

氮源对裂褶菌产裂褶多糖和 β -1, 3-葡聚糖酶的影响

何陵玲¹, 吴丽华¹, 郑必胜¹, 胡康¹, 颜盛繁², 蒋泽根²

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 广东时代食品与生命健康研究有限公司, 广东广州 510670)

摘要: 本论文初步探讨了利用裂褶菌发酵体系所产的内切 β -1,3-葡聚糖酶对发酵产生的裂褶多糖进行适度酶解, 以获得分子量适中溶解度较好的裂褶多糖的可能性。以裂褶多糖产量和 β -1,3-葡聚糖内切酶和总酶活为考察指标, 采用刚果红琼脂染色法和摇瓶培养, 从四株裂褶菌 GIM5.42、GIM5.43、GIM5.44、Sc1 中筛选出多糖产量和酶活都相对较高的菌株 GIM5.43, 多糖产量和酶活分别为 2.29 g/L 与 0.28 U/mL。在摇瓶中考察了氮源及其添加方式对裂褶菌菌体生长、裂褶多糖产率、 β -1,3-葡聚糖酶的酶活及其影响规律。结果表明: 菌体生长及其分泌胞外多糖和葡聚糖酶的最适酵母浸膏和氯化铵的添加时间和添加量是不同的。为了保证多糖产率, 采用分批补加策略, 初始酵母浸膏浓度 1.00 g/L, 发酵第 6 d 补加 0.10 g/L 酵母浸膏, 多糖产量为 4.16 g/L, 比未优化提高了 61.24%, 总酶活为 0.34 U/mL, 提高了 142.86%。

关键词: 裂褶多糖; 内切 β -1,3-葡聚糖酶; 氮源; 酶活

文章编号: 1673-9078(2018)03-77-82

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.03.011

Effects of Nitrogen Source on Schizophyllan and Beta -1, 3- glucanase Produced by *Schizophyllum commune*

HE Ling-ling¹, WU Li-hua¹, ZHENG Bi-sheng¹, HU Kang¹, YAN Sheng-fan², JIANG Ze-gen²

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510640, China)

(2. Guangdong Shidai Institute of Food and Life Sciences, Guangzhou 510670, China)

Abstract: The enzymatic hydrolysis of schizophyllan by endo- β -1,3-glucanase produced by *Schizophyllum commune* fermentation was investigated to achieve moderate molecular weight and better solubility of schizophyllan. The strain GIM5.43 with higher yield of polysaccharide and enzyme activity was selected from four strains (GIM5.42, GIM5.43, GIM5.44, Sc1). The polysaccharide yield and the enzyme activity were 2.29 g/L and 0.28 U/mL, respectively. The addition time and dosage of optimum yeast extract and ammonium chloride for the growth of *Schizophyllum commune*, the yield of schizophyllan and the enzyme activity of β -1,3- glucanase were different. The batch feeding strategy was adopted to ensure the yield of schizophyllan. The initial concentration of yeast extract was 1 g/L and 0.10 g/L yeast extract was added on the 6th day. Under these conditions, the yield of schizophyllan was 4.16 g/L, which was improved by 61.24%, and the total enzyme activity was 0.34 U/mL, which was increased by 142.86%.

Key words: schizophyllan; endo- β -1,3- glucanase; nitrogen source; enzyme activity

裂褶多糖 (Schizophyllan, 简称 SPG) 是由药用^[3], 它不仅具有保健功能, 还可用于钻井以增加石油的回收率^[4]。天然裂褶多糖分子量一般为 $10^6 \sim 10^7$ u^[5], 由于分子量太大, 导致其水溶性差。作为药物, 口服

收稿日期: 2017-09-07

基金项目: 广东省科技计划项目 (2014A010107007、2013B090600129、2013B090800033); 广州市科技计划项目 (201604016114)

作者简介: 何陵玲 (1993-), 女, 硕士研究生, 主要从事天然活性产物研究

通讯作者: 郑必胜 (1966-), 男, 博士, 副教授, 主要从事糖类物质制备及功能应用方面的研究

真菌裂褶菌 (*Schizophyllum commune* Fries) 产生的一种中性胞外多糖, 具有抗肿瘤和良好的保湿功效^[1,2], 可作为生物反应调节剂和免疫系统的非特异性刺激剂时吸收率较差, 生物利用度低; 皮下注射引起疼痛和硬化, 静脉注射引起血管闭塞^[6]。而且, 它作为原料在产品加工过程中也面临难溶解和溶解时间长等诸多问题。周林等通过对裂褶多糖进行羧甲基化^[7]和乙酰化^[8]修饰研究, 从而为得到溶解性好的改性多糖提供途径。由此, 需对天然大分子裂褶多糖进行改性, 获得分子量大小适中溶解性好的裂褶多糖。

德国 Munzber^[9]曾对 SPG 的酸水解过程进行了系统研究,发现酸水解时其分子链断裂是随机的,产物分子量分布宽。日本早在 1978 年就开展了高强度超声对裂褶多糖的降解研究^[10],并有相关的发明专利^[6]。治疗子宫癌的西佐糖(Sizofiran),就是裂褶多糖经过超声降解成分子量为 450 ku 左右的产物,但超声降解效率低,处理成本高,导致该药品的价格一直趋高。利用酶法对多糖进行定向降解和修饰是一个新的研究热点。Sutivisedsak 等^[11]发现用裂褶多糖作为唯一碳源筛选出的菌种有较高的 β -葡聚糖酶活,且该葡聚糖酶也可作用于昆布多糖和热凝胶多糖。Leathers 等^[12]发现了三种真菌产生的内切 β -葡聚糖酶可特异性地作用于裂褶多糖,其酶活达 1.70~4.30 U/mg。本项目组在前期研究中,也成功地从裂褶菌发酵液中分离出一种 β -1,3-内切葡聚糖酶,对于裂褶多糖具有很好的专一性,通过多级纯化后对其酶的特性进行了研究,证明其为典型的内切 β -1,3-葡聚糖酶^[13,14]。由此,若能在裂褶菌发酵过程中通过发酵条件的系统控制,则有可能利用其体系所产酶对所产多糖进行降解从而一步获得分子量较低,水溶性较好的裂褶多糖。本论文首先从四株裂褶菌 GIM5.42、GIM5.43、GIM5.44、*Sc1* 中筛选出酶活相对较高的菌株,之后分别探究了酵母浸膏和氯化铵的添加量和添加时间对胞外多糖产量和酶活的影响,明确了氮源的添加策略,得出胞外多糖产率、 β -1,3-葡聚糖酶活力之间的联系,为后续发酵调控制备水溶性较好的裂褶多糖的产业化应用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

供试 4 株裂褶菌的编号和来源。其中 *Sc1* 来自本实验室保藏,由广东省微生物研究所提供;GIM5.42、GIM5.43、GIM5.44 现购于广东省微生物研究所。

1.1.2 试剂

昆布多糖,购于 Sigma 公司;葡萄糖、酵母浸膏、 KH_2PO_4 、3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠和苯酚等均的分析纯。

1.1.3 仪器与设备

5424R 小型台式高速冷冻离心机:德国 Eppendorf;DU-730 紫外/可见分光光度计:美国 Beckman Coulter;ALPHA 1-2 LD plus 冷冻干燥机:德国 Christ;GI54DWS 型高压灭菌锅:美国致微。

1.1.4 培养基

斜面种子培养基(g/L):PDA 培养基。

液体培养基(g/L):葡萄糖 30,酵母浸膏 3, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50,pH 自然。

1.2 实验方法

1.2.1 培养条件

1.2.1.1 平板培养

斜面种子 28 °C 培养 7 d,然后从斜面试管中用接种环取少量菌丝,划线接种于平板培养基中,28 °C,培养 7 d。

1.2.1.2 摇瓶培养

斜面种子 28 °C 培养 7 d,然后从斜面试管中用接种环取两环菌丝,转入装液量为 100 mL 的 250 mL 一级种子瓶中,28 °C、170 r/min 培养 3 d,将一级种子培养液以 10% 的接种量转到 250 mL 培养瓶中,28 °C、170 r/min,培养温度 28 °C,pH 自然,发酵 7 d。

1.2.2 菌株筛选

以刚果红琼脂染色法定性测定菌株 GIM5.42、GIM5.43、GIM5.44、*Sc1* 内切 β -1,3-葡聚糖酶活;再进行摇瓶培养,以 SPG 和 β -1,3-葡聚糖总酶活为考察指标,筛选出多糖产量和酶活都相对较高的菌株。

1.2.3 氮源对多糖和酶活的影响

本实验探讨了有机氮和无机氮在单独及协同作用下对裂褶多糖产量和 β -1,3-葡聚糖酶活力的影响,发酵 7 d 后测定各参数,得出氮源最佳添加策略。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量的测定

取一定量的发酵液,5000 r/min 离心 10 min,弃上清液,菌体用蒸馏水洗涤 2 次,在 70 °C 烘箱中烘干至恒重,称重。

1.3.2 粗多糖的测定

取上述发酵液中的上清液,用 3 倍体积 95% 乙醇醇沉后,置于 70 °C 烘箱中烘干至恒重,称重。

1.3.3 还原糖的测定

DNS 法^[15]。

1.3.4 β -1,3-葡聚糖酶活力测定

1.3.4.1 总酶活测定^[16]

取 0.50 mL 酶液,0.50 mL NaAc-HAc 缓冲液(0.05 mol/L,pH 5.00)配制的 0.50% SPG 溶液组成反应体系于 50 °C 水浴锅中反应 30 min,加 3.00 mL DNS 溶液,沸水浴 5 min,用蒸馏水定容至 25.00 mL,混匀后,在 550 nm 处测定其 OD 值。以灭活酶做空白。

酶活力(E_{total})单位定义:在上述反应条件下,1 min 水解 β -1,3-葡聚糖释放出 1 μmol 葡萄糖所需的

酶量即为一个酶活力单位，以 U 表示。

1.3.4.2 内切酶活性测定^[17]

取 8 μL 样品加到新鲜制备的平板表面 (0.70%琼脂, 0.05% (m/V) β-1,3-葡聚糖)。平板放置过夜, 用 1.00 mg/mL 刚果红染色 45 min 后, 用 1 mol/L NaCl 脱色 30 min。内切酶活由透明圈亮度决定。

1.3.5 数据统计分析

所有的数据以平均值±标准偏差 (SD) 的形式表示, n=3。

2 结果与讨论

2.1 摇瓶发酵各参数比较

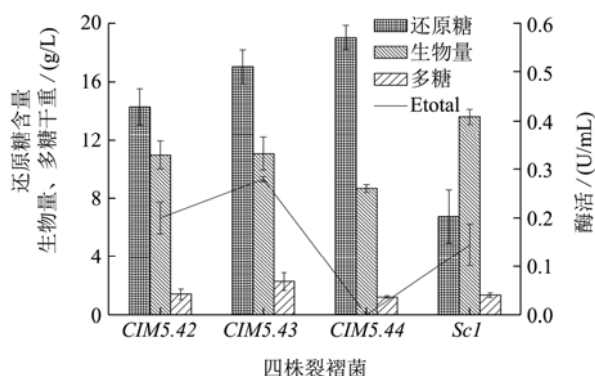


图1 四株裂褶菌生物量、胞外多糖产量和酶活力的比较

Fig.1 Biomass, exopolysaccharide and enzyme activity of four strains of Schizophyllum commune

将该四株裂褶菌株进行摇瓶培养, 7 d 后测定生物量、残糖含量、胞外多糖得率和 β-1,3-葡聚糖酶活。如图 1, 菌株 Scl 消耗还原糖能力最强, 菌体干重有最大值为 13.61 g/L; 菌株 GIM5.43 胞外多糖产量和酶活同时有最大值, 分别为 2.29 g/L、0.28 U/mL, 且其残糖含量相比较为高, 为 17.02 g/L, 可见该菌株还原糖转化率高。

2.2 β-1,3-葡聚糖内切酶活性分析

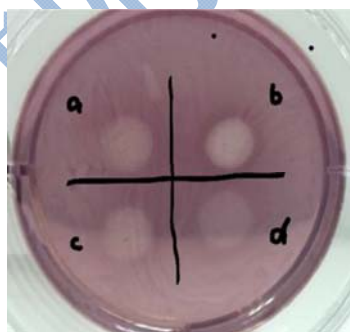


图2 刚果红染色法测定菌株内切酶活

Fig.2 Determination of the of activity endo-glucanase by congo red staining

注: a 表示 GIM5.42; b 表示 GIM5.43; c 表示 GIM5.44; d 表示 Scl。

由刚果红琼脂染色法定性测定的内切 β-1,3-葡聚糖酶活, 结果如图 2 所示, 四株裂褶菌所得透明圈大小差别不大, 但透明圈亮度差别明显, 由图 2 (b) GIM5.43 菌株透明圈最亮, 可见其内切酶活最高, 再结合图 1 胞外多糖产量, 本实验选 GIM5.43 为后续研究菌株。

2.3 氮源对多糖和酶活的影响

2.3.1 酵母浸膏的添加量对多糖得率和酶活力的影响

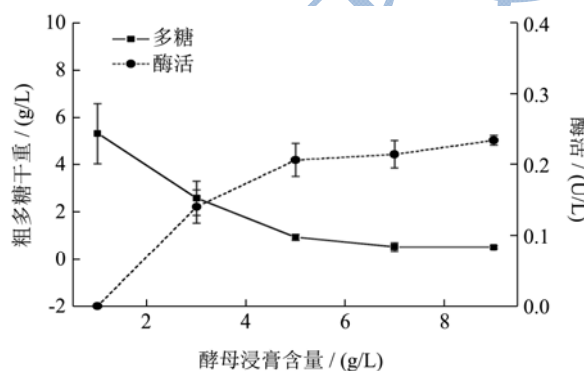


图3 酵母浸膏对多糖产量和酶活的影响

Fig.3 Effects of yeast extract on the yield of schizophyllan and the activity of β-1, 3- glucanase

由图 3, 随着酵母浸膏浓度的升高多糖得率逐渐降低, 而 β-1,3-葡聚糖酶活逐渐增大。多糖在酵母浸膏浓度为 1.00 g/L 时有最大值 5.31 g/L, 但此时酶活几乎为 0, 可能是还原糖的抑制作用 (残糖含量为 11.32 g/L), 或者是氮源缺乏不利于 β-1,3-葡聚糖酶的合成。

表1 酵母浸膏对生物量和还原糖含量的影响

Table 1 Effects of yeast extract on the biomass and the content of reducing sugar

酵母浸膏浓度/(g/L)	菌体干重/(g/L)	还原糖含量/(g/L)
1.00	10.45±0.45	11.33±0.35
3.00	14.23±0.97	4.04±0.96
5.00	16.38±0.24	0.59±0.03
7.00	16.09±0.24	0.30±0.04
9.00	15.49±0.43	0.35±0.02

摇瓶培养中, 低浓度酵母浸膏 (1.00 g/L), 菌球稀疏且较小; 高浓度 (5.00 g/L 以上) 时菌体呈羽毛状, 布满整个摇瓶, 达最大生物量为 15.49 g/L, 可知高浓度酵母浸膏促进菌丝生长, 不利于多糖的积累, 与 Munzer 报道结论不一致, 可能是菌种不同造成的^[18]。Darby 研究了培养基中氮浓度对疣状疟原虫颗粒生长的影响, 发现高浓度氮 (约 100~500 mmol/L

NH₄NO₃) 可产生紧密的平滑颗粒, 低浓度 (1~5 mmol/L) 得到非常松散和蓬松的颗粒^[19]。Pirt 和 Callow 研究产黄青霉, 发现培养基中添加硫酸铵可得到颗粒状菌体, 将玉米浆作为氮源则得到块状菌体^[20]。Burkholder 的早期工作已经表明, 介质组成确实影响菌体形态^[21], 可见酵母浸膏可改变裂褶菌菌丝体的形态, 从而影响其分泌胞外多糖^[22]。为了提高 β -1,3-葡聚糖酶活的同时又不影响多糖的产率, 后续研究中可探究 NH₄Cl 对酶活是否有提高, 或者采用分批补加酵母浸膏的方法使胞外多糖和 β -1,3-葡聚糖酶活力同时达最大值。

2.3.2 NH₄Cl 对多糖得率和 β -1,3-葡聚糖酶活力的影响

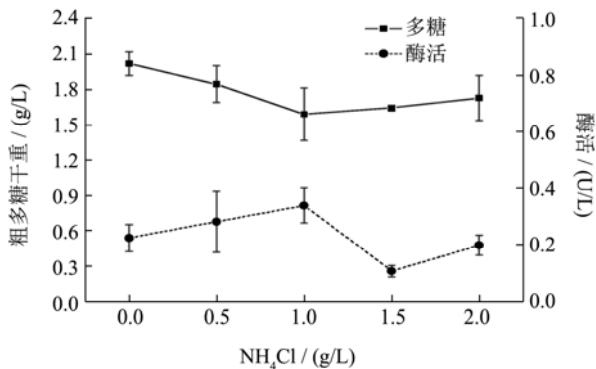


图 4 NH₄Cl 对多糖产量和酶活的影响

Fig.4 Effects of NH₄Cl on the yield of schizophyllan and the activity of β -1, 3-glucanase

当酵母浸膏浓度为 3.00 g/L 时, NH₄Cl 的添加量对裂褶菌分泌胞外多糖和 β -1,3-葡聚糖酶的影响。由图 4 可知, 随着 NH₄Cl 浓度的增加, 多糖曲线呈下降趋势, 可知当酵母浸膏含量为 3.00 g/L 时, 发酵液中添加 NH₄Cl 不利于多糖的积累, 空白组多糖产率最高为 2.02 g/L。NH₄Cl 含量为 1.00 g/L 时, 多糖产率最低, 但此时酶活有最大值 0.34 U/mL, 与赵欣^[16]报道的结论一致, 由表 2 可知, 此时还原糖含量相对其他浓度来说较低, 且菌体得率也不高, 说明裂褶菌的代谢途径和未添加 NH₄Cl 比较发生了显著改变, 菌体可能由其他途径代谢还原糖分泌其他次级代谢产物, 且这个环境更利于产酶。对于裂褶菌来说分泌胞外多糖和 β -1,3-葡聚糖酶是一个内部竞争后的结果, 若外部环境有利于多糖的积累, 那此时菌体几乎不分泌 β -葡聚糖酶, 若外部环境不利于分泌胞外多糖, 或对产酶更有利, 那此时胞外多糖反而产量更低。同样 Rau 研究溶氧量和分批发酵过程对裂褶多糖产量的影响时, 发现在发酵后期裂褶菌可产生 β -1,3-葡聚糖酶, 猜测可能是发酵罐中 C 源不足, 菌体分泌酶降解自身多糖得到可利用的碳源^[23]。

由表 2 可知还原糖含量在 10.00 g/L 以上, 但每个浓度梯度都有酶活, 说明图 3 中酵母浸膏浓度为 1.00 g/L 时酶活为 0, 很大可能是因为氮源的缺乏。本实验, 在氮源充足的情况下, 起始发酵培养基中添加 1.00 g/L NH₄Cl 有利于 β -1,3-葡聚糖酶的产生, 但却不利于多糖的积累, 所以为了保证多糖得率较高的同时发酵后期酶活力最大, 可考虑在发酵过程中分批补加 NH₄Cl, 考察 NH₄Cl 在酵母浸膏浓度较低的情况下是否可提高酶活。

表 2 NH₄Cl 对生物量和还原糖含量的影响

Table 2 Effects of NH₄Cl on the biomass and the content of reducing sugar

NH ₄ Cl 浓度/(g/L)	菌体干重/(g/L)	还原糖含量/(g/L)
0.00	14.24±0.12	11.57±1.06
0.50	13.24±0.91	14.18±1.16
1.00	13.21±1.32	11.80±1.67
1.50	12.63±1.88	14.48±2.49
2.00	13.99±0.90	14.78±1.57

2.3.3 NH₄Cl 的添加时间对多糖得率和 β -1,3-葡聚糖酶活力的影响

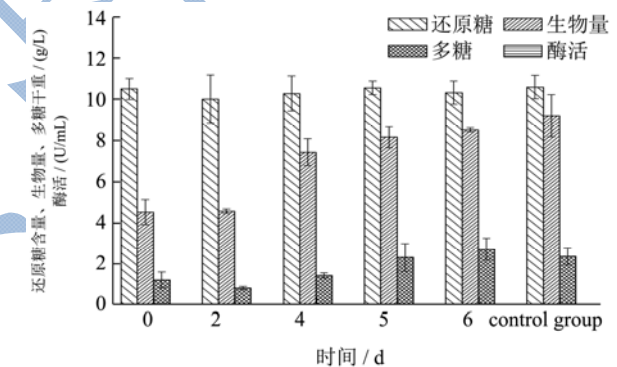


图 5 NH₄Cl 的添加时间对多糖产量和酶活的影响

Fig.5 Effects of NH₄Cl addition time on the yield of schizophyllan and the activity of β -1,3- glucanase

当酵母浸膏和 NH₄Cl 的添加量均为最佳值时, 探究 NH₄Cl 的最佳添加时间对多糖得率和酶活力的影响。

由图 5 可知, 当酵母浸膏浓度为 1.00 g/L 时, 与对照组比较, 在发酵前期添加 NH₄Cl 不利于胞外多糖和生物量的积累, 第 6 d 添加 NH₄Cl 对多糖积累有促进作用, 最大产率为 2.71 g/L, 较对照组提高了 14.83%。第 2 d 添加 NH₄Cl 其生物量、还原糖含量和胞外多糖产量都是最低的, 可能菌体处于调整期后期, 对数期初期, 此时外加 NH₄Cl 打破了内部平衡, 需重新适应环境。NH₄Cl 添加的时间越后对菌体的生长和胞外多糖产率影响越小, 因此需在后期添加 NH₄Cl。图中 β -1,3-葡聚糖酶活均为 0, 可知当有机氮酵母浸膏

浓度过低时, NH₄Cl 的添加对胞外酶活力无促进作用, 可知只有在酵母浸膏充足的情况下, 氯化铵才可提高酶活力。在后续实验中, 需重点探究分批补加酵母浸膏对菌体生长和分泌次级代谢产物的影响。

2.3.4 分批补加酵母浸膏对多糖得率和酶活的影响

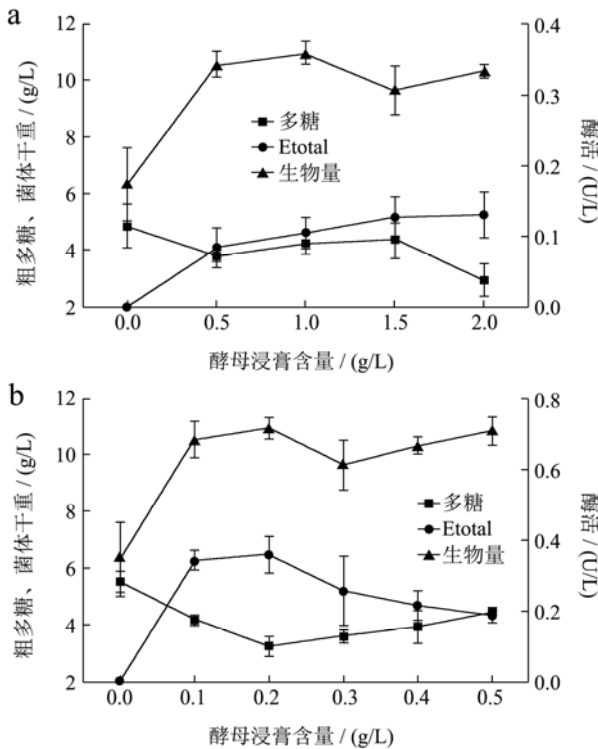


图 6 分批补加酵母浸膏对多糖产量和酶活的影响

Fig.6 Effects of batch addition of yeast extract on the yield of schizophyllan and the activity of β -1,3- glucanase

注: s 为补加酵母浸膏含量为 0~2.0 g/L; b 为补加酵母浸膏含量为 0~0.5 g/L。

初始酵母浸膏含量 1.00 g/L, 发酵第 6 d 再补加不同浓度的酵母浸膏, 首先如图 6 中 a 所示。添加酵母浸膏后生物量迅速增加, 多糖产量整体呈下降趋势, 可能是在后期添加酵母浸膏使得菌体代谢途径由多糖合成转变为菌体繁殖。随着菌体繁殖速度加快, 新生成的菌丝也开始合成多糖, 从而使得多糖产量稍有上升迹象, 但是酵母浸膏添加量达到一定的程度, 多糖产量迅速降低, 此时多糖合成途径受到抑制, 因此设计添加少量酵母浸膏, 减少菌体繁殖对多糖产量的影响。结果如图 6 中 b 所示。

添加 0.5 g/L 以下酵母浸膏, 多糖产量仍较未添加组低, 但 β -1,3-葡聚糖酶活却显著升高, 在酵母浸膏添加量为 0.2 g/L 时有最大值, 之后酶活稍有降低。可见在低初始酵母浸膏含量的情况下, 分批补加低浓度酵母浸膏可促进菌体分泌 β -1,3-葡聚糖酶。褚栋猛等探究发酵后期补加酵母膏和硫酸铵对克雷伯氏菌合

成 1,3-丙二醇的影响, 发现两种氮源均可增强关键酶活性, 促进菌体生长和 1,3-丙二醇的合成^[24], 可见氮源可显著影响次级代谢中酶活性, 从而刺激生长, 同样, 孙启星等也得到相同的结论^[25]。但随着补加浓度的增大, 菌体合成多糖速率增大, 相应的酶活降低, 跟 NH₄Cl 对产多糖和酶这两者之间关系的结论基本一致: 菌体产多糖和酶是两个相互抑制的过程, 合成 SPG 时, β -1,3-葡聚糖酶酶活被抑制。由此, 在尽量保证多糖产量的情况下提高酶活, 采用分批补加策略, 初始酵母浸膏浓度为 1.00 g/L, 发酵第 6 d 补加 0.10 g/L 酵母浸膏, 多糖产量达 4.16 g/L, 比未优化 (图 3 酵母浸膏为 3.00 g/L 时) 提高了 61.24%, 酶活为 0.34 U/mL, 提高了 142.86%。

3 结论

以 SPG 产量和 β -1,3-葡聚糖内切酶和总酶活为考察指标, 采用刚果红琼脂染色法和摇瓶培养, 从四株裂褶菌 GIM5.42、GIM5.43、GIM5.44、Sc1 中筛选出多糖产量和酶活都相对较高的菌株 GIM5.43, 多糖产量和酶活分别为 2.29 g/L 与 0.28 U/mL。因此选择该菌株进行后续研究, 优化酵母浸膏、NH₄Cl 的补加策略, 结果表明: 当酵母浸膏含量为 1.00 g/L 时, 得到小的松散菌丝体, 多糖产量为 5.31 g/L, 但总酶活较低 (0 U/mL); 含量为 7.00 g/L 以上时得到絮状绒毛状菌体, 多糖产量为 0.50 g/L, 总酶活为 0.23 U/mL。为了保证多糖产率, 采用分批补加策略, 初始酵母浸膏浓度 1.00 g/L, 发酵第 6 d 补加 0.10 g/L 酵母浸膏, 多糖产量为 4.16 g/L, 比未优化提高了 61.24%, 总酶活为 0.34 U/mL, 提高了 142.86%。当酵母浸膏含量较低 (1.00 g/L), 添加 NH₄Cl 对酶活无促进作用, 当其含量为 3.00 g/L 时, NH₄Cl 可提高总酶活达 51.20%。

参考文献

[1] RAU U. Schizophyllan [M]. Weinheim. Wiley-VCH, 2002. DOI: 10.1002/3527600035.bpol6003

[2] 周林, 郭祀远, 蔡妙颜, 等. 裂褶多糖的吸湿和保湿性能初步研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 708-711

ZHOU Lin, GUO Si-yuan, CAI Miao-yan, et al. Study on the properties of moisture absorption and moisture retaining of schizophyllan [J]. Natural Product Research and Development, 2005, 17(6): 708-711

[3] Zhang Y, Kong H, Fang Y, et al. Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and recent developments [J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013, 1(1): 53-712

- [4] Anonymous. Fungus could boost crude output by 45% [J]. Petrol Econ June, 2011, General One File, Web, 2012
- [5] RAU U. Glucans secreted by fungi [J]. Turkish Electronic Journal of Biotechnology, 2004, 2: 30-36
- [6] Kikumoto S, Yamamoto O, Komatsu N, et al. Method of producing neoschizophyllan having novel pharmacological activity: US, US4098661[P]. 1978
- [7] 周林,郑必胜,郭祀远,等.裂褶多糖的羧甲基化[J].天然产物研究与开发,2006,18(4):555-557
ZHOU Lin, ZHENG Bi-sheng, GUO Si-yuan, et al. Carboxymethylation of Schizophyllan [J]. Natural Product Research and Development, 2006, 18(4): 555-557
- [8] 周林,郭祀远,郑必胜,等.裂褶多糖的乙酰化及光谱分析[J].华南理工大学学报(自然科学版),2006,34(12):88-91
ZHOU Lin, GUO Si-yuan, ZHENG Bi-sheng, et al. Acetylation of schizophyllan and corresponding spectroscopic analysis [J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2006, 34(12): 88-91
- [9] Munzberg J, Rau U, Wagner F. Investigations on the regioselective hydrolysis of a branched β -1,3-glucan [J]. Carbohydrate Polymers, 1995, 27(4): 271-276
- [10] Tabata K, Ito W, T Kojima, et al. Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* Fries [J]. Carbohydrate Research, 1981, 89(1): 121-35
- [11] Sutivisedsak N, Leathers T D, Bischoff K M, et al. Novel sources of β -glucanase for the enzymatic degradation of schizophyllan [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2013, 52(3): 203-210
- [12] Leathers T D, Sutivisedsak N, Nunnally M S, et al. Enzymatic modification of schizophyllan [J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(3): 673-678
- [13] 郑必胜,周萌.裂褶菌产内切 β -1,3-葡聚糖酶的特性[J].现代食品科技,2011,27(7):731-733
ZHENG Bi-sheng, ZHOU Meng. Properties of endo- β -1,3-glucanase from *Schizophyllum commune* Fr [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(7): 731-733
- [14] 畅晓洁,郑必胜,赵欣.裂褶菌产内切 β -1,3-葡聚糖酶的分离纯化[J].食品工业科技,2012,33(4):227-233
CHANG Xiao-jie, ZHENG Bi-sheng, ZHAO Xin. Separation and purification of endo- β -1,3-glucanase producing by *Schizophyllum commune* Fr [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(4): 227-233
- [15] Komatsu N, Okubo S, Kikumoto S, et al. Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune* [J]. Gann, 1969, 60(2): 137-144
- [16] 赵欣.裂褶菌产内切 β -1,3-葡聚糖酶的分离纯化及其活性研究[D].广州:华南理工大学,2008
ZHAO Xin. Study on the separation and purification of endo- β -1,3-glucanase producing by *Schizophyllum commune* Fr and its activity [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2008
- [17] Sutivisedsak N, Leathers T D, Bischoff K M, et al. Novel sources of β -glucanase for the enzymatic degradation of schizophyllan [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 52(3): 203-210
- [18] Munzer S. Produktion und Charakterisierung eines von *Schizophyllum commune* ATCC 38548 gebildeten extrazellulären β -1,3-glucans [D]. Technical University of Braunschweig, 1989
- [19] Darby R T, Mandels G R. Inorganic nutrition of *Myrothecium verrucaria* [J]. Mycologia, 1954, 46(3): 276-288
- [20] Pirt S J, Callow D S. Continuous-flow culture of the filamentous mould *Penicillium chrysogenum* and the control of its morphology [J]. Nature, 1959, 184(4683): 307
- [21] Burkholder P R, Sinnott E W. Morphogenesis of fungus colonies in submerged shaken cultures [J]. American Journal of Botany, 1945, 32(7): 424-431
- [22] Tudzynski B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi [J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 656
- [23] Rau U, Gura E, Olszewski E, et al. Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing [J]. Journal of Industrial Microbiology, 1992, 9(1): 19-26
- [24] 褚栋猛,陆信曜,陈文强,等.发酵后期补加 2 种氮源对克雷伯氏菌合成 1,3-丙二醇的影响[J].食品与发酵工业,2016, 42(8):8-12
MA Dong-meng, LU Xin-yao, CHEN Wen-qiang, et al. Influences on the biosynthesis of 1,3-propanediol in *Klebsiella pneumonia* by feeding two types of nitrogen source at the late stage of fermentation [J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(8): 8-12
- [25] 孙启星,陈旭升,任喜东,等.基于 pH 调节和有机氮源流加调控补料分批发酵过程提高 ϵ -聚赖氨酸产量[J].生物工程学报,2015,31(5): 752-756
SUN Qi-xing, CHEN Xu-sheng, REN Xi-dong, et al. Enhanced ϵ -poly-L-lysine production through pH regulation and organic nitrogen addition in fed-batch fermentation [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(5): 752-756