

文章编号:1000-0615(2001)03-0249-05

## 三相流化床生物反应器同时产酶 同时降解壳聚糖的研究

吕民主<sup>1</sup>, 吴绵斌<sup>2</sup>

(1. 杭州商学院生物环境与食品科学学院, 浙江 杭州 310035; 2. 浙江大学生物工程研究所, 浙江 杭州 310027)

**摘要:**采用多孔聚酯泡沫块固定里氏木霉,在三相流化床固定化反应器中同时产酶同时降解壳聚糖。结果表明,通过控制降解时间可以得到不同平均聚合度的降解物。在 28℃, pH4.8, 通气量 2.5vvm 条件下,重复利用菌丝降解 2% (w/v) 浓度壳聚糖。每批产生的壳聚糖酶活力平均达到 150 mU·mL<sup>-1</sup> 以上,壳聚糖平均降解率为 72% 以上。利用此固定化反应器,在 45 天内连续进行 15 批同时产酶降解试验,结果发现壳聚糖酶活和壳聚糖降解率能保持稳定。

**关键词:**里氏木霉;三相流化床生物反应器;产酶降解耦合过程

**中图分类号:**Q814.3 **文献标识码:**A

## Studies on simultaneous production of chitosanase and hydrolysis of chitosan in situ with a three-phase bubble column bioreactor

LV Min-zhu<sup>1</sup>, WU Mian-bin<sup>2</sup>

(1. College of Food Science, Biotechnology and Environmental Engineering,  
Hangzhou Institute of Commerce, Hangzhou 310035, China)

(2. Institute of Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

**Abstract:** *Trichoderma reesei* ATCC56764 was immobilized on pieces of porous polyurethane foam sheet and packed in a three-phase bubble column bioreactor for simultaneous production of chitosanase and hydrolysis of chitosan in situ. The average degree of polymerization of chitosan hydrolyzates could be regulated by reaction time. Under the repeated-batch process with 2% (w/v) soluble chitosan at pH4.8, 28℃, the activity of chitosanase for each batch was about 150 mU·mL<sup>-1</sup>, the average yield of reducing sugar as D-glucosamine reached 70%. The novel immobilized bioreactor system run stably and effectively in the successive 15 batches lasting 45 days without notable change in the activity and productivity.

**Key words:** *Trichoderma reesei*, three-phase bubble column bioreactor, simultaneous chitosanase production and hydrolysis of chitosan

壳聚糖是主要由 D-氨基葡萄糖以 β-1,4 键连接而成的多糖,在自然界中主要存在于某些真菌的细胞壁中,但可以通过几丁质脱乙酰大量得到。几丁质又称甲壳素,广泛存在于虾、蟹等甲壳动物的

收稿日期:2001-03-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(29876036)

第一作者:吕民主(1964-),男,浙江杭州人,硕士,讲师,主要从事生物技术研究。E-mail:lmz@hn-bio.com

外壳中,资源丰富,是自然界中第二大可再生资源。但是它的应用却被忽视,造成资源浪费,并污染环境<sup>[1]</sup>。近年来,由于发现壳聚糖的降解物——壳聚寡糖具有抗细菌<sup>[2]</sup>、抗真菌<sup>[3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4]</sup>以及免疫激活<sup>[5]</sup>等一系列重要的生理作用,它们的作用日益引起人们的重视。壳聚寡糖可以通过酸水解或酶降解的方法得到。酸水解作为传统的制备壳聚寡糖方法,由于降解得率低、产物分离困难以及环境污染等问题,其应用日益受到限制<sup>[6]</sup>。而酶法降解通常包括壳聚糖的生产及壳聚糖降解两个主要过程。由于各自在不同反应条件下进行总的生产周期较长,设备投资大,经济成本较高<sup>[7]</sup>。

在本工作中,我们将传统的酶法降解技术作了改进,把壳聚糖酶的生产 and 壳聚糖的降解耦合在三相流化床固定化反应器中进行,并考察了该反应器长期运行的稳定性。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

里氏木霉 (*Trichoderma reesei* ATCC56764), 本实验室保藏,保存在马铃薯琼脂(PDA)斜面上。

### 1.2 壳聚糖

壳聚糖从玉环海洋生物工程公司购买,平均分子量为 30 000,壳聚糖的脱乙酰度为 88.7%。

### 1.3 培养基

生长培养基( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):葡萄糖 10,蛋白胨 1.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.4, 尿素 0.3,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0,  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.4,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3, 吐温 80 1.0, 微量元素盐 1mL。pH 用  $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柠檬酸缓冲液调至 4.8。微量元素盐( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )为  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5.0,  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$  1.6,  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.4,  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  3.7。

产酶与发酵培养基( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):可溶性壳聚糖<sup>[8]</sup>(脱乙酰度 88.7%) 20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0,  $\text{CaCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$  0.4,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3, 吐温 80 1~2, 微量元素盐 1 mL, pH 用  $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  醋酸缓冲液调 4.8。

以上培养基都在  $121^\circ\text{C}$  下灭菌 30min。

### 1.4 固定化反应器

固定化反应器为带有恒温水夹套的玻璃柱反应器( $\varphi 100\text{mm}\times 650\text{mm}$ ),固定化反应器底板为直径 5mm 的多孔筛板,筛孔分布均匀。将 6 克左右的多孔聚酯载体(大小为  $2\text{cm}\times 1\text{cm}\times 1\text{cm}$ ,空隙率大于 90%)置于反应器柱体中,吸附固定里氏木霉菌丝,反应器的工作体积为 1.5~2 L(图 1)。

### 1.5 里氏木霉的固定和壳聚糖的降解

按 10%(v/v)的比例接入里氏木霉的孢子悬液,使生长培养基中的孢子浓度达到  $10^6$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。然后在  $30^\circ\text{C}$ 、通气量 1.5~2 vvm 条件下培养。至菌丝在载体上固定化完全后,用  $\text{pH}4.8$   $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  醋酸缓冲液洗涤菌丝数次。随后,在反应器中加入已灭菌的产酶和发酵培养基进行同时产酶降解试验。反应条件为通气量 2.5 vvm,反应温度为  $28^\circ\text{C}$ 。在重复分批降解试验中,当前一批培养完成后,用  $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  醋酸缓冲液清洗菌丝数次后,再接入下一批产酶和发酵培养基。

$$\text{壳聚糖降解率}(\%) = \frac{\text{以氨基葡萄糖计的还原糖浓度}(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}) \times 161.16}{\text{初始壳聚糖浓度}(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}) \times 179.17} \times 100$$

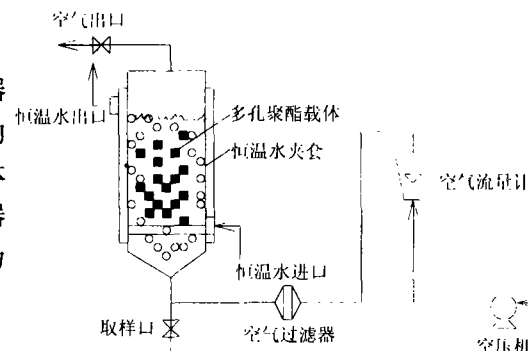


图 1 固定化反应器装置

Fig. 1 Immobilized-cell bioreactor system

## 1.6 分析方法

壳聚糖酶活的测定参照 Uchida 法<sup>[8]</sup>。以 D-氨基葡萄糖计的还原糖的测定采用 DNS 法<sup>[9]</sup>。氨基糖胺浓度的测定采用 Ehrlich 法<sup>[10]</sup>。降解物平均分子量的测定参照 Maghami 法<sup>[11]</sup>。测定菌体干重时,将已知重量的固定化载体和吸附在其上的菌丝 80℃ 烘干至恒重,扣除载体重量,即为菌体干重。D-氨基葡萄糖的测定用 Waters 510 高效液相色谱测定,糖柱为 Shodex SCI011。流动相采用超纯水,流速为 0.5 mL·min<sup>-1</sup>,检测器为 Waters 410 示差折光检测器。

## 2 结果与讨论

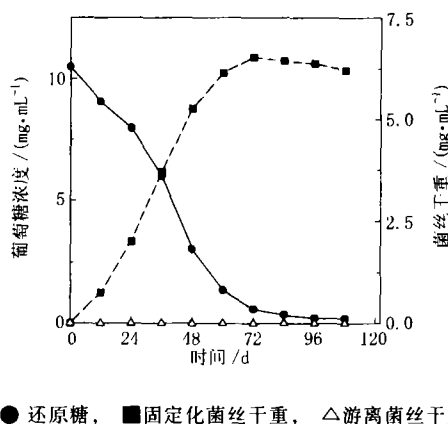
### 2.1 三相流化床反应器的开发

以多孔聚酯载体(PPF)作为固定化载体的三相流化床反应器。采用多孔聚酯作载体,菌丝不仅可以吸附在载体表面,而且还可以包络在载体中,这大大增加了单位质量载体吸附的菌丝量。此外,PPF 载体的网隔又对菌丝起到一定的过滤作用,既有利于保持菌丝活性,又能使衰老自溶的菌丝碎片通过网隔而自动脱落。而且 PPF 为疏水性材料,新生的菌丝又可在载体上重新生长。

在通气培养过程中,空气通过罐底的筛板导入,使反应器处于流化状态,这样 PPF 载体为固定的菌丝提供了较大的气液固接触的比表面积,使包络在其中的菌丝得到了充分的氧供应,这非常有利于好氧的丝状菌生长。

### 2.2 里氏木霉菌丝的固定化

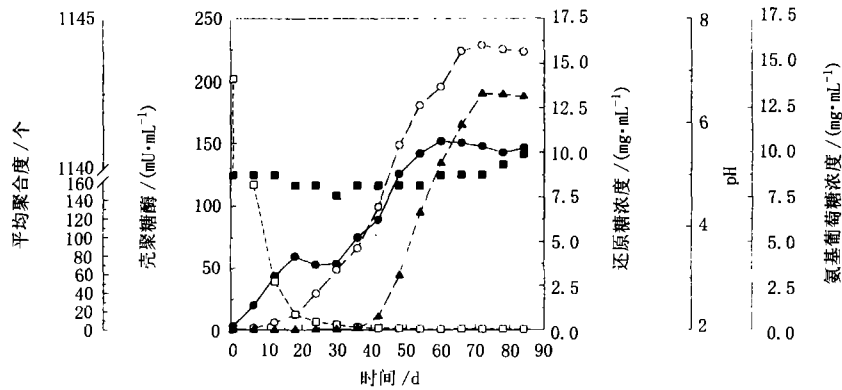
里氏木霉孢子悬液接入反应器后,分生孢子能迅速地吸附在多孔聚酯泡沫块上。大约经过 6h 左右的培养,孢子开始萌发,菌丝开始在载体表面上生长。如图 2 所示,经过 72h 培养菌体量达到最大,每克载体上所固定的菌体量达到 1.07g,每升培养基中菌体干重大约为 6.43g。在强制通气情况下,反应器已处于流化状态,对菌体的供氧充分,而且又不受剪切力的影响,因此大大增加了活性菌丝的数量。扫描电镜观察,此时菌丝体已形成较密的网络结构,生长旺盛,并与载体紧密结合。此后,由于碳源基本消耗完全,菌体生长进入了稳定期,菌量不再增加。如图 2,在菌丝体的培养过程中基本没有发现有泄漏情况存在。



● 还原糖, ■ 固定化菌丝干重, △ 游离菌丝干重  
图 2 里氏木霉在多孔聚酯泡沫上的吸附固定进程  
Fig. 2 The immobilization course of *T. reesei* mycelia

### 2.3 固定化里氏木霉同时产酶降解壳聚糖

同时产酶降解壳聚糖的过程如图 3 所示,还原糖浓度随着壳聚糖酶活力的增加而提高,培养 60h 后壳聚糖酶活力达到最大,152.3 mU·m·L<sup>-1</sup>,还原糖浓度在培养 72h 后达到最大,17.06 mg·m·L<sup>-1</sup>,之后糖浓度有所下降,直至培养结束。由于采用营养限制性培养基,壳聚糖降解物(氨基葡萄糖及氨基寡糖)并不能被里氏木霉大量消耗用于菌丝的生长,但是它们作为碳源可以维持菌体的生长并保持其活性,并且诱导壳聚糖酶的合成。降解物的平均分子量,即平均聚合度(ADP)在培养初始阶段快速降低,这说明壳聚糖酶以内切方式切割 β-1,4 糖苷键,同时在降解的初始阶段,降解物中的氨基单糖含量很低。因此若能控制好培养时间,就可以得到不同平均聚合度的降解产物。



●壳聚糖酶, ○还原糖, ■pH, □平均聚合度, ▲氨基葡萄糖

图3 固定化里氏木霉同时产酶降解壳聚糖

Fig.3 Time course of simultaneous chitosanase production and hydrolysis of chitosan with immobilized *T. reesei*

同时产酶降解同用壳聚糖酶粗酶液直接降解的结果相比较见表1,虽然前者降解的周期较长,但考虑到产酶时间需6d<sup>[12]</sup>,实际上总反应周期明显缩短,而且反应条件温和且降解率基本相同。因此,同时产酶降解无论在技术上还是在经济上都具有传统酶解方法所不可替代的优势。

表1 两种不同壳聚糖降解方法的比较

Tab.1 Comparison of two different chitosan degradation methods

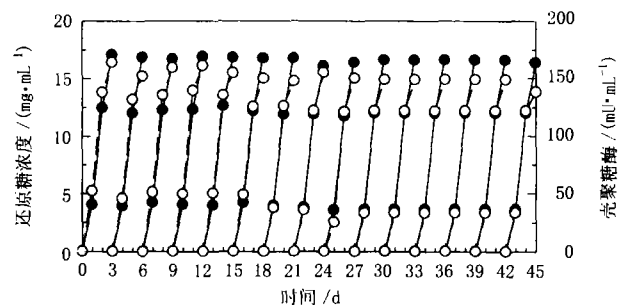
降解工艺	壳聚糖初始浓度 (%)	壳聚糖酶活 ( $\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	反应温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	降解时间 (h)	最大降解率 (%)	总降解时间 (d)
同时产酶降解	2.02	152.3*	28	72	71.9	6(3)* <sup>3</sup>
产酶和酶解分步进行	2.02	153.6* <sup>2</sup>	50	48	71.6	8

注: \* 最大壳聚糖酶活力; \* 2 初始壳聚糖酶活力; \* 3 括号中指菌丝重复利用时降解时间。

## 2.4 固定化里氏木霉重复分批降解壳聚糖

重复分批降解试验的壳聚糖初始浓度为2% (w/v), 每批周期为3d, 重复15批, 共45d。在培养过程中发现菌丝生长一直比较好, 与载体紧密结合, 培养液中因衰亡而脱落的游离菌丝量很少。壳聚糖的降解得率以及壳聚糖酶活力也一直保持相对稳定。在每批降解中, 壳聚糖酶活力平均可达到 $150\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右, 降解率也可达到72%以上(图4)。

在三相流化床固定化反应器中, 不仅菌丝所受的剪切力小, 而且反应器中溶氧浓度高, 菌丝体与氧气的接触面积大, 这些都有利于保持菌丝的活性。在重复分批培养过程中, 菌丝可以很好地附着在载体上连续地生长, 而衰老和死亡的菌丝又可从载体上脱落而随收获的每一批降解液被移去, 这样不但使菌体量保持着一定的平衡状态, 而且能使菌体持续保持较高的产酶能力。同时, 降解反应时环境的pH也相对较低, 因此每批操作中染菌的可能性也大大降低, 这些都提高了反应器长期运行的稳定性。



●还原糖浓度, ○壳聚糖酶活力

图4 固定化里氏木霉重复间歇降解壳聚糖的时间进程

Fig.4 Time course of simultaneous chitosanase production and hydrolysis of chitosan with repeated utilization of immobilized *T. reesei*

### 3 结论

采用固定化里氏木霉同时产酶降解壳聚糖可省去产酶过程,而且由于可以重复利用菌丝,因此壳聚糖降解周期缩短为 3d,与传统的两步法降解相比,新工艺的降解效率大大提高。此外从工业化角度分析,该方法具有设备投资小、工艺流程简单、培养基成本低等特点,有利于进行连续操作,实现计算机自动化控制。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Austion P R, Brine C J, Castle J E, et al. Chitin: New facets of research[J]. *Science*, 1981, 212:749 - 753.
- [ 2 ] Amako K, Shimodori S. Effects of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53:603 - 605.
- [ 3 ] Allan C R, Hadwiger L A. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition[J]. *Exp Microb*, 1979, 3:285 - 287.
- [ 4 ] Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, et al. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose against Meth-A solid tumor[J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36:784 - 790.
- [ 5 ] Hoffman J, Johansen A, Steiro K. Chitooligosaccharides stimulate atlantic salmon, *Salmo salar* L. head kidney leukocytes to enhanced superoxide anion production in vivo[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 118B:105 - 115.
- [ 6 ] Horowitz S T, Roseman S, Blumenthal H J. Preparation of glucosamine oligosaccharides (I)Separation[J]. *J Am Chem Soc*, 1957, 79:5046 - 5049.
- [ 7 ] Izume M, Ohtakara A. Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan[J]. *Agric Biol Chem*, 1987, 51(4), 1189 - 1191.
- [ 8 ] Uchida Y, Ohtakara A. Chitosanase production from *Bacillus species*[J]. *Methods in Enzymol*, 1988, 161:501 - 505.
- [ 9 ] Miller G L. Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Anal Chem*, 1959, 31:426 - 428.
- [ 10 ] Rondle C J M, Morgan W T J. Determination of glucosamine and galactosamine[J]. *Biochem J*, 1955, 61:586 - 589.
- [ 11 ] Maghami G G, Roberts G A F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan[J]. *Makromol Chem*, 1988, 189(1): 195 - 200.
- [ 12 ] Nogawa M, Takahashi H, Kashiwagi A, et al. Purification and characterization of exo- $\beta$ -D-g lucosaminidase from a cellulolytic fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(3):890 - 895.