

木霉产纤维素酶酶解木屑的条件试验

中国科学院微生物研究所纤维素酶组

(北 京)

自 60 年代以来,随着微生物酶的研究和利用,科学工作者开展了一系列纤维素酶酶解纤维素的研究^[1-7],取得了一定的成绩。本文主要报道木霉产纤维素酶酶解木屑及扩大试验的情况。

材 料 和 方 法

一、设备

1. 旋转摇床: 180—200 转/分。
2. 圆筒式球磨机: 74 转/分,装木屑 100—200 克,钢球 12—25 公斤。
3. 振动磨: 900—1100 次/分,装木屑 50 公斤。
4. 30 升及 240 升标准式发酵罐,可变搅拌速度 180—400 转/分,罐温 29—31℃,用泡敌做消泡剂。

二、材料

(一) 菌种

康氏木霉 (*Trichoderma koningi*) 白色变异

株 AS 3.4001。

(二) 培养基

1. 斜面培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂。
2. 发酵培养基: KH_2PO_4 2 克, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.0 克,蛋白胨 2.0 克,尿素 0.1 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 克, CoCl_2 2 毫克, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 毫克, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6 毫克, ZnCl_2 1.7 毫升,木屑粉 15 克,自来水 1 升,用 50% 醋酸调 pH 5—6.0, 1 公斤/厘米²灭菌 30 分钟。

(三) 底物和碳源

水曲柳木屑为碳源,80℃ 烤干到含水份约 2%,经圆筒式球磨机粉碎,装木屑 100 克,每次粉碎 5 小时的木屑粉(其中约 70% 通过 400 目筛子)作为试验用的底物(除碳源试验用 11 种树的木屑粉)。

三、方法

(一) 11 种木屑的粉碎

1. 圆筒式球磨机粉碎: 每次装木屑 60 克—200 克,连续粉碎 1—8 小时。

2. 振动磨粉碎

(1) 间断粉碎: 装料后, 粉碎不同的时间, 取粉碎后的木粉, 进行酶解。以酶解得糖率计算粉碎效果。

(2) 连续粉碎: 在规定的粉碎时间内, 从进口连续加入一定量木屑, 并于出口时不断的出来等量的粉碎好的木屑粉。如上方法测酶解率。

(二) 种子培养

在斜面培养基上长好的菌种, 用接种环取一环(约 4×10^8 个孢子/环)接入 250 毫升三角瓶装发酵培养基 25 毫升, $30-31^\circ\text{C}$ 振荡培养 18—20 小时, 作为摇瓶培养的种子, 或作为发酵罐培养的一级种子, 移接入 500 毫升三角瓶装的 50 毫升发酵培养基中, 种量 50% (体积/体积), 振荡培养 65—70 小时, 作为 30 升发酵罐的种子, 接种量 10% (体积/体积), $29-31^\circ\text{C}$, 搅拌速度 280 转/分, 通气量 1:1 (体积/体积), 培养 20—24 小时, 作为 240 升发酵罐的种子。

(三) 液体培养

1. 摇瓶培养: 250 毫升三角瓶装培养基 30 毫升, 灭菌后, 接入种子 0.5 毫升, $30-31^\circ\text{C}$, 摇床培养 5—6 天。取下, 测定 pH, 将菌丝块用研钵研碎, 再同清液混合作为纤维素酶液体曲, 测定酶活。

2. 240 升发酵罐培养: 240 升罐装培养基 100 升, 泡敌 300—500 ppm (体积/体积), 灭菌后, 接入种子 10% (体积/体积), 温度 $30-31^\circ\text{C}$, 试验不同的通气量、搅拌速度及培养时间对纤维素酶产生的影响。

(四) 纤维素酶活力的测定

1. 酶解: 称一克底物, 装入 150 毫升三角瓶中, 加 0.1M 醋酸-醋酸钠缓冲液 5 毫升, 再加入纤维素酶液体曲 5 毫升, 摇匀, 塑料布封口, 45°C 静置 3 天。

2. 比色测定: 底物酶解后, 用自来水稀释到 500 毫升, 用滤纸过滤, 吸取滤液 1 毫升, 用 DNS 法测定还原糖。用 72 型分光光度计在 550 毫微米波长下比色, 以 0.1% 葡萄糖溶液作标准曲线。

3. 计算:

$$\text{转化率}(\%) = \frac{O.D. \times A \times B \times 100}{\text{绝干木屑粉(克)} \times 1000}$$

O.D. 为 550 毫微米波长的光密度, A 为葡萄糖标准曲线的葡萄糖毫克数。B 为稀释倍数。

以木屑粉酶解后生成葡萄糖计算的转化率表示纤维素酶液体曲活力。

结果与讨论

一、纤维素酶酶解的条件

(一) 碳源

选用了 11 种树种的木粉和纤维素粉 No.123 (德国制) 作为培养基的碳源, 比较它们对纤维素酶产生的影响。结果见表 1。由表 1 看出: 楸木、杨木、黄菠萝木及纤维素粉 No.123 作碳源, 都可以得到较高的纤维素酶活力; 桦木和水曲柳次之; 红松和雪松, 其转化率是零。由于水曲柳来源丰富, 故在以后的试验中, 都以它为碳源和酶解底物。

表 1 11 种碳源的纤维素酶产量

碳源	转化率(%)
楸木 (<i>Guglans mandshurica</i>)	45.4
杨木 (<i>Populus</i>)	45.0
黄菠萝木 (<i>Phellodendron amurense</i> Rupr)	44.9
桦木 (<i>Birch</i>)	44.0
水曲柳木 (<i>Fraxinus mandshurica</i> Rupr)	43.9
白松木 (<i>Abies holophylla</i> Maxim)	43.9
黄华松木 (<i>Larix olgensis</i> A Henry)	42.8
楸木 (<i>Tilia amurensis</i> Rupr)	41.0
杨榆木 [<i>Ulmus pumila</i> Linn (elm)]	39.5
雪松木 (<i>Codrus deodara</i> Loud)	0
红松木 (<i>Pine</i>)	0
纤维素粉 No.123	45.0

(二) 氮源

以有机氮化合物和无机氮化合物作为培养基的氮源。培养后的 pH 为 6.2—6.4。不同氮源对纤维素酶产生的影响, 列于表 2。

表 2 说明, 蛋白胨作氮源的纤维素酶活力最高; 4 种无机盐类单独作氮源的酶活力都较低。此外, 又进行了以鱼蛋白胨、全血蛋白胨及黄豆饼粉代替胨试验, 结果它们的酶活力都在

表 2 不同氮源对纤维素酶活力的影响

氮 源* (克/升)	转化率(%)
蛋白胨 (2.0)	44.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.0)	42.6
NaNO_3 (1.32)	42.4
NH_4Cl (0.8)	42.8
NH_4NO_3 (0.6)	42.9
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.33)+ NaNO_3 (0.88)	42.9
NH_4Cl (0.27) + NaNO_3 (0.88)	43.3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.33)+ NH_4NO_3 (0.40)	43.1
NH_4Cl (0.27) + NH_4NO_3 (0.40)	43.0

* 总氮量以 0.212 克/升计。

42.5—43.6%。

(三) 培养基 pH 对产纤维素酶活力的影响

1. 培养基的初始 pH: 调培养基 pH 为 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 及 7.0。培养后, 分别测木屑粉转化率。结果产生纤维素酶的最适 pH 为 6.0—6.5 (见图 1)。

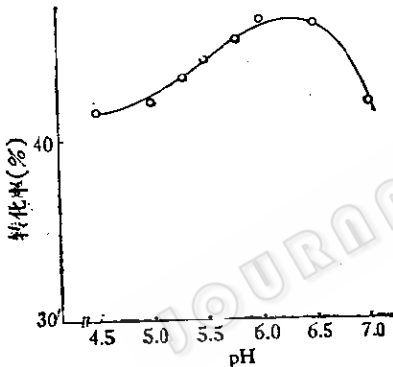


图 1 培养基初始 pH 对产纤维素酶活力的影响

2. 培养过程中 pH 变化和纤维素酶活力的关系: 木霉在生长过程中, 我们自培养 24 小时以后, 就逐日取样, 测其 pH 变化和酶活, 当培

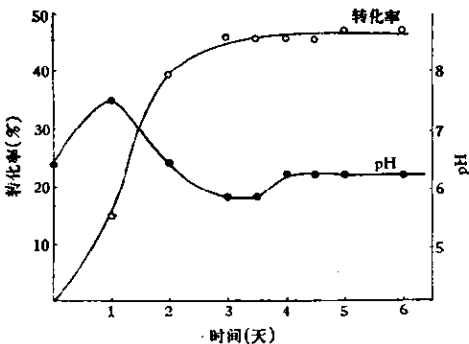


图 2 培养过程中的 pH 变化和纤维素酶活力的关系

养 3—3.5 天时, pH 上升到 5.8 左右, 此时纤维素酶活也几乎达到最高水平 (见图 2)。

二、纤维素酶酶解作用的条件

(一) 温度

从图 3 看出纤维素酶酶解的最适温度是 40—50℃。

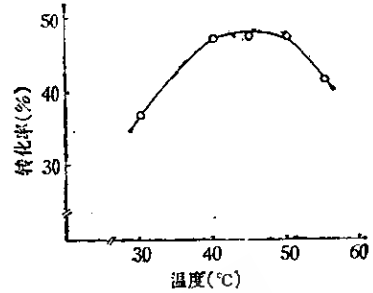


图 3 酶解温度与转化率的关系

(二) pH

0.1M 柠檬酸和 0.2M 磷酸氢二钠配成不同 pH 的缓冲液, 进行酶解比较。结果说明酶解的最适 pH 为 4.5—5.0 (见图 4)。

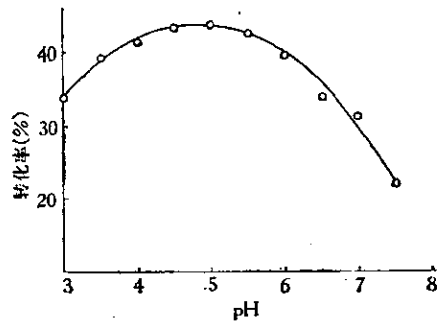


图 4 缓冲液的 pH 与转化率的关系

(三) 时间

以 50% 纤维素酶液体曲和 10% 底物, 在 pH 4.6 和温度 45℃ 的条件下进行酶解, 结果说明酶解的适宜时间是 60 小时 (见图 5)。

(四) 酶液用量

150 毫升三角瓶中加入一克底物和待测酶液, 再加入 0.2M 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.6) 和水, 使酶解液的总体积为 10 毫升, 酶解液中的缓冲液浓度为 0.05M。保温酶解后, 测糖。结

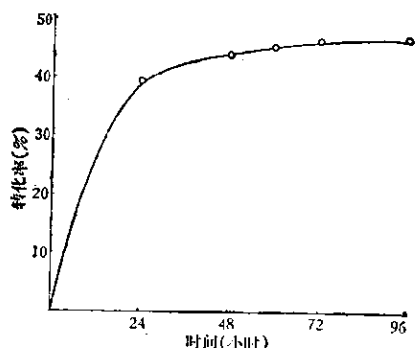


图5 酶解时间与转化率的关系

果说明：酶解的最适用酶量 5:1 (见图 6)。

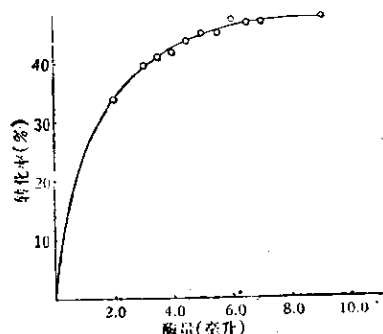


图6 酶液用量与转化率的关系

(五) 底物的浓度

在规定的酶解液中，加入不同量的酶解底物，进行酶解，比较其木粉转化率。结果列于表 3。试验说明：酶解底物的转化率随底物浓度的增加而减少。而酶解液中的糖浓度，则随底物浓度的加大而增高。底物 10%，转化率最高，底物 15%，糖浓度最高。

表 3 底物浓度对酶解的影响

底物浓度(%)	转化率(%)	酶解液的糖浓度(%)
10.0	46.3	4.63
11.0	44.6	4.91
12.0	43.9	5.27
12.5	40.3	5.04
15.0	37.7	5.66
20.0	31.3	5.26

(六) 纤维素酶液体曲贮存过程中的失活

纤维素酶液体曲加等体积的 0.1M 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.6)，摇匀，测酶活后，贮存

在 18—22℃ 及 45℃。间隔一定时间，取出测酶活，试验说明：纤维素酶液体曲的酶活相当稳定，在 18—22℃ 存放 15 天的，并无失活现象。在 45℃ 存放 3 天，失活 4.6%，15 天共失活 16.9%。

三、不同方法粉碎的 11 种木屑粉的酶解转化率

(一) 用圆筒式球磨机粉碎

1. 不同树种的木屑粉转化率：

11 种木屑分别用圆筒式球磨机粉碎后 (每筒装 100 克，粉碎 5 小时)，进行酶解，比较其转化率，结果见表 4。

表 4 11 种木屑粉的转化率

树 种	转化率(%)
桦 木	50.0
黄菠萝	47.0
杨 榆	46.9
水曲柳	46.1
杨 木	44.6
白 松	41.7
椴 木	39.7
黄华松	39.2
雪 松	34.0
红 松	33.0
楸 木	30.8

由表 4 看出，桦木木屑粉最易被纤维素酶水解，转化率最高达 50%；其次是黄菠萝木和杨榆木，转化率在 47% 左右；最难水解的是楸木和红松的木屑粉，转化率只有 30.8% 和 33.0%。

2. 改变圆筒式球磨机的粉碎条件对转化率的影响：

①钢球大小及总重量对转化率的影响：圆筒内所装钢球的大小比例和总重量不同，粉碎效果 (以酶解的转化率表示) 也不同。结果见表 5。表 5 说明，调整钢球的总重量和大小比例，可以提高粉碎效果，但这种提高是有一定限度的。

表 5 调整钢球的总重量和大小比例对粉碎效果的影响

组 别	钢 球		钢球总重量 (公斤)	转化率 (%)
	直径(厘米)	重量(公斤)		
1	2.85—3.00	5.17	12.10	34.8
	1.10—1.40	3.53		
	0.70—0.90	3.40		
2	2.85—3.00	5.79	17.37	44.9
	1.10—1.80	8.85		
	0.70—0.90	2.73		
3	2.85—3.00	2.23	20.36	45.2
	1.70—1.80	11.20		
	1.10—1.40	3.53		
	0.70—0.90	3.40		
4	2.85—3.00	5.17	23.58	45.70
	1.70—1.80	8.75		
	1.10—1.40	3.53		
	0.70—0.90	6.13		

②投料量对粉碎效果的影响：以表 5 中粉碎效果最好的第 3 组为基础，对投入不同重量木屑经粉碎 5 小时后的木屑粉的转化率进行测定。结果说明：投料量越大，粉碎效果越差。粉碎效果和投料量的关系，在该试验范围内是一直线关系(见图 7)，此直线的斜率是 -0.0956 ，也就是说，投料量从 A 增加到 B，转化率则从 a 降低到 $a - 0.0956(B - A)$ 。

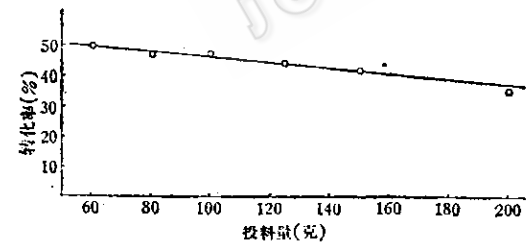


图 7 投料量对粉碎效果的影响

③粉碎时间对转化率的影响：以第 3 组的条件为基础，粉碎不同的时间，比较粉碎效果，每次投料量是 100 克。结果说明：粉碎时间延长，转化率提高，粉碎在 5 小时，转化率明显的增加，5 小时以后，转化率增加则不明显。因此，粉碎时间以 5 小时为宜(见图 8)。

(二) 用振动磨粉碎

1. 间断粉碎对转化率的影响：在振动磨内

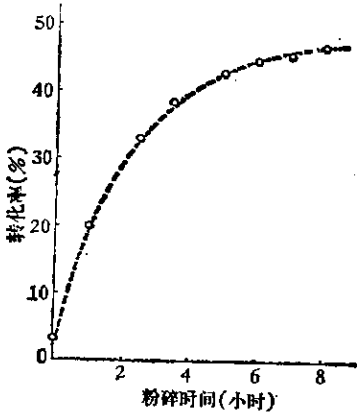


图 8 粉碎时间对转化率的影响。

装入 50 公斤水曲柳干木屑，分别粉碎 2.5，3.0，3.5 及 4.0 小时，取样测转化率。结果说明：在试验范围内，木屑粉转化率随粉碎时间的延长而增加，但增加的幅度并不大。结果见表 6。

表 6 间断粉碎时间对转化率的影响

粉碎时间 (小时)	2.5	3.0	3.5	4.0	对照*
转化率 (%)	33.9	36.8	37.2	38.0	45.2

* 圆筒式球磨机装水曲柳木屑 100 克粉碎 5 小时。

2. 连续粉碎的进料速度对转化率的影响：在一小时之内，从进料口加入不同量的水曲柳干木屑，而在出口得同样重量的木屑粉，测转化率。结果粉碎效果随着进料的速度增加而下降。结果见表 7。

表 7 不同进料速度对转化率的影响

进料速度 (公斤/小时)	30	40	50	60	对照*
转化率 (%)	43.8	39.9	34.0	33.2	42.9

* 圆筒式球磨机装水曲柳木屑 100 克粉碎 5 小时。

四、240 升发酵罐的培养条件

试验了不同的通气量和搅拌速度对纤维素酶活产生的影响，结果(表 8)说明：通气 1:0.5 (体积/体积) 和搅拌速度 250 转/分，对纤维素酶活产生是适宜的。从图 9 的 pH 变化和酶活曲线看，该菌在发酵罐中的生长情况同摇床培

养的趋势一致。

表 8 通气量和搅拌速度对纤维素酶活力的影响

通气量(体积/体积)	搅拌速度(转/分)	转化率(%)
1:0.5	250	41.3
1:1	250	41.2
1:1	350	41.2

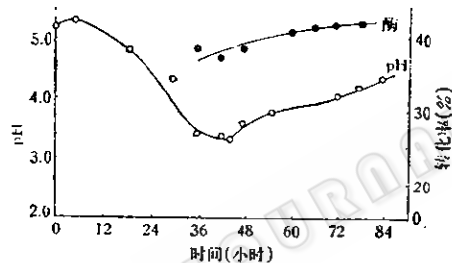


图 9 培养过程 pH 变化和酶活力的关系

参 考 文 献

[1] Ghose, T. K.: *Biotech. & Bioeng.*, 11:239—261,

1969.

[2] Ghose, T. K. & J. A. Kostik: *ibid*, 12:921—946, 1970.

[3] Toyama, N. & K. Ogawa: *Utilization of Cellulosic Wastes by Trichoderma viride, Fermentation Technology Today, Proceedings of the 4th International Fermentation Symposium*, (ed. by Gyoza Terui), Society of Fermentation Technology, Japan, 1972, pp. 743—757.

[4] Gupta, J. K., N. B. Das & Y. P. Gupta: *Agri. Biol. Chem.*, 36:1961—1967, 1972.

[5] Brown, D. E., D. J. Halsted & P. Howard: *Studies on the Biosynthesis of Cellulase by Trichoderma viride QM9123, Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose* (ed. by Bailey, M., T. M. Enari & M. Linko), Helsinki, 1975, pp. 137—153.

[6] Mystrom, J. M. & A. L. Allen: *Pilot Scale Investigations and Economics of Cellulase Production, Enzymatic Conversion of Cellulosic Materials, Technology and Applications* (ed. by Gaden, E. L. Jr., et al.), New York, pp. 55—70, 1976.

[7] 中国科学院微生物研究所纤维素酶研究小组, 北京日用化学二厂: *微生物学报*, 12(2):137—142, 1977.