



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104450561 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410635361. 3

(22) 申请日 2014. 11. 12

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO: M2014458 2014. 10. 08

(71) 申请人 华南理工大学

地址 510640 广东省广州市天河区五山路
381 号

(72) 发明人 姜文勇 徐培 宗敏华 程建华

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245

代理人 宫爱鹏

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C12N 9/42(2006. 01)

C12R 1/01(2006. 01)

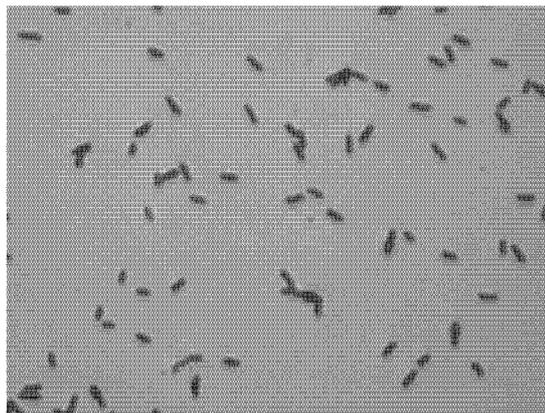
权利要求书1页 说明书4页
序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

一株产甲壳素酶菌株及其利用蟹壳发酵产甲壳素酶的应用

(57) 摘要

本发明提供了一株产甲壳素酶菌株及其利用蟹壳发酵产甲壳素酶的应用, 该菌株为类芽孢杆菌 (*Paenibacillus pasadenensis*)CS0611, 已保存于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为CCTCC M2014458, 保藏日期为2014年10月8日。以该菌为出发菌种, 利用蟹壳为碳源和氮源, 通过发酵生产甲壳素酶, 不仅具有发酵技术简单, 生产成本低, 发酵上清液酶活可达211.3mU/mL, 而且能够高效水解虾蟹壳废弃物, 降低其对环境造成的污染。



1. 一株产甲壳素酶菌株,其特征在於,该菌株为类芽孢杆菌 (*Paenibacillus pasadenensis*)CS0611,已保存于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为 CCTCC NO:M2014458,保藏日期为 2014 年 10 月 8 日。

2. 权利要求 1 所述的菌株利用蟹壳发酵产甲壳素酶的应用。

3. 根据权利要求 2 所述的应用,其特征在於,将权利要求 1 所述的菌株接种至发酵培养基中,在发酵培养基初始 pH 为 5.0-8.5,温度为 28-40℃条件下,摇床发酵培养 48-96h;离心去除菌体及蟹壳粉末,发酵上清即为甲壳素酶粗酶液;所述发酵培养基为:蟹壳粉末 0.5-20g/L,磷酸氢二钾 0.5-1.0g/L,磷酸二氢钾 0.2-0.5g/L,硫酸镁 0.3-0.7g/L,氯化钠 0.8-1.2g/L。

4. 根据权利要求 3 所述应用,其特征在於,还包括种子液的培养,将权利要求 1 所述的菌株首先接种至种子培养基中,在 28-40℃,摇床培养 12-30h,然后接种于发酵培养基,所述种子培养基采用 LB 培养基。

5. 根据权利要求 4 所述应用,其特征在於,所述种子液的培养中摇床的转速为 150-250rpm。

6. 根据权利要求 3 所述应用,其特征在於,所述发酵培养的接种量为 4% -8%, pH 为 6.0-7.0,温度 35-40℃。

7. 根据权利要求 6 所述应用,其特征在於,所述发酵培养中摇床的转速为 150-300rpm。

8. 根据权利要求 3 或 4 或 5 或 6 或 7 所述应用,其特征在於,所述离心的条件为:转速 6000-12000rpm,温度 4-10℃。

9. 根据权利要求 3 或 4 或 5 或 6 或 7 所述应用,其特征在於,所述蟹壳粉末的直径为 75-250 μm 。

10. 根据权利要求 9 所述应用,其特征在於,所述蟹壳粉末浓度为 10-30g/L;直径为 75-150 μm 。

一株产甲壳素酶菌株及其利用蟹壳发酵产甲壳素酶的应用

技术领域

[0001] 本发明提供了一株产甲壳素酶菌株及利用蟹壳发酵产甲壳素酶的方法,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 甲壳素酶是一类可高效降解甲壳素中 β -1,4 糖苷键的水解酶,主要存在于动物、植物以及真菌、细菌、放线菌中,在生物防治、卫生医疗和甲壳素的资源化利用领域具有广阔的应用前景。甲壳寡糖是甲壳素经甲壳素酶水解得到的低聚糖,在医药、食品保健和植物防御等方面的应用已经被发掘,并已成为甲壳素研究的一个热点。研究发现,聚合度为 2-8 的甲壳寡糖在降血脂血糖、激活机体免疫系统、抗肿瘤及抗感染方面具有重要作用。同时也能够延长农产品的保质期并促进农作物生长。N-乙酰氨基葡萄糖是一类显著的抗炎药,可用于治疗溃烂性肠炎及其他胃肠紊乱。因此关于甲壳素酶的研究具有重要意义。

[0003] 目前,甲壳素酶主要通过微生物发酵的方法制备,其关键点在于产酶活性高、发酵周期短的微生物菌株以及廉价的培养基原料。虾蟹壳中含有的大量甲壳素、蛋白质和矿物质盐,可以为微生物生长提供碳源、氮源及生长因子。另外,每年生物合成的甲壳素约有 100 亿吨,海产品加工产生的蟹壳、蟹壳处理不当就会对环境产生污染。利用虾蟹壳作为培养基质,不仅保护了环境,还可以得到具有高附加值的产品,拓展了对海洋生物资源高值化利用。

[0004] 由于甲壳素酶具有很高的经济开发价值和广阔的应用前景,有关产甲壳素酶微生物的报道很多,但仍存在酶制剂生产成本偏高、活性不足以满足工业化需求,这也就限制了甲壳素酶在工业上的大规模使用。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了解决现有技术存在的不足,提供一种利用筛选的类芽孢杆菌 *Paenibacillus pasadenensis*,在含蟹壳粉末培养基中发酵产甲壳素酶的方法。利用该方法可以高效生物转化虾蟹壳粉末,并得到具有高活性的甲壳素酶。

[0006] 为了实现上述目的,本发明的技术方案如下:

[0007] 一株产甲壳素酶菌株,该菌株为类芽孢杆菌菌株 (*Paenibacillus pasadenensis*) CS0611,是从山东某生物制品厂壳聚糖生产废弃物土壤中分离出来的,已于 2014 年 10 月 8 日保藏于中国典型培养物保藏中心,简称 CCTCC,保藏号为 CCTCC NO:M2014458,保藏地址为中国武汉武汉大学(邮编为 430072)。

[0008] 类芽孢杆菌 (*Paenibacillus pasadenensis*) CS0611,在营养肉汤培养基中 37℃ 培养 24h 观察,细胞为短杆状,革兰氏染色阳性。在营养肉汤固体培养基中 37℃ 培养 24h 后,菌落为乳白色,光滑,边缘整齐。

[0009] 类芽孢杆菌 (*Paenibacillus pasadenensis*) CS0611 可用普通的细菌培养基培养,如 LB 培养基, pH7.0,需氧,培养温度为 37℃;可采用斜面、液体石蜡、甘油保藏法,保藏用的

培养基为胶体甲壳素 (5-20)g/L,磷酸氢二钾 (0.5-1.0)g/L,磷酸二氢钾 (0.5-1.0)g/L,硫酸镁 (0.3-0.7)g/L,氯化钠 (0.08-0.12)g/L,蛋白胨 (1-4)g/L, pH7.0。

[0010] 类芽孢杆菌 (*Paenibacillus pasadenensis*)CS0611 特性说明如下：

[0011] 1、分子生物学鉴定：

[0012] 类芽孢杆菌 (*Paenibacillus pasadenensis*)CS061116S rDNA 测序由上海生工生物工程股份有限公司完成, DNA 序列如 Seq ID No:1 所示。

[0013] 对所得的 16S rDNA 序列进行 BLAST 比对,系统进化树如图 1。从图中的聚类结果可以看出,CS0611 的 16S rDNA 的核苷酸序列与 *Paenibacillus pasadenensis* strain NBRC 101214 有较高的同源性 (99%),与其他几种菌株有 98% 的同源性,可以认为 CS0611 属于 *Paenibacillus pasadenensis*,或是其亚种。

[0014] 2、生理生化鉴定：

[0015] 菌株 CS0611 可以利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖、果糖和木糖生长并发酵产酸,不能利用甘露醇、棉籽醇生长。可在 2% (w/v)NaCl,45℃ 条件下生长。部分生理生化特性如表 1 所示,能液化明胶,水解淀粉,卵磷脂酶、接触酶阳性,M-R 阳性,产吲哚,V-P 阴性。

[0016] 根据形态特征和生理生化特征,依据《伯杰氏细菌鉴定手册》可鉴定该菌株为类芽孢杆菌属,结合分子生物学鉴定结果,确定类芽孢杆菌 CS0611 为 *Paenibacillus pasadenensis* 或其亚种。

[0017] 表 1 类芽孢杆菌 CS0611 生理生化鉴定实验结果

[0018]

淀粉水解	明胶液化	卵磷脂酶	接触酶	产吲哚	M-R	V-P	牛奶石蕊
+	+	+	+	+	+	—	+

[0019] “+”：表示阳性，“-”表示阴性。

[0020] 所述类芽孢杆菌菌株 CS0611 能将虾蟹壳粉末作为培养基碳源和氮源生长,并发酵产甲壳素酶,发酵液中酶活可达 211.3mU/mL。应用类芽孢杆菌发酵产甲壳素酶的方法：利用蟹壳发酵产甲壳素酶的应用,具体是将该菌株接种至发酵培养基中,在发酵培养基初始 pH 为 5.0-8.5,温度为 28-40℃ 条件下,摇床发酵培养 48-96h;离心去除菌体及蟹壳粉末,发酵上清即为甲壳素酶粗酶液;所述发酵培养基为：蟹壳粉末 0.5-20g/L,磷酸氢二钾 0.5-1.0g/L,磷酸二氢钾 0.2-0.5g/L,硫酸镁 0.3-0.7g/L,氯化钠 0.8-1.2g/L。

[0021] 上述应用还包括类芽孢杆菌菌株 CS0611 种子液的培养,将类芽孢杆菌菌株 CS0611 首先接种至种子培养基中,在 28-40℃,摇床培养 12-30h,然后接种于发酵培养基,所述种子培养基采用 LB 培养基。

[0022] 所述发酵培养的接种量为 4% -8%, pH 为 6.0-7.0,转速 150-300rpm,温度 35-40℃,所述转速优选为 160-200rpm。

[0023] 步骤 (3) 所述离心的条件为：转速 6000-12000rpm,温度 4-10℃。

[0024] 所述蟹壳粉末浓度为 10-30g/L;直径为 75-150 μm。

[0025] 步骤 (2) 所述摇床的转速为 150-250rpm。

[0026] 步骤(3)所述摇床的转速为150-300rpm。

[0027] 与现有技术相比,本发明有如下有益效果:

[0028] 本发明利用蟹壳粉末作为发酵培养基原料,不仅具有发酵技术简单,生产成本低,发酵上清液酶活可达211.3mU/mL。而且能够高效水解虾蟹壳废弃物,降低其对环境造成的污染。因此,本发明具有显著的经济效益和环境效益。

附图说明

[0029] 图1是对类芽孢杆菌(*Paenibacillus pasadenensis*)CS0611及选取的菌种做的系统进化树。

[0030] 图2是类芽孢杆菌(*Paenibacillus pasadenensis*)CS0611于固体筛选培养基上的平板菌落。

[0031] 图3是类芽孢杆菌(*Paenibacillus pasadenensis*)CS0611经革兰氏染色后的显微形态。

具体实施方式

[0032] 下面结合实施例对本发明做进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0033] 实施例1

[0034] 一种利用蟹壳发酵产甲壳素酶的方法,包括如下步骤:

[0035] (1)类芽孢杆菌菌株(*Paenibacillus pasadenensis*)CS0611的活化取斜面培养物置于37℃恒温培养箱中30min,对菌种进行活化。

[0036] (2)种子液体培养

[0037] 取适量斜面培养物接种至种子培养基中,种子培养基采用LB培养基,组成为:胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,氯化钠10g/L,pH7.0。培养条件为37℃,摇床转速为180rpm,培养时间为20h。

[0038] (3)液体发酵培养

[0039] 以接种量4%将种子液转接至发酵培养基中,发酵培养基组成为:蟹壳粉末10g/L,磷酸氢二钾0.08g/L,磷酸二氢钾0.02g/L,硫酸镁0.04g/L,氯化钠0.1g/L。培养条件为30℃,摇床转速150rpm,培养时间为48h。所述发酵培养基中添加的蟹壳粉末的直径为125 μ m。

[0040] 在以上条件下发酵结束后,将培养液在转速为12000rpm,温度为4℃条件高速下离心去除菌体及蟹壳粉末,取上清液即为甲壳素酶粗酶液,酶活可达到198.6mU/mL。

[0041] 酶活的测定方法为:

[0042] 取粗酶液1mL,加入2mL 4%(w/v)胶体甲壳素溶液(由pH7.0,50mM磷酸缓冲液配制),50℃反应1h,反应结束后沸水浴10min,同时以高温酶活酶液作为空白对照。采用DNS法测定反应液中还原糖的浓度。酶活力单位定义为在上述条件下每分钟产生1 μ mol N-乙酰氨基葡萄糖所需要的酶量为一个活力单位。

[0043] 实施例2

[0044] 本实施例与实施例1的不同之处在于:

[0045] 液体发酵培养

[0046] 产酶培养基组成为：蟹壳粉末 10g/L, 磷酸氢二钾 0.07g/L, 磷酸二氢钾 0.03g/L, 硫酸镁 0.05g/L, 氯化钠 0.1g/L。接种量为 6%，培养条件为 30℃, 摇床转速 200rpm, 培养时间为 48h。

[0047] 在以上条件下发酵结束后, 发酵液离心取上清即为甲壳素酶粗酶液, 酶活可达到 205.4mU/mL。

[0048] 实施例 3

[0049] 本实施例与实施例 1 的不同之处在于：

[0050] 液体发酵培养

[0051] 产酶培养基组成为：蟹壳粉末 10g/L, 磷酸氢二钾 0.08g/L, 磷酸二氢钾 0.02g/L, 硫酸镁 0.04g/L, 氯化钠 0.1g/L。接种量为 5%，培养条件为 30℃, 摇床转速 180rpm, 培养时间为 72h。

[0052] 在以上条件下发酵结束后, 发酵液离心取上清即为甲壳素酶粗酶液, 酶活可达到 200.2mU/mL。

[0053] 实施例 4

[0054] 本实施例与实施例 1 的不同之处在于：

[0055] 液体发酵培养

[0056] 产酶培养基组成为：蟹壳粉末 0.5g/L, 磷酸氢二钾 0.08g/L, 磷酸二氢钾 0.02g/L, 硫酸镁 0.04g/L, 氯化钠 0.1g/L。接种量为 4%，培养条件为 30℃, 摇床转速 180rpm, 培养时间为 48h。

[0057] 在以上条件下发酵结束后, 发酵液离心取上清即为甲壳素酶粗酶液, 酶活可达到 155.4mU/mL。

[0058] 上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均应为等效的置换方式, 都包含在本发明的保护范围之内。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 华南理工大学

<120> 一株产甲壳素酶菌株及其利用蟹壳发酵产甲壳素酶的应用

<130> 1

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1452

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1

<400> 1

tggaccatgg ggccctgctat aatgcagtcg agcggatctt gtccttcggg atgaggtag 60

eggeggacgg gtgagtaaca cgtaggaac ctgceetcga gactgggata acctccggaa 120

acggatgcta ataccagata cgcggtcttc cctcctgggg agatcgggaa agacggagca 180

atctgtfact cggggatggg cctgcggcgc attagctagt tggtgaggta acggtcacc 240

aaggecacga tgcgtagccg acctgagagg gtgatcggec aactgggac tgagacacgg 300

[0002]

cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg	360
agcaacgccc cgtgagtgag gaaggccttc gggtcgtaaa gctctgttgc cagggaagaa	420
cgcttgggag agtaactgct cccaaggtga cggtacctga gaagaaagcc ccggetaact	480
acgtgccagc agcccgggta atacgtaggg ggcaagcggt gtccggaatt attgggcgta	540
aagcgcgcgc aggeggttt gtaagtccgg tgtttaatct tggggetcaa ccccaagtcg	600
cacgggaaac tgcaaggctt gtagtcagaa gaggaaagtg gaattccacg ttagcgggtg	660
aatgcgtag agatgtggag gaacaccagt ggcgaaggcg actttctggg ctgtaactga	720
cgctgaggcg cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt	780
aaacgatgaa tgctaggtgt taggggtttc gatacccttg gtgcccgaagt taacacaata	840
agcattccgc ctggggagta cgctcgcaag agtgaaacte aaaggaattg acggggacce	900
gcacaagcag tggagtatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt	960
gacatccctc tgaatccgct agagatagcg gggccttcg ggacagagga gacaggtggt	1020
gcatggtgt cgtcagctcg tctcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcac	1080
ccttgaattc agttgccagc acgtaagggt gggcactctg aattgactgc cggtgacaaa	1140
ccggaggaag gcggggatga cgtcaaatca featgccct tatgacctgg gctacacag	1200

[0003]

tactacaatg gccggtacaa cgggccgcga agccgcgagg cggagccaat cctaaaage	1260
cggtctcagt tcggattgca ggctgcaact cgctgcatg aagtcggaat tgctagtaat	1320
cgggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggtett gtacacaccg cccgtcacac	1380
cacgagagtt tacaacacc gaagtcggtg gggtaaccg caaggagcca gccgccgaag	1440
gtttgtaaca tt	1452

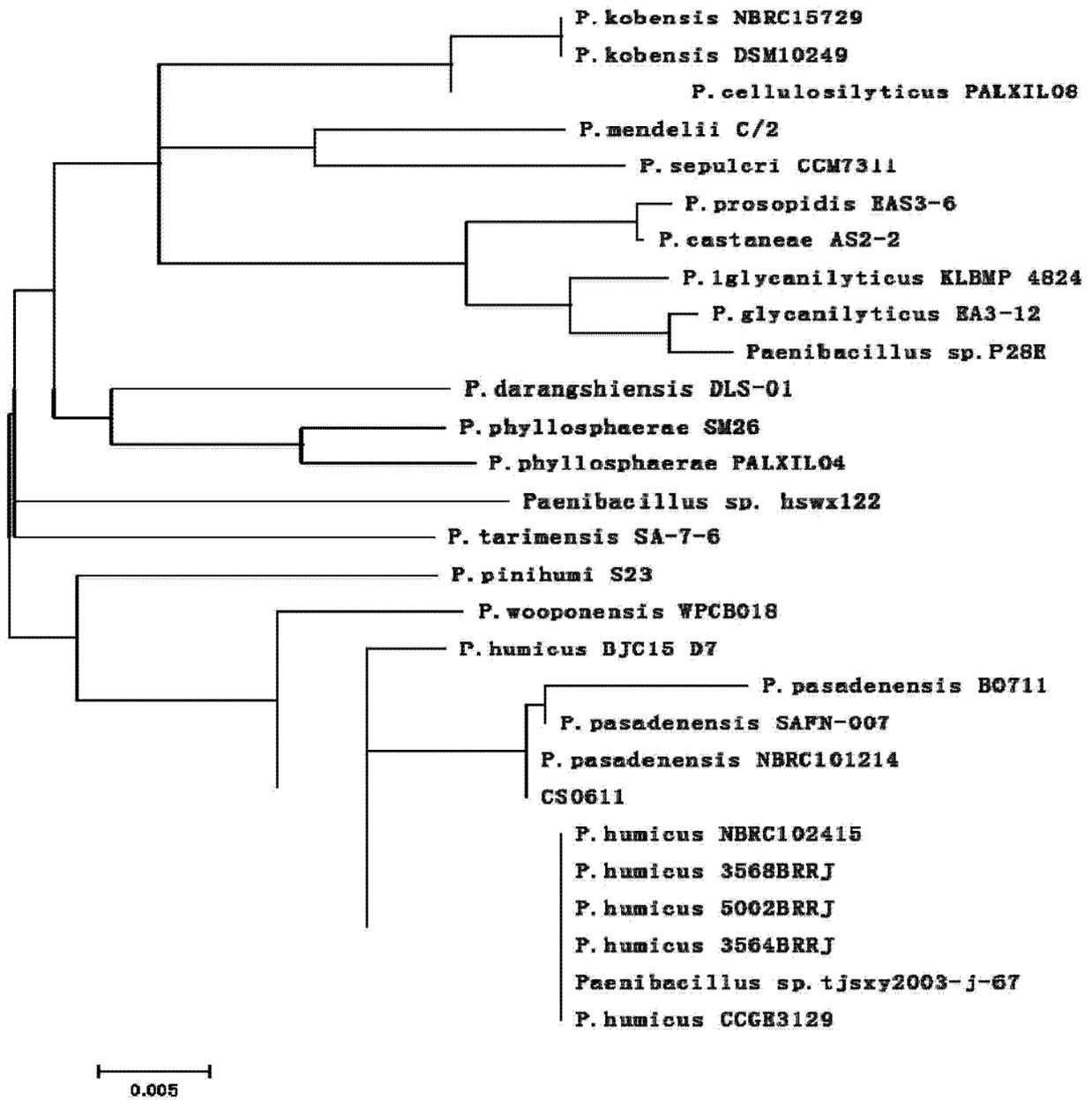


图 1

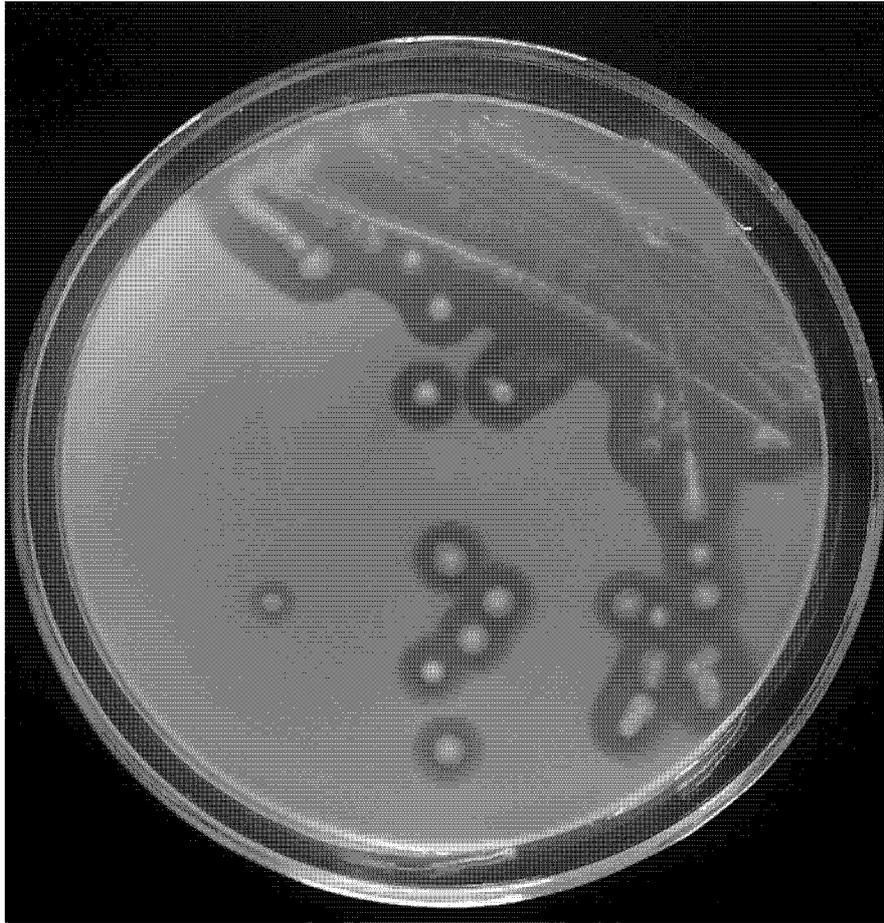


图 2

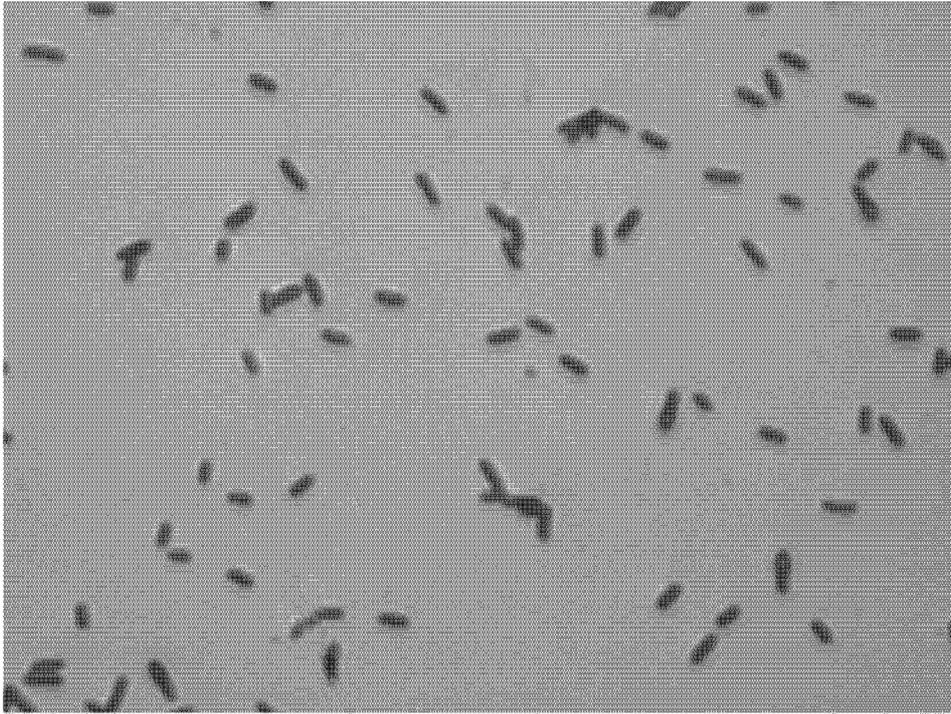


图 3