

张晓彤, 张晓萌, 苏永成, 等. 海洋 *Arthrobacter protophormiae* CDA2-2-2 产几丁质脱乙酰酶发酵条件优化 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(8): 95-101. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060330

ZHANG Xiaotong, ZHANG Xiaomeng, SU Yongcheng, et al. Optimization of Fermentation Conditions for the Production of Chitin Deacetylase from *Arthrobacter protophormiae* CDA2-2-2[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(8): 95-101. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060330

· 生物工程 ·

海洋 *Arthrobacter protophormiae* CDA2-2-2 产几丁质脱乙酰酶发酵条件优化

张晓彤, 张晓萌, 苏永成, 武波飞, 刘 姝, 卢 静, 杨 光, 房耀维*
(江苏海洋大学食品科学与工程学院, 江苏连云港 222000)

摘要: 对海洋 *Arthrobacter protophormiae* CDA2-2-2 产几丁质脱乙酰酶发酵培养基和发酵条件进行优化, 提高发酵产酶水平。在单因素实验优化的基础上, 利用 PB 试验筛选显著影响菌株发酵产酶酶因素, 进一步利用响应面法优化这些因素, 获得最佳发酵培养基和培养条件。利用单因素实验优化获得碳源、氮源、金属离子、发酵温度、发酵时间、装液量、初始 pH 和转速的最佳条件。PB 试验筛选获得显著影响发酵产酶的因素为 $MgSO_4$ 、发酵温度和葡萄糖。运用 Box-Behnken 设计, 通过响应面法对上述 3 因素进行优化, 获得 *Arthrobacter protophormiae* CDA2-2-2 最佳培养基配方为: 葡萄糖 0.5%, 酵母粉 1%, $MgSO_4$ 0.015%; 发酵条件为: 发酵温度 38 °C, 初始 pH7.0, 转速 140 r/min, 发酵时间 84 h, 接种量 2%, 装液量 40%。在此条件下 *Arthrobacter protophormiae* CDA2-2-2 产几丁质脱乙酰酶酶活为 14.58 U/mL, 较优化前提高了 2.5 倍。本研究结果为 *Arthrobacter protophormiae* CDA2-2-2 几丁质脱乙酰酶的进一步开发和应用奠定试验基础。

关键词: 几丁质脱乙酰酶, 发酵条件, 响应面法, *Arthrobacter protophormiae*

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)08-0095-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060330

Optimization of Fermentation Conditions for the Production of Chitin Deacetylase from *Arthrobacter protophormiae* CDA2-2-2

ZHANG Xiaotong, ZHANG Xiaomeng, SU Yongcheng, WU Bofei, LIU Shu, LU Jing, YANG Guang, FANG Yaowei*

(College of Food Science and Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222000, China)

Abstract: The fermentation conditions of marine *Arthrobacter protophormiae* CDA2-2-2 were optimized to enhance the production of chitin deacetylase. Different process variables such as carbon sources, nitrogen sources, temperature, metal ions, time, volume, initial pH, rotate speed, and inoculum size were evaluated by one parameter at-a-time strategy. A significant influence of $MgSO_4$, fermentation temperature and glucose on chitin deacetylase production was noted with Plackett-Burman design. Then, a three-level Box-Behnken design was employed to optimize the medium composition and culture conditions to produce the chitin deacetylase in shake-flask. Using this methodology, the quadratic regression model of producing chitin deacetylase was built and the optimal combinations of media constituents and culture conditions for maximum chitin deacetylase production were determined as $MgSO_4$ 0.01%, fermentation temperature 38 °C, glucose 0.57%. Chitin deacetylase production obtained experimentally coincident with the predicted value and the model was proven to be adequate. The optimization of these parameters in flask experiments allowed us to increase the production of chitin deacetylase to 14.58 U/mL, which was increased by 2.5 times than that of before optimization. These results support

收稿日期: 2020-06-29

基金项目: 国家自然科学基金 (31772016); 江苏省第五期“333 工程”项目 (BRA2019243); 海洋科技创新项目 (HY2018-10); 江苏省大学生创新项目 (Z202011641631020, Z202011641633009)。

作者简介: 张晓彤 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: zhangxiaotong0124@163.com。

* 通信作者: 房耀维 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: forei@163.com。

the potential use of *A. protophormiae* CDA2-2-2 to produce chitin deacetylase, which would be applied to prepare chitosan with enzymatic deacetylation route.

Key words: chitin deacetylase; optimization; response surface method; *Arthrobacter protophormiae*

几丁质普遍存在于无脊椎动物的外骨骼和角质层,也是构成大多数真菌细胞壁的主要成分^[1]。全球水产品有机体中约 8% 富含几丁质(约占干重的 8%~55%),包括虾、蟹、鱿鱼、蚝和墨鱼等^[2-3]。仅在水生生态系统,几丁质每年的产量就超过 10¹¹ 吨^[4]。在生物体中,几丁质常与其它结构物质交联,在真菌细胞壁中与 β -葡萄糖共价结合,在昆虫等动物中与特定的蛋白质交联,形成各种有序结构^[5-6]。

几丁质是自然界中总量仅次于纤维素的天然多糖和可再生聚合物。几丁质的高结晶度导致其应用受到极大限制^[7]。壳聚糖是几丁质分子中乙酰基被部分或全部脱除后的产物,因其分子中有大量游离的氨基,故其溶解性能相比几丁质得到很大改善,并具有生物可降解性,广泛用于食品、医药、轻工、印染、环保和农业等领域,具有很大的开发和推广潜力^[8-9]。

目前,工业上制备壳聚糖的方法主要是化学法,即使用浓碱热解几丁质脱除乙酰基,容易导致严重的环境污染问题,且获得的壳聚糖产品中乙酰基的脱除程度不一致,产品均一性差^[10]。酶法生产壳聚糖作为一种新型绿色环保的脱乙酰方法,反应条件温和,能耗值相对较低,污染小,可获得脱乙酰程度均一稳定的产品^[11]。因此,运用几丁质脱乙酰酶生产壳聚糖成为极具潜力的生产方式^[12]。目前国内外报道的几丁质脱乙酰酶产生菌多为真菌,包括 *Aspergillus nidulans*^[13]、*Schizosaccharomyces pombe*^[14]、*Puccinia graminis*^[15]、*Fusarium proliferatum*^[16] 等。这些菌株发酵产酶水平较低,催化温度较高。

海洋具有低温、高盐、寡营养等独特多样的生态环境,蕴含了丰富的能够产生新颖催化特性酶类的微生物资源。针对目前产几丁质脱乙酰酶微生物菌株发酵水平较低,催化温度高等问题。本研究组从连云港高公岛海域海泥样品中筛选获得一株低温几丁质脱乙酰酶细菌 *Arthrobacter protophormiae* CDA2-2-2。本研究对该菌株发酵产几丁质脱乙酰酶的发酵条件进行优化,提高发酵产酶水平,为工业化酶法催化几丁质脱乙酰制备壳聚糖提供试验基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

几丁质 澳新生物工程有限公司;蛋白胨、酵母粉、对硝基-N-乙酰苯胺、K₂HPO₄、KH₂PO₄、NaCl、NH₄SO₄ 等试剂均为分析纯 上海博微生物科技有限公司;种子培养基(酵母粉 0.1%,蛋白胨 0.5%,NaCl 1%,陈海水配制,pH7.0)、2216E 培养基(蛋白胨 0.5%,酵母粉 0.1%,FePO₄ 0.01%,琼脂 2%,陈海水配制,pH7.0)、发酵培养基(几丁质 0.5%,酵母粉 1%,葡萄糖 0.5%,MgSO₄ 0.01%,K₂HPO₄ 0.1%,

KH₂PO₄ 0.03%,陈海水配制,pH7.0) 实验室自制;陈海水 取天然海水,室温静止两周后纱布过滤。

高速冷冻离心机 美国 SIGMA 公司;分光光度计 杭州明基科学仪器有限公司;SPX-250B-2 生化培养箱 上海博迅实业有限公司;DK-8D 电热恒温水槽 上海一恒科技有限公司;Nikon 90i 全电动显微镜 上海普赫光电科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 粗酶液的制备 将保存于超低温冰箱里的甘油菌株接到 2216E 培养基平板,28 °C 培养过夜,接种于种子培养基中,28 °C,140 r/min 摇床培养 1 d 后培养得种子培养液,按 2% 接种量接种到发酵培养基,于不同发酵条件下发酵后,8000×g 离心 10 min,上清液过 22 μ m 滤膜,即为粗酶液^[17]。

1.2.2 酶活的测定 根据 Chai 等报道的方法制备对硝基乙酰苯胺标准曲线^[10]。试管中加入 30 °C 预保温的 0.05 mol/L pH7.0 磷酸缓冲液 3 mL,200 mg/L 的对硝基乙酰苯胺水溶液 1 mL,粗酶液 1 mL,于 30 °C 水浴反应 15 min,沸水浴终止酶促反应,12000 r/min 离心 10 min,测定上清液的吸光度(A₄₀₀)。以添加 1 mL 同样浓度沸水浴灭活 15 min 的酶液为对照。酶活单位(U)定义:在上述反应条件下每小时产生对硝基苯胺所需要的酶量定义为一个酶活力单位^[18]。

相对酶活:单因素变量产生的最高酶活为 100%,其他因素产生的酶活占最高酶活的比例即为相对酶活(%)。

1.2.3 单因素优化发酵产酶条件

1.2.3.1 培养基成分对菌株发酵产酶的影响 发酵条件:以 3% 接种量将种子液接种至发酵培养基,以 pH7.0、装液量 30%、30 °C、180 r/min 发酵 48 h 为基本条件,进行几丁质脱乙酰酶的酶活测定。

碳源的确定:分别添加 1% 的葡萄糖、乳糖、蔗糖、白砂糖、麦芽糖、可溶性淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、藕粉。

氮源的确定:分别添加 1% 的氯化铵、硫酸铵、硝酸铵、豆粕、米糠、麸皮、黄豆粉、酵母粉。

无机盐的确定:分别添加 0.015% 的 KCl、ZnCl₂、CaCl₂、FeSO₄、CuSO₄、CoCl₂、MgSO₄、MnSO₄,考察无机盐对菌株发酵产几丁质脱乙酰酶的影响。

1.2.3.2 发酵条件对菌株产酶的影响 发酵培养方法:以 3% 接种量将种子液接种至发酵培养基,以 pH7.0、装液量 30%、30 °C、180 r/min 发酵 48 h 为基本条件,进行几丁质脱乙酰酶的酶活测定。分别对发酵温度、发酵时间、装液量、初始 pH、转速进行单

因素优化。接种量: 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%; 装液量: 20%、30%、40%、50%、60%; 发酵温度: 20、25、30、35、40、45、50 °C; 初始 pH: 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0; 转速: 100、120、140、160、180、200 r/min; 发酵时间: 12、24、36、60、72、84、96、108、120 h。

1.2.4 PB 试验 在单因素实验的基础上, 选择葡萄糖、黄豆粉、MgSO₄、发酵时间、发酵温度、培养基初始 PH、装液量、接种量、转速为考察因素, 每个因素设计了高(1)低(-1)2 个水平(表 1), 运用 Design-Expert V8.0.6 软件进行 12 次 PB 试验设计, 分别对 9 个因素进行数据分析, 确定影响相对酶活大小的显著性因素^[19]。

表 1 Plackett-Burman 试验因素水平表
Table 1 Test factor level of Plackett-Burman

代码	因素	水平	
		1	-1
X ₁	葡萄糖(100%)	0.6	0.4
X ₂	黄豆粉(100%)	1.2	0.8
X ₃	MgSO ₄ (100%)	0.02	0.01
X ₄	发酵时间(h)	96	72
X ₅	发酵温度(°C)	38	32
X ₆	培养基初始PH	8	6
X ₇	装液量(100%)	45	35
X ₈	接种量(100%)	4	2
X ₉	转速(r/min)	140	120

1.2.5 最陡爬坡实验 在单因素优化实验和 PB 试验的基础上, 对发酵水平影响显著的 3 个因子, 选定基础发酵条件, 根据 PB 试验中 t 值选定效应方向, 设定一定步长, 进行最陡爬坡试验^[20]。

1.2.6 响应面法优化发酵产酶条件 根据单因素实验和 PB 试验结果, 确定具有显著性的 3 因素为变量, 以酶活大小为响应值, 运用 Design of Experiments 设计 3 因素 3 水平共 17 个试验点的 Box-Behnken 响应面分析试验, 因素水平表见表 2。根据最陡爬坡试验选择因素水平。响应面法采用多远二次方程来拟合因素和响应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析来寻求最优实验因素, 并对模型进行验证, 以得到菌株的最优发酵条件^[21]。

表 2 Box-Behnken 试验因素水平表
Table 2 Test factor level of Box-Behnken

水平	因素		
	A-MgSO ₄ (%)	B-发酵温度(°C)	C-葡萄糖(%)
-1	0.01	32	0.4
0	0.015	35	0.5
1	0.02	38	0.6

1.2.7 数据处理 每组实验设 3 组平行, 重复实验 3 次, 实验结果用平均值±标准方差(n=3)表示, 使用

Origin2018 作图, PB 试验和响应面采用 Design Expert 10 进行数据分析^[21]。

2 结果与分析

2.1 对硝基苯胺的标准曲线

对硝基苯胺标准曲线如图 1 所示, 该图所得线性方程为 $y=0.0556x+0.00467$ 。该方程决定系数为 0.9997, 契合度高。

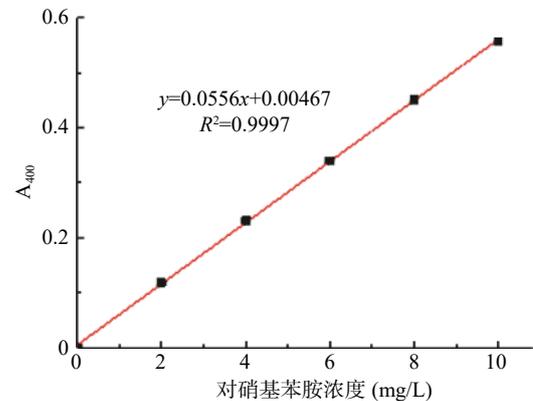


图 1 对硝基苯胺标准曲线
Fig.1 Standard curve of p-nitroaniline

2.2 发酵产几丁质脱乙酰酶条件单因素优化

2.2.1 碳源对菌株 CDA2-2-2 产酶的影响 碳源对 CDA2-2-2 产酶的影响如图 2。碳源为葡萄糖时相对酶活最大, 为 5.33 U/mL。可溶性淀粉、蔗糖和乳糖的相对酶活在 75% 以上, 玉米淀粉和木薯淀粉的相对酶活较低, 因此确定碳源为葡萄糖。前期研究发现, *Arthrobacter protophormiae* CDA2-2-2 所产几丁质脱乙酰化酶为非诱导酶, 即添加几丁质并不能增加发酵产酶水平, 且几丁质不溶于水, 作为碳源发酵水平较低, 因此在碳源优化中没有添加几丁质^[17,22]。

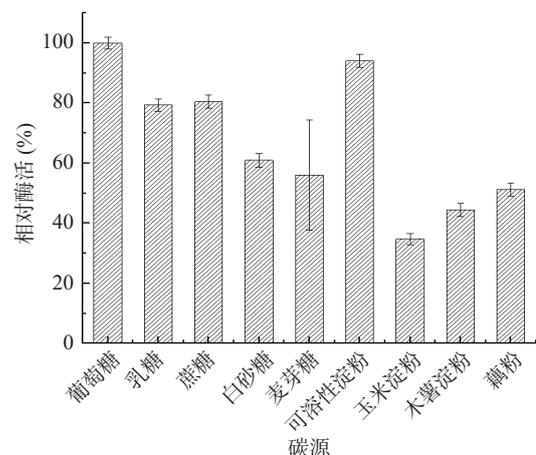


图 2 碳源对菌株 CDA2-2-2 产酶的影响图
Fig.2 Effect of carbon source on enzyme production of strain CDA2-2-2

2.2.2 氮源对菌株 CDA2-2-2 产酶的影响 氮源对 CDA2-2-2 产酶的影响如图 3。氮源为酵母粉时酶活产酶水平最高, 为 5.37 U/mL, 黄豆粉和豆粕为氮源时产酶水平达到最高水平的 97% 和 80%, 硝酸铵、

硫酸铵为氮源时产酶水平较低,可能是无机氮营养单一,而有机氮源富含微生物活动必需的生物因子和微量元素,在生长过程中更易被生物吸收利用或对几丁质脱乙酰酶本身具有激活作用^[9]。由于酵母粉价格昂贵,综合考虑成本和产酶量,选择黄豆粉为氮源进行后续优化研究。

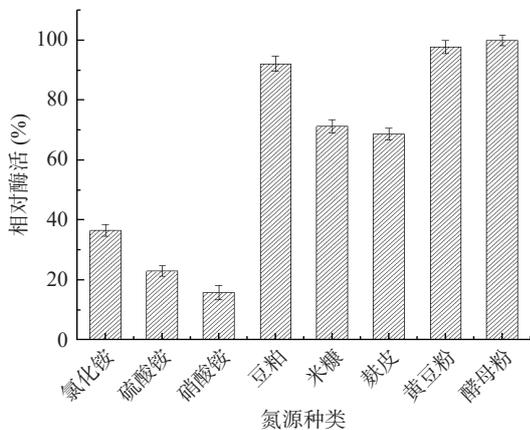


图3 氮源对菌株 CDA2-2-2 产酶的影响图

Fig.3 Effect of nitrogen source on enzyme production of strain CDA2-2-2

2.2.3 无机盐对菌株 CDA2-2-2 产酶的影响 无机盐对 CDA2-2-2 产酶的影响如图 4。无机盐为 $MgSO_4$ 时相对酶活最大为 5.28 U/mL, 而 $MnSO_4$ 、 $CoCl_2$ 、 $CuSO_4$ 、 $FeSO_4$ 、 KCl 的相对酶活在 60% 以下, 因此无机盐确定为 $MgSO_4$ 。金属离子通过影响菌株生长、酶的分泌, 以及酶活性从而影响微生物发酵产酶水平^[7]。

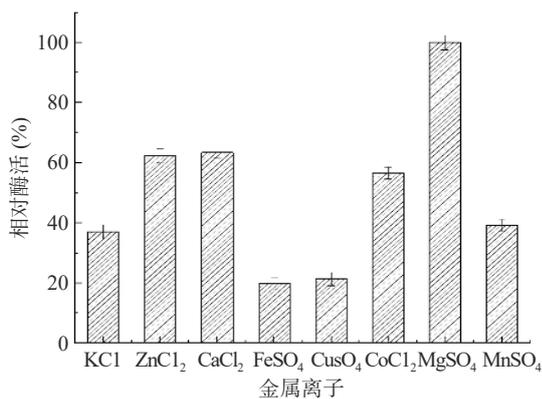


图4 金属离子对菌株 CDA2-2-2 产酶的影响图

Fig.4 Effect of inorganic salt on enzyme production of strain CDA2-2-2

2.2.4 接种量对菌株 CDA2-2-2 产酶的影响 接种量对菌株 CDA2-2-2 发酵产酶的影响如图 5。随着接种量的增加, 酶活变大, 到 2% 时产酶最高, 最高酶活为 5.33 U/mL。接种量大于 2% 后酶活逐渐变小, 因此确定接种量为 2%。接种量通过影响发酵菌株的延迟期, 接种量过小, 延迟期增长, 不利于产酶^[12]。

2.2.5 装液量对菌株 CDA2-2-2 产酶的影响 装液量对菌株 CDA2-2-2 发酵产酶的影响如图 6。装液

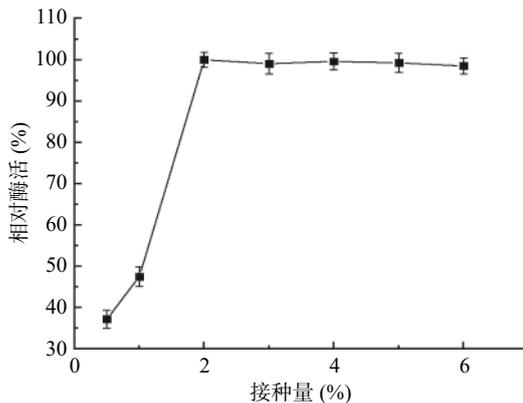


图5 接种量对菌株 CDA2-2-2 发酵产酶的影响图

Fig.5 Effect of inoculum size on enzyme production of strain CDA2-2-2

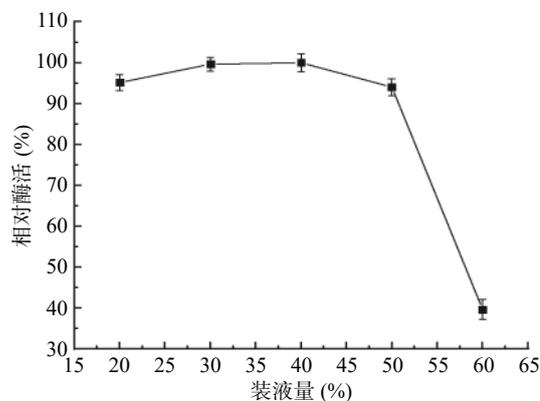


图6 装液量对菌株 CDA2-2-2 发酵产酶的影响图

Fig.6 Effect of loaded volume on enzyme production of strain CDA2-2-2

量 30%~40% 时产酶较高, 装液量高于 40% 时, 酶活快速下降。装液量为 40% 时相对酶活最高, 为 5.35 U/mL, 因此装液量确定为 40%。装液量较少时, 产酶水平较高, 随着装液量增加, 溶氧量降低, 降低菌株生长及产酶水平^[12]。

2.2.6 发酵温度对菌株 CDA2-2-2 产酶的影响 发酵温度对菌株 CDA2-2-2 发酵产酶的影响如图 7。产酶水平从 20 °C 开始随温度的升高而增大, 在 30~35 °C 内酶活较高, 当发酵温度超过 35 °C 时, 酶活开

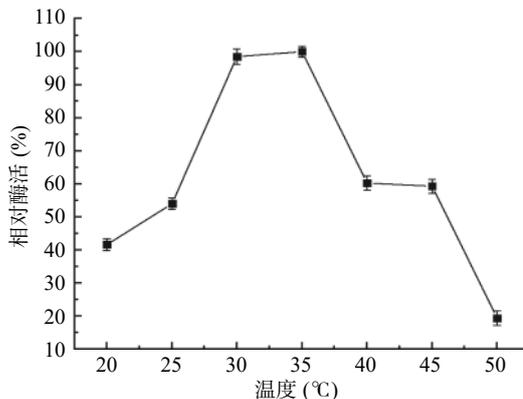


图7 发酵温度对菌株 CDA2-2-2 发酵产酶的影响图

Fig.7 Effect of fermentation temperature on enzyme production of strain CDA2-2-2

始迅速下降。35 °C 时产酶最高,酶活为 5.435 U/mL,因此发酵温度确定为 35 °C。温度影响微生物生长及代谢,同时影响酶活性,因此对菌株发酵产酶有明显影响^[23]。

2.2.7 培养基初始 pH 对菌株 CDA2-2-2 产酶的影响 培养基初始 pH 对菌株 CDA2-2-2 发酵产酶的影响如图 8。培养基的初始 pH 为 5.0 或 8.0 时,相对酶活较低。但在 pH6.5~7.5 时,酶活较高,保持 90% 以上的酶活。pH 为 7.0 时产酶最高,最高酶活为 5.41 U/mL,因此初始 pH 确定为 7.0。

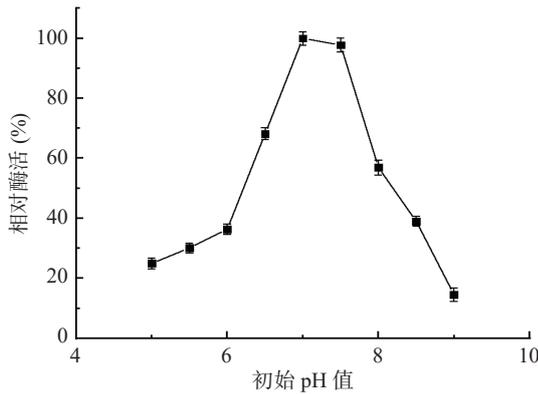


图 8 培养基初始 pH 对菌株 CDA2-2-2 发酵产酶的影响图
Fig.8 Effect of initial pH on enzyme production of strain CDA-2-2-2

2.2.8 转速对菌株 CDA2-2-2 产酶的影响 转速对菌株 CDA2-2-2 发酵产酶的影响如图 9。当转速为 100 r/min 时产酶较低,转速为 140 r/min 时产酶最高,相对酶活为 5.45 U/mL。当转速 140 r/min 以上后,酶活开始迅速下降,因此转速确定为 140 r/min。转速影响三角瓶内的溶氧,从而影响菌株的生长和发酵产酶水平^[12]。

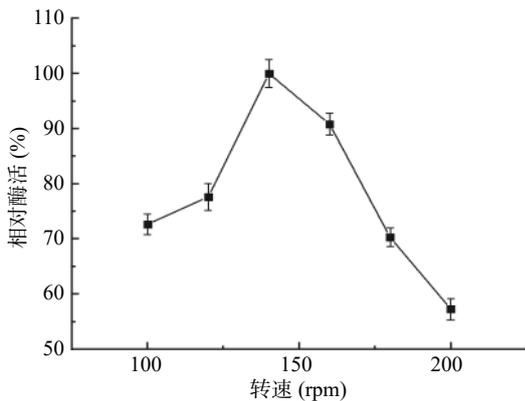


图 9 转速对菌株 CDA2-2-2 发酵产酶的影响
Fig.9 Effect of the speed of centrifugal on enzyme production of strain CDA-2-2-2

2.2.9 发酵时间对菌株 CDA2-2-2 产酶的影响 发酵时间对菌株 CDA2-2-2 发酵产酶的影响如图 10。随着发酵时间的进一步增加,相对酶活先上升后呈下降趋势。发酵时间 84 h 产酶最高,最高酶活为 5.61 U/mL,因此发酵时间确定为 84 h。

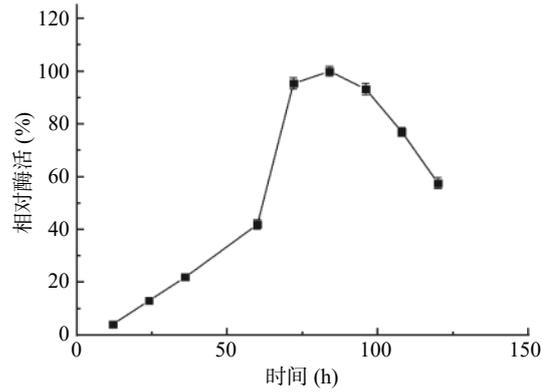


图 10 发酵时间对菌株 CDA2-2-2 发酵产酶的影响
Fig.10 Effect of fermentation time on enzyme production of strain CDA-2-2-2

2.3 PB 试验设计优选影响酶活大小的显著因素

在单因素实验的基础上,选择葡萄糖、黄豆粉、MgSO₄、发酵时间、发酵温度、培养基初始 pH、装液量、接种量、转速为考察因素,每个因素设计了高(1)低(-1)2 个水平(表 1),运用 Design-Expert V8.0.6 软件进行 12 次 PB 试验设计(见表 3),分别对 9 个因素进行数据分析,确定影响相对酶活大小的显著性因素^[22]。

表 3 Plackett-Burman 试验设计与结果

Table 3 Plackett-Burman experimental design and results

编号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	相对酶活 (100%)
1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	2.09
2	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	3.81
3	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	3.41
4	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	2.12
5	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1.89
6	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	2.01
7	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1.29
8	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1.35
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4.44
10	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	5.37
11	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	2.81
12	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1.83

运用 Design-Expert V8.0.6 软件对表 3 中数据进行显著性试验,结果见表 4。由表 4 可知,

表 4 Plackett-Burman 试验设计方差分析

Table 4 Plackett-Burman analysis of variance of test design

代码	变量	t 值	P	重要性排列
X ₁	葡萄糖(100%)	3.47	0.0152	3
X ₂	黄豆粉(100%)	-0.11	0.9256	8
X ₃	MgSO ₄ (100%)	4.65	0.0069	1
X ₄	发酵时间(h)	1.07	0.2599	9
X ₅	发酵温度(°C)	3.65	0.013	2
X ₆	培养基初始pH	-1.05	0.2701	6
X ₇	装液量(100%)	0.2	0.8566	7
X ₈	接种量(100%)	-1.46	0.1475	4
X ₉	转速(r/min)	-0.04	0.9744	5

MgSO₄、发酵温度、葡萄糖对相对酶活大小影响均显著,且显著性大小排序为 MgSO₄(X₃)>发酵温度(X₂)>葡萄糖(X₁);其他因素对相对酶活大小的影响不显著。因此选择 MgSO₄(X₃)、发酵温度(X₂)、葡萄糖(X₁)作为响应面模型的考察因素。

2.4 最陡爬坡实验结果分析

Plackett-Burman 实验可以选择出对发酵水平影响显著的因子,但是不能预测变量的最佳水平,因此,设计最陡爬坡实验,以确定重要因素的最佳水平领域^[24]。实验结果见表 5。3 个重要因素在第 2 组水平,酶活性达到最大值,随后随着数值的增加,酶活性下降,因此,选定第 2 组因素水平进行响应面优化。

表 5 最陡爬坡实验设计及结果
Table 5 Experimental design of steepest ascent and corresponding results

序号	MgSO ₄ (%)	发酵温度(°C)	葡萄糖(%)	相对酶活(U/mL)
1	0.01	32	0.4	9.87
2	0.015	35	0.5	12.65
3	0.03	38	0.6	10.25
4	0.045	41	0.7	5.79

2.5 响应面法优化菌株 CDA2-2-2 产几丁质脱乙酰酶的发酵条件

2.5.1 响应面设计及结果 根据 PB 试验结果确定优选的 MgSO₄(A)、发酵温度(B)、葡萄糖(C)3 个因素为变量,以酶活大小为响应值,运用 Design of Experiments 设计 3 因素 3 水平共 17 个试验点的 Box-Behnken 响应面分析试验(表 6)。

表 6 Box-Behnken 试验设计及结果
Table 6 Box-Behnken test design and results

试验次数	水平值			酶活(U/mL)
	A	B	C	
1	0.01	32	0.5	6.34
2	0.02	32	0.5	8.83
3	0.01	38	0.5	10.65
4	0.02	38	0.5	10.95
5	0.01	35	0.4	6.85
6	0.02	35	0.4	7.68
7	0.01	35	0.6	10.57
8	0.02	35	0.6	9.78
9	0.015	32	0.4	5.82
10	0.015	38	0.4	9.04
11	0.015	32	0.6	8.15
12	0.015	38	0.6	14.76
13	0.015	35	0.5	12.76
14	0.015	35	0.5	13.13
15	0.015	35	0.5	11.93
16	0.015	35	0.5	13.15
17	0.015	35	0.5	13.02

2.5.2 试验数据分析 对试验数据进行回归分析,得二次多项式方程:

$$Y=12.8+0.35A+2.03B+1.73C-0.55AB-0.41AC+0.85BC-2.16A^2-1.44B^2-1.91C^2$$

由表 7 可知:从 F 值的大小可以得到,一次项中各因素对几丁质脱乙酰酶酶活的影响顺序是 B>C>A。对几丁质脱乙酰酶酶活的方差分析可得模型 P<0.01,表明该方程模型极显著,不同处理间的差异性极显著;失拟项 P>0.05,表明模型失拟项不显著;模型的 R² 为 0.965,说明该模型能解释 96.5% 响应值的变化,因而该模型拟合程度良好,试验误差小,可以用于预测最优发酵条件参数^[25]。

表 7 几丁质脱乙酰酶酶活的回归方差分析表
Table 7 Regression analysis of variance of chitinic deacetylase activity

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	111.69	9	12.41	21.45	0.0003	**
A	1	1	1	1.73	0.2298	-
B	33.05	1	33.05	57.12	0.0001	**
C	24.05	1	24.05	41.56	0.0004	**
AB	1.2	1	1.2	2.07	0.1932	-
AC	0.66	1	0.66	1.13	0.3223	-
BC	2.87	1	2.87	4.97	0.0611	-
A ²	19.72	1	19.72	34.08	0.0006	**
B ²	8.75	1	8.75	15.12	0.0060	**
C ²	15.42	1	15.42	26.66	0.0013	**
残差	4.05	7	0.58			
失拟	3.01	3	1	3.87	0.1121	-
误差	1.04	4	0.26			
总离差	115.74	16				

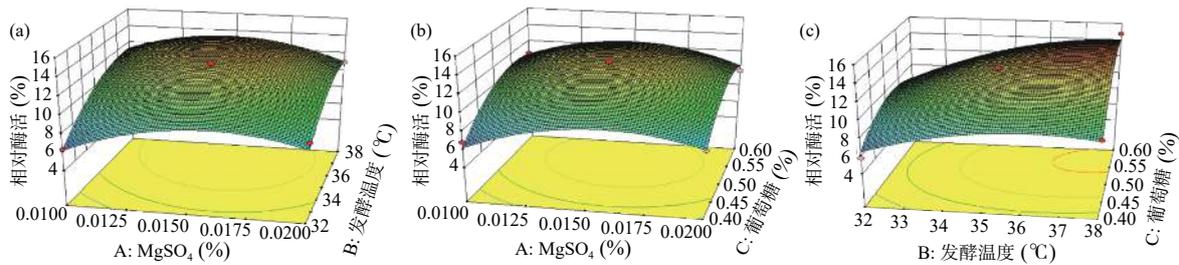
注: -表示差异不显著; *表示差异显著, P<0.05; **表示差异极显著, P<0.01。

响应面三维图 11 表明,响应面开口朝下,响应值随各自变量的值先增加后减少,说明此模型有突出稳定点,且稳定点是该模型的最大值。葡萄糖 0.5%,当 MgSO₄ 在 0.015%~0.022%,发酵温度在 35.5~37.5 °C 时酶活最大;发酵温度 35 °C 时,当 MgSO₄ 在 0.015%~0.023%,葡萄糖 0.53%~0.59%,酶活力最大;MgSO₄ 0.1% 时,发酵温度在 35.5~38 °C,葡萄糖 0.53%~0.59%,酶活最大。

2.5.3 验证性实验 使用响应面法对发酵工艺条件进行优化^[24],得到最佳培养基组合为: MgSO₄ 0.01%、发酵温度 37.76 °C、葡萄糖 0.57%,发酵产酶活预测值为 14.2932 U/mL。为了保证试验的方便可行,对各个条件做少许修正进行验证实验, MgSO₄ 0.01%,发酵温度 38 °C,葡萄糖 0.57% 进行验证试验,结果显示几丁质脱乙酰酶酶活为 14.582 U/mL,与理论值相对误差<5%,较优化前提高了 2.5 倍,优化后菌株 CDA2-2-2 发酵产几丁质脱乙酰酶水平为 14.582 U/mL,高于部分报道的细菌发酵几丁质脱乙酰酶的发酵水平^[5,25],说明响应面分析得到的模型准确可靠且具有实用性。

3 结论

采用优化发酵条件提高海洋 *Arthro bacter protophormiae* CDA2-2-2 发酵产几丁质脱乙酰酶水平,在考察了单因素对相对酶活影响的基础上,运用

图 11 $MgSO_4$ 、发酵温度、葡萄糖的交互作用对几丁质脱乙酰酶活的影响图Fig.11 Effects of $MgSO_4$, fermentation temperature and glucose interaction on enzyme activity

PB 实验设计筛选出显著性影响因素,确定显著性影响因素为 $MgSO_4$ 、发酵温度、葡萄糖。使用响应面法对发酵工艺条件进一步优化获得最佳培养基组合为: $MgSO_4$ 0.01%、发酵温度 38 °C、葡萄糖 0.57%。在此条件下,几丁质脱乙酰酶水平较优化前提高了 2.5 倍,达到 14.58 U/mL。本研究仅通过发酵条件优化提高产酶水平,进一步研究可通过诱变育种进一步提高发酵水平,以及对酶基因进行克隆和高效表达和定性进化研究,提高发酵产酶水平,提高酶的比活力和催化晶体几丁质的活性。

参考文献

- [1] 朱先玉,丛海花,尹恒.几丁质脱乙酰酶的特点及应用[J].渔业研究,2019,41(2):167-174.
- [2] 张岩,关菲菲,伍宁丰,等.几丁质脱乙酰酶的研究进展[J].生物技术通报,2019,35(11):179-186.
- [3] 魏丽蓉,秦汪艳,李永成.几丁质脱乙酰酶高产菌株的选育及其发酵特性研究[J].中国酿造,2018,37(7):61-66.
- [4] 杨倩,刘建辉,蒋彤,等.几丁质脱乙酰酶的研究进展[J].食品研究与开发,2017,38(10):200-203.
- [5] Pawaskar GM, Pangannaya S, Raval K, et al. Screening of chitin deacetylase producing microbes from marine source using a novel receptor on agar plate[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 716-720.
- [6] Liu J, Jia Z, Li S, et al. Identification and characterization of a chitin deacetylase from a metagenomic library of deep-sea sediments of the Arctic Ocean[J]. *Gene*, 2016, 590(1): 79-84.
- [7] 刘丽.几丁质脱乙酰酶产生菌的诱变筛选及发酵条件优化[D].济南:山东师范大学,2011.
- [8] Aspras I, Jaworska M M, Górak A. Kinetics of chitin deacetylase activation by the ionic liquid [Bmim][Br][J]. *Journal of biotechnology*, 2017, 251: 94-98.
- [9] 张菁菁,董文宾,缙敬轩.几丁质脱乙酰酶菌株的筛选鉴定及酶学性质[J].食品工业科技,2012,33(06):244-246,249.
- [10] Chai J, Hang J, Zhang C, et al. Purification and characterization of chitin deacetylase active on insoluble chitin from *Nitratireductor aquimarinus* MCDA3-3[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 152: 922-929.
- [11] 闫晓平,赵丹,郭巍,等.美国白蛾几丁质脱乙酰酶的克隆、表达及酶学性质[J].中国农业科学,2017,50(5):849-858.
- [12] 秦汪艳.几丁质脱乙酰酶产生菌的诱变育种及产酶条件研究[D].海口:海南大学,2018.
- [13] Liu Z, Gay L M, Tuveng T R, et al. Structure and function of a broad-specificity chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* FGSC A4[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1746.
- [14] Matsuo Y, Tanaka K, Matsuda H, et al. *cda1+*, encoding chitin deacetylase is required for proper spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Febs Letters*, 2005, 579(12): 2737-2743.
- [15] Naqi S, Cordlandwehr S, Singh R, et al. A recombinant fungal chitin deacetylase produces fully defined chitosan oligomers with novel patterns of acetylation[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(22): 6645-6655.
- [16] 雷含琨,万芳芳,潘丹阳,等.层生镰刀菌深层发酵产甲壳素脱乙酰酶的初步研究[J].菌物学报,2017,36(12):1632-1641.
- [17] 来蒋丽,刘姝,胡晟源,等.一株产几丁质脱乙酰酶海洋细菌的筛选、鉴定及发酵优化[J].生物技术通报,2017,33(11):153-159.
- [18] Sarkar S, Gupta S, Chakraborty W, et al. Homology modeling, molecular docking and molecular dynamics studies of the catalytic domain of chitin deacetylase from *Cryptococcus laurentii* strain RY1[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 104: 1682-1691.
- [19] 王瑞琪,陈钢,阙发秀,等.响应面法优化粗糙脉孢菌番茄红素的皂化提取工艺及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2020,41(11):207-213.
- [20] Liu, S, Fang Y, Lv M, et al. Optimization of the production of organic solvent-stable protease by *Bacillus sphaericus* DS11 with response surface methodology[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 79274-7929.
- [21] Zhu X, Zhao Y, Zhang H, et al. Characterization of the specific mode of action of a chitin deacetylase and separation of the partially acetylated chitosan oligosaccharides[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(2): 74.
- [22] 顾张慧,刘姝,胡晟源,等.一株产几丁质脱乙酰酶海洋细菌的筛选、鉴定及发酵优化[J].食品工业科技,2017,38(18):129-134.
- [23] 应聪萍,王瑶,李永成.一株产几丁质脱乙酰酶丝状真菌的发酵条件优化研究[J].食品工业科技,2016,37(1):170-174,218.
- [24] Ye W, Ma H, Liu L, et al. Biocatalyzed route for the preparation of surface deacetylated chitin nanofibers[J]. *Green Chemistry*, 2019, 21: 3143-3151.
- [25] 柴金龙,王敏卜,杭加豪,等.产几丁质脱乙酰酶海洋细菌的筛选鉴定及产酶条件优化[J].中国酿造,2019,38(10):89-95.