

# 青霉 NXP25 纤维素酶的产生及性质

郝志军 李忠兴

(北京宁馨儿生物科技开发有限公司 北京 101300)

**摘要:** 青霉 (*Penicillium* sp.) NXP25 在 5% 玉米穗轴粉, 3% 麦麸, 0.35% 氮源 10 号和 0.3% 氯化钙组成的液体培养基 (起始 pH 5.0) 中, 10% 接种量, 29℃, 280r/min 振荡培养 72h。在 50℃ 温度下测定, 发酵液内切-1, 4- $\beta$ -葡聚糖酶, 外切-1, 4- $\beta$ -葡聚糖酶,  $\beta$ -葡萄糖苷酶和滤纸酶活力分别为 841u/mL, 13u/mL, 24u/mL 和 46u/mL。各类型酶最适作用条件分别为 pH 4.8 和 60℃、pH 5.0 和 50℃、pH 4.5 和 70℃、pH 5.0 和 55℃; 酶活力稳定 pH 范围分别为 pH 3.0~7.0、pH 4.0~6.0、pH 4.0~7.0 和 pH 4.0~6.0; 酶在 65℃ 处理 30min 后, 酶活力分别保留 24%、7%、89% 和 8%。

**关键词:** 青霉, 液体发酵, 纤维素酶,  $\beta$ -葡聚糖酶

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0064-03

## PRODUCTION OF CELLULASE BY *PENICILLIUM* SP. NXP25 AND ITS PROPERTIES

HAO Zhi-Jun LI Zhong-Xing

(Beijing Ningxiner Bio-science and technology development limited company, Beijing 101300)

**Abstract:** Cellulase was produced by growing *Penicillium* sp. NXP25 in liquid medium consisted of 5% corn cob powder, 3% wheat bran, 0.35% nitrogen source No 10 and 0.3% calcium chloride. The optimum culture conditions were initial pH 5.0, 10% mycelial inoculum, temperature 29℃, shaking speed 280r/min and cultivation time 72h. When determining enzyme activity at 50℃, endo-1, 4- $\beta$ -glucanase activity, exo-1, 4- $\beta$ -glucanase activity,  $\beta$ -glucosidase activity and filter paper enzyme activity of the supernatant of the culture were 841u/mL, 13u/mL, 24u/mL and 46u/mL, respectively. The optimum pH and temperature for the action of the above enzymes were pH 4.8 and 60℃, pH 5.0 and 50℃, pH 4.5 and 70℃, pH 5.0 and 55℃, respectively. Stable pH range of the above enzymes were 3.0~7.0, 4.0~6.0, 4.0~7.0 and 4.0~6.0, respectively. After incubating the enzyme complex at 65℃ for 30min, 24% of endo-1, 4- $\beta$ -glucanase activity, 7% of exo-1, 4- $\beta$ -glucanase activity, 89%

收稿日期: 2001-01-08, 修回日期: 2001-04-25

of  $\beta$ -glucosidase activity and 8% of filter paper enzyme activity were remained, respectively.

**Key words:** *Penicillium* sp. Liquid fermentation, Cellulase,  $\beta$ -glucanase

近几年以来, 纤维素酶的产生与应用研究进展很快。产酶菌多使用木霉属的一些种, 酶生产已实现工业化<sup>[1]</sup>。纤维素酶能作用于大麦中的  $\beta$  葡聚糖, 因此被用于麦芽汁分离和啤酒过滤与澄清处理<sup>[2]</sup>。饲料中含有  $\beta$  葡聚糖, 作为抗营养因子的  $\beta$  葡聚糖使饲料具有粘性, 不能很好的消化利用。纤维素酶可以将相关的  $\beta$  葡聚糖降解, 从而提高饲料利用率, 改善营养吸收。作者以青霉 (*Penicillium* sp.) NXP2 为出发菌株进行选育, 获得了高产酶突变株 NXP25。该菌株所产酶在饲料和啤酒酿造等方面的应用效果非常显著。本文报道突变株 NXP25 纤维素酶的产生及性质。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

青霉 (*Penicillium* sp.) NXP25, 系作者经选育而获得。

### 1.2 种子培养基与培养方法

**1.2.1 试管斜面种子:** 保藏菌株接种于麦芽汁琼脂培养基斜面上, 28℃ ~ 30℃ 培养 4d 后使用或放 8℃ 冰箱中保存。

**1.2.2 三角瓶种子:** 250mL 三角瓶装 40mL 由 0.4g 麦麸, 0.2g 葡萄糖和 0.08mL 氮源 10 号组成的液体培养基 (pH 5.0), 灭菌后接种斜面种子一环, 28℃ ~ 30℃, 280r/min 振荡培养 48h。

### 1.3 产酶培养基与培养方法

250mL 三角瓶装 30mL 由 1.5g 玉米穗轴粉, 0.9g 麦麸, 0.105mL 氮源 10 号和 0.09g 氯化钙组成的液体培养基 (起始 pH 5.0), 灭菌后接种菌丝体悬液 3mL, 如上述条件培养 72h。离心上清即为纤维素酶溶液。

### 1.4 酶活力测定

除了外切-1, 4- $\beta$  葡聚糖酶反应时间缩短为 1h 外, 其它见文献<sup>[1]</sup>。

采用 3, 5-二硝基水杨酸试剂比色法测定还原糖<sup>[3]</sup>。每小时水解底物生成相当于 1mg 葡萄糖的还原糖所需酶量定义为一个酶活力单位 (u)。

表 1 不同纤维质材料对产酶的影响

碳 源	酶活力 (u/mL)
稻草粉	27
玉米秸粉	39
汽爆玉米秸粉	15
玉米穗轴粉	46
糖醛渣	26
甘蔗渣	16
甜菜渣	11
酒精	33
对照	9

表 2 不同氮源对产酶的影响

碳 源 (%)	酶活力 (u/mL)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.3 35
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 30
NH <sub>4</sub> Cl	0.25 35
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.2 38
NaNO <sub>3</sub>	0.4 26
氮源 10 号	0.35 46
玉米浆	1.5 25
酵母膏	0.5 39
牛肉蛋白胨	1 35
尿 素	0.15 26
对 照	15

## 2 结果与讨论

## 2.1 产酶菌发酵条件

产酶水平以滤纸糖酶活力表示。

**2.1.1 碳源对产酶的影响：**以麦麸 (0.9g) 为基础碳源, 试验不同纤维质材料 (1.5g) 对产酶的影响。表 1 结果表明, 玉米穗轴粉效果最佳, 酶活力为公司此前生产用的汽爆玉米桔粉的 3.1 倍。酒糟作为碳源, 虽然产酶效果相对低于玉米穗轴粉和玉米桔粉, 但来源方便, 故生产上也可以考虑使用。

**2.1.2 氮源对产酶的影响：**比较了不同用量无机和有机氮源对产酶的影响。选每种氮源最适用的酶活力数据列于表 2。由表 2 结果可以看出, 所试 10 种氮源中, 氮源 10 号效果最佳, 酶活力 46u/mL。

**2.1.3 钙盐对产酶的影响：**试验了 3 种钙盐对产酶的影响。表 3 结果表明, 钙盐对酶的产生有显著的促进效果, 尤其是以硫酸铵为氮源的发酵条件下更为显著。

**2.1.4 pH 对产酶的影响：**将培养基 pH 调至不同值进行产酶的试验。结果表明, 产酶适宜起始 pH 为 4.0~5.5, 最适起始 pH5.0。

**2.1.5 培养温度对产酶的影响：**于不同温度条件下进行产酶的试验。结果表明, 产酶适宜温度为 27℃~32℃, 最适为 29℃。

**2.1.6 培养时间对产酶的影响：**于不同培养时间取样测定酶活力。结果表明, 29℃ 培养 72h 产酶量达到最高。

**2.1.7 发酵液中各种类型纤维素酶的活力：**测定结果表明, 发酵液中含 CMC-Na 酶

(内切酶) 活力 841u/mL, 脱脂棉酶 (外切酶) 活力 13u/mL, 水杨苷酶 ( $\beta$ -葡糖苷酶) 活力 24u/mL, 滤纸酶活力 46u/mL。

## 2.2 酶的一般性质

**2.2.1 酶作用 pH：**在 50℃ 温度, 不同 pH 条件下测定酶活力。结果表明, 内切-1, 4- $\beta$ -葡聚糖酶, 外切-1, 4- $\beta$ -葡聚糖酶,  $\beta$ -葡糖苷酶和滤纸酶最适作用 pH 分别为 4.8、5.0、4.5 和 5.0。

**2.2.2 酶作用温度：**在最适作用 pH 于不同温度下测定酶活力。结果表明, 上述各种酶的最适作用温度分别为 60℃、50℃、70℃和 55℃。

**2.2.3 酶 pH 稳定性：**酶溶液于不同 pH 在 40℃ 放置 3h 后, 测定酶活力。结果表明, 上述各种酶稳定 pH 范围分别为 3.0~7.0、4.0~6.0、4.0~7.0 和 4.0~6.0。

**2.2.4 酶热稳定性：**pH5.0 酶溶液于不同温度放置 30min, 测定酶活力。结果表明, 上述 4 种酶分别于 55℃ 以下, 50℃ 以下, 60℃ 以下和 50℃ 以下稳定。酶在 65℃ 处理 30min 后, 4 种酶活力分别保留 24%、7%、89% 和 8%。

表 3 钙盐对产酶的影响

钙盐及用量 (%)	酶活力 (u/mL)	
	以 0.35% 氮源 10 号为氮源	以 0.3% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 为氮源
CaSO <sub>4</sub> 0.3	39	7
CaCl <sub>2</sub> 0.3	46	8
CaCO <sub>3</sub> 0.3	46	36
0.5	46	32
对照	37	7

## 参考文献

- [1] 李忠兴, 焦旭东, 郝志军. 微生物学通报, 1999, 26 (6): 403~405.
- [2] Cheremisinoff PN, Ferrante LM. Biotechnology-Current Progress vol. 1 Technomic publishing Co., Inc., Lancaster 1991. S., 183~184.
- [3] Gupta JK, Das NB, Gupta YP. Agricultural and Biological Chemistry, 1972, 36 (1): 1961~1967.