

康宁木霉液体深层发酵生产纤维素酶

李忠兴 焦旭东 郝志军

(宁夏夏盛实业集团酶分公司 银川 750001)

摘要: 以康宁木霉 (*Trichoderma kōningii*) T215 为生产菌, 在 30t 气升式发酵罐中进行了液体深层发酵生产纤维素酶的扩大试验。一、二级罐种子培养基由 8% 麦麸组成, 种龄 24h。产酶培养基由 6% 稻草粉, 1% 麦麸和 1% 蛋白胨组成, 起始 pH5.0。每罐装 22t 培养基, 10% 接种量, 通气量 0.4vvm, 罐压 0.08MPa, 29℃ ± 1℃ 培养 96h。连续试验 5 批, 平均发酵液酶活力: CMC-Na 活力 78.3IU/mL, 脱脂棉活力 1.3IU/mL, 水杨苷活力 1.4IU/mL, 滤纸活力 5.4IU/mL。

关键词: 纤维素酶, 康宁木霉, 液体深层发酵

中图分类号: Q93-936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-06-0403-03

PRODUCTION OF CELLULASE VIA SUBMERGED FERMENTATION OF *TRICHODERMA KÖNINGII*

LI Zhongxing JIAO Xudong HAO Zhijun

(Enzyme Branch Company, Ning Xia Xia Sheng Industries Group, Yinchuan 750001)

Abstract: An experiment for cellulase production was carried out in a 30t air left fermentor with an operating volume of 22t. *Trichoderma kōningii* T215 growing in the liquid medium which consisted of 6% rice straw powder, 1% wheat bran and 1% peptone (initial pH5.0). Operating conditions: seed, 10% inoculum of a 24h old fermentor culture growing in a fermentor in the medium consisted of 8% wheat bran; aeration, 0.4vvm; press, 0.08MPa; temperature, 29℃ ± 1℃; Period, 96h. Cellulase activity of the supernatant of the culture as follows: CMC-Na activity 78.3 IU/mL, absorbent cotton activity 1.3 IU/mL, salicin activity 1.4 IU/mL, filter paper activity 5.4 IU/mL.

Key words: Cellulase, *Trichoderma kōningii*, Submerged fermentation

纤维素酶的应用研究取得了很大进展,有些应用已实现工业化。酶应用市场要求廉价的酶产品。我国一直采用固体发酵法生产纤维素酶^[1],液体发酵法虽然深受重视,但缺乏可行的生产工艺。我们用中国科学院微生物研究所提供的康宁木霉(*Trichoderma kőningii*) T215及其摇瓶产酶条件,完成了30t罐液体深层发酵扩大生产试验。在试验规模上,发酵水平上,工艺设备与技术水平上均属国内领先。相对固体发酵法,本试验生产酶产品已经以生产成本低和应用效果好的优势进入了应用市场。本文报道康宁木霉 T215 液体深层发酵生产纤维素酶工艺条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

康宁木霉(*Trichoderma kőningii*)突变种 T215,中国科学院微生物研究所提供。

1.2 种子培养基和培养方法

1.2.1 试管斜面种子:将菌种接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)斜面培养基上,29℃±1℃培养4d后使用或4℃下保存。

1.2.2 茄瓶种子:0.5L茄瓶装0.1L PDA培养基,接试管斜面种子,如上培养。

1.2.3 三角瓶种子:5L三角瓶装2L由8%麦麸组成的培养基,接茄瓶种子,260r/min摇床上29℃±1℃培养24h。

1.2.4 一级罐种子:0.3t气升式罐装0.22t如上培养基,接入三角瓶种子11L,通气量0.8vvm,罐压0.08Mpa,29℃±1℃培养24h。

1.2.5 二级罐种子:3t气升式罐装2.2t如上培养基,接入上述种子(10%接种量),通气量0.6vvm,如上培养24h。

1.3 产酶培养基和培养方法

30t气升式罐装22t由6%稻草粉(80目),1%麦麸和1%蛋白胨组成的培养基(起始pH5.0),接入上述种子(10%接种量),通气量0.4vvm,如上培养108h。培养过程中每隔12h取一次样测定酶活力。

1.4 酶活力测定方法

利用3,5-二硝基水杨酸试剂比色法测定

酶水解底物产生的还原糖^[2]。每分钟水解底物(在pH4.8,0.05mol/L柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中)生成相当于1μmol/L葡萄糖的还原糖所需酶量定义为一个国际酶活力单位(IU)。

1.4.1 CMC-Na活力:1.4mL 1%CMC-Na溶液与0.1mL酶溶液50℃反应30min。

1.4.2 脱脂棉活力:50mg脱脂棉于1mL缓冲液中,加0.5mL酶液,50℃反应24h。

1.4.3 水杨苷活力:1mL 1%水杨苷溶液与0.5mL酶液50℃反应30min。

1.4.4 滤纸活力:1cm宽,50mg重的新华1号滤纸条于1mL缓冲液中,加0.5mL酶液,50℃反应1h。

1.5 发酵工艺流程

T215菌发酵产酶工艺流程见图1。

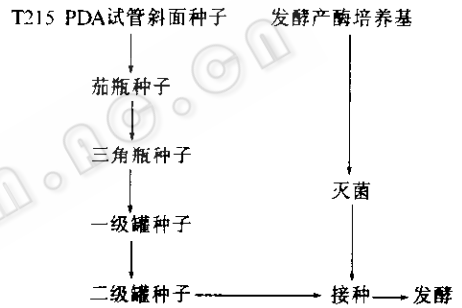


图1 T215菌液体深层发酵产酶工艺流程

2 结果与讨论

在30t罐上连续进行5批三级发酵产酶试验。由表1结果可以看出,T215菌发酵液中三种类型纤维素酶活力为:CMC-Na活力(Cx酶)78.3IU/mL,脱脂棉活力(CI酶)1.3IU/mL,水杨苷活力(葡糖苷酶)1.4IU/mL;综合纤维素酶活力(滤纸活力)为5.4IU/mL。菌发酵产酶与培养基中纤维素质量密切相关。文献报道^[3]产纤维素酶既高活力又高产率的里斯木霉(*T. reesei*) RUT-C30在含2%,5%,7.5%和10%纤维素培养基(10L罐)中产综合纤维素酶活力分别为4.2IU/mL,8.0IU/mL,8.4IU/mL和8.0IU/mL。本扩大试验产酶培养基中纤维素仅含3%,T215菌产综合纤维素酶活力达5.4IU/mL。可以说明本扩大试验结果是令人满意的。

表1 发酵液中各种类型纤维素酶的活力

试验批次	发酵周期 (h)	CMC-Na活力 (IU/mL)	脱脂棉活力 (IU/mL)	水杨苷活力 (IU/mL)	滤纸活力 (IU/mL)
1	92	75.4	1.2	1.1	5.2
2	96	74.6	1.2	1.3	5.4
3	97	79.7	1.3	1.3	5.4
4	90	81.2	1.3	1.6	5.5
5	99	80.6	1.4	1.5	5.5
平均	95	78.3	1.3	1.4	5.4

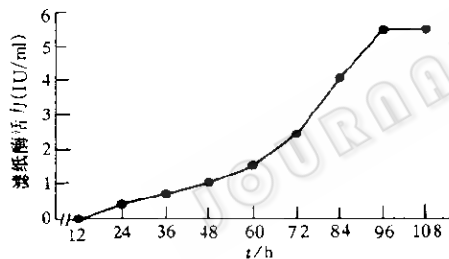


图2 康宁木霉T215产纤维素酶时间过程

由图2产酶过程曲线可以看出,培养开始,12h前,不产酶;12h后产酶速度逐渐加快,最快

时间阶段为72h到96h,产酶量约占全过程60%。T215菌罐上产酶周期为96h,比摇瓶缩短24h。

参 考 文 献

- [1] 崔福绵,刘茵,韩辉. 微生物学通报, 1995, 22(2): 72~76.
- [2] Gupta J K, Das N B, Gupta Y P. Agricultural and Biological Chemistry, 1972, 36(1): 1961~1967.
- [3] Mohagheghi A, Grohmann, K, Wyman A C. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1998, 17: 263~276.