

cytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine liposomes[J]. **Japanese Journal of Pharmacology**, 1987, 44: 77 - 84.

[8]Lis - Balchin M, Ochoka R J, Deans S G, et al. Differences in bioactivity between the enantiomers of  $\alpha$  - pinene[J]. **Journal of Essential Oil Research**, 1999, 11: 393 - 397.

[9]Skandamis P, Tsigarida E, Nychas G - J E. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C conditions [J]. **Food Microbiology, under Aerobic**, VP/MAP 2002, 19(1): 97 - 103.

[10]Singh A, Singh R K, Bhunia A K, et al. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs[J]. **Lebensmittel - Wissenschaft und - Technologie**, 2003, 36(8): 787 - 794.

[11]Mejlholm O, Dalgaard P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro - organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2002, 34(1): 27 - 31.

[12]Koutsoumanis K, Lambropoulou K, Nychas G - J E. A predictive model for the non - thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 1999, 49(1 - 2): 63 - 74.

[13]Antonios E. Goulas and Michael G. Kontominas. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf - life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes [J]. **Food Chemistry**, 2007, 100(1): 287 - 296.

[14]Suzuki T, Itakura J, Watanabe M, et al. Inactivation of Staphylococcal enterotoxin - A with an electrolyzed anodic solution[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002, 50(1): 230 - 234.

[15]Mahmoud Barakat S M, Mahmouda K, Yamazakib K, et al. A new technology for fish preservation by combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds[J]. **Food Chemistry**, 2006, 99(4): 656 -

662.

[16]Smith - Palmer A, Stewart J, Fyfe L, et al. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese[J]. **Food Microbiology**, 2001, 18(4): 463 - 470.

[17]Serrano M, Mart íez - Romero D, Castillo S, et al. The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage[J]. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2005, 6(1): 115 - 123.

[18]Feng W, Zheng Xdong. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. [C]. Food Control, In Press, Corrected Proof, Available online 12 September 2006.

[19]Weissinger W R, McWatters K H, Beuchat L R. Evaluation of volatile chemical treatments for lethality to *Salmonella* on alfalfa seeds and sprouts[J]. **Journal of Food Protection**, 2001, 64(4): 442 - 450.

[20]Roller S, Seedhar P. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh - cut melon and kiwifruit at 4 °C and 8 °C [J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2002, 35(5): 390 - 394.

[21]Nielsen P V, Rios R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2000, 60(2 - 3): 219 - 229.

[22]Seydim A C, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils[J]. **Food Research International**, 2006, 39(5): 639 - 644.

[23]Oussallah M, Caillet S, Salmieri S, et al. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle[J]. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 2004, 52(18): 5598 - 5605.

## 生物合成法生产 $\alpha$ - 葡聚糖酶

邓旭<sup>1</sup>,程志敬<sup>2</sup>,卢英华<sup>2</sup>

(1. 深圳大学生命科学学院, 广东 深圳 518060; 2. 厦门大学化学工程与生物工程系, 福建 厦门 361005)

**摘要:**概述了微生物来源的  $\alpha$  - 葡聚糖酶国内外生产现状,介绍了生产  $\alpha$  - 葡聚糖酶的不同方法,对生物合成法及其产酶的影响因素进行了具体分析,并指出今后中国  $\alpha$  - 葡聚糖酶的研究方向。

**关键词:**  $\alpha$  - 葡聚糖酶;生物合成法;微生物

中图分类号:Q781 文献标识码:A 文章编号:1004 - 311X(2006)06 - 0092 - 04

## Production of $\alpha$ - glucanase by Biosynthesis Method

DENG Xu<sup>1</sup>, CHENG Zhi - jing<sup>2</sup>, LU Ying - hua<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

2. Chemical & Biochemical Engineering Department, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Present research situation and strategies of production of  $\alpha$  - glucanase from micro - organism were reviewed. Factors influencing  $\alpha$  - glucanase production by biosynthesis method were analysed specifically, and what should be researched in  $\alpha$  - glucanase in our country was pointed out.

**Key words:**  $\alpha$  - glucanase; biosynthesis method; microorganism

$\alpha$  - 葡聚糖酶 ( $\alpha$  - glucanase)是指可将  $\alpha$  - 葡聚糖降解为低分子量片断的酶,由于对  $\alpha$  - 葡聚糖具有重要的水解作用,目前  $\alpha$  - 葡聚糖酶在饲料、食品、造纸、纺织、日化等领域发挥着巨大的作用。近年来,  $\alpha$  - 葡聚糖酶的研究势头有增无减,生产方法不断改进,来源范围不断扩大。我国从 1982 年始开展该酶种生产菌的选育,经过 20 年的努力,在这方面的研究取得了一定的进展。

目前  $\alpha$  - 葡聚糖酶的生产方法主要有两种,即提取分离法和生物合成法(即发酵法)。提取分离法主要应用于动物、植物生产  $\alpha$  - 葡聚糖酶,国内的王骥(2001)<sup>[1]</sup>等,国外的 Takashi Alkiyama, et al. (1998)<sup>[2]</sup>等都在这方面进行了研究,而生物合成法则主要应用于微生物细胞。由于自然界中微生物资源丰

富,且利用微生物细胞产酶具有易变异、生长繁殖快、产酶周期短、发酵产物单纯等优点,因此,采用生物合成法生产  $\alpha$  - 葡聚糖酶受到大多数研究者的青睐。以往文献中对  $\alpha$  - 葡聚糖酶生产的综述性报导很少,易华西等<sup>[3]</sup>的综述文章仅仅是对  $\alpha$  - 葡聚糖酶的应用及研究现状作了简单的回顾,而  $\alpha$  - 葡聚糖酶的生产基本没有涉及。本文对微生物来源的  $\alpha$  - 葡聚糖酶国内外生产现状进行了较为系统的综述。

### 1 生物合成法生产 $\alpha$ - 葡聚糖酶

生物合成法,即发酵法,是 20 世纪 50 年代以来酶的主要生产方法,可以分为液体深层发酵、固体培养发酵、固定化细胞发酵和固定化原生质体发酵等,现在普遍使用的是液体深层发酵技术。

已有报道的绝大多数  $\alpha$  - 葡聚糖酶均属胞外酶,关于胞内酶的研究相对较少。产  $\alpha$  - 葡聚糖酶菌株的培养方法大部分采用液体深层发酵法,包括摇瓶发酵培养法和发酵罐培养法(分为:分批发酵、补料分批发酵和连续发酵),且采用摇瓶发酵培养法居多,也有部分采用固体发酵培养或固定化细胞发酵等方法。

收稿日期:2006 - 09 - 14;修回日期:2006 - 10 - 30

基金项目:广东省科技计划项目资助

作者简介:邓旭(1968 - ),男,博士,副教授,研究方向:生物工程、环境生物技术, Tel: 0755 - 26535360, E - mail: dengxu @szu. edu. cn, 通讯联系人。

### 1.1 液体深层发酵

液体深层发酵是微生物细胞在液体深层中进行厌氧或需氧纯种培养过程,是目前 - 葡聚糖酶发酵生产的主要方式。该法的机械化程度较高,技术管理较严,酶产率高,质量好,产品回收率也较高。

孙玉英等(2003)<sup>[6]</sup>研究了局限曲霉(*Aspergillus restrictus*) QY-003 摇瓶发酵产 - 葡聚糖酶。在初步设计的初始产酶培养基和初始产酶条件下,摇瓶结果为478.825u/mL,在此基础上对培养基中碳、氮源以及温度、溶氧、发酵周期、菌体浓度和初始 pH 进行了优化研究。结果表明,最适碳源为大麦粉,氮源为硫酸铵,最适初始发酵 pH 为6.0,最适接种量为每瓶 1mL 孢子悬液(孢子悬液浓度为  $2.5 \times 10^7$  cell/mL),最适发酵温度为 32 ℃,500mL 三角瓶发酵液装量为 80mL 在发酵周期为 72h 时酶活达到 1 898.52u/mL,比初始产酶水平提高了 3 倍。这方面的研究还包括,国内,林宇野(1995)<sup>[4]</sup>和郑毅等(2001)<sup>[5]</sup>利用曲霉属摇瓶发酵生产 - 1,3 - 1,4 - 葡聚糖酶;费笛波等(2002)<sup>[7]</sup>对芽孢杆菌突变株 BS9418F 摇瓶发酵生产 - 葡聚糖酶进行了研究;国外,T Y Hong 和 M Meng(2003)<sup>[8]</sup>采用摇瓶发酵由芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)生产内切 - 1,3 - 葡聚糖酶;Yu V Burtseva 等(2003)<sup>[9]</sup>报道了由 *Trichoderma aureviride* 摇瓶发酵生产外切 - 1,3 - 葡聚糖酶。

### 1.2 固体培养发酵

固体培养发酵指的是将微生物接种于灭过菌的固体培养基上,在一定的培养条件下进行培养。该方法具有投资小,所需生产设备少,简便易行,适于品种的小型化生产等特点,特别适用于各种霉菌的培养和发酵产酶,但劳动强度大,原料利用率低,生产周期较长。

郑毅等(2001)<sup>[10]</sup>对黑曲霉(*Aspergillus niger*) FSN65 产 - 葡聚糖酶固态发酵进行了研究。在初始产酶培养基及初始产酶条件下,产酶水平达到624.3IU/g(干料计),在此基础上进行了产酶培养基及产酶条件的优化研究,分析了培养基碳氮比、无机氮源、水分比例以及初试 pH、培养温度、接种量和发酵周期等因素对产酶的影响,确定最佳培养方案为:培养基中 C/N 为 8:1,无机氮源为  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,培养基中干料与水分比例为 1:1,培养基初始 pH 为 6.0,接种量为每瓶 0.5mL 孢子悬液(孢子浓度为  $4.5 \times 10^7$  /mL),培养温度为 33 ℃。在以上最适条件下固态培养 70h,最高酶活可达 786.9IU/g(干料计),比初始设计提高了 26%。同时对粗酶液的酶学性质进行了研究,确定 - 葡聚糖酶的最适作用 pH 为 5.0,最适作用温度为 75 ℃。此外,国内的李卫芬(2001)<sup>[11]</sup>,国外的 Ita C Connely, et al. (1991)<sup>[12]</sup>, Kalogeris E, et al. (2003)<sup>[13]</sup>, Jecu Luiza(2000)<sup>[14]</sup> 等都曾对固体发酵生产 - 葡聚糖酶进行了研究。

### 1.3 固定化细胞发酵

固定化细胞是 20 世纪 70 年代后期才发展起来的技术,细胞固定化的方法很多,归纳起来主要可分为吸附法和包埋法两大类。固定化细胞发酵具有如下显著的优点<sup>[15]</sup>:细胞的密度高,发酵稳定性好,易于连续化生产,细胞流失少,可在高稀释率的情况下连续发酵,并可提高产品质量等。但固定化细胞发酵技术要求较高,需要特殊的固定化细胞反应器,因此只适用于胞外酶的生产。

Vladimir Jirk u(1996)<sup>[16]</sup>采用结合法,将 *Aspergillus vesicolor* 菌丝细胞共价结合于载体之上,并对其发酵产 - 葡聚糖酶进行了研究。等量(细胞干重)游离与固定化的细胞接种于培养基中,于相同条件下培养,并对二者产 - 葡聚糖酶情况加以比较。比较结果表明,两种细胞生产的酶都表现出对昆布多糖和酵母葡聚糖的活性,同时固定化细胞生产的酶还对几丁质和石耳素具有活性(表 1)。二者生产的 - 1,3 - 葡聚糖酶不仅在分子量、糖类组成等物理性质上存在差异,而且来源于固定化细胞的 - 1,3 - 葡聚糖酶无论从酶活还是 pH 与温度

的稳定性方面来讲都优于来源于游离细胞的,酶活性受重金属离子和各种清洁剂的影响也较小。此外,孙东梅(2006)<sup>[17]</sup>、Lusta K A, et al. (2000)<sup>[18]</sup>、El - Katatny, et al. (2003)<sup>[19]</sup> 等都曾对固定化细胞发酵生产 - 葡聚糖酶进行了报道。

表 1<sup>[16]</sup> 不同底物对游离与固定化细胞发酵生产 - 葡聚糖酶的影响  
Table 1 Effect of substrates on the production of - glucanase by free and immobilized cells

底物	糖苷键	菌丝细胞产 - 葡聚糖酶活性(U $\cdot$ mg <sup>-1</sup> )	
		游离	固定化
昆布多糖	- 1,3 -	73	52
酵母葡聚糖	- 1,3 -	42	76
几丁质	- 1,4 -	0	18
石耳素	- 1,6 -	0	33

## 2 生物合成法生产 - 葡聚糖酶的影响因素

采用生物合成法生产 - 葡聚糖酶会受到多方面因素的影响,包括菌种选育、培养基、操作条件以及诱导物和表面活性剂的添加、阻遏物浓度等。

### 2.1 菌种的选育方法对产酶的影响

#### 2.1.1 新种筛选

用于产酶菌株初筛的方法主要有以下四种:(1)快速凝胶扩散测定法;(2)GCN 平板法;(3)改良琼脂块鉴定平板法;(4)牛津杯琼脂块鉴定平板法。方法(1)是测定 - 葡聚糖酶的定性方法,有一定的准确性;方法(2)与(1)相比,其优点是将产酶和酶活测定融为一体,但是其筛选的准确性较差;方法(3)与前两种方法相比优点为快速,准确性高。但是方法(2)和(3)一个共同的缺点是,对于菌落蔓延很快的菌种,菌丝会很快覆盖透明圈,而采用方法(4)则可以克服这一缺陷。

郑毅等(2001)<sup>[20]</sup>对诱变后的米曲霉(*Aspergillus oryzae*) FS68 采用改良琼脂块鉴定平板法与抗高浓度阻遏相结合,进行 - 1,3 - 1,4 - 葡聚糖酶高产菌株的定向筛选工作。确定温度为 27~29 ℃,初始 pH 为 6.7,平板厚度为 2.5~3mm,脱氧胆酸钠浓度为 0.06%时,检出效果较好。在较短时间内完成 5 代诱变育种工作,其酶活单位由出发菌株的 752.16u/mL 提高到 1271.15u/mL,产酶能力提高了 69%。孙玉英等(2004)<sup>[21]</sup>应用牛津杯琼脂块鉴定平板法,从牛的瘤胃中筛选出一株产 - 葡聚糖酶活力达 2269.25u/mL 的高产局限曲霉(*Aspergillus restrictus*) 菌株。此外,郑元平等(2004)<sup>[22]</sup>对产 - 葡聚糖酶的地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) A302 菌株进行紫外线和硫酸二乙酯(DES)复合诱变和选育,获得产 - 葡聚糖酶达 27.3U/mL 的突变株 H302;林宇野(1995)<sup>[4]</sup>采用 GCN 平板法筛选出产 - 葡聚糖酶的黑曲霉(*Aspergillus niger*) 菌株。

#### 2.1.2 诱变育种

诱变育种就是采用合适的理化致变剂处理均匀分散的微生物细胞群,促使其突变频率大幅度提高,然后运用合理的筛选程序和方法把优良突变子挑选出来,以供生产实践和研究之用。诱变育种往往必须是诱发突变与大规模的筛选工作相结合才能收到良好的效果。

Henri Durand, et al. (1998)<sup>[23]</sup>为选育适合于工业化生产纤维素酶的菌株,分别以甲基硝基亚硝基胍(NTG)、乙基甲磺酸(EMS)和亚硝酸( $\text{HNO}_2$ )为诱变剂对里氏木霉(*Trichoderma reesei*) 菌株进行诱变,最终筛选出的突变株 CL847 与出发菌株 QM9414 相比在纤维素培养基中酶产量提高 4 倍,所生产的酶不受分解代谢物阻遏抑制,且表现出组成酶的性质;程志敬等人(2006)<sup>[24]</sup>利用重组 *E. coli* JM109 发酵生产 - 1 - 3,1 - 4 - 葡聚糖酶,优化条件下发酵 30h, - 葡聚糖酶活力达到 297.71 U/mL,约为初始时的 14.3 倍。

### 2.2 培养基和操作条件的影响

#### 2.2.1 培养基

培养基一般包括碳源、氮源、无机盐和生长因子等几大类

组分。不同的菌种对培养基的要求不同,同一菌种用于生产不同物质时所要求的培养基也不一样。在-葡聚糖酶的生产中,必须充分考虑各种组分,尤其是碳源和氮源对细胞生长及产酶的影响,并注意组分之间的比例,可以适当添加诱导物和表面活性剂,以期获得活性较高的-葡聚糖酶。

Usama Beshay等(2003)<sup>[25]</sup>采用重组 *E. coli* BL21 表达并生产来源于芽孢杆菌的杂合-1,3-葡聚糖酶时,初始酶活力为150U/mL,为了提高产酶水平分析了培养基中不同碳源、氮源及NaCl浓度对产酶的影响。在分析碳源的影响时,分别以木糖、半乳糖、甘油、葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、甘露糖、米粉、可溶性淀粉、糊精、玉米淀粉和马铃薯淀粉等为碳源进行实验,结果表明以乳糖为唯一碳源的培养基中-葡聚糖酶活力最高,达到380U/mL,因此,确定乳糖为最佳碳源,且浓度选为7g/L;选择氮源时,在硫酸氨、硝酸钠、硝酸氨、氯化铵、亚硝酸钠、尿素、牛肉膏和酵母粉之间进行比较,发现酵母粉为最佳氮源,此时-葡聚糖酶活力最高,达到423U/mL,确定其浓度为24g/L;NaCl的浓度对细胞生长和酶的生产也有一定的影响,NaCl浓度在0~30g/L之间变化时,细胞干重在5g/L以外明显降低,且-葡聚糖酶的活力值也以5g/L时为最高,因此,确定NaCl最佳浓度为5g/L。在以上最适条件下摇瓶发酵最高酶活达到512U/mL,为初始时的4倍。

### 2.2.2 操作条件

每一种细胞在生长繁殖和发酵产酶时都受到某些条件的影响,包括pH、温度和溶解氧等,有其最适范围,因此,必须适当调节这些条件以满足细胞生长及产酶的需要。

郑毅等(2001)<sup>[5]</sup>对黑曲霉FS25摇瓶发酵生产-1,3-1,4-葡聚糖酶的产酶条件进行了优化。在优化培养基初始pH时,设置了4.0、5.0、6.0、7.0、7.5等5个不同初始pH的发酵培养基,结果表明在所考察的pH梯度范围内,产酶培养基最适起始pH为5.0;在研究发酵温度对产酶的影响时,设置了26、28、30、32和34 5个温度梯度进行实验,结果表明发酵产酶的最适温度为32;溶氧以摇瓶装液量来控制,在250mL三角瓶中加入20mL、30mL、40mL、50mL、60mL和70mL产酶培养基,摇瓶产酶结果表明当摇瓶装液量为50mL时最适合该菌株在本实验条件下产酶;分析接种量对产酶的影响时,在每个三角瓶的产酶培养基中接入不同的种子量(用孢子悬液的mL数计),当接种量为1.5mL时,产酶水平最高;培养时间的影响,将黑曲霉孢子接入最佳发酵培养基后,32 摇瓶培养,于不同时间取样,测定酶活、pH、生物量及残糖,结果在30h其生物量达到最高峰,此时酶活也达到最大值80.1u/mL,随时间延长,虽然生物量基本维持不变,但残糖逐渐减少,产酶水平也逐渐下降,故最适的发酵周期在30h左右即可。周海燕等人<sup>[26]</sup>对发酵生产葡甘聚糖酶的最佳条件进行了探索。他们在5L发酵罐上测定不同温度、pH和接种量对发酵的影响,并用正交试验筛选最佳的产酶条件配伍。结果表明该菌产生葡甘聚糖酶的条件为接种量10%,通气量20L/h,发酵的前16h温度为40,搅拌速度200r/min,pH7.0左右,之后温度调至50,搅拌速度100r/min,pH调至6.0左右,添加0.25%的豆油做消泡剂。在此条件下发酵获得的酶比活力可达5009U/mg,总活力达到10819U/ml。

## 2.3 诱导物、表面活性剂的添加和阻遏物浓度对产酶的影响

### 2.3.1 添加诱导物

许多-葡聚糖酶都为诱导酶,尤其是纤维素酶(已经证明细菌和真菌纤维素酶均为诱导酶),因此,在培养基中添加适量诱导物对产酶有利。-葡聚糖酶的诱导物一般为-葡聚糖、寡糖、二糖等及其衍生物。

在-葡聚糖对-葡聚糖酶的诱导过程中,环境中无-葡聚糖存在时,-葡聚糖酶仅有少量合成,当外界加入一定量的-葡聚糖时,由于该糖分子量较大(一般在15000~

29000),不能进入细胞,只能被释放到胞外的、少量的-葡聚糖酶分解,产生小分子产物如寡糖或二糖、单糖等,随着小分子产物的积聚,经渗透作用进入细胞,从而对-葡聚糖酶产生诱导作用,于是-葡聚糖酶便大量合成。MD Busto等人(1996)<sup>[27]</sup>对里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)和*Pseudomonas pickettii*诱导产羧甲基纤维素酶(CMCase)进行了研究。分别以3种可溶性双糖和3种纤维素为诱导物,均可在不同程度上提高酶的产量,且以纤维素MN-300为诱导物时产酶量最高(表2)。

表2<sup>[27]</sup>不同碳源对胞外羧甲基纤维素酶(CMCase)的诱导

Table 2 Induction of extra-cellular CMCase by different carbon sources

Inducer	CMCase activity ( $\mu\text{mol glucose mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ )		
	<i>A. niger</i>	<i>T. reesei</i>	<i>P. pickettii</i>
D(+) Sucrose	-	8.94	0.00
Lactose	0.47	15.60	0.00
D(+) Cellobiose	1.54	14.50	0.36
CMC	1.11	39.61	0.0
Cellulose C-6413	0.04	140.16	0.01
Cellulose MN-300	24.49	185.08	1.42

### 2.3.2 控制阻遏物浓度

-葡聚糖酶的生产是受诱导和阻遏两种模式调控的,阻遏主要是指分解代谢物阻遏,阻遏物单独或与诱导物同时存在时都会影响-葡聚糖酶的生产,因此,控制阻遏物的浓度是十分重要的。

郑毅等(2001)<sup>[20]</sup>研究米曲霉(*Aspergillus oryzae*)产-葡聚糖酶时,发现葡萄糖为米曲霉产-葡聚糖酶抗降解阻遏物。控制葡萄糖浓度在一定范围内有助于提高酶的产量。Stoppok等(1982)<sup>[28]</sup>在培养潮湿纤维单胞菌(*Cellulomonas uda*)时,研究了葡萄糖和纤维二糖浓度对生产内切-1,4-葡聚糖酶的影响(表3),结果表明葡萄糖是*C. uda*生产内切-1,4-葡聚糖酶的阻遏物,而纤维二糖只有在高浓度时才成为阻遏物,必须有效控制二者的浓度以提高菌株产酶能力。

表3<sup>[28]</sup>诱导和阻遏作用对内切-1,4-葡聚糖酶生产的影响

Table 3 Effect of inducing or repressing compounds on the production of -1,4-glucanase

Inducing or repressing compound added	Cellobiose				Glucose			
Gcn (mmol/L)	0.00	0.05	0.10	1.00	2.00	0.00	1.00	3.00
Time required for 50% reduction in viscosity (min) <sup>a</sup>	78	69	63	114	120	66	75	81

a: 底物羧甲基纤维素钠粘度降低50%所需时间。

### 2.3.3 添加表面活性剂

细胞内-葡聚糖酶的合成是受严格代谢控制的,当细胞内合成的-葡聚糖酶浓度达到一定水平时,由于产物的抑制作用,酶的合成停止。如果使用吐温、特里顿等非离子型表面活性剂改变膜的通透性,使细胞内产生的酶不断排出细胞外,细胞内酶的浓度始终低于能引起反馈抑制的水平,这样酶的合成就可以连续进行,从而可提高酶的产量。

邓卫东等人(2005)<sup>[29]</sup>研究了吐温80对瘤胃微生物产酶能力的影响。在所测试的木聚糖酶、蛋白酶、淀粉酶、葡聚糖酶和果胶酶中,吐温80的添加能提高前4种酶的活力,提高幅度最大的是葡聚糖酶,添加0.05%和0.10%的吐温80可使葡聚糖酶活力分别提高223%和221%。孙东梅等人(2006)<sup>[18]</sup>的研究也表明添加0.1%的吐温80可以使黄绿木霉的葡聚糖酶生产能力提高17%。

## 3 展望

利用微生物细胞发酵生产-葡聚糖酶,必须充分考虑各种影响因素,注重培养基组成和操作条件的控制,以期实现菌种最大程度产酶量,因此对发酵产酶条件的优化应进行更为深入的研究。另外,我国微生物资源丰富,鉴于微生物生产

- 葡聚糖酶的种种优点,今后还应在对产酶微生物的改良和诱变方面有所侧重。在了解微生物特点的基础之上,在诸如高产菌株的选育、培养条件的优化、耐高温、耐酸碱等方面加大投入,并针对现在使用 - 葡聚糖酶存在的一次性使用成本高的问题尽量扩大酶的来源,以求生产高效低成本 - 葡聚糖酶,尽快改变我国饲料酶制剂大量依赖进口的不利状况。

参考文献:

[1]王骥,赵辅昆,陈清西.福寿螺(*Ampullaria Crosseana*)外切 - 1,4-葡聚糖酶/外切 - 1,4-木聚糖酶的分离纯化及性质[C].上海:中国生物化学与分子生物学会第八届会员代表大会暨全国学术会议论文集,2001:36-39.  
[2]Takashi Akiyama, Hanae Kaku & Naoto Shibuya. Purification, characterization and NH<sub>2</sub>-terminal sequencing of an endo - (1,3,1,4) -  $\alpha$ -glucanase from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Science*, 1998, 134:3-10.  
[3]易华西,徐德昌. - 葡聚糖酶的应用及研究现状[J]. 中外食品, 2005, (5): 38-39.  
[4]林宇野. 丝状真菌产生 - 葡聚糖酶的研究. GCN 平板的建立及产酶菌株的选育[J]. 福建师范大学学报, 1995, 11(3): 94-101.  
[5]郑毅,陈接锋,马石金,等. 黑曲霉 FS25 产 - 葡聚糖酶发酵特性的研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(4): 47-50.  
[6]孙玉英,王瑞明,关凤梅,等. 局限曲霉产 - 葡聚糖酶发酵特性的研究[J]. 酿酒科技, 2003, 118(4): 36-37.  
[7]费笛波,冯观泉,李孝辉,等. - 葡聚糖酶高产菌株 BS9418F 的选育及其发酵条件的研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(1): 29-31.  
[8]T. - Y. Hong & M. Meng. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo - (1,3 -  $\alpha$ -glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden oil [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 61:472-478.  
[9]Yu. V. Burtseva, N. S. Verigina, V. V. Sova, et al. O - Glycosylhydrolases of marine filamentous fungi: - 1,3 -  $\alpha$ -glucanases of *Trichoderma aureoviride* [J]. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2003, 39(5):475-481.  
[10]郑毅,陈接锋,吴松刚. 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 产 - 葡聚糖酶固态发酵优化的研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(12): 7-10.  
[11]李卫芬,孙建义,顾赛红. - 葡聚糖酶的分离纯化和特性研究[J]. 菌物系统, 2001, 20(2): 178-183.  
[12]Ita C. Connelly & Michael P. Coughlan. Isolation and characterization of two endo -  $\alpha$ -glucanases from solid - state cultures of the aerobic fungus *Penicillium capsulatum* [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 1991, 13:462-469.  
[13]Kalageris E., Christakopoulos P., Katapodis P, et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state culturation of agricultural wastes [J]. *Process*

*Biochem.*, 2003, 38(7):1099-1104.  
[14]Jecu Luiza. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production [J]. *Inds. Crops Prod.*, 2000, 11(1): 1-5.  
[15]郭勇. 酶的生产与应用 [M]. 北京:化学工业出版社, 2003: 20-22.  
[16]Vladimír Jirků. The use of covalently immobilized mycelia to modify the - glucanase system of *Aspergillus versicolor* [J]. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1996, 65(2): 179-185.  
[17]孙东梅,杨谦,宋金柱. 黄绿木霉固定化生产纤维素酶及酶学特性的研究 [J]. 林产化学与工业, 2006(2): 79-82.  
[18]Lusta K.A., Chung I.K., Sul I.W., et al. Immobilization of fungus *Aspergillus* sp by a novel cryogel technique for production of extracellular hydrolytic enzymes [J]. *Process Biochem.*, 2000, 35(10):1177-1182.  
[19]El - Katatny, Momein H, Ahmed M. Improvement of cell wall degrading enzymes production by alginate encapsulated *Trichoderma* spp [J]. *Food Technol. Biotechnol.*, 2003, 41(3): 219-225.  
[20]郑毅,段慧明,等. 快速筛选产 - 葡聚糖酶曲霉及抗阻遏育种 [J]. 生物技术, 2001, 11(1): 21-24.  
[21]孙玉英,王瑞明,刘庆军,等. - 葡聚糖酶高产菌株的分离筛选及其新菌种初步鉴定 [J]. 酿酒科技, 2004, (2): 25-27.  
[22]郑元平,袁康培,冯明光. 啤酒用 - 葡聚糖酶高产菌株的选育及发酵条件优化 [J]. 农业科学技术学报, 2004, 12(3): 316-321.  
[23]Henri Durand & Marc Clanet. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulose production [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 1988, 10: 341-346.  
[24]程志敬,邓旭,卢英华. 重组大肠杆菌发酵生产 1-3,1-4-葡聚糖酶培养基优化研究 [J]. 工业微生物, 2006, 36(2): 26-30.  
[25]Usama Beshay, Hesham El - Enshasy, I. M. K. Ismail, et al. - glucanase production from genetically modified recombinant *Escherichia coli*: effect of growth substrate and development of a culture medium in shake flasks and stirred tank bioreactor [J]. *Process Biochem.*, 2003, 39: 307-313.  
[26]周海燕,杨三东,周大寨. 发酵生产魔芋葡甘聚糖酶 [J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(3): 65-68.  
[27]M. D. Busto, N. Ortega & M. Perez - Mateos. Location, kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma reesei* cultures [J]. *Bioresource Technology*, 1996, 57:187-192.  
[28]Waltraud Stopok, Peter Rapp & Fritz Wagner. Formation, location, and regulation of endo - 1,4 -  $\alpha$ -glucanases and - glucosidases from *Cellulomonas uda* [J]. *Appl. Envir. Microbiol.*, 1982, 44(1): 44-53.  
[29]邓卫东,席冬梅,毛华明. 吐温 80 作为新型饲料添加剂对反刍动物瘤胃生态和生产性能的影响 [J]. 饲料工业, 2005, 26(10): 7-12.

## 黄酮和蕨类植物黄酮的研究进展

阿衣木姑<sup>1</sup> 阿布拉<sup>1</sup>, 海肉拉<sup>1</sup> 萨伊布扎提<sup>2</sup>, 苏力坦<sup>1</sup> 阿巴白克力<sup>1</sup>

(1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046; 2. 新疆伊犁师范学院化学系, 新疆 伊犁 850000)

摘要: 简明综述了黄酮的结构及其分类、生理活性与人类健康的关系, 以及蕨类植物黄酮的研究进展等等, 为了进一步开发蕨类植物黄酮提供了理论依据。

关键词: 黄酮; 生理功能; 蕨类植物黄酮; 研究进展

中图分类号: Q949.36; Q946.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-311X(2006)06-0095-04

## Flavonoids Compounds and Advances in the Research on Pteridophyte's (fern) Flavonoids

Ayimgul ABLA, Hayrolla SA YIPZAT, Sultan ABABA KRI

(1. College of Life Science and Technology, Xingjiang University, Urumqi 830046, China; 2. Department of Chemistry, Yili Teachers' College, Yili 850000, China)

Abstract: Based on research references, structure and classification of flavonoids compounds, physiological activity of flavonoids compounds and relationship with human health, advances in the research on Pteridophyte's (fern) flavonoids, etc were briefly summarized and analyzed in this paper. This summary will provide important theoretical bases for further research of the Pteridophyte's (fern) flavonoids.

Key words: flavonoids; physiological activity of flavonoids compounds; Pteridophyte's (fern) flavonoids; advances in the research

收稿日期: 2006-04-09; 修回日期: 2006-08-08

基金项目: 新疆自然科学基金项目资助 (2003-10)

作者简介: 阿衣木姑·阿布拉 (1980-) 女, 维族, 硕士生在读, 专业方向: 生化制药, E-mail: Ayimgul-80@tom.com; \*通讯作者: 苏力坦·阿巴白克力 (1958-) 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 生物化学与分子生物学生化制药, E-mail: sultan816@163.com, Tel: 0991-8582556.

黄酮类化合物广泛存在于植物体中, 有重要的生理功能: 抗氧化剂、酶抑制剂、色素及光屏蔽物、植物生长调节剂及植物抗毒素 (phytoalexins)。近年来, 分离出来的黄酮类化合物有多种药理作用: 金丝桃苷 (hyperfine) 有抗脑缺血、心肌缺血的作用以及对消化性溃疡的保护作用; 槲皮素 (quercetin)、芸香苷 (rutin) 有抗自由基和镇痛作用; 水飞蓟宾 (silybin) 有肝保