

## 里氏木霉与黑曲霉混合发酵产纤维素酶的研究



FANG Hao

方浩, 宋向阳\*, 赵晨, 常铮, 储洁, 勇强

(南京林业大学林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 江苏 南京 210037)

**摘 要:** 研究了利用里氏木霉和黑曲霉混合培养的形式产纤维素酶,以两个菌种的不同接种比和延迟黑曲霉的接种时间来寻找两个菌种发挥最大协同作用的结合点。以农林废弃物之一的玉米秸秆为底物,经过蒸汽爆破预处理后,用作产酶碳源。以里氏木霉单一培养与黑曲霉单一培养为参照进行对比研究。结果表明,黑曲霉接种较里氏木霉延迟 48 h,里氏木霉与黑曲霉接种量比为 5:1 时,滤纸酶活最高,达 3.295 IU/mL,高于里氏木霉单一培养(2.480 IU/mL), $\beta$ -葡萄糖苷酶活达 1.010 IU/mL,也远远高于里氏木霉单一培养(0.243 IU/mL)。本实验充分证明里氏木霉与黑曲霉混合培养产酶是可行的,并优于单一菌种培养。

**关键词:** 玉米秸秆;里氏木霉;黑曲霉;混合培养;纤维素酶

中图分类号:TQ351;TQ92

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2009)06-0015-05

### Cellulase Production from Mixed Fermentation of *Trichoderma reesei* RUT C-30 and *Aspergillus niger* NL02

FANG Hao, SONG Xiang-yang, ZHAO Chen, CHANG Zheng, CHU Jie, YONG Qiang

(Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology, Ministry of Education, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** Cellulase production from mixed fermentation of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* was investigated. The balance point of the two strains was established by delaying inoculation time of *A. niger* and using different inoculum ratios. The time courses of cellulase production by monoculture of *T. reesei* and *A. niger* were used as controls. It was found that the highest filter paper activity (FPA), 3.295 IU/mL, was obtained when delay in *A. niger* inoculation was 48 h and volumetric inoculum ratio of *T. reesei* versus *A. niger* was 5:1, higher than the FPA of the monoculture of *T. reesei*, 2.480 IU/mL. The  $\beta$ -glucosidase activity ( $\beta$ -GA) also increased from 0.243 IU/mL of the monoculture of *T. reesei* to 1.010 IU/mL of the mixed culture aforementioned. It was demonstrated that the mixed fermentation of *T. reesei* and *A. niger* was feasible and superior to the monoculture of *T. reesei* or *A. niger*.

**Key words:** corn stover; *T. reesei*; *A. niger*; mixed culture; cellulase

大规模使用纤维素酶降解纤维素的困难是:纤维素酶酶活低、生产成本高。这是制约纤维素燃料乙醇工业的瓶颈之一。能够生产纤维素酶的微生物有很多,研究较多的有木霉属、曲霉属、青霉属等等,目前应用最广、研究最深入的纤维素酶生产菌株大多是里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的优良突变株。其中里氏木霉 RUT C-30 被认为是最好的纤维素酶产生菌之一,也是植物纤维原料生物转化制取乙醇工艺中最有工业应用前景的微生物<sup>[1]</sup>。里氏木霉菌株虽然能产生高活力的内切型和外切型葡聚糖酶,但是所产的 $\beta$ -葡萄糖苷酶的活力比较低,分解纤维二糖的能力不够强<sup>[2-3]</sup>。黑曲霉(*Aspergillus niger*)是优良的 $\beta$ -葡萄糖苷酶生产菌株<sup>[4]</sup>,通过加入产自黑曲霉的 $\beta$ -葡萄糖苷酶,或者通过使用里氏木霉和黑曲霉共同培养<sup>[5]</sup>,可以有效地缓解纤维素酶降解纤维素过程中因纤维二糖的积累而产生的产物反馈抑制

收稿日期:2009-06-17

基金项目:国家高技术研究发展计划(2008AA05Z401);江苏高校自然科学基金重大基础研究项目(06KJA22015);江苏省高技术计划(BG2005327)

作者简介:方浩(1985-),男,江苏江阴人,硕士生,主要从事生物燃料乙醇研究工作

\* 通讯作者:宋向阳(1965-),男,副教授,博士,研究方向为生物化工;E-mail:xiangyangsong@hotmail.com。

现象。由于里氏木霉产 $\beta$ -葡萄糖苷酶的能力较弱,而曲霉属产 $\beta$ -葡萄糖苷酶的能力较强,已经有研究发现可以通过两菌种的混合发酵提高纤维素酶的活力或优化纤维素酶的组分,但这方面的研究还较少。由于价格低廉、储量丰富和可再生性,玉米秸秆和麦秆等木质纤维素原料以及其它能源作物是生物乙醇工业理想的原料<sup>[6]</sup>。蒸汽爆破可以使木质纤维素原料中的半纤维素降解、降低原料的尺寸并提高其比表面积,利于后续纤维素酶催化水解,是具有工业化应用前景的预处理方式。本实验的目的是研究里氏木霉 RUT C-30 和黑曲霉 NL02 混合液态摇瓶发酵,以蒸汽爆破预处理过的玉米秸秆为底物,产纤维素酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶的情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 微生物** 里氏木霉(*T. reesei*) RUT C-30,黑曲霉(*A. niger*) NL02,由南京林业大学生物化工研究所保藏。

**1.1.2 培养基** 菌种保藏斜面培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

Mandels<sup>[7]</sup> 菌丝体培养液配方:葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 1 g/L, Mandels 营养盐浓液 5 mL/瓶, Mandels 微量元素浓液 0.05 mL/瓶, 1 mol/L 柠檬酸缓冲液 2.5 mL/瓶, Tween 80 2 滴/瓶,以上溶液定容至 50 mL。

产纤维素酶培养基(g/L):葡萄糖 1,蒸汽爆破渣 30(绝干), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.2,尿素 0.5,蛋白胨 1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,  $\text{CaCl}_2$  0.3,  $\text{MgSO}_4$  0.08,硫酸亚铁 0.005,硫酸锰 0.001 6,硫酸锌 0.001 4,氯化钴 0.003 7, Tween 80 2 滴,初始 pH 值 4.8,装液量 50 mL。

**1.1.3 原料** 蒸汽爆破玉米秸秆,秸秆产自内蒙古呼和浩特市,风干储存。预处理方式,蒸汽爆破,维持压力 1.6 MPa,维压时间 7 min。蒸汽爆破渣用蒸馏水洗至中性,保存于 4 °C 冰箱中,平衡水分。

**1.1.4 主要试剂** 3,5-二硝基水杨酸(DNS),柠檬酸缓冲液(1 mol/L、0.05 mol/L),Mandels 营养盐浓液, Mandels 微量元素浓液, Tween 80, pNPG 溶液, 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液。

### 1.2 实验方法

产酶方法:活化完毕后的里氏木霉、黑曲霉菌液,以黑曲霉推迟接入 0(同时接入)、24、48 h 和里氏木霉与黑曲霉接种体积比 1:1、5:1 所产生的 6 种组合形式(0 h: 1:1、5:1; 24 h: 1:1、5:1; 48 h: 1:1、5:1)接入产酶培养基,第 1 天 30 °C,第 2 天开始 28 °C。从第 2 天开始每天取样,在 3 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min,取上清液(粗酶液)测定滤纸酶活力(FPA)和 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力( $\beta$ -GA),同时测定 3 个平行样,取平均值。

### 1.3 分析方法

**1.3.1 FPA 和 $\beta$ -GA 的测定方法** 采用国际理论和应用化学协会(IUPAC)推荐的标准方法<sup>[8]</sup>测定。

一个滤纸酶活力的国际单位(IU)定义为:在标准反应条件下每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  葡萄糖所需的酶量。一个 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力(IU)单位定义为:每分钟水解生成 1  $\mu\text{mol}$  对硝基苯酚所需要的酶量。

**1.3.2 总还原糖含量的测定** 用 DNS 法测定。

**1.3.3 糖组分含量测定** 用 HPLC 测定。色谱仪, Agilent 1100 型高效液相色谱仪;色谱柱, Bio-Rad Aminex HPX-87H(300 mm  $\times$  7.8 mm);柱温, 55 °C;流动相为脱气高纯水;流速 0.6 mL/min;检测器,示差折光检测器(RI);进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

**1.3.4 pH 值的测定** 用 Hanna 公司酸度计测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 里氏木霉产酶历程

产酶历程开始后, FPA 在 3 d 后开始迅速增加,在第 5 天达到最大值,为 2.480 IU/mL,随后由于 pH 值剧烈变化等环境因素的影响,纤维素酶迅速失活(见图 1(a))。导致纤维素酶失活的原因还可能来自里氏

木霉细胞破碎自溶时所产生的大量蛋白质水解酶。 $\beta$ -GA 在第4天开始明显增加,第6天达到最大值,为0.389 IU/mL。 $\beta$ -GA 增长滞后一天,主要是因为体系中的初始 $\beta$ -GA 很低。里氏木霉产的胞外纤维素酶催化水解底物生成了较多的纤维二糖,纤维二糖在体系中积累,而纤维二糖具有诱导合成 $\beta$ -葡萄糖苷酶的作用。里氏木霉产 $\beta$ -葡萄糖苷酶的能力较低,使得其所产的纤维素酶酶系结构不合理。在里氏木霉 RUT C-30 产纤维素酶的液态培养基中,需加入 Tween 80 等表面活性剂以抑制菌丝球的形成,提高里氏木霉分泌胞外蛋白的能力<sup>[9]</sup>。此历程用作里氏木霉与黑曲霉混合发酵产纤维素酶的参照。

## 2.2 黑曲霉的产酶历程

图1(b)为黑曲霉产酶历程,产酶开始,pH 值随即进入了2~3的低pH 值范围,这是典型的黑曲霉产 $\beta$ -葡萄糖苷酶的特征,FPA 始终在0.1 IU/mL以下,最高值在第2天,仅0.104 IU/mL。 $\beta$ -GA 持续增加,第7天达到1.397 IU/mL。由于FPA 很低,所以其降解底物生成还原糖的效力很低,因而还原糖质量浓度一直下降,黑曲霉消耗还原糖的同时,没有更多还原糖生成。黑曲霉产 $\beta$ -葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶的能力较强,但是产外切葡聚糖酶的能力较弱<sup>[10]</sup>,致使纤维素酶的总体酶活不高。此历程作里氏木霉与黑曲霉混合发酵产纤维素酶的参照。

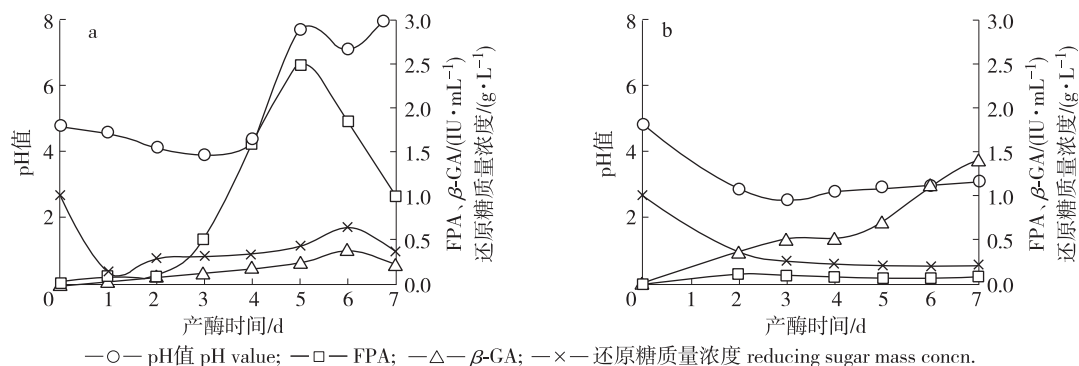


图1 里氏木霉(a)和黑曲霉(b)产纤维素酶的历程

Fig. 1 Time courses of cellulase production by *T. reesei* (a) and *A. niger* (b)

## 2.3 不同产酶形式组合的结果比照

各种产酶形式的实验结果见表1。以里氏木霉单一培养和黑曲霉单一培养作为参照。研究发现,当里氏木霉与黑曲霉同时接入培养基时,所产酶的FPA 很低而 $\beta$ -GA 较高,且 $\beta$ -GA 高于黑曲霉单一培养。以产酶形式0 h 1:1 为例,第6天的 $\beta$ -GA 为1.765 IU/mL,高于黑曲霉单一培养第6天的1.397 IU/mL。这一实验结果与Juhász 等<sup>[5]</sup>的研究结果类似。说明产酶形式0 h 1:1 和0 h 5:1 以黑曲霉产 $\beta$ -葡萄糖苷酶为主,以里氏木霉产纤维素酶为辅,里氏木霉与黑曲霉形成了协同作用。

表1 各种发酵形式的结果对比

Table 1 Comparison of results from different forms of fermentation for cellulolytic enzymes production

延迟时间/h delay time	接种量比 inoculation ratio	产酶周期/d enzyme production period	FPA/(IU·mL <sup>-1</sup> )	$\beta$ -GA/(IU·mL <sup>-1</sup> )
0	1:1	6	0.114	1.765
0	5:1	7	0.212	2.323
24	1:1	6	1.110	0.530
24	5:1	5	2.022	0.189
48	1:1	5	1.163	0.606
48	5:1	5	3.295	1.010
里氏木霉 <i>T. reesei</i>		5	2.480	0.243
黑曲霉 <i>A. niger</i>		6	0.104	1.397

产酶形式24 h 1:1 和48 h 1:1 所产酶的FPA 低于里氏木霉单一培养,高于黑曲霉单一培养; $\beta$ -GA 高于里氏木霉单一培养,低于黑曲霉单一培养。虽然FPA 较里氏木霉单一培养降低了,但是 $\beta$ -GA/FPA

提高了,酶系结构较里氏木霉产纤维素酶更合理。此实验结果类似于 Wen 等<sup>[11]</sup>的研究结果。说明此时里氏木霉与黑曲霉高度协同,共同产酶。

混合发酵形式 24 h 5:1 与 48 h 5:1 都是以里氏木霉产纤维素酶为主,不同的是前者是负作用,即黑曲霉未与里氏木霉形成协同作用,而是成了里氏木霉产纤维素酶的干扰因素,产酶形式 24 h 1:1 第 5 天的 FPA 和  $\beta$ -GA 分别为 2.022 和 0.189 IU/mL,低于里氏木霉的 2.480 和 0.243 IU/mL;后者是正作用,即里氏木霉与黑曲霉形成协同作用,互利共生,并以里氏木霉产纤维素酶为主,黑曲霉产  $\beta$ -葡萄糖苷酶为辅,此研究结果与 Gutierrez-Correa 等<sup>[12-13]</sup>和 Ahamed 等<sup>[14]</sup>的研究结果一致。

#### 2.4 最优混合发酵形式的产酶历程

图 2 为混合发酵形式 48 h 5:1 的产酶历程,FPA 在第 3 天迅速增加,为 1.196 IU/mL,第 4 天为 2.368 IU/mL,第 5 天达到最大,达 3.295 IU/mL; $\beta$ -GA 在第 3 天开始增加,第 5 天为 1.010 IU/mL,第 7 天达最大,为 1.135 IU/mL。pH 值、酶活、还原糖质量浓度变化曲线类似里氏木霉产酶历程,说明此过程为主要是里氏木霉产纤维素酶,而黑曲霉起辅助协同作用。里氏木霉与黑曲霉二者互利共生,里氏木霉产生大量的内切和外切葡聚糖酶,高效催化底物生成大量的纤维二糖,而里氏木霉的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力低,造成纤维二糖的积累,纤维二糖诱导黑曲霉产  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[1]</sup>。黑曲霉随即产生大量  $\beta$ -葡萄糖苷酶,有效降解纤维二糖生成葡萄糖,供给里氏木霉与黑曲霉。还原糖质量浓度的增加明确说明纤维素酶的高催化效能,从第 3 天的 0.367 g/L 增加到第 6 天的 1.036 g/L,甚至已经超过了 1 g/L 的起始糖质量浓度。当 pH 值大于 5.5 后,里氏木霉菌丝体开始自溶。由图 1(b)可以看出,黑曲霉产  $\beta$ -葡萄糖苷酶主要是在 pH 值 3 左右的环境中进行的,而此时的培养基环境已经不适合黑曲霉产  $\beta$ -葡萄糖苷酶。因此第 5 天后  $\beta$ -GA 并没有明显增长,仅从第 5 天的 1.010 IU/mL 增加到第 7 天的 1.135 IU/mL。

#### 2.5 里氏木霉和黑曲霉单一培养、混合培养所得酶活比较

由图 3 可见,相对于里氏木霉单一培养和黑曲霉单一培养,混合培养的 FPA 有较大的提高,在第 5 天,里氏木霉单一培养的 FPA 为 2.480 IU/mL,而混合发酵形式 48 h 5:1 的 FPA 为 3.295 IU/mL,是单一培养的 1.33 倍。相比于里氏木霉单一培养, $\beta$ -GA 有很大的提高,以第 5 天为例,里氏木霉单一培养的  $\beta$ -GA 为 0.243 IU/mL 混合发酵形式 48 h、5:1 的  $\beta$ -GA 为 1.010 IU/mL,是单一培养的 4.16 倍。而在第 4、5 天时,混合培养的  $\beta$ -GA 高于黑曲霉单一培养,第 6、7 天时  $\beta$ -GA 小于黑曲霉单一培养的原因是混合培养后期的培养基环境不利于黑曲霉产  $\beta$ -葡萄糖苷酶。

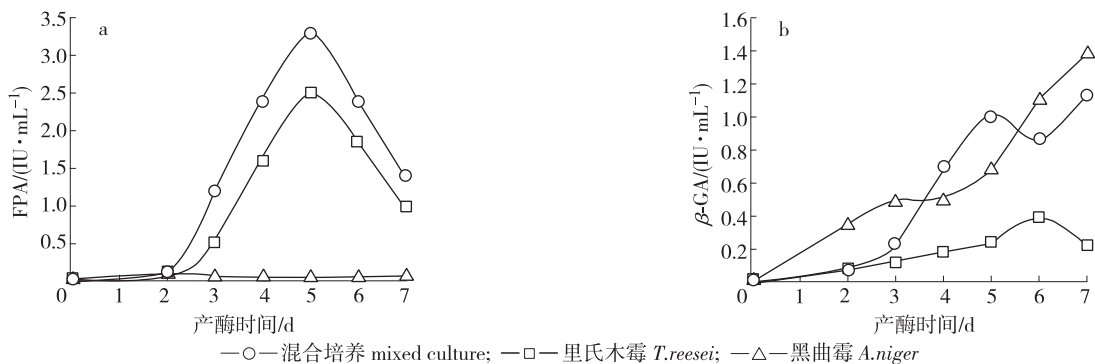


图 3 混合培养与单一培养所产 FPA (a) 和  $\beta$ -GA (b) 酶活力比较

Fig. 3 Comparison of enzyme activities of FPA (a) and  $\beta$ -GA (b) from the mixed cultures and monoculture of *T. reesei* and *A. niger*

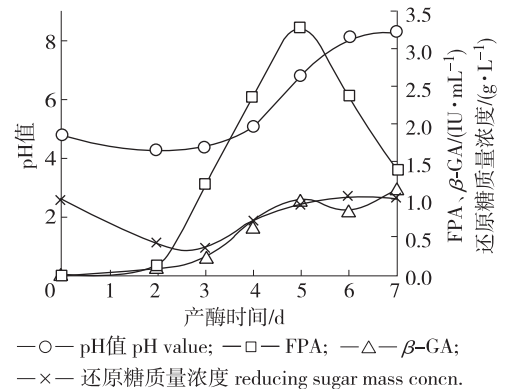


图 2 混合发酵形式的产酶历程 (48 h, 5:1)

Fig. 2 Time course of cellulase production by the mixed culture fermentation

混合培养产酶的 FPA 与  $\beta$ -GA 高于单一培养的原因是:混合发酵所产的纤维素酶各组分的协同作用很强,此发酵产酶方式能够产较强活力的内切葡聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[5]</sup>,使得底物去糖基化,并产生龙胆二糖,龙胆二糖是强烈的产纤维素酶诱导物<sup>[15]</sup>。说明混合培养优于里氏木霉单一培养,当协同作用充分发挥时,不仅可以改善纤维素酶的组分,而且可以提高纤维素酶的总体酶活和酶的产率。

### 3 结论

**3.1** 相对于里氏木霉单一培养和黑曲霉单一培养,里氏木霉与黑曲霉混合培养形式 48 h 5:1 所产酶的滤纸酶活力与  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力高于单一培养,在第 5 天,里氏木霉单一培养的 FPA 为 2.480 IU/mL,而混合培养所产酶的 FPA 为 3.295 IU/mL,是单一培养的 1.33 倍;里氏木霉单一培养的  $\beta$ -GA 为 0.243 IU/mL,而混合培养所产酶的  $\beta$ -GA 为 1.010 IU/mL,是单一培养的 4.16 倍。说明通过调整菌种接种量的配比与黑曲霉的延迟接种,找到了里氏木霉与黑曲霉发挥最大协同作用的最佳结合点,使得这两种真菌互利共生,使其所产的纤维素酶具有高效降解农林废弃物——玉米秸秆的能力。

**3.2** 实验结果表明,里氏木霉与黑曲霉是较好的混合菌种培养的“伴侣”,二者可以兼容并且发挥协同作用,所产纤维素酶活力高于里氏木霉单一培养和黑曲霉单一培养。里氏木霉与黑曲霉混合培养具有良好的大规模产纤维素酶的工业应用前景。

#### 参考文献:

- [1] ORTEGA N, BUSTO M D, PEREZ-MATEOS M. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulose[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2001, 47(1): 7-14.
- [2] STOCKTON B C. Cellobiase production by a selected *Aspergillus niger* strain in solid state fermentation[J]. Biotechnology Letters, 1991, 13(1): 57-62.
- [3] 宋向阳, 毛连山, 余世袁. 以里氏木霉制备纤维素酶的研究[J]. 化工时刊, 2000, 12(1): 11-13.
- [4] RASHID M H, RAJOKA M I, SIDDIQUI K S, et al. Kinetic properties of chemically modified  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* 280[J]. Pakistan Journal of Zoology, 1997, 29(4): 354-363.
- [5] JUHÁSZ T, KOZMA K, SZENGYEL Z, et al. Production of  $\beta$ -glucosidase in mixed culture of *Aspergillus niger* BKM F 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C-30[J]. Food Technology and Biotechnology, 2003, 41(1): 49-53.
- [6] BALAT M, BALAT H, ÖZ C. Progress in bioethanol processing[J]. Progress in Energy and Combustion Science, 2008, 34(5): 551-573.
- [7] MANDELS M, MEDEIROS J E, ANDREOTTI R E, et al. Enzymatic hydrolysis of cellulose: Evaluation of cellulase culture filtrates under use condition[J]. Biotechnology Bioengineering, 1981, 23(9): 2009-2026.
- [8] GHOSE T K. Measurement of cellulose activities[J]. Pure & Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257-268.
- [9] DOMINGUES F C, QUEIROZ J A, CABRAL J M S, et al. The influence of culture conditions on mycelia structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26(5/6): 394-401.
- [10] HANIF A, YASMEEN A, RAJOKA M I. Induction, production, repression, and derepression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*[J]. Bioresource Technology, 2004, 94(3): 311-319.
- [11] WEN Z, LIAO W, CHEN S. Production of cellulase/ $\beta$ -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(9): 3087-3094.
- [12] GUTIERREZ-CORREA M, PORTAL L, MORENO P, et al. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse[J]. Bioresource Technology, 1999, 68(2): 173-178.
- [13] GUTIERREZ-CORREA M, TENDERDY R P. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation[J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(7): 665-667.
- [14] AHAMED A, VERMETTE P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C 30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor [J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 42(1): 41-46.
- [15] SUTO M, TOMITA F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 92(4): 305-311.