

文章编号:1009-038X(2003)02-0030-04

## 碳源对绿色木霉 ZC 产中性纤维素酶的影响

郑亚平, 余晓斌

(江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

**摘要:** 筛选得到一株高产中性纤维素酶的绿色木霉 ZC, 对其培养基中的碳源进行了优化, 探讨了碳源的种类、混合碳源以及碳源与麸皮的比例对其产酶的影响, 确定了以 4 g/dL 玉米秸秆粉、1 g/dL 麸皮为主的发酵培养基, 此培养基中纤维素酶滤液酶活可达 321.12 U/mL.

**关键词:** 绿色木霉; 中性纤维素酶; 液态发酵

**中图分类号:** Q 556.2

**文献标识码:** A

### The Effect of Carbon Source for Neutral Cellulase Produced by *Trichoderma viride*

ZHENG Ya-ping, YU Xiao-bin

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** A strain *Trichoderma viride* ZC producing extracellular neutral cellulase was screened. The effect of various carbon source, mixed carbon source, and ratio of corn fibre to wheat bran on enzyme activity in shaking flasks was investigated. Fermentation culture medium with 4 g/dL corn fibre and 1 g/dL wheat bran was selected. Enzyme activity can reach 321.12 U/mL in the culture medium.

**Key words:** *Trichoderma viride*; neutral cellulase; submerged fermentation

纤维素酶是指能水解纤维素  $\beta$ -1,4 葡萄糖苷键,使纤维素变成纤维二糖和葡萄糖的一组酶的总称,纤维素酶是由葡聚糖内切酶(Cx 酶)、葡聚糖外切酶(C<sub>1</sub> 酶)、 $\beta$ -葡萄糖苷酶 3 个主要成分组成的诱导型复合酶系.按最适作用 pH 值不同,纤维素酶可分为酸性纤维素酶(最适 pH 为 4.8 左右,由绿色木霉、里氏木霉、康氏木霉、黑曲霉、青霉等产生)、中性纤维素酶(最适 pH 为 6~8,由长梗木霉、腐殖菌、芽孢杆菌等产生)、碱性纤维素酶(最适 pH 8~11,由嗜碱芽孢杆菌、腐殖菌等产生).不同来源的纤维素酶其结构和功能相差很大,来源于真菌的纤维素

酶,酶系较全,活性强<sup>[1-2]</sup>.

中性纤维素酶在纺织、食品、饲料和制药等行业均具有广泛的应用前景,尤其是在纺织领域应用市场最大.酸性纤维素酶在纺织品整理方面,已得到成功而又广泛的应用,但中性纤维素酶与酸性纤维素酶相比,其处理效果独特,具有如下优点:(1)高反差外观:中性纤维素酶能让织物具有反差大和背着色低的外观,蓝、白色的对比非常强,简化了或省略了清洁工序.中性纤维素酶不会使处理后的服装产生严重的背面沾污,具有抗返染,次品率低,产品质量均匀、手感好等特点.(2)适应 pH 值范围广:

收稿日期:2002-09-20; 修回日期:2002-11-08.

作者简介:郑亚平(1978-),女,山东郓城人,发酵工程硕士研究生.

中性纤维素酶能在较广的 pH 值范围内使用,这对工艺的灵活性非常重要.操作人员只需对 pH 值进行少量控制工作便可获得稳定的磨蚀效果.(3)适应温度范围广:可在中性纤维素酶适用的温度范围(55~60℃)内使用这种酶,也可以在较低的温度下使用它,以降低能耗.(4)较强的线性剂量反应:与传统酸性纤维素酶相比,只需使用较少剂量的这种酶便能迅速获得高水平的磨毛效果.使用较高剂量时,这种酶的作用与磨毛程度成正比.(5)稳定性好:中性纤维素酶在 37℃ 下保存 3 个月仍能保持良好的活性.

纤维素酶主要是受纤维性碳源诱导而生产的,所以碳源的种类、结晶度以及与其他原料的配比都对产酶影响显著,故作者在此研究了碳源对中性纤维素酶活的影响.

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株

绿色木霉 ZC(*Trichoderma viride* ZC),由作者所在实验室筛选保藏.

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基(均为质量浓度 g/dL) Avicel 2, 蛋白胨 0.3,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1, 琼脂 2.5, 自然 pH.

1.2.2 种子培养基(均为质量浓度 g/dL) Avicel 1, 麸皮 1, 酵母膏 0.1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2,  $\text{CaCl}_2$  0.03,  $\text{MgSO}_4$  0.03, 自然 pH.

1.2.3 发酵培养基(均为质量浓度 g/dL) 麸皮 1, 蛋白胨 0.3,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2, 尿素 0.05, 葡萄糖 0.25,  $\text{MgSO}_4$  0.03, 此为 基础培养基, 添加不同碳源后使用.

### 1.3 培养方法

按体积分数 5% 的接种量接入 250 mL 三角瓶, 装液量为 50 mL, 摇床转速 150 r/min, 29℃ 培养 72 h.

### 1.4 原料处理方法

玉米秸秆、豆皮、豆秆、玉米芯、小麦秆烘干粉碎至 20 目.

### 1.5 分析测定方法

1.5.1 粗酶液的制备 将培养液直接于 3 000 r/min 离心 10 min, 取其上清液供测定.

1.5.2 滤纸酶活(FPase)测定方法 试管中放入卷成小卷的 Whatman No. 1 滤纸(0.5 cm×5 cm)在 pH 6.0, 50℃ 条件下酶解 60 min. 用 DNS 法测定还原糖(以葡萄糖作为标准).

1.5.3 酶活定义 滤纸酶活的定义为,每分钟水

解生成 1 μg 葡萄糖时所用该酶量为 1 个酶活单位 U(1 μg/(min·mL)).

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养基碳源的优化

纤维素酶是诱导酶,在微生物发酵过程中,做碳源的物质同时又是诱导物的主要来源.为确定不同碳源对产酶的影响,选用不同的纤维性材料和一些可溶性糖类作为碳源,质量浓度见表 1, 2.

表 1 纤维性碳源对酶活的影响

Tab.1 Effect of fiber carbon source

碳源	质量浓度/(g/dL)	FPase/(U/mL)
Avicel	2.0	398.6
Avic/麸皮	1.0/1.0	541.6
CMC	2.0	200.2
CMC/麸皮	1.0/1.0	205.4
S.F	2.0	340.6
S.F/麸皮	1.0/1.0	468.0
果胶	2.0	139.0
果胶/麸皮	1.0/1.0	211.0
纸浆	2.0	190.0
纸浆/麸皮	1.0/1.0	328.6

注:Avicel:微晶纤维素,南京购得;CMC:羧甲基纤维素,和光纯药工业株式会社提供;S.F:棉纤维,韩国仁荷大学提供.

表 2 可溶性糖类对酶活的影响

Tab.2 Effect of soluble sugars

碳源质量浓度/(g/dL)	FPA/(U/mL)	
葡萄糖	2	93.60
果糖	2	111.60
木糖	2	120.24
半乳糖	2	26.26
山梨糖	2	229.60
蔗糖	2	104.76
乳糖	2	17.28

由表 1, 2 结果可知,不同种类的碳源培养基合成纤维素酶的能力不同.表 1 显示纤维素结晶度高越容易被利用.S.F 和 Avicel 的纤维素结晶度非常高,其酶活也最高,分别为 340.6 U/mL 和 398.6 U/mL.麸皮含有淀粉、纤维素、半纤维素、有机氮及

生长因子等营养物质,当麸皮加入各种所试碳源中均可不同程度地促进产酶,Avicel与麸皮作为复合碳源时酶活有大幅度的提高,达到了541.6 U/mL.

由表2结果可知,可溶性糖类作为碳源时,山梨糖<sup>[4,5]</sup>产酶的效果优于其它的可溶性糖类;其次是木糖和果糖;半乳糖、葡萄糖和蔗糖能促进菌体生长,但对纤维素酶的产生具有较强的抑制作用;尤其当蔗糖作为碳源时,其残糖很高;但是对于乳糖<sup>[6]</sup>来说,菌株ZC则很少利用,菌丝体生长很差.

由表1,2比较得:以可溶性糖类作为碳源的酶活明显低于纤维性碳源的酶活.可溶性糖类对纤维素酶的合成还是存在一定的抑制作用.

## 2.2 工业化碳源的优化

为了降低生产成本,使其有利于工业化生产,进一步对工业化碳源进行了优化.这些原料来源丰富,价格便宜,都是含纤维素较高的谷物废弃物.

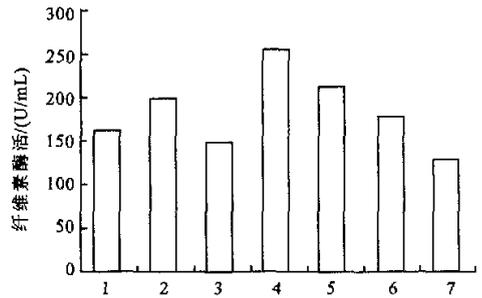
由表3的结果可知,豆皮粉是较好的工业化碳源,用作碳源时其酶活可达397.08U/mL,而玉米芯不利于产酶,玉米秸秆粉、豆秆粉、小麦秆粉分别作碳源时,产酶能力相当.这是由于菌种对不同原料的可及性有差别.菌株ZC对于豆皮粉可及性好,易利用豆皮粉,因而产酶高,并且可以缩短产酶周期.与表1的数据相比,此数值略低于结晶度高的纤维性碳源的酶活.但是选用这些原料,成本大大降低.后续试验均选用玉米秸秆粉,因为豆皮处理工序繁琐,并且两者单独作为碳源时酶活差别不大.

表3 不同工业化碳源对木霉ZC产酶的影响  
Tab.3 Effect of various industrial carbon source

碳源	FPase/(U/mL)
玉米秸秆粉	321.12
豆秆粉	296.28
豆皮粉	397.08
玉米芯粉	203.12
小麦秆粉	316.68

## 2.3 混合碳源对产酶的影响

纤维素的含量、纤维素与其它成分结合的方式等依原料不同而有差别,所以它们对纤维素酶的诱导行为多少就会有差别.把几种不同的原料混合起来使用就会取长补短,相互作用,共同诱导纤维素酶.如图1所示,2 g/dL玉米秸秆粉分别和2 g/dL豆皮粉、2 g/dL豆秆粉共同作碳源时其纤维素酶活都要高于它们单独作碳源时的酶活.初步研究认为,两种碳源混合时,产生的这种促进作用并不是简单的“加和作用”,而是一种“复合诱导作用”.



1. 4 g/dL 玉米秸秆粉; 2. 4 g/dL 豆皮; 3. 4 g/dL 豆秆;  
4. 2 g/dL 玉米秸秆粉+2 g/dL 豆皮; 5. 2 g/dL 玉米秸秆粉+  
2 g/dL 豆秆; 6. 3 g/dL 玉米秸秆粉+1 g/dL 豆秆;  
7. 1 g/dL 玉米秸秆粉+3 g/dL 豆秆.

图1 混合碳源产酶

Fig.1 Effect of mixed carbon source

## 2.4 玉米秸秆粉与麸皮比值的优化

在纤维素酶的生产中,影响因素最显著的是诱导物与麸皮的比值.因为麸皮中含有很多种有用物质,其中纤维素和半纤维素能诱导纤维素酶的产生;有机氮及生长因子能促进菌体的生长.并且麸皮是一种广泛而易得的原料,如果培养基中的麸皮的质量浓度增大了,生产成本又会进一步降低.本实验是分两步完成的,先以玉米秸秆粉的质量浓度不变,改变麸皮的质量浓度,接着以麸皮的质量浓度不变,改变玉米秸秆粉的质量浓度.

表4 玉米秸秆粉与麸皮比值对酶活的影响

Tab.4 Effect of ratio of corn fibre to wheat bran

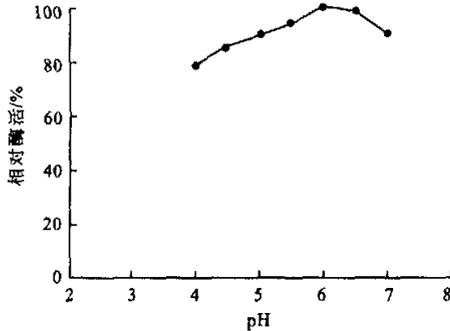
$\rho(\text{秸秆粉}) : \rho(\text{麸皮})$	FPase/(U/mL)
4.0/1.0	321.12
4.0/1.5	315.00
4.0/2.0	245.88
2.0/1.0	278.64
6.0/1.0	178.92

由表4结果可知:玉米秸秆粉的质量浓度以4 g/dL为宜.质量浓度过大,发酵液浓稠,而木霉的菌丝较短,难以快速的延伸,使得玉米秸秆粉不能完全被利用.麸皮的添加量以1 g/dL为宜.随着麸皮的质量浓度增大,纤维素酶活呈下降趋势.玉米秸秆粉质量浓度与麸皮质量浓度的最佳配比为4,其滤纸酶活可达321.12 U/mL.这与很多报道结果类似,可见麸皮能促进纤维素酶的产生.

## 2.5 纤维素酶反应的最适pH值

由图2,3可知,这种中性纤维素酶反应的最适pH值为6.0,在pH 6~8时均可以表现出较强的酶活力,而酸性纤维素酶反应的最适pH值为4.8左

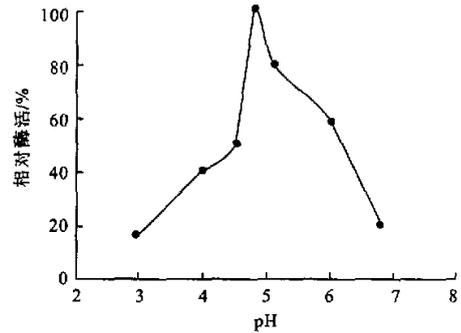
右,因而可以判定此酶为中性纤维素酶。酸性纤维素酶与中性纤维素酶相比最大的缺点就在于酶反应适应 pH 值范围窄,在 pH 5 时,相对酶活已降到 80%;在 pH 6 时,相对酶活已不足 60%;在 pH 7 时酶活基本丧失。而中性纤维素酶能在较广的 pH 值范围内使用(最适 pH 值 6~8),这对工艺的灵活性非常重要。在生产过程当中,操作人员只需对 pH 值进行少量控制,就可以获得满意的效果。这将有利于实现中性纤维素酶的产业化生产。



注:以 pH 5.5 时的酶活性为 100

图 2 中性纤维素酶作用的最适 pH 值

Fig. 2 The optimal pH of neutral cellulase



注:以 pH 5 时的酶活性为 100

图 3 酸性纤维素酶作用的最适 pH

Fig. 3 The optimal pH of acid cellulase

### 3 结 论

本试验主要研究了碳源对纤维素酶生产的影响,发现不同碳源对其酶活的影响相差很大。可溶性糖类对 ZC 有一定的阻遏的作用,纤维性碳源中结晶度高的优于工业化碳源粗纤维的。考虑到生产成本,在摇瓶发酵时采用 4 g/dL 玉米秸秆粉、1 g/dL 麸皮为主的发酵培养基。

### 参考文献:

- [1] 吴长青,何国庆,董爱茶. 纤维素酶的液态深层发酵研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(8): 60-64.
- [2] 卜登攀. 饲用纤维素酶及产酶微生物[J]. 宁夏农学院学报, 2000, 21(4): 72-78.
- [3] 陈士成,曲音波,张岩,等. 产中性纤维素酶芽孢杆菌 Y106 产酶条件优化[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(5): 457-461.
- [4] Masahiro N, Hirofumi O, Yasushi M, et al. L-Sorbose induces gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* [J]. *Curr Genet*, 2001, 38: 329-334.
- [5] 王冬,曲音波,高培基. L-山梨糖提高木霉纤维素酶合成速率机制的研究[J]. 真菌学报, 1995, 14(2): 143-147.
- [6] Morikawa Y, Obashi T, Mantani O, et al. Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 44: 106-111.

(责任编辑:杨 萌)