

青霉菌发酵和超滤耦合制备壳低聚糖*

张 匡, 郑连英

(浙江大学生物工程研究所, 浙江杭州, 310027)

摘 要 在 5 L 发酵罐中, 采用高产壳聚糖酶菌株 *Penicillium* sp. ZD-Z1, 经半连续发酵和超滤耦合制备不同分子质量壳低聚糖。考察了稀释率、壳聚糖浓度、发酵时间对菌体生长和产量的影响。理想条件为: 当稀释率为 0.15 h^{-1} , 流加壳聚糖浓度为 3% 的培养基, 发酵 96 h 后, 壳低聚糖产量提高了 5 倍。采用不同截留分子质量 (MWCO) 超滤膜分离不同分子质量的壳低聚糖。通过喷雾干燥获得高纯度壳低聚糖样品。

关键词 壳聚糖, 发酵, 超滤, 耦合, 壳低聚糖

壳聚糖在医药、食品、化妆品、农业、环保等领域已得到广泛的应用, 它的相对分子质量起着至关重要的作用^[1~3]。由壳聚糖酶降解壳聚糖得到的小分子质量壳低聚糖, 易溶于水, 易被人体吸收。相对于 5 000~10 000 u 大分子质量的壳低聚糖显示出更强的抑菌性能和生物活性。在治疗糖尿病时, 20 ku 壳低聚糖比 140 ku 壳聚糖对于脂多糖有更强的亲和力。而且小分子质量壳低聚糖在抗肿瘤和 DNA 表达系统中也有着巨大的潜力^[4~6]。笔者在前期研究中采用 *Penicillium* sp. ZD-Z1 菌株深层间歇发酵产酶降解壳聚糖, 易出现产物被大量消耗, 对产品质量的稳定性及产量影响较大。而采用半连续发酵和超滤耦合制备壳低聚糖时, 不断移出产物能够缓解酶解反应的产物抑制作用并且能够延长发酵时间, 极大提高了酶的利用率。目前发酵和超滤的耦合主要应用在蛋白质和多糖的酶解过程^[7, 8], 应用于发酵法连续生产壳低聚糖尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 主要材料和设备

菌株: 高产壳聚糖酶菌株 *Penicillium* sp. ZD-Z1, 由浙江大学生物工程研究所实验室从土壤中筛选得到。发明专利号为 ZL 02 1 59880.0。壳聚糖: 玉环澳兴甲壳素有限公司生产, 脱乙酰度 90%, 分子质量 290 ku。5L 发酵罐: GYB 型, 上海联环生物工程有限公司; 超滤装置: 赛普(无锡)膜科技发展有限公司; 凝胶色谱仪: 150-GPC 型, 美国 Waters 公司; 喷雾干燥仪: B-290 型, 瑞士 Buchi 公司。

第一作者: 硕士研究生(郑连英教授为通讯作者)。

* 国家自然科学基金重点项目(50233020)和浙江省重点科技项目(2005C22001)资助

收稿日期: 2007-02-02

1.2 培养基

斜面培养基(g/L): 壳聚糖 8, 尿素 1, K_2HPO_4 0.6, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, MgSO_4 0.12, 琼脂 15, pH 5.0。

发酵培养基(g/L): 壳聚糖 30, 尿素 1, K_2HPO_4 0.6, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, MgSO_4 0.12, pH 5.0。

1.3 发酵和超滤的耦合过程

在 5 L 发酵罐中, 发酵条件为: 转速 180 r/min, 温度 $30\text{ }^\circ\text{C}$, 装液量 3.5 L, pH 4.6~5.0, 发酵 36 h 后开始耦合操作, 每 2 h 从发酵罐中取出发酵液进行抽滤, 同时流加等量发酵培养基, 使罐内发酵液体积保持稳定。然后依次用截留分子质量为 20 ku、5 ku 和 2 ku 的超滤膜进行超滤。将截留的大分子壳聚糖和酶返回到发酵罐中。实验流程图如图 1 所示。发酵过程中每隔 4 h 测 1 次还原糖浓度和菌体浓度, 用来监测发酵过程。实验中研究了超滤特性、稀释率对发酵过程的影响, 并且考察了不同壳聚糖浓度的发酵液发酵时的降解效果。

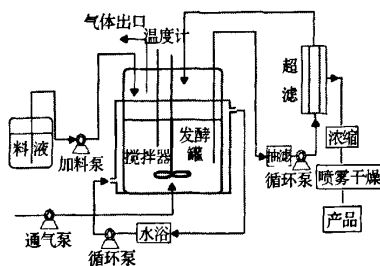


图 1 发酵和超滤耦合制备壳低聚糖的流程图

1.4 壳低聚糖的分离和产品制备

发酵液经抽滤除去菌体后, 依次采用截留分子质量为 20 ku、5 ku 和 2 ku 超滤膜的顺序进行超滤, 得到壳低聚糖分子质量范围为 5~20 ku、2~5 ku 和 2 ku 以下的溶液, 再进行真空蒸馏浓缩, 得到浓度较高的壳低聚糖溶液, 最后进行喷雾干燥, 得到不同分子

质量的壳低聚糖样品。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体浓度测定

定时、定量取出的发酵液,经抽滤后,将菌体滤饼在 80 ℃ 下干燥 48 h 后称重。

1.5.2 还原糖浓度测定

壳聚糖的酶解程度由发酵液中还原糖浓度表示,并且采用 DNS 法测定发酵液中的还原糖浓度。

1.5.3 壳低聚糖测定

采用凝胶渗透色谱(GPC)分析。分离柱由 Waters Ultrahydrogel (1 000, 250, 120) 串联。测试温度 30 ℃, 流动相: 0.2 mol/L HAc + 0.1 mol/L NaAc, 流动相流速 0.8 mL/min。标准品采用葡萄糖。

2 结果和讨论

2.1 稀释率的影响

在壳聚糖浓度为 2% 的发酵液中,稀释率分别为 0.20 h⁻¹、0.15 h⁻¹ 和 0.10 h⁻¹ 时,考察发酵液中的菌体浓度,半连续操作始于第 36 h。

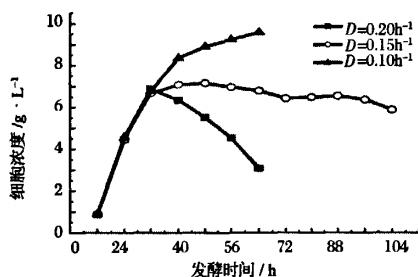


图2 稀释率对发酵过程中细胞浓度的影响

如图2所示,当稀释率为 0.20 h⁻¹ 时,发酵液中的菌体的生长量明显小于被移走的菌体量,导致发酵液中的菌体浓度明显下降。当稀释率为 0.10 h⁻¹ 时,发酵液中的菌体浓度随着连续操作的进行而明显上升,虽然高菌体浓度对产酶有利,但是低稀释率大大降低了半连续发酵的生产效率。选取 0.15 h⁻¹ 的稀释率基本能保持稳定的菌体浓度,从而有助于菌体稳定地产酶降解壳聚糖。

2.2 壳聚糖浓度的影响

考察不同壳聚糖浓度的培养基下的发酵效果,稀释率为 0.15 h⁻¹,发酵液中的壳聚糖浓度分别为 2% 和 3% 时,发酵 32 h 后进行半连续操作,还原糖浓度随时间的变化如图3所示。

超滤时,发酵液中的壳聚糖酶的分子质量为 43

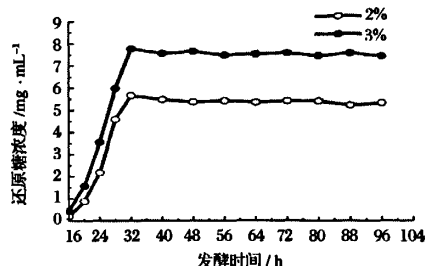


图3 壳聚糖初始浓度对还原糖浓度的影响

ku, 远大于超滤膜的截留分子质量,所以壳聚糖酶随着超滤截留液返回发酵罐中。因此,虽然在发酵后期发酵液中的菌体浓度会有所下降,但此时发酵液中的酶含量依然很高,所以流加的壳聚糖仍然能够被分解,发酵液中的还原糖浓度继续维持在稳定状态。3% 壳聚糖浓度发酵液中产生的还原糖浓度明显高于 2% 壳聚糖浓度的发酵液,这说明使用 3% 壳聚糖浓度的发酵液进行发酵的效果更好,有利于提高产壳低聚糖的效率。

2.3 超滤过程特性研究

2.3.1 操作压力对膜通量的影响

为防止生成的壳低聚糖和壳寡糖被消耗,将半连续发酵和超滤耦合,及时分离生成的高浓度壳低聚糖和壳寡糖,提高壳低聚糖产率。超滤是以压力差为推动力,操作压力对超滤以及能量消耗有很大的影响。对截流分子质量 20 ku、5 ku 和 2 ku 的超滤膜,在不同操作压力下进行超滤实验,确定合适的操作压力。图4表明,随着操作压力的增大,一开始膜通量上升很快,对超滤达到 0.4 MPa 时,膜通量趋于稳定。超过临界压力是不利的,因为那样不但不能提高膜通量,反而会造成能量消耗的增大和超滤膜面产生浓差极化现象。因此操作压力应控制在 0.4 MPa。

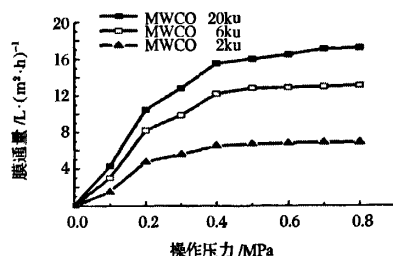


图4 操作压力对膜通量的影响

2.3.2 膜通量与运行时间的关系

将抽滤后的发酵液依次通过截留分子质量为 20 ku、5 ku 和 2 ku 的超滤膜,研究膜通量与超滤时间的

关系。如图 5 所示,膜通量在超滤 4 h 后基本保持稳定,能连续操作 24 h 以上。稳定的膜通量能确保超滤和发酵的耦合。

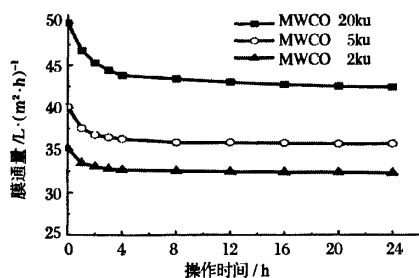


图 5 膜通量和操作时间的关系

2.4 壳低聚糖分子质量的测定

将超滤分离得到的分子质量为 5 k~20 ku、2 k~5 ku 的壳低聚糖分别上样,采用凝胶渗透色谱分析样品的重均分子质量(M_w)、数均分子质量(M_n)、峰值分子质量(M_p)和分子质量分散指数(M_w/M_n),分散指数反映了分子大小差别的范围(见表 1 和图 6)。结果表明,样品中的分子质量分散指数比较大,这是由于在连续发酵过程中,壳聚糖被持续降解成不同分子质量的壳低聚糖,造成分子量分布比较宽。样品的重均分子质量略大于超滤膜的截留分子质量,这表明分子质量大于截留分子量的壳低聚糖没有被完全除去,部分仍然透过了超滤膜。

表 1 壳低聚糖分子质量测定结果

壳低聚糖样品	M_n	M_w	M_p	M_w/M_n
5~20 ku	4475	21637	11235	4.83
2~5 ku	2038	5599	3351	2.75

表 2 进料速率和操作温度的影响

进口温度/℃	进料速率/mL·min ⁻¹		
	4	6	8
150	无冷凝水、无粘壁、产品颜色较深	无冷凝水、有粘壁	有冷凝水、大量粘壁
155	无冷凝水、无粘壁、产品颜色较深	无冷凝水、基本无粘壁	有冷凝水、大量粘壁
160	无冷凝水、无粘壁、产品颜色较深	无冷凝水、基本无粘壁	有冷凝水、大量粘壁

3 结 论

(1)将半连续发酵和超滤分离耦合后,产物被定时移出能够缓解酶解反应的产物抑制,极大提高单位酶的利用率,发酵效率更高。相比于发酵时间为 48 h 的批发酵,半连续发酵能维持 96 h 以上。耦合后的壳低聚糖产量比批发酵时提高 5 倍。

(2)当超滤操作压力为 0.4 MPa 时,膜通量能够维持在稳定水平。选择合适的超滤膜可以有效地控

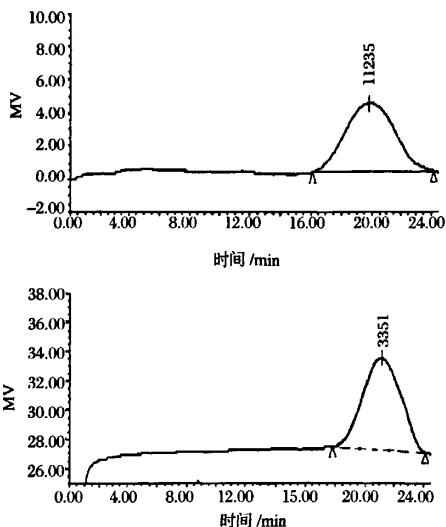


图 6 壳低聚糖分子质量凝胶渗透色谱

2.5 喷雾干燥法制备壳低聚糖样品

超滤分离得到的壳低聚糖溶液,经真空蒸馏浓缩 2 倍后进行喷雾干燥,考察了进料速率和进口温度对产品质量的影响制备壳低聚糖。喷雾干燥评选条件见表 2。理想的喷雾干燥条件为:进口温度 160 ℃;进料速率 6 mL/min;气体流速 27 m³/h,此时出口温度为 93 ℃,所得产品经真空干燥后测得其水分含量为 7%~10%,扣除水分后产品得率可达到 90% 以上。喷雾干燥得到的壳低聚糖呈淡黄色,粉末状,应在干燥避光条件下保存。

制产物分子质量的分布。

(3)当进口温度为 160 ℃,进料速率为 6 mL/min,喷雾气流为 27 m³/h 时,喷雾效果最好。

参 考 文 献

- Eugene Khor, Lee Yong Lim. Implantable applications of chitin and chitosan[J]. Biomaterials, 2003, 24: 2 339~2 349
- Koide S S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks [J]. Nutrition Research, 1998, 18(6): 1 091~1 101

- 3 Okamoto Y, Yano R, Miyatake K. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 53: 337~342
- 4 Vishu Kumar AB, Varadaraj MC, Lalitha RG, et al. Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1670: 137~146
- 5 Zheng LY, Zhu JF. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights [J]. Carbohydr Polym, 2003, 54(4): 527~530
- 6 No HK, Park NY, Lee SH, et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights[J]. Int J Food Microbiol, 2002, 74(1): 65~72
- 7 岑沛霖, 林建平, 江龙法. 生物反应与分离耦合过程的研究现状和趋势[J]. 化工学报, 1997, 11(5): 35~40
- 8 杨斌, 吕燕萍, 谭字桐. 乙醇连续发酵与膜超滤耦合过程研究 [J]. 膜科学与技术, 1997, 17(1): 9~17

Preparation of Chitosan-oligosaccharides with Different Molecular Weight by Coupling of Fermentation and Ultrafiltration

Zhang Kuang, Zheng Lianying

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

ABSTRACT The coupling of semi-continuous fermentation and ultrafiltration was developed on chitosan-oligosaccharide preparation. High yielding chitosanases strain: *Penicillium* sp. ZD-Z1 was applied in the fermentation carried out in a 5-liter fermentor. The influences of dilution rate, chitosan concentration in broth and fermentation time on biomass and yield were studied. It was found that the optimal operation condition of fermentation was under dilution rate of 0.15 h^{-1} , chitosan concentration in broth of 3% and fermentation time of 96 hours. The yield of chitosan-oligosaccharides was increased 5-fold after coupling. Separation of chitosan-oligosaccharides with different molecular weight was achieved based on the use of ultrafiltration membrane with different molecular weight cut-off (MWCO). Chitosan-oligosaccharide powders with high purity were acquired by spray drying.

Key words chitosan, fermentation, ultrafiltration, coupling, chitosan-oligosaccharides

2007 第二届中国(长沙)国际食品博览会将举行

2007 第二届中国(长沙)国际食品博览会将于 2007 年 10 月 25~28 在长沙湖南国际会展中心举行。

2007 第二届中国(长沙)国际食品博览会,旨在搭建代表国际食品工业技术水准的展示、交流合作的平台,推动中国食品行业交流与合作、吸收国外先进技术与投资、提升我国食品技术水准和装备水平、提高生产工艺和产品档次、增强食品及关联产品的市场竞争能力,为参展企业创造良好的商业和贸易机会,使更多的中国食品走向世界、国外食品进入中国。

2007 第二届中国(长沙)国际食品博览会组委会与国际绿色产业组织(GIO)将携手合作,在展会同期举办“2007 第二届中国(长沙)国际食品产业投资洽谈会”。洽谈会作为食博会的投融资平台,将为急需发展资金的参展企业提供获得投资的绝佳机会。届时,20 家国内外知名投资公司将会参加本次洽谈会,与参展企业共谋发展。

2007 年“三湘农产品质量安全行”将首次纳入“食博会”中,为省内外食品质量安全提供市场准入服务,为企业申报无公害农产品、绿色食品和有机食品的认证,公布“2007 年度三湘农产品质量安全行”获得“质量安全”的企业和产品名单、同时帮助农产品企业推广 GMP、HACCP、ISO9000 等国际先进管理模式。展期间将举办“湖南省政府职能厅局领导与参展企业家对话会”,针对湖南省食品质量安全监管及市场准入制度、食品质量安全检验、检测体系、标准化体系、流通环节食品安全检测体系及省外、海外食品产品进入湖南省市场的相关规定等议题展开对话与交流。

在第一屆良好有效的广告宣传基础上,由湖南省广播电视局牵头,组委会将扩大与行业媒体、主流强势媒体的合作,加大专业观众招商力度,加大人力财力物力的投入,保障博览会专业观众质量和数量的稳步提高。组委会还与海外代理机构、行业协会开展深入合作,以便于宣传推广和销售展会,全力提高海外参展商和参观观众的数量。

联系电话: 0731-4467531、13808489529; 传真: 0731-4468648、4467328; 联系人: 唐艳。