

康氏木霉固态发酵生产纤维素酶条件的研究

张建新^{1,3}, 刘起丽^{1,2}, 李学梅¹, 吴云锋³, 马威¹, 姜秋会¹, 梁树才¹

(1 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2 河南科技学院 植物保护系, 河南 新乡 453002;

3 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 以麸皮和玉米芯为主要原料, 采用康氏木霉(*Trichoderma koningii*)固态发酵生产纤维素酶, 并对影响纤维素酶活性的碳源和氮源配比、外加氮源、培养基初始pH值、培养时间和表面活性剂等因素进行了研究。结果表明, 培养基碳源和氮源配比以麸皮: 玉米芯为3: 2时最适合; 外加氮源以质量分数0.8%硝酸铵产纤维素酶活性最高; 培养基初始pH值为3.0时, 纤维素酶活力最高, 是对照的1.37倍; 表面活性剂以质量分数0.50%“奇强”洗洁精对提高纤维素酶活性的作用最显著, 较对照提高12.4%; 培养时间为72h时, 纤维素酶活性最高。

[关键词] 康氏木霉; 纤维素酶; 固态发酵; 酶活性

[中图分类号] Q936

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)11-0099-04

我国人口多, 人均土地少, 饲料资源紧张, 人畜争料的矛盾十分突出。因此, 要保持我国饲料工业和畜牧业的持续发展, 必须解决好饲料问题。地球上最丰富的资源是植物性纤维素类物质, 每年约生成1 500~2 000亿t, 其中除部分作为造纸和植物性纤维利用外, 大部分被燃烧或废弃, 不仅造成资源浪费, 而且还会污染环境^[1]。以植物性纤维为原料, 利用微生物生产纤维素酶, 并将其转化为人类急需的能源、食物和化工原料, 对于人类社会解决环境污染、食物短缺和能源危机具有重大的现实意义。因此, 通过微生物发酵充分利用农副产品下脚料、秸秆、糠等生产纤维素酶添加剂, 用于提高畜禽生产性能, 提高饲料利用率, 改善粗饲料的营养价值, 降低饲料成本, 具有广阔的开发前景。纤维素酶不仅适用于饲料生产, 同时还广泛用于食品加工、酿造、城市废水处理, 以及采油、烟草与茶叶加工等行业^[2]。张建新等^[3,4]已成功的以简单的麸皮和玉米芯为底物, 利用黑曲霉发酵生产木聚糖酶。纤维素酶作为复合饲用酶制剂的重要组成之一, 目前在生产上主要以稻草等秸秆为原料。为了配合利用麸皮和玉米芯生产木聚糖酶, 实现企业不改变原料的情况下可同时生产两种酶, 本文对1株康氏木霉固态发酵生产纤维素酶的条件进行了研究, 以为纤维素酶生产的中试和开发利用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 康氏木霉(*T. koningii* 13006)由中国工业微生物菌种保藏中心提供。

1.1.2 供试试剂 (1)二硝基水杨酸(DNS)试剂。取酒石酸钾钠182g, 溶于500mL蒸馏水中, 依次加入3,5-二硝基水杨酸6.3g, NaOH 21g, 苯酚5g, 亚硫酸钠5g, 搅拌至溶解, 冷却后用蒸馏水定容至1 000mL, 贮于棕色瓶中备用, 室温下放置15d后使用。

(2)羧甲基纤维素钠(CMCNa)溶液。取2g羧甲基纤维素钠(粘度0.3~0.6 Pa·s)溶于200mL蒸馏水中, 水浴加热至溶解, 用一层纱布过滤, 取滤液100mL, 加入pH 4.8磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 蒸馏水40mL混匀, 贮冰箱备用。

(3)1g/mL标准葡萄糖液。精确称取105℃烘至恒重的无水葡萄糖(分析纯)1.0000g, 以蒸馏水溶解, 定容至100mL容量瓶中制成1g/mL标准葡萄糖液。

1.1.3 培养基 PDA^[5]: 去皮马铃薯200g, 蔗糖20g, 琼脂15g, 水1 000mL, 121℃高压蒸汽灭菌30min。

三角瓶培养基: 试验处理中, 在研究碳源对产纤维素酶的影响时, 培养基中麸皮与玉米芯质量比

[收稿日期] 2005-03-16

[基金项目] 河南省重大科技攻关项目(122010200)

[作者简介] 张建新(1974-), 男, 山东陵县人, 在读博士, 主要从事微生物酶制剂研究。

别为 0:5, 1:4, 2:3, 3:2, 4:1 和 5:0; 在研究其他条件对产纤维素酶的影响时, 麸皮和玉米芯质量比以研究的最佳配比为基准, 每瓶共装干料 25 g, 料水比为 1:1.25, 0.05 mg/mL $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mg/mL KH_2PO_4 , 121 °C 高压蒸汽灭菌 60 min。

1.1.4 主要仪器 723 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司分析仪器总厂生产), 恒温水浴锅(40±0.2) °C, 电子天平($d=0.0001$ g 北京赛多利斯天平有限公司生产), 0.246 mm 粉碎机。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 将保藏的康氏木霉菌种接种到 PDA 斜面培养基中活化培养 72 h, 放在 4 °C 冰箱中保存。接种时用接种环刮 1 环康氏木霉孢子接种到三角瓶培养基中, 与培养基混匀, 在 28 °C 培养 72 h。所有处理平行重复 3 次。

1.2.2 酶活性的测定^[1] 采用 DNS 测定还原糖法测定羧甲基纤维素(CMC)酶活性: 将三角瓶培养基中培养好的酶样自然干燥, 用 0.246 mm 粉碎机粉碎。精确称取以“四分法”采样取得的样品 1 g, 用蒸馏水定容至 50 mL(装于带有刻度的试管), 充分振荡(7 min 左右), 振荡液用滤纸过滤, 所得滤液即为待测酶液。取 0.5 mL 待测酶液预热, 加入 CMCNa 溶液 1.5 mL, 40 °C 恒温反应 20 min, 立即加入 DNS 试剂 3 mL, 在沸水浴中煮 7 min, 终止反应后立即加入 10 mL 蒸馏水, 冷却后在可见分光光度计 550 nm

比色。将在规定条件下每分钟催化底物生成 1 μmol 葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活力单位。

$$\text{CMC 酶活性}/(\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{r}{w \cdot 20} \times \frac{1}{180} = \frac{r}{3600w}$$

式中, r 为从曲线上查得的与标准葡萄糖液相对应的葡萄糖质量浓度($\mu\text{g/mL}$); w 为实际参与反应的酶量(μg); 20 为反应时间(min); 180 为葡萄糖的分子量。

2 结果与分析

2.1 不同配比麸皮和玉米芯对纤维素酶活性的影响

由图 1 可见, 纤维素酶活性随麸皮比例的增加而上升, 当麸皮与玉米芯质量比为 5:0 时酶活性最高, 但除 0:5 外, 其他配比对康氏木霉生产纤维素酶的影响不显著。这可能是因为麸皮富含多糖、蛋白质、纤维素和矿物质等常用的培养基成分, 既是碳源又是氮源, 还含有某些其他对微生物生长和产酶起促进作用的因子, 但麸皮过多, 培养基粘性增大, 不利于透气, 影响生产规模和产量。而玉米芯中含有丰富的纤维素, 能增加培养基空隙, 且成本比麸皮小, 但玉米芯过多, 菌丝生长缓慢, 酶活性低。综合考虑以上各种因素, 麸皮与玉米芯质量比以 3:2 为宜, 既不影响产量, 又降低了生产成本。

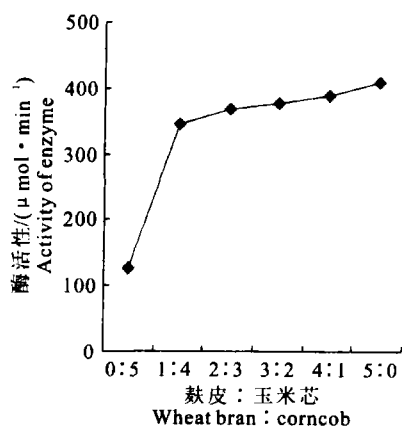


图 1 不同配比麸皮和玉米芯对纤维素酶活性的影响

Fig. 1 Effect of different ratio between wheat bran and corncob on activity of cellulase

2.2 外加氮源对纤维素酶活性的影响

从表 1 可以看出, 硝酸铵作为氮源时产酶活力最高, 达到 249.3 $\mu\text{mol/min}$, 磷酸氢二铵产酶活力

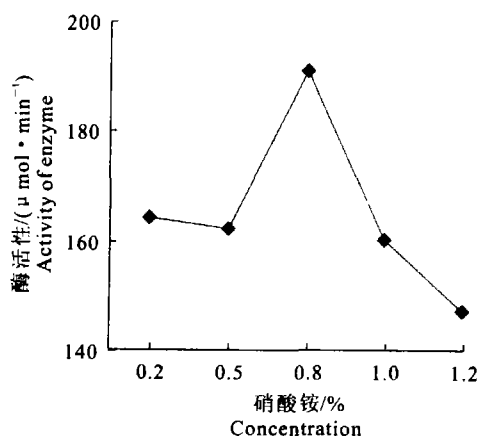


图 2 不同浓度硝酸铵对纤维素酶活性的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of ammonium nitrogen on activity of cellulase

最低, 这可能是因为硝酸铵中氮元素含量较高, 使其有利于利用康氏木霉生产纤维素酶。有机氮源尿素和蛋白胨的产酶活力较其他无机氮源低, 这可能是

由于有机氮会促进菌体的生长繁殖,对酶的合成不利。

表 1 不同外加氮源对纤维素酶活性的影响
Table 1 Effect of added different nitrogen sources on activity of cellulase

氮源 Nitrogen source	质量分数/% Concentration	酶活性/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) Activity of enzyme
NaNO ₃	0.5	235.2
尿素 Urea	0.5	224.5
蛋白胨 Peptone	0.5	224.2
NH ₄ NO ₃	0.5	249.3
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.5	209.2
NH ₄ Cl	0.5	213.7
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	231.9
对照 Control	0	181.9

由图 2 可以看出,硝酸铵作为氮源时,以质量分数为 0.8%时产酶活力最高,质量分数为 1.2%时产酶活力最低。这是因为合适浓度的氮源能促进康氏木霉生产纤维素酶,而高浓度的氮源抑制其产生纤维素酶。

2.3 培养基初始 pH 值对纤维素酶活性的影响

改变培养基起始 pH 值,28℃培养 72 h,酶活性测定结果见表 2。从表 2 可以明显看出,随 pH 逐渐升高,酶活性逐渐降低。pH 6.4 为培养基自然 pH 值,当培养基初始 pH 值为 3.0 时,酶活性最高,为自然 pH 值的 1.37 倍。这可能是由于霉菌一般适于在偏酸性的环境下生存,通过酸性环境改变培养基中有机化合物的离子化作用程度,以有利于细胞对营养物质的吸收利用,促进微生物的生长;另外,酸性环境增大了细胞膜的通透性,有利于纤维素酶的胞外分泌,从而大大提高了纤维素酶的分泌量。

表 2 培养基初始 pH 值对纤维素酶活性的影响
Table 2 Effect of initial pH of medium on activity of cellulase

培养基初始 pH 值 Initial pH of medium	酶活性/($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) Activity of enzyme
3.0	243.8
4.0	235.7
5.0	210.5
6.0	186.8
6.4	177.7
7.0	173.3
8.0	157.8

2.4 培养时间对纤维素酶活性的影响

培养时间分别为 24,48,72,96 和 120 h 时取样,烘干,测定纤维素酶活性,结果见图 3。图 3 结果表明,培养时间为 72 h 时,酶活性最高,为 233.7 $\mu\text{mol}/\text{min}$;从 24~72 h,酶活性呈逐渐升高趋势,在 72 h 达到顶峰。这是由于在 72 h 以前菌体大量增加,其分泌纤维素酶的量大大增加,酶活性逐渐增加。而从 72~120 h,酶活性呈逐渐下降趋势,这是由于在 72 h 以后,菌体不再增加,随着培养时间的延长菌体逐渐衰退,分泌纤维素酶逐渐减少,由于温度、湿度等因素的影响,酶蛋白逐渐变性失活,酶活性随之逐渐下降。

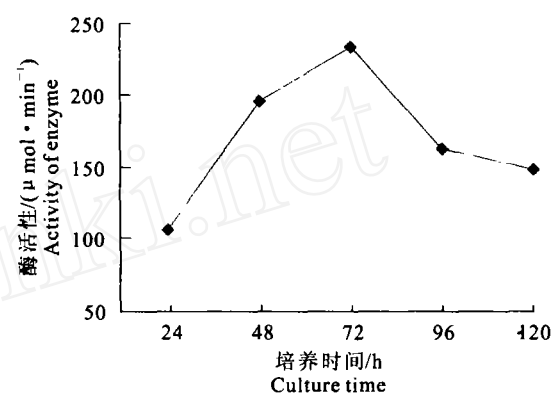


图 3 培养时间对纤维素酶活性的影响
Fig. 3 Effect of culture time on production of enzyme

2.5 表面活性剂对纤维素酶活性的影响

表面活性剂是一端亲水另一端疏水的两性小分子,它能作用于细胞膜,改变膜结构的通透性,有利于胞外酶的不断排出,从而提高酶产量。由表 3 可以看出,加入表面活性剂对康氏木霉产纤维素酶有一定的促进作用,“奇强”洗洁精随其浓度的提高酶活性有所增加,吐温-20 和“奇强”洗衣粉从质量分数 0.05%~0.10%时酶活性降低,但从 0.10%~0.50%又逐渐增加,这是由于所加的表面活性剂大都为混合物,其中含有多种未知成分,可能对菌体的生长及产酶量起到副作用。由表 3 还可以看出,当质量分数为 0.50%时,所有表面活性剂产纤维素酶活性均最高,分别比对照增加 12.0%,12.3%和 12.4%。其中,“奇强”洗洁精对产纤维素酶的促进作用最强,比对照增加 12.4%。由于“奇强”洗洁精不但能显著提高酶活性,还有无毒无害,价格低,使用方便的优点,能够避免其他表面活性剂带来的副作用,因此在本实验中是较为理想的表面活性剂。

表 3 不同表面活性剂对纤维素酶活性的影响
Table 3 Effect of different surfactant on activity of cellulase μmol/min

表面活性剂质量分数/% Concentration of surfactan	吐温-20 Tween-20	“奇强”洗衣粉 Qiqiang washing powder	“奇强”洗洁精 Qiqiang washing-up liquid
0.05	257.3	264.5	219.2
0.10	185.1	229.2	249.3
0.20	212.0	260.3	264.9
0.50	274.7	275.6	275.9
CK	245.4	245.4	245.4

3 讨 论

根据本试验结果,并综合考虑纤维素酶活性和生产成本等因素,确定康氏木霉产纤维素酶最优的产酶条件为:麸皮与玉米芯质量比 3 : 2,外添加质量分数 0.8%硝酸铵,质量分数 0.5%“奇强”洗洁精,培养基初始 pH 为 3.0,培养 72 h.由于本研究测定纤维素酶活性时采用的是培养物直接粉碎的粗酶

粉,未经过提纯,可能对酶活性有影响.另外,在酶活性测定过程中,酶的稀释度、浸提等均可能对酶活性有影响,但是经过多次试验,得出了比较一致的结果.此外,还对固态发酵纤维素酶的中试放大了进一步研究,也得到了比较理想的结果.利用液态发酵生产纤维素酶在工厂化大规模生产中存在一定优势,因此研究液态发酵生产纤维素酶有其更重要的意义,至于其发酵条件还有待进一步研究.

[参考文献]

[1] 瞿明仁,晏向华,黎观红,等.饲用真菌纤维素酶研究与应用[J].饲料工业,1999,20(12):30—32.
[2] 陈侠甫,王景林.纤维素酶高产菌株的选育和在养殖业中的应用研究[J].饲料工业,1994,15(3):10—11.
[3] 张建新,李学梅,姜立娜,等.黑曲霉固态发酵木聚糖酶中试条件的研究[J].微生物学杂志,2003,23(4):20—22.
[4] 李用芳,李学梅,张建新,等.木聚糖酶产生菌的选育和发酵条件研究[J].生物技术,2004,14(1):25—27.
[5] 李宗义,刘国生,李学梅.微生物学实验技术[M].北京:气象出版社,1997.
[6] 崔福绵,刘 茜,韩 辉.康宁木霉 CP88329 纤维素酶产生条件的研究[J].微生物学通报,1995,22(2):72—76.
[7] 张德强,黄镇亚,张志毅.绿色木霉纤维素酶 AS3.3032 固态发酵的研究[J].北京林业大学学报,2001,23(2):57—60.
[8] 郭杰炎,蔡武城.微生物酶[M].北京:科学出版社,1986.

Studies on the conditions of cellulase produced by
Trichoderma koningii with solid state fermentation

ZHANG Jian-xin^{1,3}, LIU Qi-li^{1,2}, LI Xue-mei¹, WU Yun-feng³,
MA Wei¹, JIANG Qiu-hui¹, LIANG Shu-cai¹

(1 College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China; 2 Department of Plant Protection, Institute of Henan Science and Technology, Xinxiang, Henan 453002, China; 3 College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Using wheat bran and corncob as main substances, cellulase is produced by *Trichoderma koningii* with solid state fermentation. The effect on cellulase activity is studied of proportioning of carbon and nitrogen source, added nitrogen source, initial pH of medium, culture time and surfactant. The results indicated; the proportioning of wheat bran and corncob is most suitable at 3 : 2. The activities of enzyme is the highest when the mass concentration of added ammonium nitrate is 0.8%. When initial pH of medium is 3.0, and the activity of cellulase is the highest, 1.37 times as much as that of the control. With washing-up liquid as surfactant, the effect is the best, the activity is higher than control by 12.4% when its volume concentration is 0.5%. When the culture time is 72 h, the activity of enzyme reaches the highest.

Key words: *Trichoderma koningii*; cellulase; solid state fermentation; zymine