

拟康氏木霉 N₂-78 产纤维素酶摇瓶发酵的研究

复旦大学生物系微生物专业

上海酒精二厂

(上海)

在拟康氏木霉 N₂-78 产纤维素酶固体发酵法的基础上,我们于 1975—1976 年开展了用该菌产纤维素酶液体发酵的研究工作。现将研究结果简报如下:

一、菌株的选育和特性

拟康氏木霉 N₂-78 在固体培养时是一株纤维素酶高产菌株,但是在液体发酵条件下却不产生纤维素酶。通过单孢子分离,摇瓶发酵条件试验等工作,由 N₂-78 菌株得到在液体发酵条件下产生纤维素酶的菌株。该菌株不但能在液体发酵条件下产生纤维素酶,而且在固体发酵中的产酶水平也不低于母株。

二、摇瓶发酵结果及分析

运用正交设计和单因子试验两种方法,对各种碳、氮源和微量元素等进行配比试验,确定摇瓶发酵的培养基是(重量/体积): 稻草

粉 1%, 麸皮 0.5%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, KH₂PO₄

表 1 不同组成的培养基发酵试验和结果

培养基成分和酶活性*		培养基		
		1	2	3
培养基成分	稻草粉	1.0	1.0	1.0
	麸皮	0.5	0.5	0.5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	0.2	0.2
	KH ₂ PO ₄	0.1		0.1
	过磷酸钙		0.1	
	Na ₂ CO ₃	0.1		
	CaCO ₃			0.1
	葡萄糖第一次结晶母液(体积/体积)	1.0	1.0	1.0
酶*活性	滤纸崩潰	0	0	+++
	滤纸糖化力(毫克/毫升)	0	0.14	0.54
	CMC 酶活(毫克/毫升)	0	77	134

* 0.1M pH4.6 醋酸缓冲液, 40℃: 滤纸崩潰, 滤纸糖化力保温 2 小时, CMC 酶活保温 30 分钟。

0.1%, CaCO₃ 0.1%, 葡萄糖第一次结晶母液 1%; 发酵试验结果见表 1。

葡萄糖第一次结晶母液和 CaCO₃ 对产酶有协同作用, 据报道前者含有能强烈诱导拟康氏木霉产生纤维素酶的物质^[1]和 30—40% 的葡萄糖。由表 1 可见其用量以 1% 较好, 葡萄糖过多时发酵液中的酶活迅速下降, 可能是产生了“葡萄糖效应”的缘故^[2]。CaCO₃ 对产酶的影响可能是多方面的^[3]。N₂-78 液体发酵菌株在碳水化合物基质里生长时会同时有酸产生, 使培养液的 pH 从 6.0 左右降至 2.5, 而 CaCO₃ 的存在会中和发酵过程中产生的酸, 使 pH 保持相对稳定, 有利于产酶。

根据我们的实验条件, 用孢子悬液接种的最适发酵条件是: 500 毫升三角瓶装 50—100 毫升培养基, pH 4.5—6.0, 每瓶接入 10⁶ 个孢子, 30℃ 振荡培养三天, 而在摇瓶发酵过程中会形成菌丝球, 菌丝球的大小和质地与接种的孢子数有关, 也与发酵终了时的产酶水平密切相关,

结果见表 2。

表 2 孢子接种量和菌丝球大小对产酶的影响

菌丝球与酶活	孢子浓度 (个数/毫升)					
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
CMC 酶活(毫克/毫升)	50	78	111	133	151	139
滤纸糖化力(毫克/毫升)	—	0.31	0.61	0.57	0.63	0.61
滤纸崩溃	0	+	+++	+++	+++	+++
菌丝球直径(毫米)	5.0		1.0	0.5	0.5	

用菌丝接种不仅可以缩短发酵周期, 还能提高酶产量。菌丝接种的种子培养基成份是(重量/体积): 米糠 1%, 麸皮 0.5% (NH₄)₂SO₄ 0.2%, KH₂PO₄ 0.1%, 葡萄糖第一次结晶母液 1%; 接入 10⁶ 个孢子, 振荡培养 32—36 小时后, 种子液由原来的黄白色变成鹅黄色, 此时还原糖迅速消耗, pH 降到 2.5, 菌丝粗壮, 大部分开始结球, 以 6—10% (体积/体积) 的接种量接入摇瓶, 振荡培养 60 小时。因用菌丝接种的培养物代谢旺盛, 对纤维素基质消耗快且菌体衰老

表 3 孢子接种和菌丝接种摇瓶发酵结果的比较

发酵过程		接种方式	孢子接种	菌丝接种
菌丝球	直径(毫米)		0.5	1.0
	开始结球时间(小时)		20	4
	开始自溶时间(小时)		48	52
发酵液	发酵终了培养液残糖(毫克/毫升)		0.7—0.8	0.3—0.4
	发酵终了培养液颜色		黄绿色, 混浊	淡黄色, 清澈
	pH 降至最低点时间(小时)		24	20
酶活测定	开始产酶时间(小时)		30	24
	酶活力达最高时间(小时)		74	64
	CMC 酶活(毫克/毫升)		150 左右	230 左右
	滤纸糖水平(毫克/毫升)		0.8 左右	1.1 左右

慢, 所以缩短了产酶延滞期, 提高了产酶水平。结果见表 3。

与国外同类型工作相比较^[1,3], 我们的发酵培养基具有营养成分简单, 产酶延滞期短, 到达产酶高峰时间早等优点^[4]。据有关单位用此酶液进行研究^[5]证明, 在上述条件下, 该菌株的产酶水平高于固体曲。因此是一株优良菌株。

参 考 文 献

- [1] Mandels, M., F. Parrish, and E. T. Reese: *J. Bacteriology.*, **83**(2): 400—408, 1962.
- [2] Mandels, M., and D. Sterberg: *醱酵工学杂志* **54**(4): 267—286, 1976.
- [3] Mandels, M., and E. T. Reese: *J. Bacteriology.*, **73**(2): 269—278, 1957.
- [4] 张文雄, 宇佐美昭次: *醱酵工学杂志* **47**(7): 447—458, 1969.
- [5] 上海植物生理研究所纤维素酶组, 上海酒精二厂: *微生物学报*, **18**(1): 27—38, 1978.