

里氏木霉 Rut C-30 液态发酵法生产纤维素酶

余晓斌

具润谟

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

(韩国 仁荷大学生物工学科, 402- 751)

摘要 探讨了增强里氏木霉 Rut C-30 产纤维素酶的方法, 添加葡糖糖于培养基中, 可促进菌体生长, 但不能提高产酶; 采用 Avicel 与麸皮复合碳源, 以及使用 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲系统控制发酵液 pH, 在摇瓶发酵条件下, 可获得很高活力的纤维素酶, 培养 6 d, 酶活可达到 $\text{CM Case 1 } 667 \sim 2\ 084 \text{ nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$, $\text{FPA } 150 \sim 200 \text{ nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$. 采用 2.5 L 发酵罐培养, 通过控制 pH 和溶氧, 纤维素酶活力为 $\text{CM Case 2 } 223.8 \text{ nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$, $\text{FPA } 194.5 \text{ nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$.

关键词 里氏木霉; 羧甲基纤维素酶活; 滤纸糖酶活; β -葡萄糖苷酶

中图分类号 TQ 925. 9

0 前 言

纤维素酶具有广泛的应用价值, 其最大的应用领域是把纤维素类物质酶法水解成葡萄糖。近年来纤维素酶已应用于众多的工业领域, 如食品、饲料、医药、纺织、洗涤剂和造纸工业^[1]等。

国外对纤维素酶有近 40 多年的广泛研究, 纤维素酶产生菌有木霉、青霉、曲霉、细菌、放线菌等, 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^[2]。我国对纤维素酶的研究和生产也进行了广泛的研究, 但大多采用固体发酵方式^[3, 4], 对液体发酵生产纤维素酶的研究报道尚不多见。固体发酵虽有许多优越之处, 但仍存在发酵水平不稳定, 不适于大规模生产等弊端, 因此对纤维素酶液体深层发酵的研究很有意义。高活力纤维素酶通常是在发酵罐中通过分批发酵或流加发酵获得的^[5, 6], 对如何在实验室摇瓶条件下获得高活力酶的研究, 国内外文献报道均不多见。笔者对摇瓶条件下如何获得高活力的纤维素酶活进行了研究, 并用 2.5 L 发酵罐进行了初步上罐试验。

1 材料与方 法

1.1 菌种

里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) Rut C-30.

韩国贸易、工业、能源部基金项目

收稿日期: 1997-09-02

第一作者: 余晓斌, 男, 1965 年 11 月生, 工学博士

Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://>

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 土豆 PDA 斜面, 30 培养 6 d 后使用。

1.2.2 发酵培养基 摇瓶发酵培养基: 蛋白胨 3 g/L, 硫酸 2 g/L, 酵母膏 0.5 g/L, KH_2PO_4 4 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, Tween-80 0.2 ml/L 为基础培养基, 不同碳源添加后, 121 灭菌 20 min 后使用。

2.5 L 发酵罐培养基: Avicel 30 g/L, 麸皮 10 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, Tween-80 0.2 ml/L, 消泡剂(Antifoam204 Sigma Co.) 适量。

1.3 发酵方法

摇瓶发酵, 采用生理盐水斜面孢子悬液, 按 10% 种量接种至 50 ml 培养液中(250 ml 三角瓶), 28 旋转摇床 150 r/min 培养 6 d。

2.5 L 罐(KF-2.5 L, Korea Fermentor Co.) 发酵, 将培养 48 h 的液体种子, 按 10% 种量接种于 1.4 L 培养基中, 温度 28 , 风量 1 02 ~ 1 1, 转速 250 ~ 400 r/min, 通过流加 2 mol/L NH_4OH 自动控制发酵液 pH 为 4.0; 通过控制风量和转速, 保持溶氧饱和度在 20%。

1.4 酶活测定^[7]

1.4.1 羧甲基纤维素酶活(CMCase)的测定 取适当稀释酶液 0.5 ml, 加入 0.5 ml 1% CMC 溶液(溶于 pH4.8 0.1 mol/L HAc-NaAc 缓冲液), 50 反应 30 min, 加入 3 ml DNS 试剂, 沸水浴 5 min, 冷却后加水稀释测糖。

1.4.2 滤纸酶活(Filter paper activity, FPA)测定 称取 50 mg Whatman No. 1 滤纸, 加 1 ml pH4.8 0.1 mol/L HAc-NaAc 缓冲液, 加入适当稀释酶液 0.5 ml, 50 反应 1 h, 加入 3 ml DNS 试剂测糖。

1.4.3 葡萄糖苷酶活测定 取适当稀释酶液 0.5 ml, 加入 0.5 ml 1% 水杨素溶液(溶于 pH4.8 0.1 mol/L HAc-NaAc 缓冲液), 50 反应 30 min, 加入 3 ml DNS 试剂测糖。

以上酶活均扣除发酵液中的还原糖后计算酶活力。

1.5 菌体干重 DCW(Dry Cell Weights)测定

参照文献方法[8]测定。取 3 ml 稀释 n 倍的发酵液, 加 3 ml 1 mol/L HClO_4 , 沸水浴中反应 20 min, 冷却至室温, 5 000 r/min 离心 10 min, 于 260 nm 波长下测上清液 OD 值, 定为 A 。同法测定不含菌体的离心发酵清液, OD 值为 B , 则每升发酵液菌体干重(DCW)为 $0.65 \times n(A - B)$ (g/L)。

2 结果与讨论

2.1 碳源及各种碳源与麸皮复合对产酶的影响

对霉菌而言, 纤维素酶是诱导酶, 碳源的不同对纤维素酶的合成有显著的影响, 因此试验了一系列碳源及与麸皮复合对产酶的影响, 结果见表 1。由表 1 可知 Avicel 与麸皮复合碳源产酶最高, 而且麸皮加入所试碳源中均可促进产酶。因此在以下的试验中, 选用 Avicel 与麸皮作为碳源。

麸皮广泛应用于发酵工业中, 含淀粉、纤维素、半纤维素 有机氮及生长因子, 麸皮促进产酶的原因, 可能是其所含的纤维素和半纤维素对酶的合成具有诱导作用, 其含有的丰富

营养物质可促进菌体的生长。

表 1 不同碳源对里氏木霉 Rut C-30 产酶的影响

碳源	浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	CMCase/ $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$	FPA/ $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$	pH 终值
Avicel	10	972.0	85.85	3.05
Avicel+ 麸皮	10+ 10	1327.3	93.52	2.99
Solka Flocc	10	1063.2	76.68	2.95
Solka Flocc+ 麸皮	10+ 10	1221.4	84.68	2.87
纸浆	10	889.8	68.35	5.90
纸浆+ 麸皮	10+ 10	1154.9	82.68	5.22
乳糖	10	269.2	19.34	4.57
乳糖+ 麸皮	10+ 10	5984.5	78.85	3.03
淀粉	10	78.18	3.67	4.88
淀粉+ 麸皮	10+ 10	554.9	43.01	3.22
CMC	10	71.51	4.17	6.70
CMC+ 麸皮	10+ 10	346.4	36.34	6.52
麸皮	10	378.1	33.01	6.45
麸皮	20	664.6	48.01	6.34
纤维素粉	10	1215.1	75.68	5.24
葡萄糖	10	330.9	15.33	3.46

2.2 摇瓶发酵过程中 pH 的控制

要获得纤维素酶的高产, 发酵培养基应含有较高的基质浓度和营养, 以供菌体的充足生长和酶的大量合成, 但在以纯纤维素如 Avicel, Solka Flocc 等为碳源的情况下, 纤维素酶的合成过程中伴随着产酸, 产酸被认为是纤维素酶合成过程中必需的, 并可能对纤维素酶的合成具有诱导作用^[9], 在大量的摇瓶试验中我们曾试图通过增加基质 Avicel 浓度来提高产酶量, 但发现 10 g/L Avicel 产酶最好, 产酶量随 Avicel 浓度的增加而下降, 其原因在高浓度碳源条件下, 由于碳源代谢菌体大量产酸, 导致培养液 pH 急剧下降, 当 Avicel 浓度提高到 20 g/L 时, 发酵液 pH 就已低于 3.0。当发酵液 pH < 3.0, 将导致酶的失活和菌体生长的停滞^[5, 10], 因此 pH 的控制被认为是发酵产生纤维素酶成败的关键因素之一。表 2 表明, 当以 20 g/L Avicel+ 10 g/L 麸皮为碳源时, 发酵终了 pH 值(2.69)很低, 因此酶活也很低。在摇瓶发酵试验过程中, 我们曾试验了多种 pH 控制方法中, 发现 K_2HPO_4 (3 g/L)- KH_2PO_4 (4 g/L) 缓冲系统具有较好的效果, 而且操作简单方便, 当 Avicel 浓度增至 20 g/L 仍可有效控制 pH, 由表 2 可见, 当培养基中采用 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲系统后, pH 得到有效控制, 酶活显著提高。

表 2 不同培养基产酶比较

培养基	20 g/L Avicel+ 10 g/L 麸皮	10 g/L Avicel+ 10 g/L 麸皮	10 g/L Avicel+ 10 g/L 麸皮 + 3 g/L K_2HPO_4 -4 g/L KH_2PO_4
CMCase / $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$	134.2	372.6	628.5
pH 终值	2.69	3.01	5.63

30 培养 4.5 d

2.3 添加葡萄糖对产酶的影响

由表 1 可知, 当以葡萄糖为唯一碳源时, 该菌仍可产生可观数量的纤维素酶活, 表明该菌具有一定的抗分解代谢阻遏的能力, 葡萄糖易被菌种利用, 因此添加一定数量的葡萄糖于培养基中, 促进菌体的生长, 有可能提高产酶量, 同时以不加葡萄糖的培养基为对照。由于碳

源浓度较高, 所有培养基中均加入 3 g/L K_2HPO_4 , 以防止 pH 偏低。

由图 1 可见, 菌体量(DCW)随葡萄糖浓度的增加而增加, 添加葡萄糖的培养基在培养初期其酶活略高于对照, 表明葡萄糖具有一定的缩短产酶延滞期作用, 但发酵终了酶活与对照无显著差异, 其原因可能是该菌种未能完全解除分解代谢阻遏, 葡萄糖对产酶仍存在一定程度的抑制, 因此添加葡萄糖虽可增加菌体量和缩短产酶延滞期, 但不能提高最终产酶量。

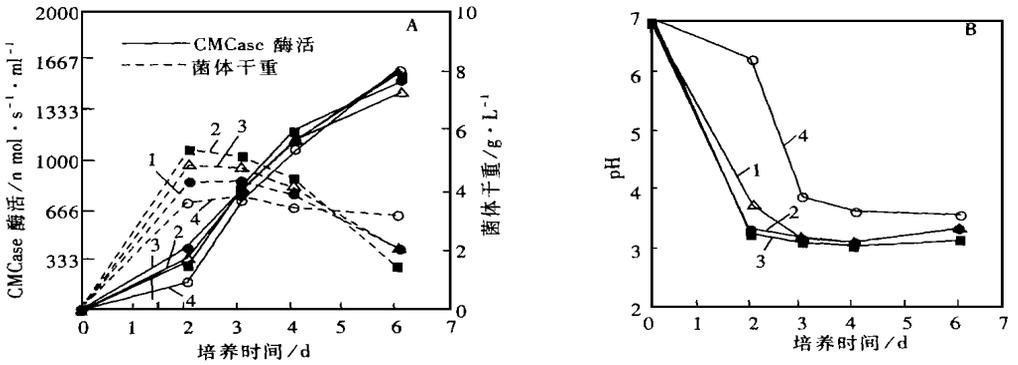


图 1 葡萄糖的浓度对产酶的影响

1—10 g/L Avicel+ 10 g/L 麸皮+ 2 g/L 葡萄糖 2—10 g/L Avicel+ 10 g/L 麸皮+ 4 g/L 葡萄糖
3—10 g/L Avicel+ 10 g/L 麸皮+ 6 g/L 葡萄糖 4—10 g/L Avicel+ 10 g/L 麸皮(对照)

2.4 Avicel 与麸皮的配比对产酶的影响

为了探明 Avicel 与麸皮的最佳配比, 试验了不同配比对产酶的影响。见表 3。

当使用 10 g/L Avicel 时, 酶活随麸皮浓度的增加而增加; 当使用 20 g/L Avicel 时, 加入 30 g/L 麸皮产酶较好。因此对摇瓶培养而言, 10 g/L Avicel 与 50 g/L 麸皮或 20 g/L Avicel 与 30 g/L 麸皮是较佳配比。

2.5 2.5 L 罐发酵

见图 2。

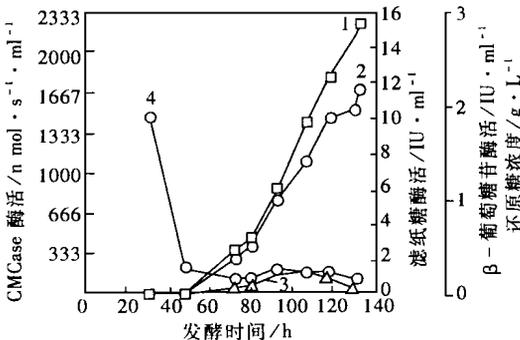


图 2 2.5 L 全自动发酵罐产酶过程曲线

1—CMCase 2—FPA 3— β -葡萄糖苷酶 4—还原糖

由于采用发酵罐培养, pH 易于控制, 因此可加大 Avicel 浓度, 提高至 30 g/L, 通过流加 2 mol/L LNH_4OH 控制发酵液 pH 值 4.0 左右, 兼补充氮源。由图 1 可见, 发酵 2 d 后, 酶活迅速增长, 培养至 130.5 h 后, $CMCase$ 2 223.78 $nmol \cdot s^{-1} \cdot ml^{-1}$, FPA 194.54 $nmol \cdot s^{-1} \cdot ml^{-1}$, 但整个发酵过程中 β -葡萄糖苷酶活力一直很低。

表 3 Avicel 与麸皮的不同比对产酶的影响

Avicel 与麸皮 浓度配比	CMCase/ $nmol \cdot s^{-1} \cdot ml^{-1}$	FPA/ $nmol \cdot s^{-1} \cdot ml^{-1}$	pH 终值
10/10	1317.9	103.5	3.06
10/20	1600.0	124.4	2.98
10/30	1680.8	137.5	2.97
10/40	1872.5	153.9	2.99
10/50	1925.4	214.2	3.22
10/60	1886.2	197.8	3.26
20/10*	1589.0	131.4	3.76
20/20*	2006.4	155.5	4.08
20/30*	2096.8	173.4	4.48
20/40*	2012.7	164.7	4.91

* 因培养基中使用高浓度 Avicel, 添加 3 g/L K_2HPO_4 于培养基中, 防止 pH 偏低。

3 结 语

通过优化摇瓶发酵培养基成分和 pH 控制的策略,可获得高活力纤维素酶,产酶菌种的性能得到了客观地表达,这对产酶菌的育种和筛选具有十分重要的意义。上罐发酵采用高浓度基质流加发酵,产酶量可得到进一步提高。

参 考 文 献

- 1 胡学智. 酶制剂生产技术. 北京: 化学工业出版社, 1994
- 2 Ingrid P, Folke T, Barbel H. Fungal cellulolytic enzyme production: A Review. Proc Biochem, 1991, 26: 65 ~ 74
- 3 张树政, 王修恒. 工业微生物成就. 北京: 科学出版社, 1988
- 4 刘淑华, 鲁新洁, 张发群. 固态纤维素酶曲的制备. 微生物学通报, 1992, 19(3): 151 ~ 153
- 5 Tangnu S Kishen, Harvey W Blanch, Charles R Wilke. Enhanced production of cellulase, hemicellulase, and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* (Rut C-30). Biotechnol and Bioeng. 1981, 23: 1837 ~ 1840
- 6 Watson T G, Nelligan I, Lessing L. Cellulase production by *Trichoderma reesei* (Rut C-30) in fed-batch culture. Biotechnol. Lett, 1984, 6(10): 667 ~ 672
- 7 Willis A Wood, Scott T Kellogg. Methods in Enzymology. (Volume 160, Biomass Part A), Cellulose and Hemicellulose. Academic Press, Inc
- 8 Morikawa Y, Kawamori M, Shinsha Y, et al. Improvement of cellulase production in *Trichoderma reesei*. Agric Biol Chem 1985, 49(6): 1869 ~ 1871
- 9 Mandels M, Andreotti R E. Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. Proc Biochem, 1978, 13: 6 ~ 13
- 10 Sternberg D, Dorval S. Cellulase production and ammonium metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. Biotechnol and Bioeng, 1979, 21: 181 ~ 191

Cellulase Production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 in Submerged Fermentation

Yu Xiaobin

((School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Koo Yoonmo

(Dept. of Biological Engineering, Inha University, Incheon, Korea, 402- 751)

Abstract This paper discussed enhancement in cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. It was found that glucose can promote cell growth, but it didn't increase cellulase production. A combination of Avicel and wheat bran was used as carbon source. The $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ buffer system was used for pH control, resulting in very high enzyme production in shake flask culture, Maximum CMCase 1667 ~ 2084 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$, FPA 150 ~ 200 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ were achieved within 6 days' culture. When it was grown in 2.5 L fermentor, where pH and DO levels were controlled, the enzyme activity were 2223.8 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ of CMCase activities and 194.5 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ of FP activities respectively.

Key words *trichoderma reesei*; CMCase; FPA; β -Glucosidase