

烟曲霉产壳聚糖酶液体发酵条件研究

周 桂¹, 何子平², 禰金彩¹

(1. 广西民族大学 化学与生态工程学院, 广西 南宁 530006; 2. 广西农业科学院, 广西 南宁 530007)

摘要:以烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) 为出发菌, 通过选择适合的培养条件, 筛选出产壳聚糖酶的菌株。实验结果表明, 烟曲霉是良好的产壳聚糖酶出发菌。烟曲霉液体发酵产壳聚糖酶最适培养基组成为: 壳聚糖 1%, KH_2PO_4 0.06%, 尿素 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, MgSO_4 0.012%, 20% 土豆汁 3%, NaCl 0.05%。在 pH 5.0、温度 28℃、摇床转速 120 r/min 培养条件下振荡培养 3 d, 烟曲霉产壳聚糖酶的能力最强, 达 25.1 U/mL。

关键词: 烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*); 壳聚糖酶; 液体发酵

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2006)02-0034-04

壳聚糖是甲壳素经脱乙酰化的产物, 是由 β -(1, 4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖单元和 β -(1, 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖单元组成的共聚物。壳聚糖广泛存在于虾、蟹和昆虫的外壳及藻类、菌类的细胞壁之中, 是迄今发现惟一的天然碱性多糖。由于壳聚糖分子质量大, 溶解性差, 在人体内不易被吸收而使它的应用受到极大限制。经降解得到的壳寡糖不仅有水溶性好、易吸收等优点, 还具有抗细菌、真菌, 调节机体免疫及抗癌等功能^[1, 2], 属功能性低聚糖。制备壳寡聚糖的方法主要有化学法和酶降解法, 化学法存在诸多缺点, 而酶降解法具有反应条件温和、寡糖得率高、不造成环境污染等优点, 是壳聚糖降解发展的主要方向。目前已发现 30 多种专一或非专一性酶可用于壳聚糖的降解。这些酶包括专一性水解酶如壳聚糖酶、几丁质酶; 非专一性水解酶如脂肪酶、溶菌酶、蛋白酶等^[3-5]。

Monaghan 等^[6]在研究细菌和真菌过程中, 首先提出壳聚糖酶(chitinase, EC3.2.1.99) 是一种不同于几丁质酶的新酶, 这种酶对胶态几丁质不水解, 但是能够降解几丁质脱乙酰化的壳聚糖, 所以它被认为是线性壳聚糖具有水解专一性的一种酶。目前已经在许多微生物中发现有壳聚糖酶的存在, 包括细菌、放线菌和真菌等。其中对细菌 *Bacillus* 属和放线菌 *Actinomyces* 属的许多菌株已经作了较多的研究。国内曾报道球孢白僵菌、假单胞菌、青霉菌产壳聚糖酶的研究^[7-9]。作者报道了烟曲霉产壳聚糖酶的条件研究, 有关此方面的研究尚未见报道。

1 材料与 方法

1.1 材料

1.1.1 壳聚糖

脱乙酰度 83.97%, 平均相对分子质量 4.9×10^4 。

1.1.2 烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)

广西农科院植物保护研究所提供。

1.1.3 培养基及培养条件

1.1.3.1 斜面种子培养基及培养条件

20% 土豆汁 100 mL, 葡萄糖 0.2 g, 琼脂 2 g; pH 6; 121℃ 灭菌 30 min, 冷却, 无菌检查培养 2 d, 取少量烟曲霉接入斜面种子培养基, 28℃ 下培养 5 d 后, 4℃ 冰箱保存待用。

1.1.3.2 选育平板培养基及培养条件

(1) KH_2PO_4 0.06%, 尿素 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, MgSO_4 0.012%, 20% 土豆汁 3%, NaCl 0.05%, 琼脂 2%; pH 5.5。(2) 1% 壳聚糖溶液 (pH 5.5)。(1) 与 (2) 分别在 121℃ 灭菌 30 min 后, 按 1:1 体积混合, 冷却, 无菌检查培养 2 d, 从斜面种子培养基中取少量烟曲霉至含壳聚糖成分的选育平板培养基中, 28℃ 下培养 5 d。

1.1.3.3 摇瓶发酵产壳聚糖酶培养基及培养条件

收稿日期: 2004-08-29; 修回日期: 2004-10-10

基金项目: 广西壮族自治区青年基金项目(桂科青 0481036); 广西壮族自治区教育厅资助项目(桂教科研 2002-316)

作者简介: 周 桂(1969), 女, 湖北宜昌人, 副教授, 主要从事天然产物的生物转化与应用研究, E-mail: zhouguigx@hotmail.com

摇瓶发酵产酶培养基除琼脂外,组成及配制方法同1.1.3.2,从选育平板培养基中取一定量烟曲霉接种于摇瓶发酵产酶培养基中,150 mL 摇瓶装液量 50 mL,温度 28℃,摇床转速 120 r/min,振荡培养产壳聚糖酶。

1.2 方法

1.2.1 还原糖含量的测定

采用 DNS 法测定^[10]。

1.2.2 壳聚糖酶活力的测定^[11]

定时从摇瓶发酵产壳聚糖酶培养基中取发酵液 3 mL,离心后取上清液(粗酶液)2 mL 与 1% 壳聚糖溶液 2 mL 混合,30℃ 下保温 30 min,调节混合液的 pH 8.0,离心除去沉淀,取上清液 1 mL,用 DNS 法测定还原糖含量,计算壳聚糖酶活力,以水解壳聚糖每分钟产生相当于 1 $\mu\text{mol/L}$ 氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量为一个单位(U)。

1.2.3 培养时间对烟曲霉产壳聚糖酶能力的测定

从选育平板培养基中取一定量烟曲霉接种于摇瓶发酵产酶培养基中,150 mL 摇瓶装液量 50 mL, pH 5.5, 28℃, 120 r/min 振荡培养,每隔 12 h 取样测定壳聚糖酶活力。

1.2.4 培养温度对烟曲霉产壳聚糖酶能力的测定

从选育平板培养基中取一定量烟曲霉接种于摇瓶发酵产酶培养基中,摇瓶装液量 50 mL, pH 5.5,在不同的温度下 120 r/min 振荡培养 3 d 后分别取样测定壳聚糖酶活力。

1.2.5 pH 值的变化对产酶能力的测定

调节摇瓶发酵产壳聚糖酶液体培养基的 pH 值分别为 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 从选育平板培养基中取一定量烟曲霉分别接种于摇瓶发酵产酶培养基中,150 mL 摇瓶中 50 mL 装液量, 28℃, 120 r/min。振荡培养 3 d 后取样测定壳聚糖酶活力。

1.2.6 摇瓶液体培养基装液量变化时产酶能力的影响实验

在 150 mL 的三角烧瓶中分别装入 30, 50, 70, 90 mL 同组成的产酶液体培养基,分别接入同量菌种, pH 5.0, 28℃, 120 r/min, 振荡培养 3 d 后取样测定壳聚糖酶活力。

1.2.7 添加氮源不同对产酶能力的影响实验

在平板培养基及摇瓶液体培养基中分别添加 0.2% 的尿素、蛋白胨、酵母膏作为不同的氮源,平板培养 4 d,分别接入同量菌种于含对应氮源的摇瓶中,150 mL 摇瓶装液量 50 mL, pH 5.0, 28℃, 120 r/min 振荡培养 3 d 后取样测定壳聚糖酶活力。

1.2.8 培养基中壳聚糖质量分数对产酶能力的影响

平板培养基及摇瓶液体培养基均分别采用 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% 的不同质量分数壳聚糖溶液。平板培养 4 d 后,取同量菌种接入对应壳聚糖溶液质量分数的摇瓶中,振荡培养 3 d 后取样测定壳聚糖酶活力。

2 结果与讨论

2.1 培养时间对烟曲霉产壳聚糖酶能力的影响

从图 1 可知,从培养的第 48 小时起菌种就显示明显的酶活力,到第 72 小时酶活力达到最大值,在随后的 24 h 内,酶活力有所下降,但下降趋势平稳,可能随着培养时间的延长,菌体的衰退,发酵液 pH 值的变化等,引起壳聚糖酶生物合成衰退。因此该菌种产酶最佳培养时间为 3 d。

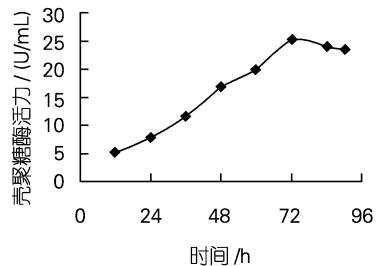


图 1 烟曲霉产壳聚糖酶过程曲线

Fig. 1 Time course of chitosanase production by *Aspergillus fumigatus*

2.2 培养温度对烟曲霉产壳聚糖酶能力的影响

由图 2 可知,该菌种在 28℃ 时的酶活力均明显大于 22, 32, 36℃ 时的酶活力,其酶活力在 28℃ 呈最大值, 32, 36℃ 时的酶活力均略小于 28℃ 的酶活力,小于 22℃ 及大于 36℃ 时酶活力很低。温度过低,菌丝生长缓慢,不利于产酶,温度过高,菌丝旺盛生长,产热较多,对酶的稳定性造成影响。

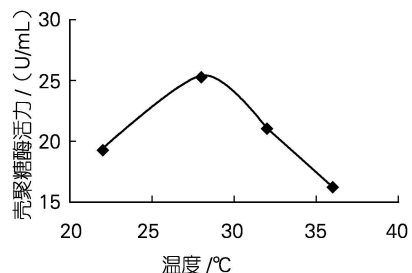


图 2 培养温度对烟曲霉产壳聚糖酶的影响

Fig. 2 The effect of temperature on chitosanase production by *Aspergillus fumigatus*

2.3 pH 值的变化对产酶能力的影响

由图 3 可知, pH 值在 4~ 5.5 之间的培养液其培养效果较好, 产酶能力较高, pH 5.0 时酶活力达峰值, pH 6.0 的弱酸性条件下其产酶能力则显著下降, 中性条件其产酶能力则远不及酸性条件。

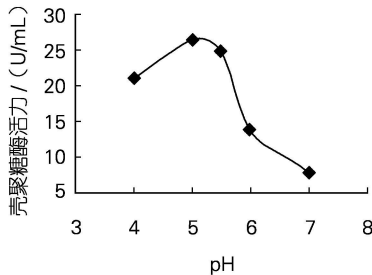


图 3 pH 对烟曲霉产壳聚糖酶的影响
Fig. 3 The effect of pH on chitosanase production by *Aspergillus fumigatus*

2.4 摇瓶液体培养基装液量变化时对产酶能力的影响。

由图 4 可知, 150 mL 三角瓶中 50 mL 的装液量时产酶活力达峰值, 装液量大于 70 mL 时产酶能力则有较明显的下降。当装液量较多时, 摇瓶振荡培养过程中不利于气、液、液、液传质, 液体培养基中的溶解氧难于满足细胞生长和产酶的需要。一般装液量约控制在低于摇瓶体积的 1/2。因此, 应充分利用三角烧瓶容积, 并考虑好氧菌的呼吸强度与产酶的需要。

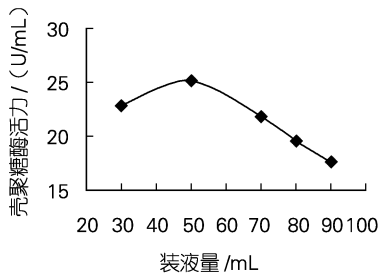


图 4 装液量对烟曲霉产壳聚糖酶的影响
Fig. 4 The effect of fermentation liquor volume on chitosanase production by *Aspergillus fumigatus*

2.5 添加氮源不同对产壳聚糖酶能力的影响

由图 5 可知, 对于该菌种而言, 在实验范围内, 将尿素作为培养基氮源, 其产酶能力较蛋白胨及酵母膏优越, 而蛋白胨及酵母膏的产酶效果无太大的差别, 因此, 在三者中, 尿素为最佳氮源。由此可见, 该菌种可能比较适合于小分子的有机氮源。

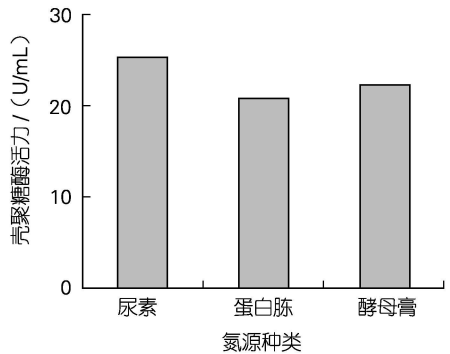


图 5 氮源对烟曲霉产壳聚糖酶的影响
Fig. 5 The effect of nitrogen on chitosanase production by *Aspergillus fumigatus*

2.6 培养基中壳聚糖质量分数对产壳聚糖酶能力的影响

由图 6 可知, 0.5%, 1.0% 的壳聚糖溶液对产酶能力的影响比较接近, 低质量分数壳聚糖溶液产酶效果较好, 其中 1.0% 的壳聚糖溶液产酶能力最佳。壳聚糖质量分数增大, 其黏度也增大, 这会影响发酵液的溶氧效果与传质效果。因此, 该菌种适宜壳聚糖质量分数为 0.5% ~ 1.0%。该菌种培养基组成可考虑采用 1.0% 壳聚糖溶液效果较好。

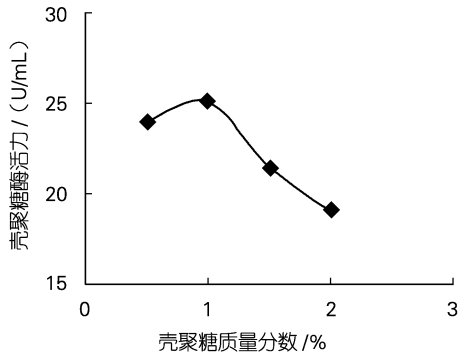


图 6 壳聚糖质量分数对烟曲霉产壳聚糖酶的影响
Fig. 6 The effect of chitosan concentration on chitosanase production by *Aspergillus fumigatus*

3 小结

真菌菌丝顶端表现出的有规律的生长, 是通过其细胞壁物质的合成与分解来实现的, 几丁质、脱乙酰几丁质(壳聚糖)等均为真菌细胞壁的常见成分, 壳聚糖酶与几丁质酶和几丁质合成酶等协同作用, 完成真菌细胞壁物质的合成与分解, 壳聚糖酶是一种诱导酶, 在真菌细胞正常代谢活动中, 微量合成或不合成。

而在适当底物存在下, 选择适合的菌种与培养条件, 加以一定的诱导手段, 壳聚糖酶将会大量合成。实验结果表明烟曲霉是良好的产壳聚糖酶的出发菌。

烟曲霉产壳聚糖酶的最佳培养条件为: 培养时间 3 d, 培养温度 28℃, pH 5.0, 150 mL 摇瓶中液体培养基装液量为 50 mL, 最佳氮源为尿素, 培养基中壳聚糖质量分数为 1.0%, 摇床转速为 120 r/min。烟曲霉在最佳培养条件下产壳聚糖酶能力达 25.1 U/mL。

参考文献:

[1] Ohtakara A. Microbial chitosanases: the degradation of chitosan and their application[J]. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1988, **62**(8): 49-52.
[2] Suzuki S. Immunopotentiating function of N-acetylchitooligosaccharides and chitooligosaccharides [J]. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1988, **62**(8): 41-43.
[3] Pantaleone D, Yalpani M, Scollar M. Unusual susceptibilities of chitosan to enzymatic hydrolysis[J]. *Carbohydr Res*, 1992, **237**: 325-332.

[4] Yalpani M, Pantaleone D. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis[J]. *Carbohydr Res*, 1994, **256**: 159-175.
[5] You J J, Kim S. Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system[J]. *Process Biochem*, 2000, **5**(6): 623-632.
[6] Monaghan R L, Eveleigh D E, Tewari R P. Chitosanases, a novel enzyme[J]. *Nature*, 1973, **245**(142): 78-80.
[7] 方祥年, 杜昱光, 黄秀梨, 球孢白僵菌高壳聚糖酶突变株的筛选[J]. *微生物学通报*, 2001, **28**(3): 60-64.
[8] 王钦宏, 蔡静平. 壳聚糖酶生产菌的筛选、鉴定及其产酶培养条件的研究[J]. *工业微生物*, 2000, **30**(4): 32-36.
[9] 葛正红, 曾嘉. 青霉菌产壳聚糖酶的分离纯化及性质研究[J]. *中国医药工业杂志*, 2002, **33**(8): 378-381.
[10] 张维杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999, 10-11.
[11] Uchida Y, Ohtakara A. Chitosanase from *Bacillus* sp. [J]. *Methods Enzymol*, 1988, **161**: 501-505.

Study on conditions of chitosanase from *Aspergillus fumigatus* by liquid fermentation

ZHOU Gui¹, HE Zeping², XU AN Jircai¹

(1. Chemistry and Ecological Engineering College, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China; 2. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Received: Aug., 29, 2004

Key words: *Aspergillus fumigatus*; chitosanase; liquid fermentation

Abstract: A mutant of *Aspergillus fumigatus*, which could synthesize chitosanase effectively under the optimized conditions, was obtained with selective nutrient mediums. The optimized liquid fermentation mediums were as follows: chitosan 1%, KH_2PO_4 0.06%, Urea 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, MgSO_4 0.012%, 20% potato juice 3%, NaCl 0.05%, and pH 5.0. After 3 days' fermentation at 120 r/min and 28℃, the chitosanase activity produced by the mutant of *A. fumigatus* reached a higher level of 25.1 U/mL.

(本文编辑: 张培新)