

绿色木霉液体发酵产纤维素酶的培养基优化

董玲玲¹,李志军²,田毅红¹,曾晶¹,邹坤¹,龚大春¹

(1.三峡大学-艾伦麦克德尔米德再生能源实验室,湖北宜昌 443002;2.安琪酵母股份有限公司,湖北宜昌 443002)

摘要: 研究液体摇瓶发酵产纤维素酶的最佳培养基组成。通过单因素实验确定了培养基中氮源、碳源和诱导碳源的种类,采用正交试验确定了培养基中4种主要营养成分的组成。结果表明,摇瓶液体发酵产纤维素酶的最佳产酶培养基的种类和组成为:有机氮源蛋白胨和无机氮源硫酸铵的含量分别为11 g/L和13 g/L,葡萄糖6 g/L,磷酸二氢钾10.5 g/L,爆破的稻草为13.4 g/L,纤维素酶的滤纸酶活为19.22 U/mL。

关键词: 微生物; 纤维素酶; 绿色木霉; 液体发酵; 培养基优化

中图分类号:Q55;Q814;TQ920;Q93-3

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2010)02-0027-04

Optimization of Culture Medium for Cellulase Production by Liquid Fermentation of *Trichoderma viride*

DONG Ling-ling¹, LI Zhi-jun², TIAN Yi-hong¹, ZENG Jing¹, ZOU Kun¹ and GONG Da-chun¹

(1. Alan G. Macdiamid Institute of Renewable Energy, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002;

2. Angel Yeast Co. Ltd., Yichang, Hubei 443002, China)

Abstract: The best culture medium for the preparation of cellulase by liquid fermentation of *Trichoderma viride* was determined in this paper. Firstly, the species of nitrogen source, carbon source and induced carbon source were determined through single factor test. Then four main compositions of culture medium were determined through orthogonal experiments. The results showed that the compositions of the best culture medium for cellulase preparation were as follows: peptone content (organic nitrogen source) was 11 g/L, (NH₄)₂SO₄ content (inorganic nitrogen source) was 13 g/L, glucose content was 6 g/L, KH₂PO₄ content was 10.5 g/L, and steam-explosion straw content was 13.4 g/L. The filter paper activity of the produced cellulase was 19.22 U/mL.

Key words: microbe; cellulase; *Trichoderma viride*; liquid fermentation; culture medium optimization

随着全球能源危机、粮食危机和环境危机的到来,人们把目光转向木质纤维素来源,地球上最丰富、最廉价的再生资源^[1]。如果把纤维素转化为葡萄糖,这对于缓解世界粮食危机、改善人类生活水平以及固体废弃物资源转化具有不可估量的价值^[2],而纤维素酶正是能把纤维素和半纤维素转化成糖类的最环保和最简单的生物酶。纤维素酶的工业生产有两种方法,固体发酵和液体发酵,目前国内主要以固态法为主;而国外主要以液体深层发酵产纤维素酶为主,工艺控制简单,规模放大容易。纤维素酶产生菌主要有木霉、青霉和曲霉等,其中里氏木霉(即绿色木霉)是世界公认的产纤维素酶最具研究价值的真菌^[3],本实验就是采用绿色木霉进行液体摇瓶发酵,并对其培养基和工艺条件的优化,研究其最佳培养基组成和工艺条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

绿色木霉,由三峡大学艾伦麦克德尔米德再生能源研究所保藏。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养

在装有PDA培养基(马铃薯20%,葡萄糖2%,琼脂2%)的试管中接入绿色木霉,于30℃静置培养3~5d。

1.2.2 种子培养基和发酵培养基

种子培养基见表1,摇瓶发酵培养基见表2。

1.2.2.1 种子培养基

原料组成为:葡萄糖10 g/L,诱导碳源(爆破稻草)5.4 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.4 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.3 g/L, KH₂PO₄ 20 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.4 g/L, 安琪酵母抽提物10 g/L, FeSO₄·

基金项目 湖北省教育厅高校产学研合作资助项目(CXY2009B2008) 横向项目“纤维素乙醇的相关关键技术的研究”(200800230)。

收稿日期:2009-09-21

作者简介:董玲玲(1975-),研究生,从事生物催化与转化的研究。

通讯作者:龚大春(1967-),男,生物化工博士,教授,硕士生导师,主要从事生物质能的研究与开发以及手性化合物的合成技术研究。dch-gong_2004@163.com。

表1 种子培养基

原料组成	培养基(g/L)
葡萄糖	10
诱导碳源(爆破稻草)	5.4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3
KH ₂ PO ₄	20
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4
安琪酵母抽提物	10
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg/L
七水硫酸锌	1.4 mg/L
六水氯化钴	3.7 mg/L
一水硫酸锰	1.6 mg/L
Penicilin	2.00 mL/L

注: Penicilin 制备成 5 mg/mL(下同)。

表2 摇瓶发酵培养基

原料组成	用量(g/L)
蛋白胨	适量
碳源及诱导碳源	适量
KH ₂ PO ₄	适量
CaCl ₂	0.8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	适量
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0 mg/L
七水硫酸锌	1.4 mg/L
六水氯化钴	3.7 mg/L
一水硫酸锰	1.6 mg/L
Tween 80	0.3 mL/L
Penicilin	2 mL/L

7H₂O 5 mg/L,七水硫酸锌 1.4 mg/L,六水氯化钴 3.7 mg/L,一水硫酸锰 1.6 mg/L,Penicilin 2.00 mL/L(注:Penicilin 制备成 5 mg/mL,下同)。

1.2.2.2 摇瓶发酵培养基

原料组成: 蛋白胨适量, 碳源及诱导碳源适量, KH₂PO₄ 适量, CaCl₂ 0.8 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.6 g/L, (NH₄)₂SO₄ 适量, FeSO₄·7H₂O 5.0 mg/L, 七水硫酸锌 1.4 mg/L, 六水氯化钴 3.7 mg/L, 一水硫酸锰 1.6 mg/L, Tween 80 0.3 mL/L, Penicilin 2 mL/L。

1.3 方法

1.3.1 3种酶活的测定

1.3.1.1 滤纸酶活定义^[4]

1g 固体酶(或 1mL 液体酶),在(50±1)°C、指定 pH 条件下(酸性纤维素酶 pH4.8,中性纤维素酶 pH6.0),1h 水解滤纸底物,产生出相当于 1mg 葡萄糖的还原糖量,为 1 个酶活力单位,以 U/g(或 U/mL)表示。

1.3.1.2 CMC 酶活定义^[5](内切葡聚酶酶活)

还原糖法,1g 固体酶(或 1mL 液体酶),在(50±0.1)°C、指定 pH 条件下(酸性纤维素酶 pH4.8,中性纤维素酶 pH6.0),1h 水解解甲基纤维素钠底物,产生出相当于 1mg 葡萄糖的还原糖量,为 1 个酶活力单位,以 U/g

(或 U/mL)表示。

1.3.1.3 β-葡萄糖苷酶活^[6](纤维二糖酶)

还原糖法,1g 固体酶(或 1mL 液体酶),在(50±0.1)°C、指定 pH 条件下(酸性纤维素酶 pH4.8,中性纤维素酶 pH6.0),0.5 h 水解 1%水杨苷溶液底物,产生出相当于 1mg 葡萄糖的还原糖量,为 1 个酶活力单位,以 U/g(或 U/mL)表示。

1.3.2 粗酶液的提取

无菌条件下,将摇瓶摇匀,取发酵液 1.5 mL 于小离心管中,2500 r/min 离心 5 min,小心取出上清液,适当稀释后备用。

2 结果与分析

2.1 摇瓶培养基的碳源确定及优化

有研究者^[7-8]分别利用葡萄糖、木糖、乳糖、纤维二糖作为碳源,在 30 °C、150 r/min,初始 pH5,50 mL 装液量/250 mL 三角烧瓶的条件下培养 6 d,取样进行滤纸酶活的测定,确定菌体生长用碳源。

在蛋白胨 15 g/L、硫酸铵 20 g/L、碳源 8 g/L、磷酸二氢钾 8 g/L,其他成分与 1.2.2.2 节相同的情况下,滤纸酶活见图 1 所示。

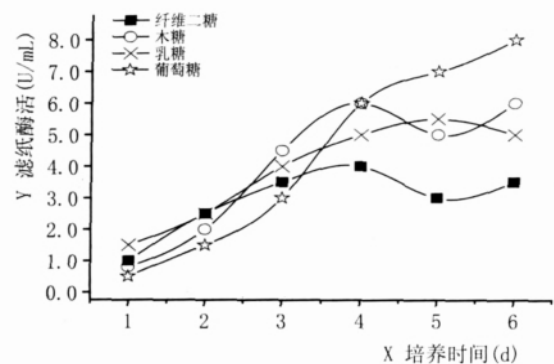


图1 4种不同碳源产酶情况比较

从图 1 中可以看出,在 3 d 以前,以葡萄糖为碳源的培养基滤纸酶活并没有优势,但是从第 3 天到第 6 天,葡萄糖的酶活显著增高,说明菌体生长前期,葡萄糖对纤维素酶的产生有抑制作用,到了后期,随着菌体的增长,碳源的消耗,葡萄糖的抑制作用逐渐减少,纤维素酶的产量显著增多,说明尽管葡萄糖较其他 3 种碳源更为强烈地抑制纤维素酶的产生,但是它可能更有利于菌体自身的生长,到了后期,这种利于菌体生长的效果就体现在纤维素酶的产量显著增高,所以本实验选用葡萄糖作为菌体生长的碳源。

2.2 诱导碳源的比较和优化

与 2.1 节确定的培养基和发酵工艺条件相同,在 2.1 节基础上进行爆破稻草、微晶纤维素及其爆破稻草和微

晶纤维素以一定比例混合,比较不同诱导碳源下纤维素酶的产量变化,8 g/L的葡萄糖作为碳源。不同比例的爆破稻草对纤维素酶产量的影响结果见图2,不同比例的微晶纤维素对纤维素酶产量的影响结果见图3,爆破稻草和微晶纤维素按不同比例混合对纤维素酶产量的影响结果见图4。

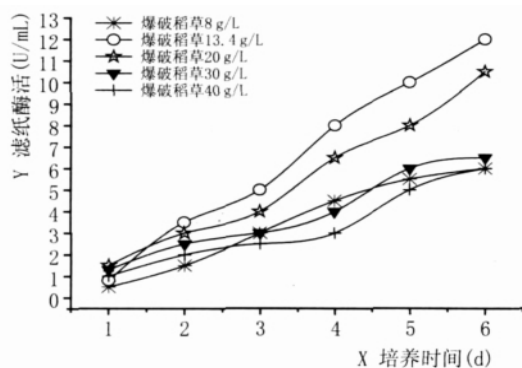


图2 不同比例的爆破稻草对纤维素酶产量的影响

从图2中可以看到,当爆破稻草的量为13.4 g/L时,纤维素酶的滤纸酶活达到最高,但是由过高的纤维素含量可能会影响菌体后期对氧气的需求量,爆破稻草的含量过高时,滤纸酶活反而变低,然而当爆破稻草的量低于8 g/L时,菌体可能不能充分接触到纤维素,也会影响纤维素酶的产量。

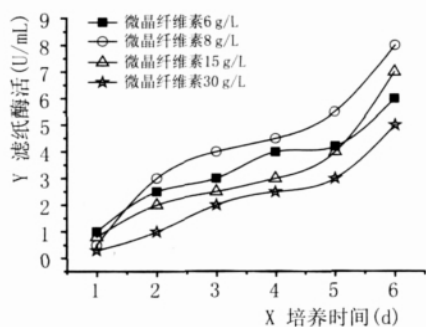


图3 不同比例的微晶纤维素对纤维素酶产量的影响

从图3可以看到,单独使用微晶纤维素的量为8 g/L时,纤维素酶的滤纸酶活达到最大值。但是从图2和图3中也可以看到,两种诱导碳源在合适的比例下,滤纸酶活达到峰值时,爆破稻草的用量要稍多于微晶纤维素,但是不可否认的是,爆破稻草在13.4 g/L时,滤纸酶活的峰值达到12 U/mL,而微晶纤维素却始终没有达到这个峰值。

当微晶纤维素和爆破稻草按一定比例混合时(微晶纤维素和爆破稻草混合使用的总量限制在单独使用微晶纤维素和爆破稻草最佳量的一半,即 $(13.4+8)/2 \approx 10$ g/L)。从图4中可以看到,微晶纤维素所含比例越高,纤维素酶的峰值就越低,爆破稻草含量最高的一组酶产量到了第4天开始占明显优势。比较图2、图3、图4,本实验采用单一的爆破稻草作为诱导碳源。

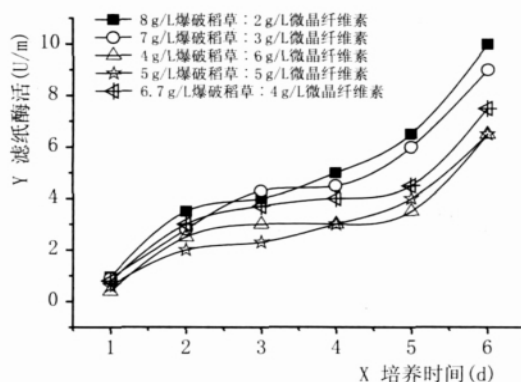


图4 爆破稻草和微晶纤维素按不同比例混合对纤维素酶产量的影响

2.3 摇瓶发酵培养基中有机氮源和无机氮源确定

本实验中为了精确知道有机氮源和其他几种主要营养物质的比例关系,选择纯度比较高的蛋白胨作为有机氮源。无机氮源分别采用硫酸铵、硝酸铵、碳酸铵进行比较。

与2.2确定的培养基和发酵工艺条件相同,分别采用20 g/L的硫酸铵、硝酸铵、碳酸铵,13.4 g/L的爆破稻草进行发酵试验,结果见图5。

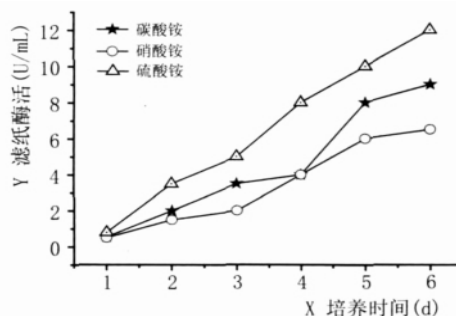


图5 3种无机氮源对纤维素酶产量的影响

从图5中可以看到,相同比例的无机氮源,硫酸铵作为无机氮源更有利于纤维素酶的产量。所以本实验选择硫酸铵作为无机氮源。

2.4 摇瓶发酵工艺条件的优化

利用2.3节确定的培养基组成,分别对发酵温度、初始发酵pH值、摇床转数进行比较,以滤纸酶活作为优化标准,试验方法见2.1,最终确定发酵温度为30℃、初始pH值5.0、转数150 r/min,该结果和大多数文献资料中^[9-10]关于绿色木霉液体发酵产纤维素酶的工艺条件是一致的。

2.5 滤纸酶活、CMC酶活及其β-葡萄糖苷酶活的关系

表3是大量实验中选取的有代表性的5组实验,相同工艺条件下,分别测定了5组实验中的3种酶活。

表3实验结果表明,滤纸酶活与CMC酶活、β-葡萄糖苷酶活成一定的线性关系,当滤纸酶活较高时,其他两

表3 滤纸酶活、 β -葡萄糖苷酶活、CMC酶活 (U/mL)

序号	滤纸酶活	β -葡萄糖苷酶活	CMC酶活
1	5.85	1.46	11.24
2	7.83	2.13	7.88
3	6.60	1.60	6.34
4	6.03	1.57	7.38
5	4.06	0.94	6.03

种酶活也较高,尤其是 β -葡萄糖苷酶的酶活对滤纸酶活的影响更加显著,因此采用滤纸酶活作为正交实验优化的评价指标。

2.6 正交试验确定的摇瓶发酵培养基的最佳发酵条件

根据笔者的大量实验和查阅相关资料^[11],在表2的基础上,确定发酵温度为30℃,发酵周期为6d,转速为150 r/min,种子液的接种量为50 mL/250 mL的三角烧瓶,发酵到48 h的种子液按5%的接种量接种到发酵培养基中,爆破稻草13.4 g/L,对蛋白胨、葡萄糖、硫酸铵和磷酸二氢钾进行4因素4水平的正交实验,结果见表4。

表4 4因素4水平正交实验及结果 (%)

项目	因素				滤纸酶活 (U/mL)
	A 蛋白胨	B 葡萄糖	C 硫酸铵	D 磷酸二氢钾	
1	11.0	7.0	13.5	12.0	15.68
2	11.0	6.5	13.0	11.5	12.69
3	11.0	6.0	12.5	11.0	12.65
4	11.0	5.5	12.0	10.5	14.08
5	10.0	7.0	13.0	11.0	10.25
6	10.0	6.5	13.5	10.5	10.59
7	10.0	6.0	12.0	12.0	11.11
8	10.0	5.5	12.5	11.5	7.94
9	9.0	7.0	12.5	10.5	10.97
10	9.0	6.5	12.0	11.0	16.47
11	9.0	6.0	13.5	11.5	10.88
12	9.0	5.5	13.0	12.0	14.54
13	8.0	7.0	12.0	11.5	10.17
14	8.0	6.5	12.5	1.20	9.25
15	8.0	6.0	13.0	10.5	17.31
16	8.0	5.5	13.5	11.0	11.68
均值1	13.775	11.768	12.207	12.645	
均值2	9.973	12.250	13.697	10.420	
均值3	13.215	12.988	10.203	12.762	
均值4	12.103	12.060	12.957	13.238	
极差分析	3.802	1.220	3.494	2.818	

从表4可以看出,最优的组合是 $A_1B_3C_2D_4$,4种主要

的营养物质的比例为蛋白胨1.1%,葡萄糖0.6%,硫酸铵1.3%,磷酸二氢钾1.05%。4种营养物质对滤纸酶活的影响大小顺序为:蛋白胨>硫酸铵>磷酸二氢钾>葡萄糖,通过实验验证表明, $A_1B_3C_2D_4$ 这个组合的滤纸酶活是19.22 U/mL,证明正交试验的结果是正确的。

3 结论

以滤纸酶活为优化指标,对绿色木霉液体发酵产纤维素酶进行了培养基优化。结果表明,有机氮源选择蛋白胨,无机氮源选择硫酸铵,碳源选择葡萄糖,诱导碳源选择爆破稻草,蛋白胨和硫酸铵分别为11 g/L和13 g/L,葡萄糖为6 g/L,磷酸二氢钾为10.5 g/L,在此条件下纤维素酶的滤纸酶活为19.22 U/mL。

参考文献:

- [1] 汤金婷,董玲玲,李志军,等.木质纤维素酶解糖化发酵研究[J].酿酒科技,2009,(3):125-129.
- [2] 程驭宁,梁如玉.绿色木霉HB产纤维素酶的条件研究[J].西南农业大学学报,2000,22(6):539-541.
- [3] 张继泉,王瑞明.绿色木霉生产纤维素酶的进展[J].山东食品发酵,2001,(4):12-15.
- [4] QB 2583—2005,纤维素酶制剂[S].
- [5] 张瑞萍,等.纤维素酶的滤纸酶活和CMC酶活的测定[J].印染助剂,2002,19:51-52.
- [6] 张玲,姚卫荣. β -葡萄糖苷酶的液态发酵生产[D].无锡:江南大学,2007.
- [7] 肖克,刘克武.绿色木霉的筛选与产纤维素酶发酵条件优化及部分酶学性质研究[D].成都:四川大学,1994.
- [8] 苏香萍,龚大春,曾晶等.纤维素酶产生菌黑曲霉的选育及其产酶条件的研究[J].酿酒科技,2009,(4):25-29.
- [9] Zhiyou Wen*, Wei Liao, Shulin Chen. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure[J]. Bioresource Technology, 2005,96:491-499.
- [10] Isabel Membrillo a, Carmen Sa'nchez b, Marcos Meneses d, Ernesto Favela c, Octavio Loerac. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains[J]. Bioresource Technology, 2008, 99:7842-7847.
- [11] 杨盛,侯红萍.纤维素酶的研究进展及应用前景[J].中国调味品,2008,(11):82-84.

洋河蓝色经典将参展世博会

本刊讯 在即将举办的2010年上海世博会上,洋河蓝色经典入选上海世博会参展项目。江苏馆展示内容将包括物联天下、江苏经济和品味生活三方面,品味生活将有洋河蓝色经典的实物展品、产品工艺和宣传视频及图文等。洋河蓝色经典从2003年面市以来,以独特的“绵柔”风格倍受广大消费者追捧,演绎着“世界上最宽广的是海,比海更高远的是天,比天空更博大的是男人的情怀”这一富有哲理的品牌文化,进一步丰富了洋河的蓝色文化。“蓝色风暴”势如破竹,引领着中国白酒创新的方向。(小小)