

产纤维素酶绿色木霉 F UV₂₆₄ 产酶条件优化

林英 秦萍 杜志强 张蓓蓓 (沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要 对诱变菌株绿色木霉 F UV₂₆₄ 产纤维素酶条件进行了研究, 结果表明: 以 1% (NH₄)₂SO₄ 和 2% 酵母膏为氮源, 并加入 3% 表面活性剂, 2% Mandels 营养盐, 麸皮与稻草粉比例为 1:3, 加水量为干料的 4 倍, 可提高酶的产量。该菌株最适产酶培养条件为 pH 值 4.6~5.6, 30℃ 条件下发酵 96~135 h 纤维素酶的酶活性达到较高水平。此研究可为工业化生产纤维素酶提供依据。

关键词 纤维素酶; 绿色木霉; 产酶条件

中图分类号 Q946.5 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)11-2312-02

Study on Optimization Producing Cellulase Conditions of *Tichoderma*

LIN Ying et al (Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract In this paper the producing cellulase conditions of mutant strain *Tichoderma* F UV₂₆₄ were studied. The result of experiment showed that: the optimal nitrogen source is 1% (NH₄)₂SO₄ and 3% the surface active material, the optimal salt group is 2% Mandels, bran:straw is 1:3, solid:liquid is 1:4. The enzyme vitality of cellulase can be increased after adding these influential factors. The optimum culture condition of producing cellulase is pH 4.6~5.6 at 30℃ for 96~135 h, and the maximum cellulase activity is reached. This research can provide the basis for the cellulase manufacture.

Key words Cellulase activity; *Tichoderma*; Producing cellulase conditions

纤维素是世界上最丰富的再生能源, 约占生物总量的 50%, 但由于其组成结构的复杂性, 转化利用纤维素一直是个难题^[1]。纤维素酶是降解纤维素生成葡萄糖的一类酶的总称, 在工农业生产中应用广泛。纤维素酶能提高产品得率, 改善质量, 简化工艺, 故提高纤维素酶活性的研究尤为重要^[2]。培养基的组成、配比、培养条件等都会对菌种产生的纤维素酶活性的高低造成一定的影响。在实验中要根据不同的产酶菌种选取适宜的产酶条件。笔者选取绿色木霉原生质体诱变菌株 F UV₂₆₄ 为研究对象, 对菌株的产纤维素酶条件进行了优化, 为今后工业化生产提供依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 菌株。绿色木霉 F UV₂₆₄ (由出发菌株绿色木霉 F₂₆₄ 原生质体经紫外线诱变获得)。

1.1.2 试剂。溶菌酶 (Lywalyne), 北京奥博星生物技术责任有限公司; 蜗牛酶 (Snailase), 北京百泰生化技术公司; 其他均为国产化学纯或分析纯。高渗缓冲液为 PBS-0.6 mol/L NaCl, 即 0.2 mol/L 磷酸缓冲液中加入一定量的 NaCl 配制而成。

1.1.3 仪器。HC303-4A 型电热恒温培养箱, BH2 型光学显微镜, HZQ X100 恒温振荡培养箱, GL-20G 型高速冷冻离心机, HH6 型恒温水浴锅, 722 型光栅分光光度计。

1.1.4 培养基。斜面培养基 (PDA): 由 200 g 马铃薯制成的浸汁中加入葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 加自来水定容至 1 000 ml, pH 自然。液体种子培养基: 麸皮 5 g, 稻草粉 10 g, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g, KH₂PO₄ 1.0 g, CaCl₂ 1.0 g, 定容至 1 000 ml。固体发酵基础产酶培养基: 麸皮 0.5 g, 稻草粉 1.5 g, 蛋白胨 0.06 g, 自来水 10 ml 拌匀平板培养。

1.2 方法

1.2.1 培养方法。将在 PDA 上培养 3 d 的菌株, 制成 1.0 × 10⁶ 个/ml 的孢子悬浮液。分别取 1 ml 接于 100 ml 液体种子培养基中, 28℃、120 r/min 培养 2 d, 将液体种子按 10% 的接种量接于固体发酵培养基中, 并搅拌均匀, 于 28℃ 恒温培

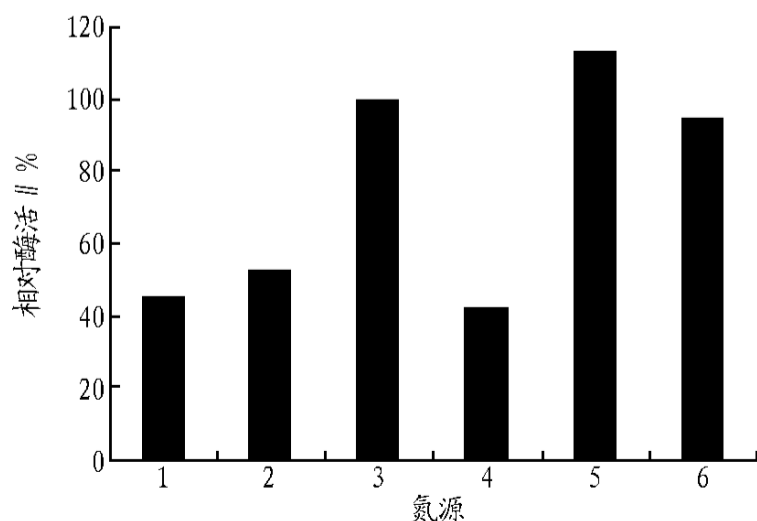
养 96 h, 将固体发酵物加入 6 倍去离子水, 浸提 1 h 后, 用 4 层纱布过滤挤压, 然后在 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液即为粗酶液, 4℃ 冰箱保存, 备用。

1.2.2 优化发酵条件实验。在固体发酵基础培养基中, 进行单因素实验, 实验设不同氮源、表面活性剂、pH 值、通气量、麸皮添加量、培养时间、固液比、无机盐条件下处理, 每处理 3 次重复, 发酵结束后测定粗酶液的滤纸酶活力 (FPA)。

1.2.3 纤维素酶活力 (FPA) 的测定。以 50 ng 滤纸条 (新华 1 号定量滤纸, 1 cm × 6 cm) 为底物, 加入 pH 值为 4.5 的 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液 1.5 ml, 加适当浓度的酶液 0.5 ml, 50℃ 保温 1 h, 用 DNS 法测定还原糖生成量, 1 min 由底物产生 1 μmol 还原糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位 (文中酶活力单位均表示为 IU/g 干料)。实验结果的比较采用相对酶活形式表示 (以某一条件下的酶活为 100%, 其他条件下的结果与之相比即得各自的相对酶活值)。

2 结果与分析

2.1 不同氮源对产酶的影响 改变产酶基本培养基所添加氮源的种类, 选择一些有机氮源和无机氮源, 研究其对产酶的影响, 加入量为其干重的 3%。结果表明 (图 1), 以有机氮酵母膏和无机氮 (NH₄)₂SO₄ 为主要氮源时的酶活最高, 最有利于酶的分泌。



注: 1. (NH₄)₂SO₄, 2. NaNO₃, 3. 酵母膏, 4. 蛋白胨, 5. (NH₄)₂SO₄ + 2% 酵母膏, 6. (NH₄)₂SO₄ + 2% 蛋白胨。

图 1 不同氮源对产酶的影响

2.2 表面活性剂对产酶的影响 表面活性剂是一端亲水

作者简介 林英 (1975 -), 女, 辽宁锦州人, 硕士, 实验师, 从事微生物工程与酶工程研究。

收稿日期 2006-04-10

和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,有利于提高胞外酶的产量^[3]。一些真菌所产生的水解酶类,在酶的积累和排出过程中,往往由于反馈现象而抑制酶的继续产生。如能设法提高细胞质膜的透性,使酶不断地排出,克服反馈现象,则可使酶的产量大幅度提高。以市售雕牌洗衣粉(主要成分为烷基苯磺酸钠)为价廉且安全可靠的表面活性剂,将菌接种在含洗衣粉的产酶基本培养基上,含量(占基质的重量百分比)分别为1%、3%、5%、7%、10%。

实验结果表明(图2),在浓度为1%~3%时,纤维素酶产量逐步提高。在加入量为3%时纤维素酶酶活最高。当加入量超过3%时,随着加入量的继续加大,酶活开始下降。这说明加入3%表面活性剂提高了木霉菌的细胞膜通透性,反馈现象得到克服;但浓度超过3%时,会导致细胞膜破坏,发生膜解体,使其透性大增,细胞内的电解质大量外渗,加之细胞内各细胞器被膜破坏,各种代谢失调,产酶活动受到抑制。

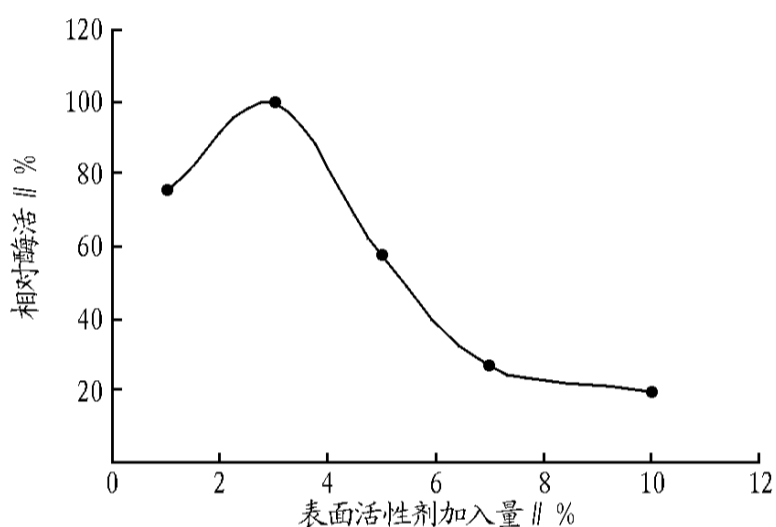


图2 表面活性剂对产酶的影响

2.3 无机盐对产酶的影响 在产酶基础培养基中添加2%干料重的不同种类的无机盐,研究其对酶活的影响。实验结果表明(图3),添加一定量的钙盐可促进菌株的产酶,这可能是因为钙离子在菌株的生理生化活动中起着一定的调节作用,以含多种盐类的Mandels营养盐的效果最好。

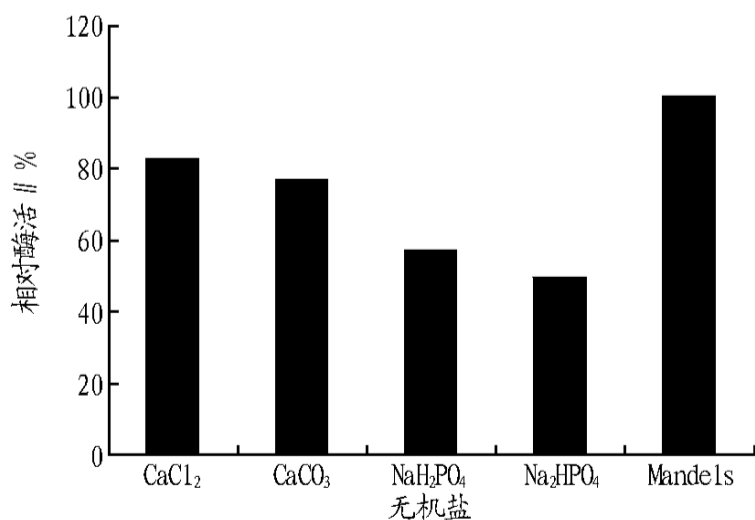


图3 无机盐对产酶的影响

2.4 麸皮添加量对产酶的影响 麸皮对菌种产酶的影响是双方面的:它一方面作为粗纤维原料可以诱导纤维素酶的产生,同时为纤维素酶的产生提供必要的营养因子;另一方面,麸皮含量的增加又会降低培养基的蓬松程度,使通气量降低,另外麸皮中本身含有还原糖,所以含高浓度麸皮的发酵培养基中同时含有较高浓度的还原糖,这就阻遏了纤维素酶的产生,进而影响产酶量。因而可以通过改变培养

基中麸皮的添加量,来研究其与纤维素酶活力之间的关系,从而确定产酶培养基中的适宜添加量,使其发挥最大的产酶能力。实验结果表明(图4),当麸皮:稻草粉为1:3时,此时的菌株生长旺盛,且酶活达到最高值。在其他比例条件下,该菌株虽能生长,但产酶量较低。

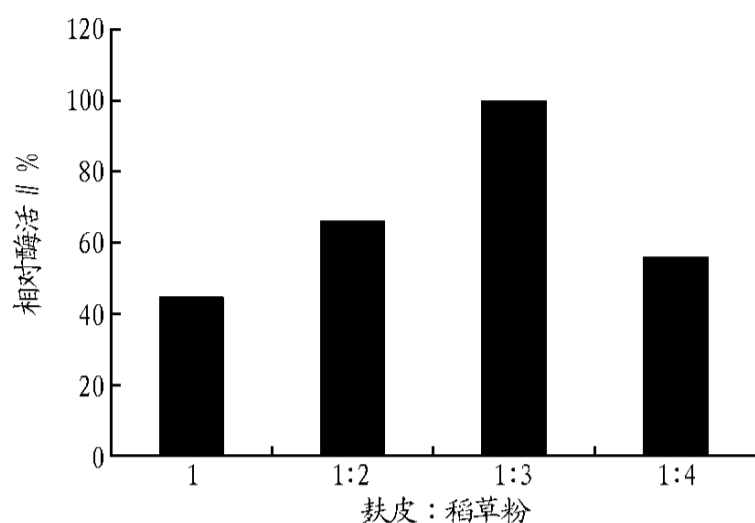


图4 麸皮添加量对产酶的影响

2.5 发酵液pH值对产酶的影响 采用离子浓度为0.1 mol/L的柠檬酸和柠檬酸钠的缓冲系统来配制产酶基本培养基的不同起始pH值,研究其对该菌株产酶情况的影响。结果表明(图5),生长环境pH值为4.6~6.0,菌株生长均很旺盛,产酶量下降较少。在pH值为5.6时,其产酶量为最大产酶量的94.2%(pH值5.0)。在环境中pH值为6时,其产酶量为最大产酶量的80.0%。说明该菌株对pH适应能力较强。在整个发酵过程中用缓冲液控制发酵液的pH值获得了很好的效果,较用NaOH和HCl调节的发酵液pH要稳定得多。

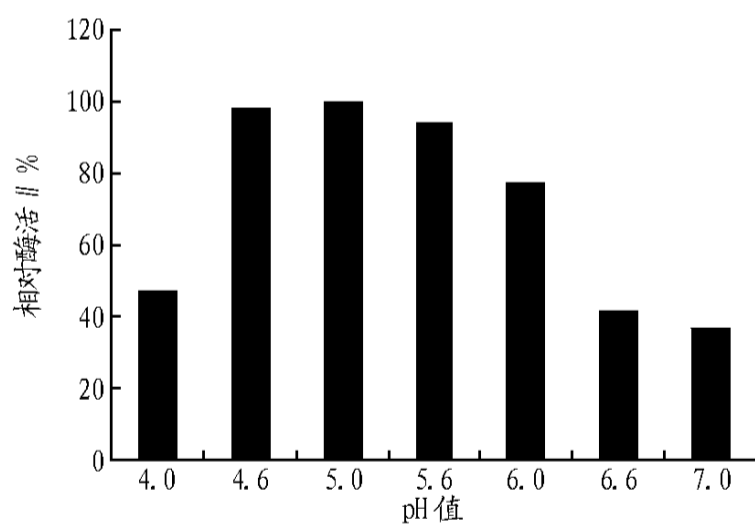


图5 发酵液pH值对产酶的影响

2.6 固液比对产酶的影响 在发酵过程中培养基的含水量也是影响产酶的关键环节之一,不论是孢子萌发,菌丝生长,还是酶的形成都需要适当的水分。该实验选择加水量分别为干料的2、3、4、5和6倍进行实验,结果表明(图6),适宜的用水量应为原料的3~4倍,此时绿色孢子多,酶活最高。而培养基中的水分太多和太少,都对酶的形成不利;水分太少,菌体生长所需水分及营养供应不足,使酶产量下降;水分太多,菌体形成孢子时间延长,氧气供应不足,透气性下降,从而使产酶量下降。只有在水分适中时菌丝生长良好,产孢子多,有利于纤维素酶的形成。

2.7 不同通气量对产酶的影响 在250 ml三角瓶中按产酶基本培养基的配制比例分别加入干料量为3、6、9、12、15 g,在30℃条件下,培养发酵4 d后,测定各自的滤纸酶活。实验结果表明(图7),该菌株的瓶装量为6 g时的酶活明显

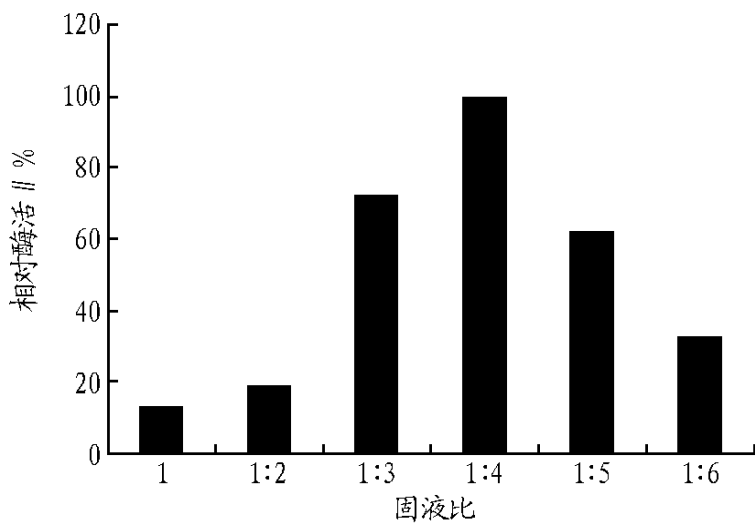


图6 固液比对产酶的影响

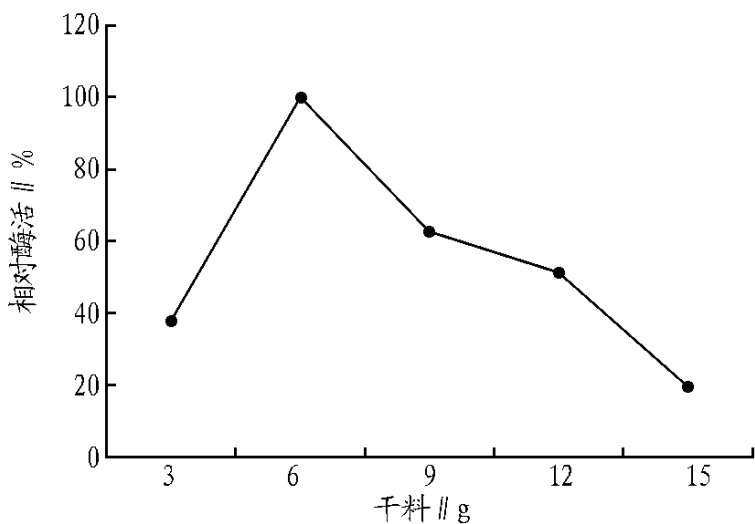


图7 不同通气量对产酶的影响

高于其他瓶装量。说明在该条件下菌株的代谢最旺盛,最有利于酶的分泌。

2.8 不同培养温度对产酶的影响 在不同温度下进行发酵实验,观测菌株生长情况,4 d 后提取粗酶液测定滤纸酶活,结果表明(图8),菌株在较低的温度下(26℃)生长缓慢,且产酶量很低;在温度32℃以上菌株生长迅速,但产酶

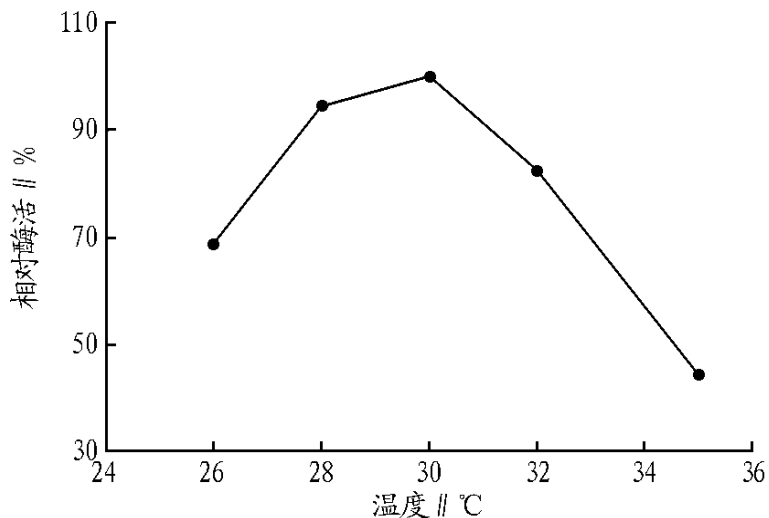


图8 不同培养温度对产酶的影响

量反而下降;30℃时,菌株虽处于亚生长条件下,但产酶量最高。

2.9 不同培养时间对产酶的影响 培养过程对产酶有较大的影响,无论是菌株的生长,还是酶的产生都需要一个过程。观测发现(图9),发酵前期主要是菌丝体旺盛生长阶段,产酶量极低,在发酵88 h后,开始大量形成孢子,酶产量也迅速增加,到96 h菌丝完成迅速生长期,进入到产酶高峰期,然后产酶进入平稳状态,再延长培养时间,酶活反而下降。因此,该菌株适宜的培养时间为96~135 h。

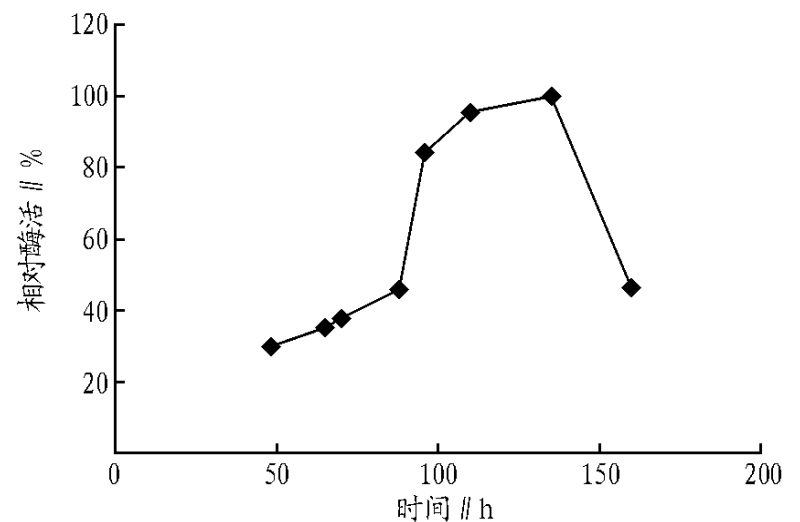


图9 不同培养时间对产酶的影响

3 结论

培养基的组成、配比、培养条件等都会对菌种产生的纤维素酶酶活造成一定的影响。在实验中要根据不同的产酶菌种选取适宜的产酶条件。该实验初步确定了菌株F UV₂₆₄的最适产酶条件。不同氮源对产酶影响较大,在相同加入量条件下,发酵培养基以1%(NH₄)₂SO₄和2%酵母膏为氮源时最佳。在培养基质中再加入适宜的表面活性剂、Mandels营养盐并选择麸皮与稻草粉比例为1:3以及适宜的加水量时,纤维素酶酶活可有明显的提高。对于菌株绿色木霉F UV₂₆₄的培养条件在选择起始pH值为4.6~5.6,在30℃发酵96~135 h条件下,纤维素酶酶活达到最高值。该研究对实际生产应用有指导意义,为稻草粉和麸皮的综合利用,减少环境污染,提高经济效益开辟了新途径。

参考文献

- [1] 张鸿雁,陈锡时.微生物纤维素酶分子生物学研究进展[J].生物技术,2003,13(3):41-42.
- [2] 张宇昊,王颀,张伟,等.康氏木霉的原生质体诱变[J].纤维素科学与技术,2004,12(2):18-19.
- [3] 姜秋会,熊亚,才治民.康氏木霉固态发酵纤维素酶的初步研究[J].青海草业,2004,13(1):6-9.