

螺旋纤维床固定化生物反应器同时产酶降解壳聚糖的研究

吴绵斌 夏黎明 岑沛霖*

(浙江大学生物工程研究所 杭州 310027)

摘 要 采用多孔聚酯泡沫固定里氏木霉,在鼓泡柱固定化反应器中同时产酶降解壳聚糖。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产物。在 28℃,pH4.8,通气量 3vvm 条件下,利用固定化反应器,在 30d 内连续进行 10 批同时产酶降解试验,结果发现壳聚糖酶活力和壳聚糖降解率能保持稳定。每批产生的壳聚糖酶活力平均达到 0.15u/mL 以上,壳聚糖平均降解率为 73%。

关键词 里氏木霉 螺旋纤维床 固定化生物反应器 产酶降解耦合过程

中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0368-05

近年来由几丁质和壳聚糖降解而形成的甲壳寡糖具有抗细菌^[2]、抗真菌^[3]、抗肿瘤^[4]以及免疫激活^[5]等一系列重要的生理作用,已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^[6]由于得率低、产物分离困难以及环境污染等问题,其应用受到限制。酶法降解通常包括壳聚糖酶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,成本较高。

本工作我们将壳聚糖酶的生产 and 壳聚糖的降解耦合在固定化反应器中同时进行,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*)本实验室保藏,保存在 PDA 斜面上。

1.2 培养基

生长培养基(g/L):葡萄糖 10,蛋白胨 1,(NH₄)₂SO₄ 1.4,尿素 0.3,KH₂PO₄ 2.0, CaCl₂·2H₂O 0.4, MgSO₄·7H₂O 0.3,吐温 80 1.0,微量元素 1mL。pH 用 1mol/L 柠檬酸缓冲液调至 4.8。微量元素(g/L):FeSO₄·7H₂O 5.0, MnSO₄·H₂O 1.6, ZnSO₄·7H₂O 1.4, CoCl₂·6H₂O 3.7。

营养限制培养基:可溶性壳聚糖^[7](脱乙酰度

88.7%) 20, KH₂PO₄ 2.0, CaCl₂·2H₂O 0.4, MgSO₄·7H₂O 0.3,吐温 80 1~2,微量元素 1 mL, pH 用 1mol/L 醋酸缓冲液调至 4.8。

以上培养基都在 121℃ 下灭菌 30min。

1.3 固定化反应器

本试验所用固定化反应器如图 1 所示,为带有恒温水夹套的玻璃柱反应器(φ100mm×650mm),将 8.6g 多孔聚酯泡沫(厚 5mm,空隙率大于 90%)用不锈钢丝网固定成螺旋状,置于反应器柱体,反应器底板是直径为 5mm 的多孔筛板,筛孔分布均匀。反应器的工作体积为 1.6L。

1.4 里氏木霉的固定化和壳聚糖的降解

按 5% 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 10⁶ 个/mL。在 30℃、通气量 1.5vvm 条件下培养,至菌丝在载体上固定完全后,用 pH4.8 0.05mol/L 醋酸缓冲液洗涤 3 次。接着,在反应器中加入已灭菌的营养限制培养基进行同时产酶降解试验。反应条件为通气量 3vvm 28℃ 培养 12h,至培养基粘度下降后,通气量减小为 1.5vvm。在重复分批试验中,当前一批试验完成后,用 0.05mol/L 醋酸缓冲液清洗菌丝 3 次后,再接入下一批营养限制培养基,如此反复进行。壳聚糖降解率(%)=

$$\left(\frac{\text{以氨基葡萄糖计的还原糖浓度}(\text{mg/mL}) \times 161.16}{\text{初始壳聚糖浓度}(\text{mg/mL}) \times 179.17} \times 100 \right)$$

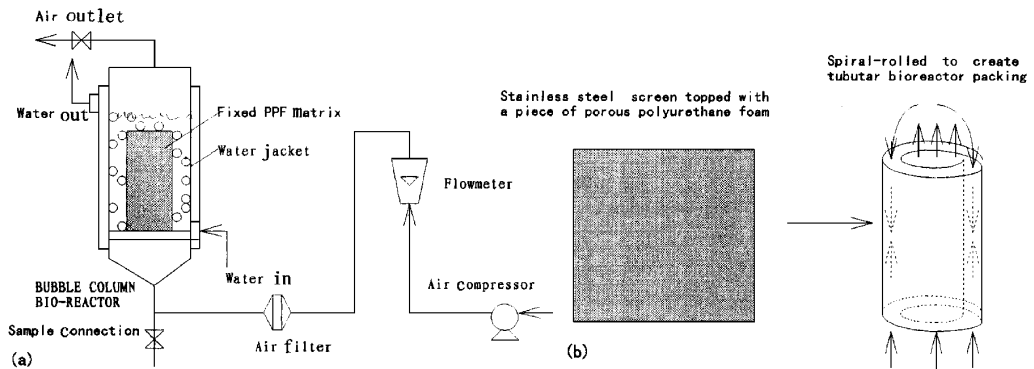


图 1 固定化反应器装置图

Fig. 1 Immobilized-cell bioreactor system

(a) Reactor system (b) Construction of spiral wound fibrous matrix

1.5 分析方法

1.5.1 壳聚糖酶活的测定：参照 Uchida 法^[7]，每分钟产 $1\mu\text{mol}$ 氨基葡萄糖为 1 个壳聚糖酶活力单位。

1.5.2 还原糖的测定：采用 DNS 法^[8]，以 *D*-氨基葡萄糖为标准。

1.5.3 氨基糖胺浓度的测定：采用 Ehrlich 法^[9]。

1.5.4 降解物分子量的测定：参照 Maghami 法^[10]。

1.5.5 菌体干重的测定：将已知重量的固定化载体和吸附在其上的菌丝于 80°C 烘干至恒重，扣除载体重量，即为菌体干重。

1.5.6 *D*-氨基葡萄糖的测定：用 Waters510 高效液相色谱测定，色谱条件：糖柱为 Shodex SC-1011。流动相：超纯水。流速： $0.5\text{mL}/\text{min}$ 。检测器：Waters 410 示差折光检测器。

2 结果与讨论

2.1 固定化反应器的开发

本试验研究了以多孔聚酯泡沫 (PPF) 为固定化载体的螺旋纤维床固定反应器 (Convolved fibrous bed bioreactor, CFBB)。采用如图 1. b 所示的螺旋状结构载体，可以大的表面积吸附菌丝，亦可包络生长其中的菌丝。改变多孔载体的厚度可以控制反应体系的传质速率。载体之间螺旋形的空隙，使空气和代谢产生的 CO_2 可以自由地向上流动，这样在罐底进料中就不存在大压降的影响。衰老和死亡的菌丝也可从载体上脱落至反应器底部。由于 PPF 为疏水性材料，新生的菌丝又可在载体上重新生长。此外，PPF 材料的网络对菌丝又起到过滤作用，既有利于保持活性菌丝，又使衰老自溶的菌丝碎片通过网络而自动脱落。

在通气培养过程中，反应器的工作情况类似于

气升式反应器，空气通过螺旋状固定化载体之间的空隙向上流动，而培养液则沿固定化载体向下流动，这样 PPF 载体为菌丝吸附提供了较大的比表面积，从而形成良好的气液固三相接触。此外，实验所用 PPF 载体的空隙率大于 90%，这样也大大提高了反应器的工作体积。

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卷上。大约经过 6~8h 的培养，孢子萌发，菌丝开始多孔聚酯泡沫表面上生长。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量达到 1.26g，每升培养基中菌体干重大约为 6.78g。经扫描电镜观察，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，菌量不再增加。在培养过程中没有发现培养液中有游离菌丝的存在。

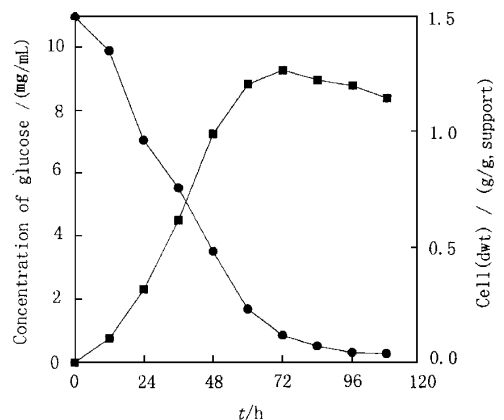


图 2 里氏木霉在多孔聚酯泡沫上的吸附固定进程

Fig. 2 The immobilization course of

Trichoderma reesei mycelia

在相同培养条件下,与搅拌转速为 200r/min(在此转速下菌体生长最好)的 B. Braun BIOSTAT B 5L 通气搅拌罐中游离细胞培养结果相比,菌量高约 20%。观察发现固定化反应器中气体分散情况很好,气泡细微,在固定化载体表面密集分布,从而大大改善了菌体的供氧状况。从溶氧情况的比较也可发现(见图 3),固定化反应器中溶氧低点的出现要

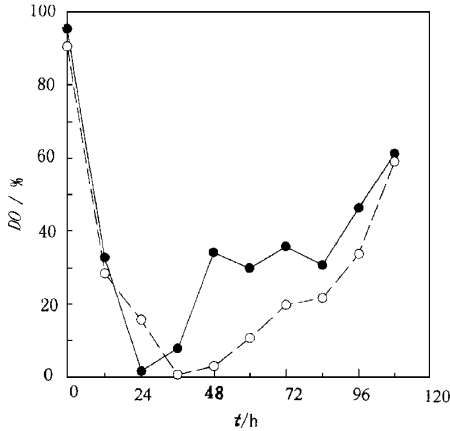


图 3 培养液中溶氧浓度随时间的变化曲线

Fig. 3 Dissolve oxygen concentration varied with time

● Immobilized bioreactor ; ○ CSTR

比传统的搅拌罐早 12h 出现。由于体系中的溶氧水平主要由耗氧和供氧的相对大小所决定,而在相同的培养条件下耗氧量一般不会有很大区别。因此可以认为在固定化反应器中溶氧水平优于通气搅拌罐。而且,在固定化反应器中,菌丝不仅生长于载体表面,而且深入载体里面,并与此紧密缠结,这大大增加了菌体与培养基和空气的接触面积,促进了它们之间的物质传递。降低剪切力造成的损害,也增加了活性菌丝的数量。

2.3 固定化里氏木霉产酶降解壳聚糖

同时产酶降解壳聚糖的过程如图 4 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为 158mu/mL,还原糖浓度在培养 72h 后达到最大为 16.48mg/mL,之后基本保持稳定直至培养结束。在培养过程中发现载体吸附的菌量基本维持不变,这可能是由于采用营养限制性培养基,壳聚寡糖降解物不能被里氏木霉大量消耗用于菌丝的生长,但是它可以维持菌体生长的动态平衡并保持菌丝的活性,诱导壳聚糖酶的合成。

同时产酶降解同传统酶降解的结果相比较(见表 1),前者所需的最适反应温度明显降低,降解率

表 1 两种不同壳聚糖降解方法的比较

Table 1 Comparison of two different chitosan degradation methods

Degradation method	Concentration of soluble chitosan / %	Chitosanase activity / (mu/mL)	Optimum temperature / °C	Total period / d	Degradation period / d	Maximum degradation efficiency / %
Simultaneous enzyme production and hydrolysis	2.05	158.4 ^a	28	6(3) ^d	3	73.9
Traditional enzymatic hydrolysis	2.05	155.6 ^b	50	5~6 ^e	2	72.6

Note ^aMaximum chitosanase activity ^bInitial chitosanase activity ^cIncluding immobilization of mycelia and chitosan degradation ^dRepeated utilization of mycelia ^eIncluding chitosanase production and degradation of chitosan.

略有提高。由于固定化菌丝不仅生长在载体的表面而且深入基质内部,这大大增加了菌丝与可溶性壳聚糖的接触面积,同时由于壳聚寡糖可以进入细胞的周质空间^[11],促进了部分定位于此的壳聚糖酶也参与了酶解。而且,在同时产酶降解工艺中,壳聚糖酶活力能保持稳定,从而显示了良好的降解效果。

2.4 里氏木霉产酶降解壳聚糖机制的初步探讨

里氏木霉产生的壳聚糖酶为诱导酶^[12]。采用同时产酶降解工艺,由于菌体已生长完全,作为次级代谢产物的壳聚糖酶可以被壳聚糖诱导立即产生,因此培养开始后酶活就快速上升(如图 4),12h 后已达到 51.4mu/mL。但在培养中期(12~30h)壳聚糖酶活力的提高并不明显。此后,壳聚糖酶的活力才开始升高。类似现象在木质纤维的酶降解中也存

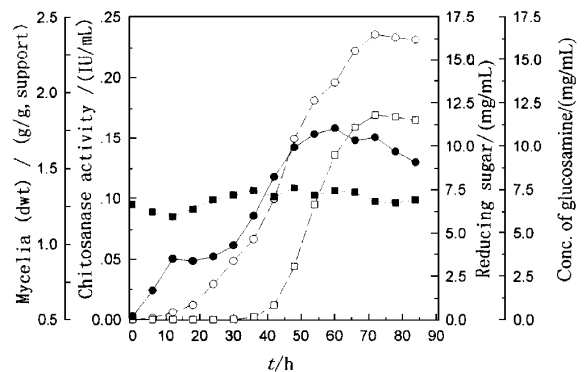


图 4 固定化里氏木霉同时产酶降解壳聚糖

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

● Chitosanase ; ○ Reducing sugar

■ Dry weight of mycelia ; □ D-Glucosamine
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

在。夏黎明等^[12]在研究纤维素酶解过程中,发现降解初期纤维素酶被固体底物吸附而引起游离酶活降低,随着底物被水解,酶蛋白又被解吸附回到液相,引起酶活的上升。在可溶性壳聚糖的酶解过程中是否存在类似的机理还有待更深入的研究。

从壳聚糖的降解结果来分析,虽然同时产酶降解工艺降解率与传统酶解法相比有提高,但实际降解率同纤维素降解得率^[13]相比并不高。降解物的 HPLC 图谱(图 5)显示,降解液中基本只有单糖和二糖,其它寡糖的浓度已相当低。此时还原糖浓度不再上升的主要原因是高浓度氨基葡萄糖对外切-氨基葡萄糖糖苷酶(exo- β -D-glucosaminidase)具有较大的抑制作用^[14],氨基二糖不能再被降解为氨基葡萄糖,因此还原糖浓度上升不明显。

壳聚糖及其降解物的平均聚合度(ADP)在培养初始阶段快速降低(图 6),降解物的 HPLC 图谱也显示,在同时产酶降解的初期,壳聚糖水解液中的氨基单糖含量几乎测不出,显示壳聚糖酶主要以内切

方式切割 β -1,4 糖苷键。这对于壳聚寡糖的生产具有重要的意义,只要控制培养时间就可以得到某一平均聚合度的壳聚寡糖。

2.5 固定化里氏木霉重复分批降解壳聚糖

重复分批降解试验每批周期为 72h,重复 10 批,共 30d。在培养过程中发现菌丝生长一直比较好,与载体紧密结合(见图 7),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,壳聚糖酶活力可达到 0.15IU/mL 以上,降解率也可达到 73%(见图 8)。

在该固定化反应器中,菌丝不仅所受剪切小,而且反应器中溶解氧浓度高,菌丝体与氧的接触面积大,这些有利于保持菌体的活性。特别在重复培养过程中,菌丝可以附着在 PPF 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,而且能使菌体保持持续的活性。此

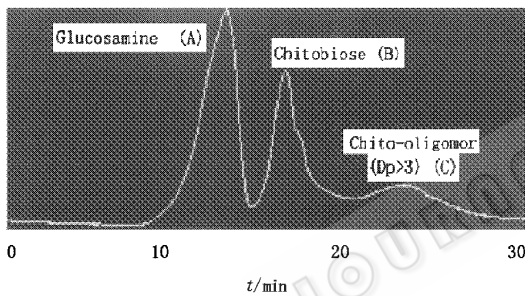


图 5 壳聚糖水解液的高效液相色谱图

Fig. 5 HPLC pattern of hydrolyzate derived from soluble chitosan

A. Glucosamine B. Chitobiose C. Chito-oligomer(DP>3)

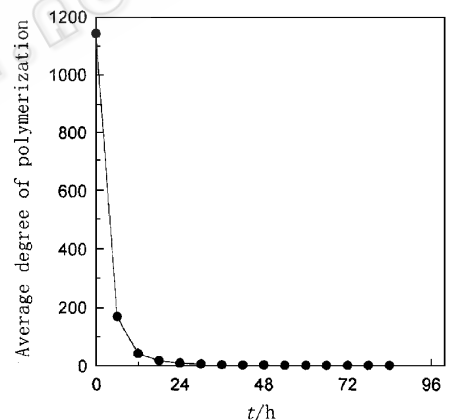


图 6 壳聚糖平均聚合度随时间的关系

Fig. 6 Effect of degradation time on ADP of soluble chitosan

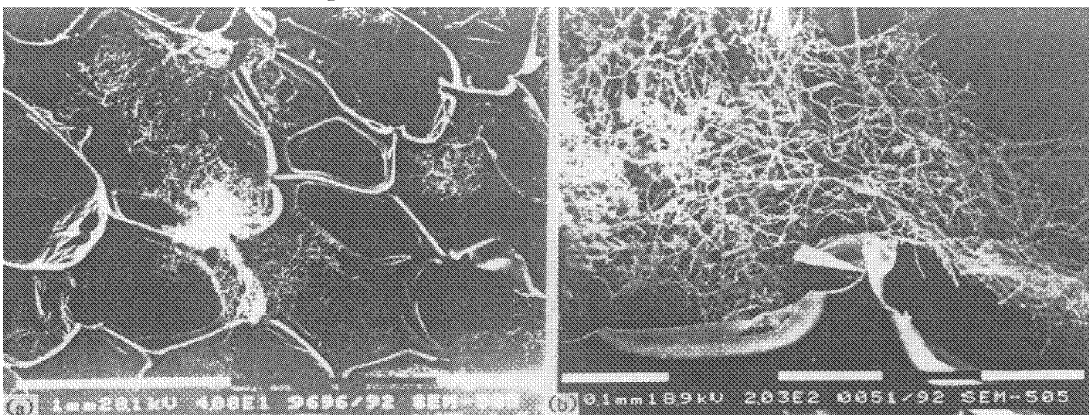


图 7 重复利用 30d 后的固定化里氏木霉载体的扫描电镜照片

Fig. 7 SEM potographs of immobilized *Trichoderma reesei* after used for 30 days

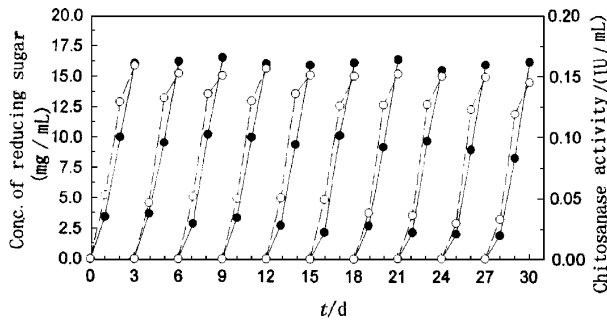


图 8 固定化里氏木霉重复间歇降解壳聚糖的时间进程

Fig. 8 Time course of simultaneous chitosanase production and hydrolysis of chitosan with repeated utilization of immobilized mycelia of *T. reesei* R1
 ● Reducing sugar ○ Chitosanase activity

外,该固定化反应器也不会像固定床反应器和膜反应器,由于菌体生长旺盛造成反应器堵塞以及压降的突然升高。同时,降解反应的 pH 为 4.8,因此每一批操作中染菌的可能性也大大降低了,这些都提高了反应器长期运行的稳定性。

重复利用菌丝同时产酶降解壳聚糖,由于省去了菌丝培养,降解周期只需 3d(表 1),同传统的两步法降解相比,由于产酶一般需要 3~4d^[11,15],因此新工艺总的水解周期将大大缩短。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。为了进一步提高降解率,下一步工作将考虑将产物的分离与同时产酶降解耦合进行,以消除降解终产物对壳聚糖酶的抑制和阻遏作用。

参 考 文 献

- [1] Austion P R, Brine C J, Zikakis J P. *Science*, 1981, **212**: 749~753
- [2] Amako K, Shimodori S, Imoto T *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**: 603~605
- [3] Allan C R, Hadwiger L A. *Exp Microb*, 1997, **3**: 285~287
- [4] Tokoro A, Tatewadi N, Suzuki K *et al.* *Chem Pharm Bull*, 1988, **36**: 784~790
- [5] Hoffman J, Johansen A, Steiro K *et al.* *Comp Biochem Physiol*, 1997, **118B**: 105~115
- [6] Horowitz S T, Roseman S, Blumenthal H J. *J Am Chem Soc*, 1957, **79**: 5046~5049
- [7] Uchida Y, Ohtakara A. *Methods in Enzymol*, 1988, **161**: 501~505
- [8] Miller C L. *Anal Chem*, 1959, **31**: 426~428
- [9] Rondle C J M, Morgan W T J. *Biochem J*, 1955, **61**: 586~589
- [10] Maghami G G, Roberts G A F. *Makromol Chem*, 1988, **189**: 195~200
- [11] Bassler B, Lee C, Yu Y C, Rosseman S. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 24276~24286
- [12] Nogawa M, Takahashi H, Kashiwagi A *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 890~895
- [13] 夏黎明, 代淑梅, 岑沛霖. *微生物学报*, 1998, **38**(2): 114~119
- [14] Sakai K, Katsumi R, Isobe A *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, **1079**: 65~72
- [15] Yoshihara K, Hosokawa J, Kubo T *et al.* *Agric Biol Chem*, 1990, **54**: 3341~3343

Studies on Simultaneous Production of Chitosanase and Chitosan Degradation *in situ* with *Trichoderma reesei* in Convuluted Fibrous Bed Bioreactor

WU Mian-Bin XIA Li-Ming CEN Pei-Lin

(Institute of Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract The cells of *Trichoderma reesei* were immobilized on a roll of porous polyurethane foam sheet and packed in a bubble column bioreactor for simultaneous production of chitosanase and degradation of chitosan *in situ*. The average degree of polymerization could be regulated by reaction time. Under the repeated-batch process with 2% soluble chitosan at pH 4.8, 28°C, the activity of chitosanase for each batch was above 0.15 IU/mL, the average yield of reducing sugar as D-glucosamine reached 73%. The novel immobilized bioreactor system run stably and effectively in the successive 10 batches lasting 30 days without notable change in the activity and productivity.

Key words *Trichoderma reesei*, convuluted fibrous bed bioreactor, chitosanase production and hydrolysis of chitosan