

② 575-577, 580

产黄纤维单胞菌纤维素酶的培养条件

郭爱莲¹, 杨琳¹, 刘梅¹, 王宏仓¹, 郎惠云²

(1. 西北大学生物学系, 陕西西安 710069; 2. 西北大学化学系, 陕西西安 710069)

TQ925

TQ924

摘要:对产黄纤维单胞菌(*Cellulomonas flavigena*)所产纤维素酶的条件和天然纤维素能力的利用进行了研究。认为该菌产酶最适起始 pH 为 6.0, 最适产酶温度为 25℃, 8~16 h 为产酶高峰期; CMC-Na、酪蛋白是该菌最好的碳氮源; 高浓度的葡萄糖抑制纤维素酶的形成, 而纤维二糖是该菌的较好碳源和诱导剂。

关键词:产黄纤维单胞菌; 纤维素酶; 天然纤维素; 培养条件

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274X(1999)06-0575-03

纤维素是地球上数量最大的再生资源, 如何经济有效地加以利用, 一直是科学家关注的问题。利用纤维素酶处理原料, 可改变细胞壁的通透性, 提高细胞内含物的提取率, 改变食品质量等, 故广泛地应用在食品发酵、酿造等方面。它还能使农业废料、饲料、垃圾中的有机成分变废为宝, 从而开辟出环境保护的有效途径。在自然界中, 许多霉菌^[1]和细菌^[2]都能产生纤维素酶, 但有关细菌纤维素酶的报道很少。本文侧重于兼性厌氧的产黄纤维单胞菌产酶条件的研究。

1 材料和方法

1.1 所用主要培养基

1.1.1 种子培养基 CMC-Na 5 g; NaNO₃ 1 g; Na₂HPO₄ · 7H₂O 1.18 g; KH₂PO₄ 0.9 g; MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g; KCl 0.5 g; 酵母膏 0.5 g; 酪蛋白 0.5 g; 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 7.0。

1.1.2 产酶培养基 CMC-Na 5 g; NH₄NO₃ 1 g; KCl 0.5 g; 酪蛋白 3 g; MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g; MnCl₂ · 4H₂O (1%) 0.2 mL; CaCl₂ (10 mg/mL) 1 mL; Na₂MnO₄ · 2H₂O (0.1%) 0.1 mL; ZnSO₄ · 7H₂O (1%) 0.2 mL; 磷酸缓冲液 (pH 6~6.28) 100 mL, 蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.2 产酶条件的测定方法

1.2.1 生长曲线的测定^[3]

1.2.2 生物量的测定方法 取培养液 2 mL, 加无菌水 4 mL, 在 721 分光光度计上 630 nm 测光密度。

1.2.3 测定培养时间对酶活力的影响 25℃ 摇床培养 16 h, 每隔 2 h 取样, 测酶活力。

1.2.4 测定培养温度对酶活力的影响 在 20~40℃ 之间, 测定温度对酶活力的影响, 每隔 5℃ 取一点, 经培养后测酶活力。

1.2.5 测定培养基起始 pH 值对酶活力的影响 使培养基的起始 pH 值为 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 25℃, 恒温摇床培养测酶活力。

1.2.6 测定培养基装量对酶活力的影响 在 250 mL 三角瓶中, 分别装入 10~80 mL 不同装量的产酶培养基(每 10 mL 为一个装量)。

1.2.7 测定碳源对酶活力的影响

(1) CMC-Na 为碳源对酶活力的影响。按不同 CMC-Na 浓度的产酶培养基试验。浓度范围为 1~9 g/L。

(2) 不同纤维素碳源对酶活力的影响。碳源分别为 CMC-Na 0.5%; CMC-Na 0.25% + 麸皮 0.25%; CMC-Na 0.25% + 麦秆粉 0.25%; 微晶纤维素 0.5%; 微晶纤维素 0.25% + 麦秆粉 0.25%; 麸皮 0.5%; 麦秆粉 0.5% 等。未经处理的天然纤维素, 其

收稿日期: 1999-04-12

基金来源: 陕西省自然科学基金资助项目 (FH973126)

作者简介: 郭爱莲 (1945-), 女, 山东日照人, 西北大学教授, 从事微生物学研究。

大小在 18 目以上。

(3) 葡萄糖作碳源对酶活力的影响。葡萄糖的浓度范围 1~8 g/L, 每增加 1 g 为一个样品。

(4) 测定纤维二糖对酶活力的影响。以纤维二糖作碳源, 浓度范围为 0.5~4 g/L, 每增加 0.5 g/L 为一个样品。

1.2.8 测定氮源对酶活力的影响 用不同的有机氮源和无机氮源。酪素、蛋白胨、酵母膏、尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 NaNO_3 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 均为 0.1%; 酵母膏 0.05% + 酪素 0.3%; 酵母膏 0.05% + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05%; 酵母膏 0.05% + NH_4NO_3 0.05%; 酵母膏 0.05% + NaNO_3 0.05%; 酵母膏 0.05% + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.05%; 酵母膏 0.05% + 蛋白胨 0.05%; 酵母膏 0.05% + 尿素 0.05% 测定酶活力的影响。

1.2.9 静置厌氧条件下对酶活力的影响 在静置厌氧条件下, 分别在 25, 30, 37 °C 培养测酶活力。

1.3 酶活测定方法

用文献[4]中 3,5-二硝基水杨酸法测纤维素酶活力。

1.4 天然纤维素的预处理^[4]

先将材料粉碎, 用 NaOH 等处理, 再分别过筛获得 34, 50, 100 目(~0.4, 0.3, 0.14 mm) 3 种样品。

2 结果和讨论

2.1 生长曲线的测定

菌体在 10 h 达到其菌数最高值, 即对数期。在 10~20 h 之间, 菌数变化很小, 由对数期转为稳定期。

2.2 不同培养条件对酶活力的影响

2.2.1 培养时间对酶活力的影响 该菌在培养 8~16 h 为酶活高峰期, 10 h 为酶活最高值, 16 h 后酶活力开始下降。

2.2.2 培养温度对酶活力的影响 结果如图 1, 产酶最适温度为 25 °C 左右, 此时酶活力呈最大值。

2.2.3 培养基的起始 pH 对酶活力的影响 从图 2 可以看出: pH 6.0 为产酶培养基最佳起始值; 在 pH 5.5~7.5 之间, 酶活较高。

2.2.4 培养基装量对酶活力的影响 测定出培养基的最适装量为 250 mL 三角瓶中装 50 mL, 少于或超过 50 mL 装量, 对纤维素酶活力有影响。

2.2.5 碳源对纤维素酶形成的影响

(1) CMC-Na 对酶活力的影响。实验证实: CMC-Na 5 g/L 为菌种产纤维素酶的最佳用量, 5~9 g/L, 生物量趋于恒定。

(2) 葡萄糖对酶活力的影响。葡萄糖浓度 5 g/L 为产酶的最佳用量, 若高于 5 g/L, 随着葡萄糖浓度的增大, 酶活力急剧下降。

(3) 纤维二糖对酶活力的影响。纤维二糖浓度 2.5 g/L 为产酶的最佳用量, 生物量随纤维二糖浓度变化的趋势与产酶量的变化趋势基本相当。

(4) 不同纤维素碳源对酶活力的影响。表 1 显示, CMC-Na 为产黄纤维单胞菌产纤维素酶的最佳纤维素碳源, 其他均低于 CMC-Na。

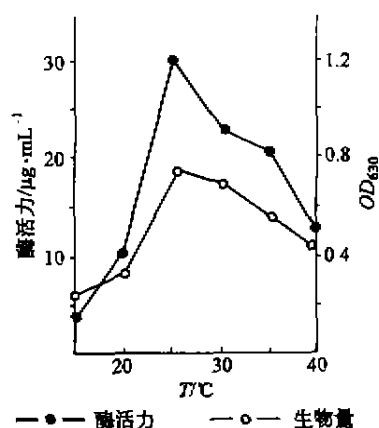


图 1 培养温度对酶活力的影响

Fig. 1 Effect of the cultural temperature on enzyme activity

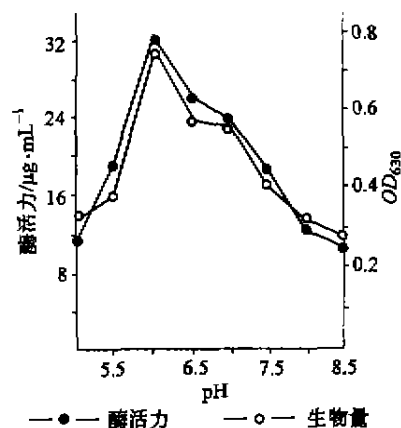


图 2 培养起始 pH 对酶活力的影响

Fig. 2 Effect of the cultural original pH on enzyme activity

2.2.6 氮源对酶活力的影响 从表 2 可以看出: 酵母膏、酪素和 NH_4NO_3 为产酶的最佳氮源, 尤其在共同使用酵母膏和酪素、酵母膏和硝酸铵时, 可使酶活力大大提高。

2.2.7 静置厌氧条件对酶活力的影响 在 25℃ 和 30℃ 时,表现出相似的酶活力趋势;48 h 左右为酶活力高峰期。在 37℃ 时,酶活力较低,40 h 为酶活力高峰期,整体酶活力较前两者低。

表 1 碳源对酶活力的影响

Tab. 1 Effect of the carbon source on enzyme activity

碳源	生物量	酶活力
CMC-Na	0.74	33.44
CMC-Na+麸皮	0.84	9.12
CMC-Na+麦秆粉	0.79	15.2
微晶纤维素	0.43	12.16
微晶纤维素+麸皮	0.92	16.72
微晶纤维素+麦秆粉	0.88	10.64
麸皮	1.2	7.6
麦秆粉	1.15	9.88

表 2 氮源对酶活力的影响

Tab. 2 Effect of the nitrogen source on enzyme activity

氮源	酶活力	氮源	酶活力
酪素	24.32	酵母膏+酪素	30.40
蛋白胨	3.80	酵母膏+(NH ₄) ₂ SO ₄	10.64
酵母膏	22.80	酵母膏+NH ₄ NO ₃	25.54
尿素	6.08	酵母膏+NaNO ₃	15.20
(NH ₄) ₂ SO ₄	9.12	酵母膏+NH ₄ H ₂ PO ₄	7.14
NH ₄ NO ₃	21.28	酵母膏+蛋白胨	7.60
NaNO ₃	11.40	酵母膏+尿素	6.84
NH ₄ H ₂ PO ₄	6.08		

2.2.8 对天然纤维素的分解利用 在含纤维二糖 0.005% 和不含纤维二糖条件下,分解利用天然纤维素的情况见表 3。

表 3 表明:含 0.005% 纤维二糖的酶活性高于不含纤维二糖的酶活性;经预处理的天然纤维素的酶活性高于未经预处理天然纤维素的酶活性;纤维素酶是一种诱导酶,纤维二糖可作为诱导剂。

产黄纤维单胞菌为兼性厌氧菌,25℃ 为最适产酶温度,比较适宜于天然条件下降解纤维素。通过生

表 3 利用天然纤维素的情况

Tab. 3 The capability of the use of natural cellulose

天然纤维素	含 0.005% 纤维二糖		不含纤维二糖
	生物量	酶活	酶活
经预处理			
34 目麦秆粉	0.68	30.40	15.30
100 目麦秆粉	0.84	45.60	24.32
34 目麸皮	0.80	48.64	28.68
50 目麸皮	0.70	34.96	12.16
34 目桔皮粉	0.65	30.40	16.20
50 目桔皮粉	0.73	38.00	18.24
未经预处理			
100 目麦秆粉	1.60	21.28	13.68
100 目麸皮	1.59	9.12	4.56
100 目桔皮粉	1.66	2.74	1.52

物酶技术,能提高食品发酵、酿造原材料的利用率,提高农作物废料中纤维素的利用等。

参考文献:

- [1] Joglekar A V. Studies on cellulase production by a penicillium funiculosum strain in an instrumented fermenter[J]. Enzyme Microb Technol, 1983, 5: 22-24.
- [2] Sleat R, Mah R, Robinson R. Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, clostridium cellulovorans sp. nov[J]. Appl Environ Microbiol, 1984, 48(1): 88-93.
- [3] [日]微生物研究法讨论会. 微生物学实验法[M]. 程光胜、李玲阁、张启先等译. 北京: 科学出版社, 1981. 114-115.
- [4] 中山大学生物系生化微生物学教研室. 生化技术导论[M]. 北京: 人民教育出版社, 1979. 61-62.
- [5] Tanaka M, Matsuno R. n-Butylamine and acid-stem explosion pretreatments of rice straw and hardwood, effects on substrate structure and enzymotic hydrolysis[J]. Enzyme Microb Technol, 1990, 12: 190-195.

(编辑 张银玲)

(下转第 580 页)

- [3] 郭孝武,王蕊娥,员维俭等. 超声提取与碱性浸泡法对小檗碱成分提出率的影响[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 1997, 25(1): 47-49.

(编辑 张银玲)

An experimental study on ultrasonic extraction rate of berberine

GUO Xiao-wu

(Applied Acoustics Institute, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The techniques of extracting berberine from rhizoma of *Coptis chinensis* by ultrasound are studied by experiment systematically. The optimum parameters for extraction berberine are proposed. Experimental results show that ultrasonic is a simple, time-saving, energy-saving and high-effect way, which can be used as a simulative technology in lab.

Key words: ultrasonic extraction; *Coptis chinensis*; berberine; yield

(上接第 577 页)

Studies on the cultural condition of strain

cellulomonas flavigena cellulase

GUO Ai-lian, YANG Lin, LIU Mei, WANG Hong-cang, LANG Hui-yun

(1. Department of Biology, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Department of Chemistry, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Studies on the cultural condition of strain *Cellulomonas flavigena* cellulase were made; when the optimum pH was 6.0; the optimum temperature was 25°C; 8~16 h was the zymogenous peak. The best carbon source and nitrogen source were CMC-Na, casein. High concentration glucose inhibited the cellulase production. Cellulobiose was better carbon source and inducer, and studied on the capability of the use of natural cellulose.

Key words: *Cellulomonas flavigena*; cellulase; natural cellulose; culture condition

· 学术动态 ·

我校“夏商周断代工程”研究取得重要成果

在国家重大科研项目——“夏商周断代工程”所取得的 22 个重要阶段性成果中, 我校周晓陆副教授和他的课题组获取了 5 个公认的成果。在 1996~1999 年期间, 周晓陆参与陕西天文台和我校共同承担的“工程”中 6 个子课题研究。其中“天再旦”、“武王伐商”、“吴虎鼎及周代铜器研究”、“虎簋铭文及周穆王纪年研究”等, 获得公认成就。“三苗日食”、“天大噬”也获得重要成果。例如武王伐商年确认为公元前 1046 年, 懿王元年为公元前 899 年, 昭王 19 年为公元前 997 年, 并再次确认共和元年为公元前 841 年, 把中国明确纪年的历史向前大大推进。

1999 年国庆期间, 首都北京为 50 年大庆举办的《光辉的历程》和《新中国文物工作 50 年》两个国家级大型展览中, 周晓陆历尽艰辛, 在新疆拍摄的多幅有关“天再旦”学术大型彩色照片和他所在学科组掌握的西周初年考古学、古文字学资料得到显著展示。这也是我校科研领域显著成绩的重要展示。

(薛 鲍)