

螺旋纤维床固定化反应器两步法生产壳聚糖酶

吴绵斌¹ 黄 萍²

(¹ 浙江大学材料与化工学院生物工程研究所 杭州 310027)

(² 浙江大学药学院 杭州 310031)

摘 要 采用了菌体生长与产酶分步的新工艺利用里氏木霉(*Trichoderma reesei*) ATCC56764 生产壳聚糖酶,酶活力比在相同条件下进行的一步法产酶提高了 1.7 倍。采用此工艺在螺旋纤维床生物反应器中进行产酶试验,酶活比采用游离细胞培养又提高了 39%,达到 0.246 U/mL。固定化菌丝还能够长期保持活性,在重复分批操作中,经过 10 批共 15 天的产酶实验,平均每批的酶活保持在 0.235 U/mL 左右。

关键词 里氏木霉,固定化菌丝,螺旋纤维床生物反应器,壳聚糖酶

中图分类号:Q814 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2003)06-0764-05

里氏木霉在以葡萄糖为碳源的情况下,菌丝生长较其它碳源更为良好,并能产生少量组成型壳聚糖酶,但只有在氨基葡萄糖存在的情况下,才能诱导产生高活力壳聚糖酶。当浓度提高到某一范围以后,氨基葡萄糖也会阻遏壳聚糖酶的生物合成。这种现象在壳聚糖酶生产中较为普遍,很多人^[1,2]采用孢子直接接入诱导培养基的方法生产壳聚糖酶,这样虽然能诱导产生壳聚糖酶,但培养时间长。而且由于缺乏足够的营养元素及合适碳源,菌体会生长不好,酶活力不能得到充分提高。

本文在对菌体生长和产酶分离的两步法生产壳聚糖酶培养条件进行优化的基础上,重点对采用螺旋纤维床固定化生物反应器(Convoluted fibrous bed bioreactor, CFBB)生产壳聚糖酶进行研究。

1 材料和方法

1.1 培养基

1.1.1 菌株 里氏木霉(*Trichoderma reesei*) ATCC56764,本实验室保藏,斜面培养采用 PDA 培养基,28℃培养 72h。

1.1.2 菌丝生长培养基 每升含葡萄糖 50g,蛋白胨 2g,营养盐溶液 100 mL, Mandels 微量元素溶液 1mL, 0.05mol/L 柠檬酸缓冲液调 pH5.0。

营养盐溶液组成 每升含 (NH₄)₂SO₄ 14.0g, KH₂PO₄ 20.0g, 尿素 3.0g, CaCl₂·2H₂O 3.0g, MgSO₄·7H₂O 3.0g。 Mandels 微量元素盐溶液组成 每升含 FeSO₄·6H₂O 7.0g, MnSO₄·H₂O 1.6g, ZnSO₄·7H₂O 1.4g, CoCl₂·6H₂O 3.7g。

1.1.3 产酶培养基 每升中含氨基葡萄糖 225mg, Mandels 微量元素盐溶液 1mL, 吐温 80

基金项目 国家自然科学基金资助(299876036)

作者简介 吴绵斌(1969-),男,浙江宁波人,副教授,博士,研究方向为生物工程。Tel:86-571-87953080;Fax:86-571-87951358;E-mail:wumb@cmsce.zju.edu.cn

收稿日期 2002-11-11,修回日期:2003-08-25

1g, 用 1mol/L 柠檬酸缓冲液调 pH4.8。微量元素盐溶液的组成同上。

以上培养基在 1.03×10^5 Pa 下灭菌 20min。当研究培养基某一成分对产酶的影响时, 可以改变这一成分的浓度。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞固定化 将里氏木霉孢子悬液接入到螺旋纤维床生物反应器中, 接种量为 5×10^5 个/mL, 按培养液的 5% 体积比接入 2L/min (1.0vvm) 通气量, 30℃ 条件下培养 72h。

1.2.2 固定化细胞诱导产酶 去除培养基后, 用 0.05mol/L pH4.8 的柠檬酸缓冲液洗涤菌丝 2 次, 然后再接入产酶培养基, 以 3L/min (1.5vvm) 通气量, 28℃ 培养。

1.3 实验设备和装置

1.3.1 固定化细胞培养实验装置 (参见文献 [6]) (1) 设备和装置: 本实验使用反应器为螺旋纤维床固定化反应器 (CFBB), 结构为带有夹套的玻璃柱反应器 ($\phi 110\text{mm} \times 660\text{mm}$), 载体用不锈钢丝网固定成卷状, 反应器底板是直径为 5mm 的多孔筛板, 筛孔分布均匀。工作体积为 2L。无菌空气从反应器的底部通过筛孔均匀地通入反应器中, 培养温度由夹套中恒温水调节。(2) 固定化载体: 载体为多孔聚氨酯泡沫 (Porous polyester foam, PPE), 空隙率大于 90%, 载体重量为 10g, 由日本日清纺织株式会社提供。

1.4 分析方法

1.4.1 壳聚糖酶活的测定 采用 Uchida 法, 每分钟产 $1\mu\text{mol}$ 氨基葡萄糖为 1 U 壳聚糖酶活单位^[3]。

1.4.2 还原糖的测定 采用 DNS 法^[4]。

1.4.3 氨基葡萄糖浓度的测定 采用 Ehrlich 法^[5]。

1.4.4 菌体干重的测定 见文献 [6]。

2 结果和讨论

2.1 里氏木霉的固定化

T. reesei 孢子悬液接入 CFBB 经过 6h, 培养液逐渐变清, 孢子大部分被吸附到固定化载体上。随后孢子逐渐萌发, 在载体上产生白色的菌丝斑点, 直至里氏木霉菌丝覆盖在整个载体表面, 培养液能保持清亮, 没有发现有游离菌丝的存在。实验中发现 *T. reesei* 生长速度较快, 经过 6h 的生长停滞期, 进入迅速生长期, 至 60h 后生长进入稳定期, 至 72h 菌体生长达到最大值为 11.2g/L, 每克载体结合的菌量达 1.13g。

由于碳源浓度与菌量有较大关系, 于是考察了碳源浓度对里氏木霉菌丝生长的影响 (培养基中的碳氮比保持在 7:1 左右), 通气量提高到 4L/min (2vvm)。实验中发现增加碳源量可以提高菌丝量, 但当菌量达到 1.5g/g 载体时, 载体吸附量已接近饱和, 培养液中残糖浓度也开始上升。对 CFBB 来说, 初糖浓度控制在 100g/L 为最佳, 而采用相同培养基及培养条件下, 在 B. Braun Biostat B 5L 连续搅拌罐 (Continuous stirred tank reactor, CSTR) 中为 80g/L。

2.2 里氏木霉生产壳聚糖酶条件优化

将固定化结束后的 *T. reesei* 菌丝洗涤 2 次后接入产酶培养基, 28℃ 通气量 3L/min (1.5vvm) 下培养, 经 30h 左右诱导, 壳聚糖酶活力已达到顶峰 (202.4 mL/mL)。

2.2.1 通气量的影响 实验结果显示增加通气量可以有效地提高壳聚糖酶活力,当通气量提高到 3L/min(1.5vvm)时,比 1L/min(0.5vvm)时高 60% 左右,这说明里氏木霉只有在供氧充足的条件下才能大量产生壳聚糖酶,再继续提高通气量,壳聚糖酶活已没有明显提高。

2.2.2 菌龄对产酶的影响 固定化细胞的菌龄对许多酶的活力有很大影响,实验结果可以发现菌龄对壳聚糖酶生产有一定关系,固定化周期在 2 ~ 3d 的菌丝活力较高,但培养 2d 时由于菌量还未达到高峰,选用固定化 3d 的菌丝较为合适。

2.3 壳聚糖酶不同生产方法的比较

2.3.1 壳聚糖酶一步法生产与两步法生产的比较 在 B. Braun Biostat B 5L 通气搅拌罐(装液量 3L)中对壳聚糖酶生产的两种方法进行了比较(一步法生产壳聚糖酶的培养基见文献 [7],两步法培养条件与在 CFBB 中相同,参见“1.2”)。从图 1 和图 2 的实验结果可以发现,一步法生产壳聚糖酶的周期只有 3d,而且单位菌体壳聚糖酶的比产酶量也比两步法高。但是由于一步法培养基碳源中没有葡萄糖,菌体浓度与两步法培养时低,单位培养液壳聚糖酶活力是两步法的 1/2 左右。采用两步法工艺,壳聚糖酶活由 65mU/mL 提高到 176mU/mL,菌体量由 1.21g/L 提高到 13.02g/L。由于里氏木霉菌丝在发酵罐中进行高密度培养较容易实现,因此两步法工艺在放大上也是可行的。由上可见,将菌丝生长和产酶分开,既可以采用最佳的碳源(葡萄糖)培养 *T. reesei*,又可以采用合适的诱导物(氨基葡萄糖)诱导壳聚糖酶的产生,同一步法相比具有明显的优势。

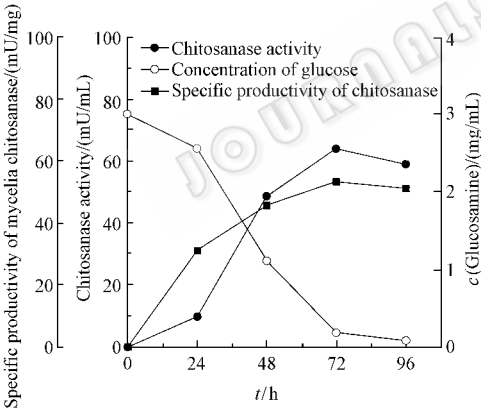


图 1 采用一步法生产壳聚糖酶的时间进程

Fig.1 Time course of chitosanase production by *T. reesei* with one step process

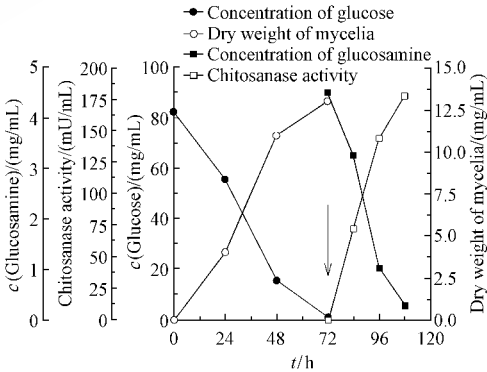


图 2 采用两步法生产壳聚糖酶的时间进程

Fig.2 Time course of chitosanase production by free cell *T. reesei* in 5L CSTR

2.3.2 固定化细胞与游离细胞生产壳聚糖酶的比较 根据单因素实验得到的优化培养条件[菌龄为 72h,通气量 4L/min(2vvm)],在 CFBB 中进行试验(图 3)。由于 CFBB 比 CSTR 可采用更高的碳源浓度,葡萄糖浓度的初始浓度由 80g/L 提高到 100g/L,菌体浓度也由 13.02g/L 提高到 18.04g/L,壳聚糖酶活力由 176 mU/mL 提高到 246 mU/mL,比 Nogawa 等^[1]报道用 *T. reesei* PC-3-7 生产的壳聚糖酶活要高 30% 左右,而且在菌量提高 20% 的情况下,壳聚糖酶对菌丝量的比活力能保持基本不变。

2.4 固定化细胞重复分批生产壳聚糖酶

由以上单因素实验得到的优化条件 ,进行重复利用菌丝产酶的实验研究。重复分批产酶实验周期为 36h ,一共进行了 10 批 ,共 15d 左右(图 4)。在培养过程中 ,发现菌丝生长良好 ,与载体结合紧密 ,培养液中因衰亡而脱落的游离菌丝量很少。每批壳聚糖酶活力也能保持相对稳定。菌体的比产酶率始终维持在约 0.4U/g·h。

在 CFBB 中 ,菌丝不仅所受剪切力影响小 ,而且反应器中溶解氧浓度高 ,气、液、固传质状况良好 ,菌丝通常能保持较高的活性。PPF 载体如过滤网 ,衰老和死亡的菌丝会因向上气流的涌动而从载体上脱落 ,随每一批培养液而被移走 ,而生长良好的菌丝会紧密结合支持的载体。显微镜观察发现当重复利用菌丝结束后 ,菌丝生长还是十分旺盛 ,还有新的菌丝分枝顶端出现。同时 ,由于产酶培养的 pH 较低(约 4.8) ,这也降低了操作中染菌的可能性。因此 ,固定化里氏木霉菌丝经过多次培养 ,还能保持较高的活性。

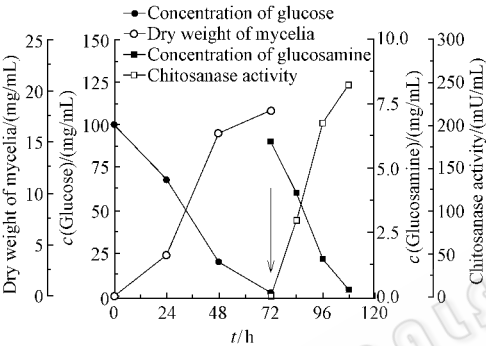


图 3 固定化细胞生产壳聚糖酶时间进程

Fig.3 Time course of chitosanase production with immobilized mycelium of *T. reesei* in CFBB

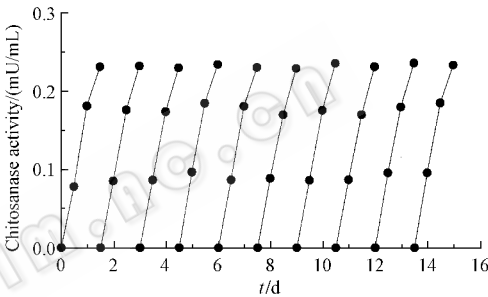


图 4 固定化里氏木霉重复间歇生产壳聚糖酶的时间进程

Fig.4 Time course of chitosanase production with repeated utilization of immobilized mycelia of *T. reesei*

3 结论

(1)对 *T. reesei* ATCC56764 生产壳聚糖酶的研究表明 ,采用菌丝生长和诱导产酶分步进行的方法 ,既可大大提高菌体量 ,又可避免葡萄糖对壳聚糖酶合成的阻遏 ,酶活比采用菌丝生长和诱导产酶同时进行的一步产酶法提高 1 倍以上。(2)通过优化操作条件 ,产生的壳聚糖酶活比在相同条件下通气搅拌罐中进行的游离细胞产酶提高了 39% ,达到 0.246 IU/mL。固定化菌丝还能够长期保持活性 ,在重复分批操作中 ,经过 10 批共 15d 的操作 ,平均每批的酶活保持在 0.235IU/mL 左右。(3)CFBB 具有结构简单 ,能耗低 ,供氧充足 ,混合均匀等优点 ,非常适合于好氧的 *T. reesei* 进行固定化和高密度培养 ,而且工艺过程较为简便 ,培养过程中 pH 低 ,不易染菌 ,因此只要解决好反应器放大问题 ,实现该工艺的产业化非常有希望。

参 考 文 献

[1] Nogawa M , Takahashi H , Kashiwagi A , et al . Purification and characterization of exo-β-D-glucosaminidase from a cellulolytic fungus , *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl Environ Microbiol* , 1998 , 64 (3) : 890 ~ 895 .
[2] 王士奎 , 杜声亮 , 张友忠 , 等 . 球孢白僵菌对壳聚糖降解作用的研究 . *微生物学通报* , 1993 , 20 (3) : 144 ~ 146 .
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [3] Uchida Y , Ohtakara A. Chitosanase from *Bacillus species* . *Methods Enzymol* ,1988 **36** :501 ~ 505.
- [4] Rondle C J M , Morgan W T J. Determination of glucosamine and galactosamine . *Biochem J* ,1955 **61** :586 ~ 589.
- [5] Maghami G G , Robert G A F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan . *Makromol Chem* ,1988 **189** :195 ~ 200.
- [6] 吴绵斌 ,夏黎明 ,岑沛霖. 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. *生物工程学报* ,2000 **16** (3) :368 ~ 372.
- [7] Shimosaka M , Nogawa M , Ohino Y , *et al* . Chitosanase from the plant pathogenic fungus , *Fusarium solanif* sp. phaseoli-purification and some properties . *Biosci Biotech Biochem* ,1993 **57** (2) :231 ~ 235.

Chitosanase Production in Convuluted Fibrous Bed Bioreactor with Two-Step Process

Wu Mianbin^{1*} Huang Ping²

(¹ Institute of Bioengineering , Zhejiang University , Hangzhou 310027 ,China)

(² College of Pharmaceutical Science , Zhejiang University , Hangzhou 310031 ,China)

Abstract : Chitosanase activity can be increased remarkably by a two-step process , in which , the growth of *T. reesei* was in the first step with glucose as carbon source and enzyme induction by D-glucosamine in the second step. With the novel process chitosanase activity produced was about 100% higher than that in the traditional one step process. Under the optimized culture conditions : aeration rate was 4L/min(2 vvm) and age of mycelia were 72 h , The activity of chitosanase produced by immobilized *T. reesei* in convuluted fibrous bed bioreactor(CFBB) was 246mU/mL which was about 39% higher than that with free cell culture in 5L CSTR under the same culture conditions. Furthermore , the novel bioreactor was also feasible to be operated in repeated batch mode. During 10 repeated-batch in 15 days , the average production of chitosanase activity to each batch was kept 235mU/mL.

Key words : Chitosanase , Immobilized hyphae , Convuluted fibrous bed bioreactor(CFBB) , *Trichoderma reesei*

Foundation item : National Natural Science Foundation of China(29987036)

* Corresponding author. Tel 86-571-87953080 ;Fax 86-571-87951358 ;E-mail :wumb@zju.edu.cn

Received date : 11-11-2002

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持！为了适应改革开放的需要,使科研成果尽快得到交流,2004年(44卷第1期开始)本刊将全新改版,更换彩色封面,由原来的小16开本改为标准大16开本(210×297),双月刊,每册128页,发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎投稿！欢迎订阅！欢迎提出宝贵意见！

《微生物学报》编辑部