

# 里氏木霉纤维素酶产生条件的研究

陈春洪 邝哲师 陈 薇 赖来展

(广东省农业科学院生物技术研究所 广州 510640)

**摘要** 通过对培养基、水份含量、氮源、培养时间、培养基的起始 PH 以及培养温度的研究,测定 *Trichoderma reesei* GAB 纤维素酶的  $C_1$  酶和  $C_x$  酶的酶活,找到了一个最佳的条件,即:稻草粉:花生壳 = 4:1,物料:水份 = 2:3,以  $NH_4Cl$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 $NH_4H_2PO_4$  为氮源,起始 pH 为自然 pH(约 5.8),在 28℃ 下培养 84~96h,其酶活性为最高,达到  $C_1$  酶为 58.2 $\mu$ ,  $C_x$  酶为 1500 $\mu$ 。同时,也找到了减少生产成本的一条途径。

**关键词** 纤维素酶  $C_1$ 、 $C_x$ , 里氏木霉, 酶活

**分类号** TQ 920.1

纤维素酶的研究及应用越来越受到各国的重视。纤维素酶在解决果汁沉淀、产生植物原生质体、纤维的糖化以及作为饲料添加剂在畜牧业中的应用逐步开展起来,而世界各地的研究室把主要的精力放在木霉属(*Trichoderma*)上<sup>[1]</sup>,因为其产生的纤维素酶活性高、酶系比例协调。而对其产酶条件的研究,有助于降低成本,提高纤维素酶生产的经济效益。因此,论文通过对 *T.reesei* GAB 产酶的研究,找到产生纤维素酶的最佳条件。因为对纤维素酶的评价主要是看  $C_1$  酶,因而我们的工作也以  $C_1$  酶为主。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 稻草粉:秋季晒干后的稻草、粉碎、呈烟丝状。

1.1.2 花生壳粉:晒干后的花生壳,粉碎,过 20 目筛。

1.1.3 菌种:里氏木霉(*T.reesei* GAB),由本所引进后改造。

### 1.2 方法

1.2.1 酶活的测定,培养物培养至一定时间后,取湿料 3g,溶于 200ml 水中。取 0.5ml 酶溶液,加入含有 50mg 滤纸或 50mg 羧甲基纤维素钠(CMC)、pH 为 4.4 的缓冲液中,在 55℃ 下保温 1h 或 20min,加入二硝基水杨酸(DNS)显色液,沸

水中保温 10min,冷却至室温,在波长为 550nm 下测定 OD 值,与标准曲线对照,以每分钟生成葡萄糖的  $\mu$ mol 数为一个酶活单位,以 u 表示。

1.2.2 培养基的配制,称取 100g 物料(稻草粉:花生壳粉 = 4:1),加入 150ml 水,再加入 3g  $(NH_4)_2SO_4$ ,混匀,在 121℃、 $1 \times 10^5$ pa 下灭菌 30min。

1.2.3 培养方法:以 *T.reesei* 孢子悬液接种,接种后混合均匀,在 28℃ 下培养约 90h 后,测定其酶活。

1.2.4 各种条件的研究,培养方法与 1.2.3 相同,替换不同的条件,如不同的氮源、不同的水份含量、不同的起始 pH 值、不同的培养温度、不同的培养时间等。

## 2 结果与分析

### 2.1 稻草粉与花生壳粉的比例

试验结果见表 1。该结果表明:稻草粉与花生壳的比例增加,其  $C_1$  酶活也增加,当其比例为 4:1 时,其酶活达到最大,即 58.2u/ml。而且其生长状态良好,因此选用这个比例。

### 2.2 培养基中水分的含量

试验了六种不同水分含量培养基产酶效果

广东省科委科技攻关项目资助

1997-03-03 收稿

表1 培养基中稻草粉与花生壳粉不同比例的结果

稻草粉/花生壳粉 (W/W)	0:5	1:4	2:3	3:2	4:1	5:0
纤维素酶C <sub>1</sub> (μ)	18.2	18.8	17.2	32.7	58.2	57.5
纤维素酶Cx(μ)	474	1064	563	1275	1500	1500

的影响,即物料与水的比例(W/W)为1:3、1:2、2:3、1:1、3:2和2:1。结果表明,物料与水的比例在2:3时,产酶活性最高,C<sub>1</sub>酶活力单位为58.2,同时,可以看出,水分对产酶的影响不是很大,因此,在实际生产中可通过减少用水量来降低生产成本。

### 2.3 氮源对产酶的影响

在八种不同的氮源中,以NH<sub>4</sub>Cl、NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>为氮源,其酶活分别为58.1u/ml、57.9u和58.2u,说明该三个值基本上没有区别。而其它氮源的酶活相对较低。分析这个结果,C<sub>1</sub>酶活性高,其氮源均为(NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>态氮。因此,认为(NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>态氮比NO<sub>3</sub><sup>-</sup>态氮的产酶效果好,这与有关的报道<sup>[2~4]</sup>相吻合。同时,从该结果中还可以看出,无机氮优于有机氮。

### 2.4 培养过程对产酶的影响

试验了八种不同培养时间对产酶效果的影响,培养24h后开始收获,以后每隔12h收获一次,直到培养108h后收获完毕。从试验结果可以看出,培养过程对产酶效果有较大的影响,酶的产生有一个过程,前期是菌丝体的旺盛生长期,培养一个时间(84h后),菌丝体完成了对数生长期,开始平稳生长期,进入一个临界状态,此时,产酶活性达到最高,因此,适宜的培养时间是84~96h。

### 2.5 培养的起始pH值对产酶的影响

试验表明,起始pH对产酶有一定影响,在pH为4.5~5.0时,C<sub>1</sub>酶活较高;自然pH时(约为5.8),C<sub>1</sub>酶活最高,在pH为5.5~6.5之间,产酶有所下降;而pH为7.0时,产酶又有所提高。

### 2.6 培养温度对产酶的影响

结果表明,培养温度为28℃时产酶效果最好,低于或高于28℃,产酶量都明显下降。在高于32℃时,产酶量只有28℃时的三分之一。说明高温有利于菌丝体的旺盛生长,但会降低酶的分泌量,因此,在实际生产中,可考虑培养前期提高温度保证菌丝体的正常生长,在培养后期适当降温以促进酶的分泌。

### 2.7 酶的性质

2.7.1 pH对酶活的影响,不同pH反应,酶的最适pH为4.0~5.0。

2.7.2 作用温度的影响,不同温度下进行反应,最适温度为50~60℃。

2.7.3 酶的pH稳定性:酶于各pH的缓冲液中,55℃保温4h,测定剩余酶活力,酶在pH3.5~6.5之间稳定。

2.7.4 酶的热稳定性:酶于pH4.5的缓冲液中,在45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃下分别保温30min后,55℃以下稳定,60℃保温30min后,酶活力剩余20%。

## 参 考 文 献

- [1] 徐同. 真菌学报, 1996, 15(2): 143~148.
- [2] 李永泉, 赵小立, 贺筱容等. 真菌学报, 1996, 14(3): 226~233.
- [3] 宋桂经. 微生物学通报, 1997, 24(6): 364~367.
- [4] 崔福绵, 那安, 马建华等. 微生物学通报, 1995, 22(2): 72~76.

## THE STUDY ON THE FACTORS OF PRODUCING CELLULASE BY *TRICHODERMA REESEI* GAB

Chen Chunhong Kuang Zhesi Chen Wei Lai Laizhan

(Biotechnical Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640)

**Abstract** The factors including media, water contents, nitrogen sources, cultural time, original

pH and cultural temperatures were studied for producing cellulase by *Trichoderma reesei* GAB, The results showed that the best condition are: the ratio of material and water equals 2:3, the best nitrogen sources are  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , the original pH is natural pH, and the cultural time is 84~96 hours, the cultural temperature is at 28℃. The results showed that cultured at that condition the cellulase  $\text{C}_1$  is 58.2 $\mu$  and the cellulase Cx is 1500 $\mu$ .

**Key words** Cellulase  $\text{C}_1$ , Cx, *Trichoderma reesei* GAB, Enzyme activity