

# 黑曲霉产壳聚糖发酵工艺的优化

李一婧,王廷璞,马伟超,张文科

(天水师范学院生命科学与化学学院,甘肃天水 741001)

**摘要:**通过单因素及正交实验对黑曲霉产壳聚糖的发酵工艺进行了优化。结果表明,最佳发酵条件为:70mL 玉米浆,4% 葡萄糖,1.2% 硫酸镁,8.0 × 10<sup>8</sup> 孢子量,pH7.4~7.6,转速为 130r/min,29℃ 发酵 72h 的壳聚糖的产率最高,达到 18%。

**关键词:**黑曲霉,壳聚糖,优化

## Optimization of technology of chitosan fermentation by *Aspergillus niger*

LI Yi-jing, WANG Ting-pu, MA Wei-chao, ZHANG Wen-ke

(College of Life Science & Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China)

**Abstract:** The optimum condition for chitosan fermentation by *Aspergillus niger* were studied by single factor and orthogonal experiments. The optimal conditions of chitosan production were as follows: 70mL/L corn steep liquor, 4g/L glucose, 1.2g/L of magnesium sulfate, 8.0 × 10<sup>8</sup> spores, pH 7.4~7.6, 130r/min, 29℃ for 72h. There was a maximum productivity of chitosan 18%.

**Key words:** *Aspergillus niger*; chitosan; optimization

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)12-0162-03

壳聚糖(chitosan)为甲壳素的脱乙酰化产物,是一种天然生物高分子线形多糖,它是迄今为止唯一发现的阳离子动物纤维和唯一的碱性多糖<sup>[1]</sup>。在自然界中,甲壳素广泛存在于低等植物菌类、藻类的细胞,节肢动物虾、蟹、蝇蛆和昆虫的外壳,贝类、软体动物(如鱿鱼、乌贼)的外壳和软骨,高等植物的细胞壁等,每年生物合成的资源量高达 100 亿 t,是地球上仅次于植物纤维的第二大生物资源,其中海洋生物的生成量在 10 亿 t 以上,可以说是一种用之不竭的生物资源。如果将甲壳素中的乙酰基脱除,则得到溶解性大大改善的壳聚糖<sup>[2]</sup>。壳聚糖在提高机体免疫力、抗肿瘤、抗氧化、抗自由基、强化肝功能、降血糖、降血压、降低血脂调节胆固醇方面具有明显的作用<sup>[1]</sup>。另外,壳聚糖可作为固定化载体,其具有机械性能良好、化学性质稳定、耐热性强、细胞毒性极低、亲和性好、安全性高等优点。此外,其在医药、食品、农业、饲料添加剂、纺织方面、造纸工业、化妆品工业和环保等领域也有广泛应用<sup>[2-6]</sup>。壳聚糖的制取通常采用化学法<sup>[5]</sup>,然而化学法生产壳聚糖耗能大、污染严重,并且生产的壳聚糖相对分子质量及脱

乙酰度不均一,壳聚糖的脱乙酰度和乙酰基的分布对其物理化学性质和生物活性均有较大的影响<sup>[7]</sup>。此外,由于原料虾壳或蟹壳不易收集且原料的质量不能保证稳定,时间长了还有腐败的可能。因此从 20 世纪 80 年代起日本和美国先后开始研究用微生物发酵的方法生产壳聚糖,国内从 20 世纪 90 年代初也开始了这方面的研究,目前研究重点主要集中在菌株的选育和培养基的优化<sup>[8-9]</sup>。此外,能脱除甲壳质分子中的乙酰基,生成壳聚糖的甲壳质脱乙酰酶(chitin deacetylase, CDA)在毛霉、根霉、曲霉和青霉等多种微生物中得以纯化,为酶法生产壳聚糖奠定了基础<sup>[7,10]</sup>,利用丝状真菌制备壳聚糖必将成为一条大规模生产壳聚糖的有效途径。本文通过单因素及正交实验对黑曲霉产壳聚糖的发酵工艺进行了优化,为微生物发酵生产壳聚糖提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

黑曲霉 天水师范学院生命科学与化学学院生物系保藏;酵母粉(OXOID)、蛋白胨(OXOID)、牛肉膏、琼脂粉 北京奥博星生物技术有限公司;其它试剂均为分析纯;基础培养基及发酵条件 在含有 4% 葡萄糖,1% MgSO<sub>4</sub>,3% 酵母粉和 4% 蛋白胨,自然 pH 的培养基上接种 1mL 10<sup>8</sup> 个/mL 黑曲霉菌悬液,装液 30mL 于 100mL 发酵瓶中,放置在 28℃,128r/min 的恒温摇床上进行发酵,3d 后检测壳聚糖含量。

收稿日期:2010-05-14

作者简介:李一婧(1981-),女,讲师,主要从事天然产物生理生化分析研究。

基金项目:天水师范学院研究基金资助(TSA0920)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化 采用 PDA 培养基。

1.2.2 黑曲霉孢子数测定 系列稀释及血球计数法<sup>[11]</sup>。

1.2.3 壳聚糖的提取 参考叶龙祥的方法<sup>[12]</sup>并加以改进。取发酵液 100mL 在 10000r/min 的离心机上离心 10min 得菌体沉淀,加入重蒸水洗涤菌体沉淀至无色,称菌体的湿重与干重,然后在所得沉淀中加入 7% NaOH(菌体湿重:碱 = 1:10, g/mL), 50℃ 下处理 3h 后离心,重蒸水洗涤沉淀至上清液无色;取上述沉淀,加入乙醇:水 = 1:1 的 20% NaOH 溶液(菌体湿重:碱 = 1:10, g/mL), 与 560W 的微波炉处理 10min,然后离心洗涤沉淀至上清液呈中性;接着取上述沉淀,加入 5% 乙酸(菌体湿重:酸 = 1:15, g/mL),置于 100℃ 的水浴锅处理 5h,离心分离,取上清液调节 pH 为 8~10,直到出现大量白色沉淀为止,离心,用重蒸水洗涤沉淀至上清液呈中性,在 50℃ 的真空干燥箱中干燥 20min,得到白色固体,即为壳聚糖。

1.2.4 壳聚糖产率计算

$$\text{壳聚糖的产率} = \frac{\text{得到的壳聚糖质量}}{\text{提取前的干菌体重量}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 发酵时间对壳聚糖产率的影响

接种黑曲霉,浓度为 10<sup>8</sup> 个/mL,接入 1mL,置于 28℃,128r/min 的恒温摇床上进行发酵,发酵时间分别为 24、48、72、96h,每隔 24h 提取壳聚糖,进行比较分析,每一时间平行做 3 组,结果如表 1 所示。

表 1 发酵时间对壳聚糖产率的影响

发酵时间 (h)	产率 (%)	差异显著性	
		a = 0.05	a = 0.01
24	5.6182	c	C
48	10.2019	b	B
72	14.9186	a	A
96	14.1263	a	A

由表 1 可知,发酵 72h 与 24、48h 之间有显著差异,而与 96h 之间没有显著性差异。随着发酵时间的延长,壳聚糖产率先升高后降低,在 72h 壳聚糖产率最高,所以最佳发酵时间为 72h。

2.2 温度对壳聚糖产率的影响

将发酵温度分别控制在 23、25、27、29、31、33℃,转速为 130r/min 培养 72h,提取壳聚糖,进行比较分析,结果如表 2 所示。

表 2 温度对壳聚糖产率的影响

发酵温度 (℃)	产率 (%)	差异显著性	
		a = 0.05	a = 0.01
23	8.2694	d	D
25	11.1258	c	C
27	12.4800	bc	BC
29	15.5245	a	A
31	13.9364	ab	AB
33	11.9046	c	BC

由表 2 可知,发酵温度 29℃ 与 23、25、27、33℃ 之间有显著性差异,29℃ 与 31℃ 之间没有显著差异。随着发酵温度的升高,壳聚糖产率先升高后降低,在

29℃ 时壳聚糖产率最高,最佳发酵温度为 29℃。

2.3 转速对壳聚糖产率的影响

将发酵温度控制在 29℃,摇床转速分别取 120、125、130、135、140、145r/min,进行发酵培养 72h,提取壳聚糖,进行比较分析,结果如表 3 所示。

表 3 摇床转速对壳聚糖产率的影响

摇床转速 (r/min)	产率 (%)	差异显著性	
		a = 0.05	a = 0.01
120	12.9599	c	B
125	13.4707	bc	AB
130	15.5233	a	A
135	14.8063	ab	AB
140	14.2627	abc	AB
145	13.9663	abc	AB

由表 3 可知,发酵时摇床转速 130r/min 与 135、140、145r/min 无显著差异,而与 120、125r/min 有显著差异,随着转速的增大,壳聚糖产率先升高后降低,在 130r/min 时壳聚糖产率最高,所以最佳摇床转速为 130r/min。

2.4 发酵培养基的优化

根据单因素实验结果设计 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交实验,其中四因素分别为培养基中葡萄糖、玉米浆和硫酸镁的含量及黑曲霉接种量,结果如表 4 所示。

表 4 基础培养液正交实验结果及极差分析

实验号	A 玉米浆 (mL/L)	B 葡萄糖 (%)	C 硫酸镁 (%)	D 接种量 孢子数 (×10 <sup>8</sup> )	产率 (%)
1	70	3.0	1.0	7.0	16.7
2	70	3.5	1.1	8.0	14.5
3	70	4.0	1.2	9.0	17.9
4	72	3.0	1.1	9.0	11.8
5	72	3.5	1.2	7.0	13.5
6	72	4.0	1.0	8.0	16.3
7	80	3.0	1.2	8.0	15.8
8	80	3.5	1.0	9.0	13.7
9	80	4.0	1.1	7.0	12.6
k <sub>1</sub>	16.37	14.77	15.57	14.27	
k <sub>2</sub>	13.87	13.9	12.97	15.53	
k <sub>3</sub>	14.03	15.6	15.73	14.47	
R	2.5	1.7	2.77	1.27	

由表 4 极差分析可知,各因素影响壳聚糖产率的顺序依次是:硫酸镁 > 玉米浆 > 葡萄糖 > 孢子量。可以确定最优发酵培养基配方为:70mL/L 玉米浆,4% 葡萄糖,1.2% 硫酸镁,8.0 × 10<sup>8</sup> 孢子量,在此培养条件下得到最高产率为 18%。

3 结论

利用黑曲霉发酵生产壳聚糖,其产率受发酵温度、转速、时间、接种量和培养基成分及其 pH 等因素的影响。在考察单因素影响实验中发现,发酵温度控制在 29℃ 以下,壳聚糖产率随温度的升高而增加;这是由于在一定的温度范围内,温度的升高对菌株的生长和增殖具有一定的促进作用。摇床转速为 130r/min 时,壳聚糖产率达到最大,继续增大转速,其产率呈下降趋势;这是由于转速过大破坏了菌丝体,影响后期菌体的收集。最佳发酵时间为 72h,

(下转第 167 页)

推移而逐步增大,达到峰值之后又开始下降。自溶度高的菌株 GS2 产蛋白酶活力到达峰值的时间约为 36h 左右,而自溶度较低的菌株 GS1 约为 45h 左右。

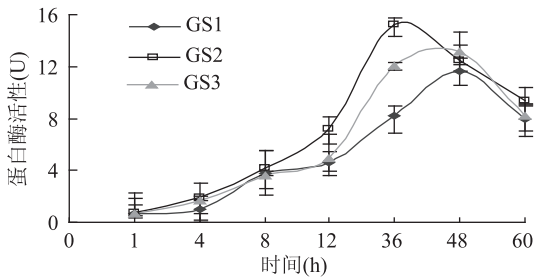


图 8 不同菌株嗜热链球菌自溶期间蛋白酶活性变化

### 3 结论

不同菌种或菌株其自溶程度不同,同时菌株的生长环境对自溶也有一定影响;过高或者过低的培养温度和 pH 都可抑制乳酸菌的自溶,每种乳酸菌都存在一个最适宜的培养条件,在该条件下菌体繁殖最稳定。通常在高于 45℃ 的培养条件下,菌体在对数生长期因自溶过快会导致活菌数急剧下降,不利于乳酸菌的增殖;在 4~10℃ 低温条件下,菌体几乎不发生自溶。培养环境 pH 的升高也会增大菌体的自溶程度,过酸的环境则会抑制菌体自溶。

相同培养条件下,乳酸乳杆菌产脂肪酶活性最高,嗜热链球菌与德氏乳杆菌保加利亚亚种次之,而产蛋白酶活性最高的是德氏乳杆菌保加利亚亚种,嗜热链球菌与乳酸乳杆菌次之。乳酸菌产生的脂肪酶和蛋白酶活性变化与菌株自溶程度有密切的关系,自溶度越大的菌株产酶活性到达峰值的时间越短。所以在乳酸菌发酵剂的选择过程中,应根据所需目的的不同,针对各种目标菌群进行分析,找到最适合的培养条件,或者通过添加自溶度不同的菌株来加速或降低发酵剂的自溶程度,从而达到生产所

需的目的,使之成为适合工业生产的优良发酵剂。

### 参考文献

[1] Gasson M J. Lytic systems in lactic acid bacteria and their bacterio phages [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1996, 70 (10): 147-159.

[2] Albert G R, Alexei V C, Vladislav S G, et al. Regulates autolysis of cellular membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (25): 6897-6905.

[3] Crow V L, Coolbear T, Gopal P K, et al. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese [J]. *Int Dairy Journal*, 1995, 5 (8): 855-875.

[4] Law B A, Sharpe M E, Reiter B. The release of intracellular dipeptidase from starter streptococci during cheddar cheese ripening [J]. *J Dairy*, 1974, 41: 137-146.

[5] Tetsuya Masuda, Ayako Hidaka, Naoko Kondo, et al. Intracellular enzyme activities and autolytic properties of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri* [J]. *Food Sci Technol*, 2005, 11 (3): 328-331.

[6] Ken-ji Yokoia b, Ken-Ichi Kawasakib, Akira Taketoc, et al. Characterization of lytic enzyme activities of *Lactobacillus gasseri* with special reference to autolysis [J]. *Int J Food Microbiol*, 2004, 96 (3): 273-279.

[7] Girbe B, Gerard V, Jan K, et al. Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180 (22): 5947-5953.

[8] 卢燕云, 林建国, 李明, 等. 复合诱变选育酸性蛋白酶高产菌株 [J]. *中国酿造*, 2009, 202 (1): 49-51.

[9] 朴真三, 刘畅, 冯艳, 等. 铜绿假单胞菌脂肪酶产生条件 [J]. *吉林大学自然科学学报*, 1998 (1): 97-99.

[10] 李艾黎, 邓凯波, 霍贵成. 环境因素对酸奶菌株自溶的影响 [J]. *微生物学通报*, 2008, 35 (8): 1262-1267.

(上接第 163 页)

延长发酵时间,壳聚糖产率亦呈下降趋势;这是由于培养初期菌丝体迅速生长,壳聚糖量也迅速积累,随着培养时间的增加,壳聚糖量逐渐达到饱和,而菌丝体的量也不再增加,而且有一些菌丝面临溶菌;另一方面,壳聚糖的相对分子质量随着培养期的延长也会迅速下降。

通过上述一系列实验得出黑曲霉发酵生产壳聚糖的最佳发酵工艺为:70mL/L 玉米浆,4% 葡萄糖,1.2% 硫酸镁,8.0 × 10<sup>8</sup> 孢子量, pH7.4~7.6, 转速为 130r/min, 29℃ 发酵 72h 的壳聚糖的产率最高。

### 参考文献

[1] 周文清, 江莹. 壳聚糖的研究进展 [J]. *景德镇高专学报*, 2008, 23 (2): 46-48.

[2] 李润铭, 邓顺周. 甲壳素及壳聚糖在医药领域的应用研究进展 [J]. *食品与药品*, 2007, 9 (12): 50-53.

[3] 孙冀平. 壳聚糖及其应用 [J]. *中国食品添加剂*, 2005 (5): 83-86.

[4] 翟荣玲, 刘艳琴, 孙丰林, 等. 壳聚糖应用研究进展 [J]. *山东畜牧兽医*, 2008, 29 (9): 36-38.

[5] 杨艾玲. 壳聚糖的研究进展 [J]. *化工中间体*, 2009 (10): 17-20.

[6] SHAHIDI F, ARACHCHI J K V, JEON Y - J. Food applications of chitin and chitosans [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1999 (10): 37-51.

[7] 赵祥颖, 刘丽萍, 刘建军. 微生物甲壳质脱乙酰酶的研究进展 [J]. *食品与药品*, 2008, 10 (7): 38-41.

[8] 谭天伟, 王炳武, 陈鹏. 生物法生产壳聚糖 [J]. *化工进展*, 2001 (9): 4-5.

[9] NADARAJAH K, KADER J, MOHD MAZMIRA, et al. Production of Chitosan by Fungi [J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2001, 4 (3): 263-265.

[10] BANKS I R, SPECHT C A, DONLIN M J, et al. A Chitin Synthase and Its Regulator Protein Are Critical for Chitosan Production and Growth of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* [J]. *EUKARYOTIC CELL*, 2005, 4 (11): 1902-1912.

[11] 周德庆. 微生物学实验教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.

[12] 叶龙祥, 刘清斌. 黑曲霉发酵生产壳聚糖工艺研究 [J]. *化学与生物工程*, 2007, 24 (7): 45-48.