



培养基组成对雅致放射毛霉发酵生产壳聚糖的影响

刘珍利, 赵华, 楚宁, 张洋

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 研究了发酵培养基中不同碳源、氮源、无机盐对雅致放射毛霉 (*Actinomucor elegans*) 合成壳聚糖的影响. 采用单因素和响应面法优化了发酵培养基中玉米粉和玉米浆这两种主要成分的最佳添加量组合. 结果表明, 最佳培养基组成为 (g/L): 玉米浆 68, 玉米粉液化液 42, KH_2PO_4 2, MgSO_4 2. 采用优化后的培养基, 壳聚糖产量最大达到 2.223 g/L, 比优化前提高了 64.30%.

关键词: 壳聚糖; 雅致放射毛霉; 玉米浆; 玉米粉; 响应面法

中图分类号: TQ929⁺.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2010)02-0013-05

Effects of the Fermentative Culture Medium on Production of Chitosan from *Actinomucor elegans*

LIU Zhen-li, ZHAO Hua, CHU Ning, ZHANG Yang

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The effects of carbon source, nitrogen source and inorganic salts on production of chitosan from *Actinomucor elegans* were investigated. The proportion of two main components (corn steep liquor and corn flour) was optimized by single-factor design and response surface methodology. The results show that the optimal proportion (g/L): corn steep liquor 68, liquefied corn flour 42, KH_2PO_4 2, MgSO_4 2. Under the above conditions, the yield of chitosan reached 2.223 g/L, which increased about 64.30% compared with non-optimization.

Keywords: chitosan; *Actinomucor elegans*; corn steep liquor; corn flour; response surface methodology

壳聚糖是自然界中唯一的天然高分子碱性多糖, 具有独特的生理活性和良好的成膜性、保湿性、吸附性和抗菌性^[1]. 甲壳素广泛存在于甲壳纲的动物虾、蟹的外壳中, 以及昆虫的甲壳、真菌的细胞壁和植物的细胞壁中^[2]. 国内外研究发现一些真菌, 如蓝色犁头霉^[3] (*Absidia coerulea*)、鲁氏毛霉^[4] (*Mucor rouxii*)、米根霉^[5] (*Rhizopus oryzae*)、黑曲霉^[6] (*Aspergillus niger*) 等能够利用自身酶系直接合成壳聚糖, 作为细胞壁的主要成分. 直接从真菌细胞壁中提取壳聚糖省去由甲壳素制备壳聚糖用强碱脱乙酰这一工艺步骤, 能降低对环境的污染. 据陈忻等^[7-8]报道, 雅致放射毛霉 (*Actinomucor elegans*) 产壳聚糖不仅产率高,

而且质量好、纯度高, 但目前国内未见对其发酵培养基的研究报道. 本文利用液体深层培养雅致放射毛霉合成壳聚糖, 重点探讨培养基中主要成分对壳聚糖产量的影响. 采用单因素和响应面结合的方法, 优化了发酵培养基中玉米浆和玉米粉液化液的添加量对雅致放射毛霉合成壳聚糖的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

雅致放射毛霉 (*Actinomucor elegans*) TCCC

收稿日期: 2009-10-15; 修回日期: 2009-12-28

基金项目: 国家科技基础条件平台资助项目 (2005DKA21204-10)

作者简介: 刘珍利 (1982—), 女, 重庆人, 硕士研究生; 通信作者: 赵华, 教授, zhaohua@tust.edu.cn.

45001, 天津科技大学微生物菌种保藏管理中心保藏.

1.1.2 培养基

斜面培养基 PDA: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基.

发酵基础培养基 (g/L): 葡萄糖 30, 蛋白胨 20, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2, KH_2PO_4 2, pH 自然, 115 °C 湿热灭菌 20 min.

1.1.3 试剂

玉米, 天津市场购买; 玉米浆, 天津科瑞斯试剂公司; 高温 α -淀粉酶 (酶活力为 3×10^4 U/mL), 天津利华酶制剂技术有限公司. 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 玉米粉的液化处理

将玉米去胚粉碎过 60 目筛得玉米粉, 称取 50 g, 加水 120 mL, 加入高温 α -淀粉酶 (10 U/g), 85 ~ 90 °C 搅拌 30 min, 加热煮沸 10 min 灭酶活, 即可直接用来配制发酵培养基.

1.2.2 氮含量的测定

有机氮源中的氮含量用凯氏定氮法测定^[9].

1.2.3 菌体培养方法

采用 PDA 培养基, 将菌种接种在斜面培养基上, 恒温培养箱中 28 °C 培养 3 ~ 7 d, 待斜面上长出大量孢子后取出. 用灭菌的生理盐水 10 mL 洗脱孢子, 两层无菌纱布过滤除菌丝, 过滤液加到装有少量玻璃珠的三角瓶中充分振荡, 得到接种用孢子悬浮液. 用血球计数板计数, 用蒸馏水调整孢子悬浮液中孢子, 最终浓度为 10^6 mL⁻¹. 向 50 mL 发酵培养基中接入 2 mL

孢子悬液, 28 °C、200 r/min 恒温摇床培养 48 h.

1.2.4 菌丝干重测定

将发酵液用布氏漏斗装置减压抽滤收集菌体, 用蒸馏水洗涤至滤液澄清, 60 ~ 80 °C 烘箱中干燥至恒重, 称重.

1.2.5 壳聚糖提取

将研磨后的菌体用 2% 的 NaOH 溶液 (菌体 (g) : 碱液 (L) = 1 : 20) 沸水浴处理 2 h, 离心得到碱不溶物, 用蒸馏水洗至滤液中性, 再用 2% 醋酸溶液 (菌体 (g) : 酸液 (L) = 1 : 40) 于 60 °C 处理 3 h, 离心, 上清液中缓慢加入 30% NaOH 溶液, 边加边搅拌, 中和至 pH 为 9, 出现大量白色絮状沉淀, 静置后离心, 将沉淀物用蒸馏水洗涤至滤液 pH 是中性, 离心, 收集沉淀物, 真空冷冻干燥, 即为壳聚糖粗品.

1.2.6 菌丝体浓度和壳聚糖产量的计算

菌丝体浓度 = 菌体干质量 / 发酵液体积

壳聚糖产量 = 壳聚糖质量 / 发酵液体积

2 结果与分析

2.1 发酵培养基成分的确定

2.1.1 碳源对雅致放射毛霉合成壳聚糖的影响

分别以 30 g/L 的蔗糖、麦芽糖、糊精、乳糖、玉米粉、玉米粉液化液替换基础培养基中的碳源. 培养基中其他成分不变, 每个实验作 3 个平行, 实验结果见表 1.

表 1 碳源对壳聚糖产量的影响

Tab.1 Effects of carbon sources on chitosan production

| 碳源 | 葡萄糖 | 蔗糖 | 麦芽糖 | 糊精 | 乳糖 | 玉米粉 | 玉米粉液化液 |
|----------------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| 菌丝体形态 | 菌丝球 | 菌丝团 | 菌丝球 | 菌丝球 | 菌丝团 | 絮状 | 絮状 |
| 菌丝体浓度/(g·L ⁻¹) | 13.452±0.181 | 4.413±0.343 | 13.237±0.223 | 15.661±0.245 | 3.812±0.298 | 16.828±0.311 | 18.153±0.157 |
| 壳聚糖产量/(g·L ⁻¹) | 1.018 | 0.308 | 0.949 | 1.172 | 0.258 | 1.176 | 1.296 |

由表 1 可知, 碳源种类对雅致放射毛霉生物量合成有较大影响, 进而对壳聚糖产量产生影响. 雅致放射毛霉对蔗糖和乳糖利用较差; 能较好利用葡萄糖、麦芽糖、糊精和玉米粉. 说明雅致放射毛霉自身的液化、糖化能力均比较强, 能直接利用含淀粉的原料, 通过自身的糖化酶系把淀粉转化为葡萄糖, 满足了其正常代谢和合成产物的需要. 但不经液化处理的高浓度玉米粉灭菌过程中原来悬浮的淀粉颗粒糊化使培养液黏度增加, 黏度的增加使得菌丝体在摇瓶中不易分散, 不利于菌体生长. 玉米粉培养菌体壳聚糖产量最高, 达到 1.296 g/L. 另外, 由实验结果可知, 絮状菌丝体比球状菌丝体的得率高, 团状菌丝体菌体得率最

低. 文献[10]报道, 菌丝形态在一定程度上可能会影响菌体的生长速率, 玉米粉有利于菌丝的分散, 使其菌丝形态为絮状, 这可能也是导致菌体对玉米粉利用效率高的原因之一. 考虑到原料来源以及成本问题, 选用玉米粉液化液作为碳源.

2.1.2 氮源对雅致放射毛霉合成壳聚糖的影响

分别以 20 g/L 的牛肉膏、酵母粉、玉米浆, 5.8 g/L 硝酸钠、7.3 g/L 硝酸铵、12 g/L 硫酸铵替换基础培养基中的氮源 (无机氮源换算成与蛋白胨相同氮含量), 30 g/L 玉米粉液化液为碳源, 培养基中其他成分不变, 每个实验作 3 个平行, 实验结果见表 2.

表2 氮源对壳聚糖产量的影响

Tab.2 Effects of nitrogen sources on chitosan production

| 氮源 | 蛋白胨 | 牛肉膏 | 酵母粉 | 玉米浆 | 硝酸铵 | 硫酸铵 | 硝酸钠 |
|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| 菌丝体浓度/(g·L ⁻¹) | 18.013±0.123 | 18.252±0.254 | 19.621±0.196 | 18.807±0.325 | 6.546±0.422 | 5.468±0.334 | 10.423±0.236 |
| 壳聚糖产量/(g·L ⁻¹) | 1.312 | 1.325 | 1.414 | 1.353 | 0.458 | 0.395 | 0.759 |

由表2可知,以不同的有机氮源和无机氮源作为唯一氮源时,氮源种类对菌丝生长影响很大,雅致放射毛霉对牛肉膏、蛋白胨、酵母粉、玉米浆这些有机复合氮源利用率远远高于对硝酸铵、硫酸铵、硝酸钠这些无机氮源。有机复合氮源中含有一些微生物生长所需的多种微量元素和酶活促进剂,更加有利于促进菌体生长。利用玉米浆为氮源培养菌体生产壳聚糖产量达到1.353 g/L。实验所用玉米浆中含氮量为4.01%,是几种有机氮源中含氮量最低的,但是同样的添加量所得菌体量与其他几种有机氮源相差不大。分析原因可能是玉米浆中含有丰富的可溶性蛋白、生物素、无机盐和菌体生长必须的营养因子^[11],有效促进菌体生物量合成。玉米浆不仅可以作为雅致放射毛霉的氮源还能为菌体生长提供生长因子,培养基中无需再添加生长因子。所以考虑到原料成本问题,选用

玉米浆作为氮源。

2.1.3 无机盐对雅致放射毛霉合成壳聚糖的影响

无机营养元素是构成细胞的重要成分,对维持酶的活性也有重要作用。以30 g/L的玉米粉液化液为碳源,20 g/L的玉米浆为氮源,以不加任何无机盐为对照,分别添加2 g/L的几种不同的无机盐,如:硫酸镁、磷酸二氢钾、氯化钙、氯化钾,研究其对壳聚糖产量的影响,每个实验作3个平行,实验结果见表3。

由表3可知,无机盐对菌丝体的生长有一定的促进作用,硫酸镁和磷酸二氢钾效果最好。未添加无机盐的对照组菌体也能较好生长,说明培养基中玉米浆含有的维生素和微量元素能基本满足雅致放射毛霉菌体生长的需求。添加少量的硫酸镁和磷酸二氢钾能为菌体生长提供所需的磷、钾、硫、镁等离子,更好地促进菌体生长。

表3 无机盐对壳聚糖产量的影响

Tab.3 Effects of inorganic salts on chitosan production

| 无机盐 | 对照 | MgSO ₄ ·7H ₂ O | KH ₂ PO ₄ | KCl | CaCl ₂ |
|----------------------------|--------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------|-------------------|
| 菌丝体浓度/(g·L ⁻¹) | 16.311±0.233 | 17.864±0.158 | 17.637±0.256 | 16.469±0.274 | 16.853±0.383 |
| 壳聚糖产量/(g·L ⁻¹) | 1.135 | 1.285 | 1.235 | 1.166 | 1.176 |

2.2 培养基组分的单因素优化

2.2.1 玉米浆添加量对壳聚糖产量的影响

以30 g/L的玉米粉液化液为碳源,向培养基中添加不同浓度的玉米浆,实验结果如图1所示。

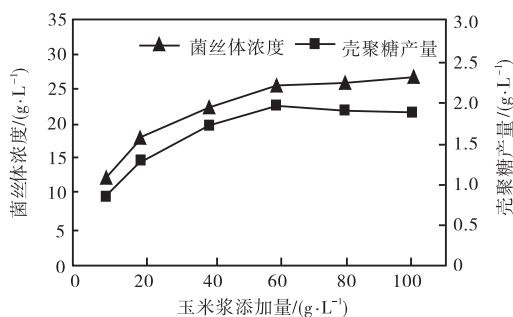


图1 玉米浆添加量对壳聚糖产量的影响

Fig.1 Effect of the concentration of corn steep liquor on chitosan production

由图1可知,在较低添加量时,玉米浆用量提高,体系营养增加,有利于菌体生长繁殖,使得发酵液中生物量增加,壳聚糖产量也增加。当玉米浆添加量为

60 g/L,壳聚糖的产量达到最大值1.915 g/L,随后继续增加玉米浆添加量,生物量有所增加,但对壳聚糖产量影响不大,并有下降的趋势。因此,确定培养基中玉米浆的添加量为60 g/L。

2.2.2 玉米粉液化液添加量对壳聚糖产量的影响

以60 g/L的玉米浆为氮源,向培养基中添加不同浓度的玉米粉液化液,实验结果如图2所示。

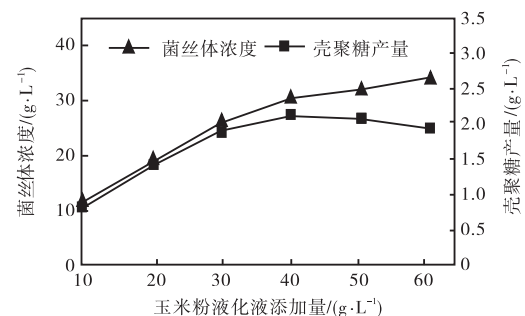


图2 玉米粉液化液添加量对壳聚糖产量的影响

Fig.2 Effect of the concentration of corn flour on chitosan production

由图 2 可知,玉米粉液化液添加量从 10 g/L 增加到 40 g/L 时,菌丝体浓度不断增加,壳聚糖产量从 0.846 g/L 增加到 2.142 g/L,但是当玉米粉液化液添加量超过 40 g/L 时,菌丝体浓度增加,但壳聚糖得率反而有所下降. 因此,确定培养基中玉米粉液化液的添加量为 40 g/L.

2.3 响应面法优化培养基中玉米粉液化液和玉米浆的添加量

2.3.1 实验因素水平编码与实验结果

根据单因素优化实验结果,选择玉米浆和玉米粉液化液的最适添加量作为后续响应面优化的中心点,分别以 X_1 、 X_2 表示,壳聚糖产量 Y 为响应值. 采用响应面分析法在 2 因素 5 水平上对培养基的组成进行优化. 按方程 $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X$ 对自变量进行编码,其中 x_i 为自变量的编码值, X_i 为自变量的真实值, X_0 为实验中心点处自变量的真实值, ΔX 为自变量的变化步长. 因此, $x_1 = (X_1 - 6) / 2$, $x_2 = (X_2 - 4) / 1$,各因素及水平编码见表 4.

表 4 实验因素水平及编码
Tab.4 Levels and codes of factor

| 因素 | 代码 | 编码水平 | | | | |
|-----------------------------|-------|-----------|----|----|----|-----------|
| | | -1.414 21 | -1 | 0 | 1 | +1.414 21 |
| 玉米浆/(g·L ⁻¹) | X_1 | 31.7 | 40 | 60 | 80 | 88.3 |
| 玉米粉液化液/(g·L ⁻¹) | X_2 | 25.9 | 30 | 40 | 50 | 54.1 |

根据 Box-Behnken 中心组合原理,设计方案安排 13 个实验点,其中 1~8 为析因实验,9~13 为零点. 析因点为自变量取值在 x_1 、 x_2 所构成的三维顶点,零点为区域的中心点,其中零点实验重复 5 次,用于估计实验的误差. 每个实验重复 3 次取平均值. 中心组合的实验设计及结果见表 5.

表 5 中心组合的实验设计及实验结果
Tab.5 Test design and results of the central composite design

| 实验号 | x_1 | x_2 | 壳聚糖的产量/(g·L ⁻¹) |
|-----|-----------|-----------|-----------------------------|
| 1 | -1 | -1 | 1.672 |
| 2 | -1 | 1 | 1.892 |
| 3 | 1 | -1 | 1.931 |
| 4 | 1 | 1 | 2.032 |
| 5 | -1.414 21 | 0 | 1.811 |
| 6 | +1.414 21 | 0 | 2.085 |
| 7 | 0 | -1.414 21 | 1.862 |
| 8 | 0 | 1.414 21 | 2.012 |
| 9 | 0 | 0 | 2.142 |
| 10 | 0 | 0 | 2.134 |
| 11 | 0 | 0 | 2.154 |
| 12 | 0 | 0 | 2.098 |
| 13 | 0 | 0 | 2.213 |

利用 SAS 软件对表 5 实验数据进行多元回归分析,建立二次响应面回归模型. 对该模型进行方差分析,并且利用 F 检验和 P 值来确定其在统计学上的显著性. 从方差分析结果表 6 可知回归模型的 F 检验显著($P < 0.01$),相关系数 $R^2 = 0.947 8$,由此认为玉米浆和玉米粉液化液两种培养基组分与壳聚糖产量之间存在显著的回归关系. 由于玉米浆和玉米粉液化液在交互项上 $P > 0.05$,可认为两者的交互作用不显著. 失拟项在 $\alpha = 0.05$ 水平上不显著($P = 0.305 1 > 0.05$),说明数据中没有异常点,不需要引入更高次的项,模型恰当,因此可以用该模型代替实验真实点对实验结果进行分析. 由表 7 可知拟合的二次多项式回归方程为

$$y = 2.148 2 + 0.098 312x_1 + 0.066 642x_2 - 0.115 288x_1x_1 - 0.029 75x_1x_2 - 0.120 788x_2x_2$$

表 6 方差分析表
Tab.6 Variance analysis of regression equation

| 方差来源 | 自由度 | 平方和 | 均方 | F 值 | $Pr > F$ |
|------|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 模型 | 5 | 0.287 993 | 0.057 599 | 25.402 99 | 0.000 238 |
| 一次项 | 2 | 0.112 85 | 0.056 425 | 24.885 46 | 0.000 658 |
| 二次项 | 2 | 0.171 603 | 0.085 801 | 37.841 34 | 0.000 177 |
| 交互项 | 1 | 0.003 54 | 0.003 54 | 1.561 373 | 0.251 623 |
| 误差 | 7 | 0.015 872 | 0.002 267 | | |
| 失拟项 | 3 | 0.008 879 | 0.002 96 | 1.692 973 | 0.305 069 |
| 误差项 | 4 | 0.006 993 | 0.001 748 | | |
| 总和 | 12 | 0.303 865 | | | |

表 7 回归方程系数显著性检验
Tab.7 Regression coefficients and their significance of the quadratic model

| 模型项 | 参数估计 | 标准误差 | T 值 | $P > T $ |
|----------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| x_1 | 0.098 312 1 | 0.016 835 5 | 5.839 688 | 0.000 637 |
| x_2 | 0.066 641 8 | 0.016 835 | 3.958 475 | 0.005 472 |
| x_1x_1 | -0.115 288 | 0.018 054 | -6.385 79 | 0.000 372 |
| x_1x_2 | -0.029 75 | 0.023 809 | -1.249 55 | 0.251 623 |
| x_2x_2 | -0.120 788 | 0.018 054 | -6.690 44 | 0.000 28 |

响应曲面图是响应值在各实验因子交互作用下由得到的结果所构成的一个三维空间曲面. 对回归模型进行规范性分析,绘制出相应的响应面图和等高线图(图 3)来确定最大响应值时变量的最佳水平. 由图 3 可以看出,各交互因素的最佳作用点基本都落在实验范围之内. 通过响应面分析得出最佳实验参数为 $x_1 = 0.397$ 、 $x_2 = 0.227$,计算后得到玉米浆添加量为 67.9 g/L、玉米粉液化液添加量为 42.3 g/L 时,此时模型预测的壳聚糖的最大产量为 2.175 g/L.

2.3.2 回归模型的验证实验

为验证模型的有效性,并考虑到实际工艺方便,

将响应面优化后的培养基修正为玉米浆添加量 68 g/L、玉米粉液化液添加量 42 g/L,进行 5 次发酵实验. 结果显示 5 组平行实验壳聚糖的平均产量为 2.223 g/L,与理论预测值 2.175 g/L 相对误差小于 5%,实验结果与模型的预测值基本一致.

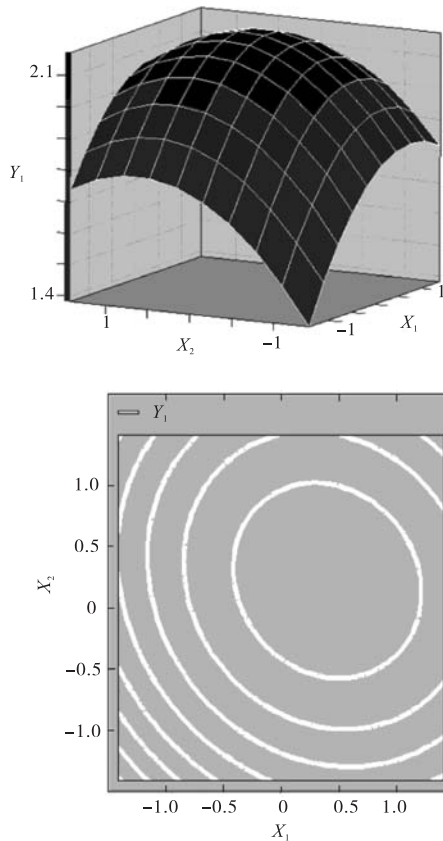


图 3 响应曲面和等高线图

Fig.3 Response surface stereograms and contour map

3 结论

通过研究不同的碳氮源对雅致放射毛霉发酵合成壳聚糖的影响,确定玉米粉液化液和玉米浆作为最适碳源和氮源. 以壳聚糖产量为指标,通过单因素实验和响应面法优化了发酵培养基,确定了发酵培养的

最佳组成为 (g/L): 玉米浆 68, 玉米粉液化液 42, KH_2PO_4 2, MgSO_4 2. 28 °C 摇床转速 200 r/min 培养 48 h 后,壳聚糖产量为 2.223 g/L,较优化前的 1.353 g/L 提高了 64.30%. 实验证明,利用价格低廉且来源丰富的玉米浆、玉米粉液化液为原料培养雅致放射毛霉菌体制备壳聚糖,不仅取得了良好效果,而且原料粗放,培养基组分简单,有效降低了生产成本.

参考文献:

- [1] Kumar M N V R. A review of chitin and chitosan applications[J]. *Reactive and Functional Polymers*, 2000, 46(1):1-27.
- [2] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 5-6.
- [3] 小林丘, 滝口泰之, 岛原健三, 等. 犁头霉属甲壳素的分布及其性状[J]. *日本农艺化学会志*, 1998, 62(10): 1463-1469.
- [4] White S A, Farina P R, Fulton I. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1979, 38(2):323-328.
- [5] 陈世年. 从米根霉细胞壁寻找天然壳聚糖的研究(I)[J]. *华侨大学学报:自然科学版*, 1995, 16(3):323-327.
- [6] 曹健, 殷蔚申. 黑曲霉几丁质和壳聚糖的研究[J]. *微生物学通报*, 1995, 22(4):200-203.
- [7] 陈忻, 袁毅桦, 黄耀威, 等. 微生物培养法生产壳聚糖的初步研究[J]. *食品科学*, 1999(7):22-25.
- [8] 陈忻, 赖兴华, 袁毅桦, 等. 用丝状真菌制备壳聚糖的研究[J]. *精细化工*, 2000, 17(3):132-134.
- [9] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.5—2003 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [10] 潘进权, 刘耘. 菌丝结团问题的探讨[J]. *中国酿造*, 2002(4):33-34.
- [11] 李文友, 赵学明. 玉米浆为有机氮源的 L-乳酸发酵的研究[J]. *化工时刊*, 2006, 20(9):61-63.