

从不同发酵温度下单位发酵液含壳聚糖酶活力的结果(图 5)来看,30 ℃ 为最佳发酵温度,此结论与微杆菌^[10]、曲霉^[12]、假单胞菌^[13]的结果一致,而有别于耐高温的芽孢杆菌来源壳聚糖酶^[14-16]。

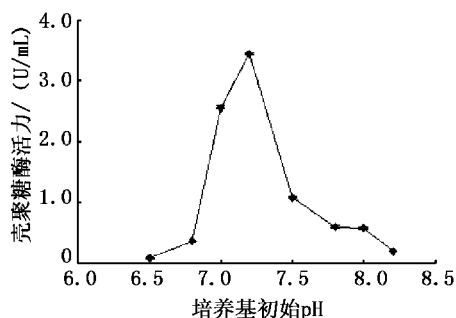


图4 培养基初始 pH 对发酵产壳聚糖酶的影响

Fig. 4 Effect of initial pH of medium on chitosanase fermentation

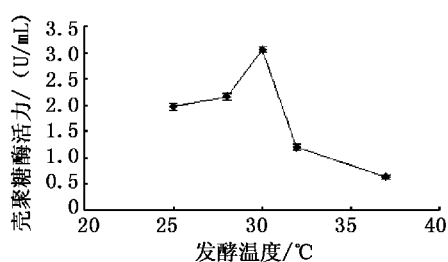


图5 发酵温度对产壳聚糖酶的影响

Fig. 5 Effect of fermentation temperature on chitosanase production

2.3.3 碳源的影响

图6表示不同种类或浓度的碳源对菌株产酶能力的影响,由图可知,1%胶体壳聚糖有利于产酶。该菌株产生的是诱导型壳聚糖酶,即只有以壳聚糖或其衍生物作为碳源才能诱导产酶,以蔗糖、淀粉及羧甲基纤维素钠等其他非壳聚糖物质为碳源,其产酶能力很弱或几乎不产酶,这与国内外的报道基本一致^[10-13]。

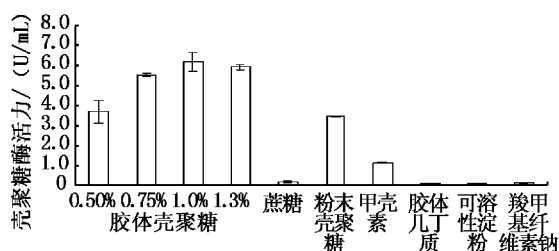


图6 不同碳源对发酵产壳聚糖酶的影响

Fig. 6 Effect of different carbon sources on chitosanase fermentation

2.3.4 氮源的影响

如图7所示,不同氮源对该菌株产酶影响很大。在有机氮源中,以蛋白胨为最适;采用无机

氮源时,发酵产酶能力普遍较低,但以硝酸钾氮源为产酶相对高。在最适温度 30 °C、pH 7.2 及最佳碳氮源条件下,发酵 60 h 后发酵液中壳聚糖酶活力可达(6.10 ± 0.12) U/mL,与目前文献报道的野生菌株相比(基本低于 3 U/mL)^[10-13,15-16],其产酶能力相对较高。

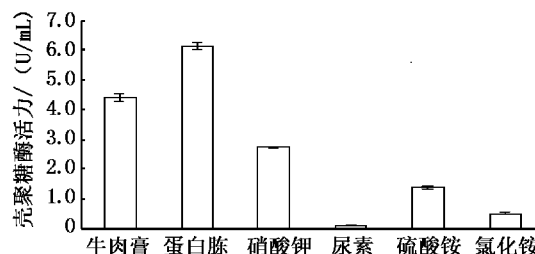


图7 不同氮源对产酶的影响

Fig. 7 Effect of different nitrogen sources on chitosanase production

3 结论与讨论

以壳聚糖为唯一碳源,依据菌株生长产生的透明圈直径、菌落直径以及两者比值筛选菌株,配合摇瓶发酵复筛结果及发酵动力学研究,确定了一株产壳聚糖酶活力高、发酵时间短的菌株 H₂。经形态、培养、生理生化特征及 16S rDNA 分析,该菌株被鉴定为浅玫瑰色链霉菌(*Streptomyces roseolus*)。目前文献报道的产壳聚糖酶微生物主要来源于细菌的芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[14-17]、微杆菌属(*Microbacterium*)^[10]、链霉菌属(*Streptomyces*)^[18-20]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[4,13]和真菌的青霉(*Penicillium*)^[11]、曲霉(*Aspergillus*)^[12]、木霉(*Trichoderma*)^[21-22]。本研究又从链霉菌属得到了一株新的高产菌株,分子进化关系上与灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)最为接近,为发酵生产壳聚糖酶提供了一种新的微生物来源。

进而,本文对筛选所得野生菌株 *Streptomyces roseolus* DH 的基本发酵条件进行了研究,结果表明:培养基最佳初始 pH 为 7.2,发酵最适温度为 30 °C,最适碳、氮源分别为 1% 胶体壳聚糖和 0.5% 蛋白胨。在此条件发酵 60 h 后,单位发酵液壳聚糖酶活力达(6.10 ± 0.12) U/mL。目前研究较为深入的是芽孢杆菌属和链霉菌属细菌来源的壳聚糖酶,单位发酵液的酶活力一般 < 1 U/mL^[23-24],微杆菌属野生菌株的壳聚糖酶的生产

为 3.6 U/mL,通过发酵条件优化将单位发酵液酶活力提高到 118 U/mL,是目前报导的产酶最高菌株^[10]。本文筛选所得的野生菌株产酶能力优于之前报道的其他野生菌株,为后期发酵条件的优化预留了较大的空间,也为发酵生产壳聚糖酶及壳聚寡糖奠定了优良的条件。

实验中还发现,菌株 *Streptomyces roseolus* DH 在发酵初始 pH 上与以往文献报道有较大的差异,预示着该菌株在产酶代谢机制上有很大的不同,深入研究相关物质代谢及动力学过程将为微生物壳聚糖酶的研究提供一个新的视点。

参考文献:

- [1] PILLAI C, WILLI P, SHARMA C. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation [J]. *Prog Polym Sci*, 2009, 34(7):641-678.
- [2] MARGUERITE R. Chitin and chitosan: Properties and applications [J]. *Prog Polym Sci*, 2006, 31(7):603-632.
- [3] 曹振杰,童春,张婧一,等. 壳聚糖对受免尼罗罗非鱼生长和免疫功能的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(4):463-468.
- [4] 王艳,周培根,俞剑荣,等. 产壳聚糖酶菌株选育及培养条件优化[J]. *中国海洋大学学报*, 2005, 35(2):293-296.
- [5] 逢玉娟,韩宝芹,刘万顺,等. 高产壳聚糖酶菌株的筛选和发酵产酶条件研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2005, 35(2):287-292.
- [6] 布坎南,吉布斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所,译. 北京:科学出版社,1984.
- [7] HOLT J G, KREIG N R, SNEATH H A, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th edition) [M]. The United States of America: Library of congress Cataloging-in-Publication Data, 1994.
- [8] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1975.
- [9] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol and Evol*, 2007, 24(8):1596-1599.
- [10] SUN Y Y, HAN B Q, LIU W S, et al. Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Microbacterium* sp. OU01 [J]. *Bioresource Technol*, 2007, 98(8):1548-1553.
- [11] 郑连英,隋斯光. 产壳聚糖酶菌株的诱变育种及其产酶条件研究[J]. *浙江大学学报:工学版*, 2004, 38(8):1039-1042.
- [12] 陈小娥,夏文水,余晓斌. 壳聚糖酶高产菌株选育及发酵条件研究[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(3):66-69.
- [13] 邱乐泉,楼坚,潘加林. 壳聚糖酶产生菌的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. *浙江工业大学学报*, 2005, 33(2):148-151.
- [14] GAO X A, JU W T, JUNG W J, et al. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus cereus* D-11 [J]. *Carbohydr Polym*, 2008, 72(3):513-520.
- [15] WANG S L, YEH P Y. Purification and characterization of a chitosanase from a nattokinase producing strain *Bacillus subtilis* TKU007 [J]. *Process Biochem*, 2008, 43(2):132-138.
- [16] LIN Y W, HSIAO Y C, CHIANG B H. Production of high degree polymerized chitooligosaccharides in a membrane reactor using purified chitosanase from *Bacillus cereus* [J]. *Food Res Int*, 2009, 42(9):1355-1361.
- [17] ADACHI W, SAKIHAMA Y, SHIMIZU S, et al. Crystal Structure of Family GH-8 Chitosanase with Subclass II Specificity from *Bacillus* sp. K17 [J]. *J Mol Biol*, 2004, 343(3):785-795.
- [18] FUKAMIZO T, HONDA Y, GOTO S, et al. Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. N174 [J]. *Biochem J*, 1995, 311(2):377-383.
- [19] LIN F, SHEE T, ARUL J, et al. Effect of bipolar membrane electrobasification on chitosanase activity during chitosan hydrolysis [J]. *J Biotechnol*, 2008, 134(3):305-311.
- [20] NGO K X, UMAKOSHI H, SHIMANOUCI T, et al. Heat-Enhanced Production of Chitosanase from *Streptomyces griseus* in the Presence of Liposome [J]. *J Biosci Bioeng*, 2005, 100(5):495-501.
- [21] LIU J, XIA W S. Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulose [J]. *Biochem Eng J*, 2006, 30(1):82-87.
- [22] LIU P, XIA W S, LIU J. The role of carboxyl groups on the chitosanase and CMCase activity of a bifunctional enzyme purified from a commercial cellulase with EDC modification [J]. *Biochem Eng J*, 2008, 41(2):142-148.
- [23] WANG S L, WU P C, LIANG T W. Utilization of squid pen for the efficient production of chitosanase and antioxidants through prolonged autoclave treatment [J]. *Carbohydr Res*, 2009, 344(8):979-984.
- [24] KYROIWA T, NOGUCHI Y, NAKAJIMA M, et al. Production of chitosan oligosaccharides using chitosanase immobilized on amylose-coated magnetic nanoparticles [J]. *Process Biochem*, 2008, 43(1):62-69.

Screening, identification and fermentation of a chitosanase-producing strain

WEI Fu-wei, JIANG Xia-yun, CHEN Shun-sheng, CHEN Dao-chun, DANG Pei-yu

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Chitosanase (EC3.2.1.132) catalyses the hydrolysis of the β -1,4 glycosidic bonds in chitosan to produce physiologically active chitooligosaccharides, polyglucosamines with 2 to 10 degrees of polymerization. It has been found in many microorganisms including bacteria and fungi. 51 chitosanase-producing strains were screened and isolated from 11 soil-samples rich in shrimp and crab shells by transparent circles in the culture media containing chitosan as sole carbon source. After screening of flat-panel, flask-shaking cultivation and enzyme kinetics in fermentation, a strain (H₂) with higher chitosanalytic activity was acquired. According to its morphological, cultural, biochemical and physiological characteristics and phylogenetic analysis of 16S rDNA, the strain was identified and named as *Streptomyces roseolus* DH. Further studies of fermentation conditions showed that the optimum temperature and initial pH of medium were 30 °C and 7.2, respectively. Moreover, the colloid chitosan (1.0%) and peptone (0.5%) were chosen as the best carbon and nitrogen sources among the tested ones. Under these conditions, the activity of chitosanase in media reached 6.10 ± 0.12 U/mL after 60-hour fermentation. This strain with higher yield of chitosanase and shorter fermentation period displayed good potential for future applications.

Key words: chitosan; chitosanase; *Streptomyces*; fermentation