

黄绿木霉菌产纤维素酶条件优化

林志伟 孙冬梅* 张红梅 赵金玲

(黑龙江八一农垦大学 大庆 163319)

摘要: 利用正交设计方法研究了温度、接种量、pH 值、装液量等不同发酵条件对黄绿木霉菌产纤维素酶的影响, 研究表明, 在这些因素中影响该菌株产纤维素酶的最主要因素为温度, 而其他三个因素对该菌株产纤维素酶影响比较小。研究中得出该菌株最适产酶条件为发酵 5d, 28℃、初始 pH 为 6、接种量为 8%、装液量为 40 mL (150 mL 三角瓶), 摇床转速为 170 r/min。

关键词: 黄绿木霉菌, 纤维素酶, 正交设计

The Optimal Condition of Producing Cellulase by *Trichoderma aureoviride*

LIN Zhi-Wei SUN Dong-Mei* ZHANG Hong-Mei ZHAO Jin-Ling

(Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319)

Abstract: Producing cellulase conditions such as different temperature, inoculum size, liquid level and pH level by *Trichoderma aureoviride* in the shaking bottle were studied by orthogonal design method. The results showed that the main factor affecting the producing cellulase was temperature among the orthogonal conditions. The optimum conditions were as follows: cultivating solution initial pH was 6, cultivating temperature was 28℃, inoculation size was 8%, liquid level was 40 mL in 150 mL triangle bottle, rotation speed was 170 r/min.

Keywords: *Trichoderma aureoviride*, Cellulose, Orthogonal design

纤维素分子本身具有结构致密的特点, 在植物细胞壁中木质素和半纤维素又对纤维素形成了保护层, 使得纤维素更加不容易降解, 因而难以被充分利用, 造成了纤维素资源的极大浪费^[1]。微生物可产生纤维素酶将纤维素降解为低分子量的己糖或戊糖, 被进一步利用^[2]。本文选取黄绿木霉菌为研究对象, 对该菌株产纤维素酶的发酵条件进行了优化, 对该菌株在生产中的应用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌种

Trichoderma aureoviride sp., 本实验室保藏。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基(%) : 土豆琼脂培养基(PDA), 自然 pH。

1.2.2 产酶培养基(%) : 液体 Mendals 产酶基本培养

基。微晶纤维素 7.5 g, (NH₄)₂SO₄ 1.4 g, 脲 0.3 g, 蛋白胨 1.5 g, 吐温 80 6 g, 微量元素(FeSO₄·7H₂O, ZnSO₄·7H₂O, MnSO₄·H₂O, CoCl₂), 1 × 10⁵ Pa, 25 min。

1.3 培养方法

产酶培养：150 mL 三角瓶装不同量的培养基，以微晶纤维素为底物，根据正交实验进行接种，摇瓶培养，转数控制在 165 ~170 r/min。

1.4 正交设计

选择影响液体发酵生产纤维素酶的四种发酵条件，初始 pH 值、摇床温度、装液量和接种量等 4 因素 4 个水平进行试验，以正交设计助手软件为参考。各因素的实验取值见表 1。

1.5 测定方法

1.5.1 粗酶液的制备：取培养液 10000 r/min 离心 10 min，所得上清液即为粗酶液。

1.5.2 纤维素酶活测定方法：(1) CMC 酶活性：以

羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为底物用 DNS 法测定。(2) FPA 酶活性：以定量新华滤纸为底物用 DNS 法测定。(3) -葡萄糖苷酶活性：以 0.5%的水杨苷为底物用 DNS 法测定。

以加入粗酶液后立即沸水浴 5 min 的处理为对照。

用葡萄糖作标准溶液，以 1 mL 酶液 1 min 分解底物生成 1 mmol 葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活单位，以 U 表示。

2 结果与讨论

2.1 产酶条件的研究

2.1.1 不同发酵条件对该菌株产 CMC-Na 纤维素酶的影响：按照正交设计助手要求将发酵第 5 天的实验结果绘制到表格中，利用该软件进行分析，得到如下表 2。

表 1 纤维素酶发酵条件正交实验的影响因素和水平				
Table 1 Factors and levels affected the fermentation orthogonal design				
水平号 (Level number)	影响因素(Factors)			
	温度() (Temperature)	pH 值 (pH value)	装液量 (Liquid level)	接种量 (Inoculation size)
1	24	4	20	4
2	28	5	40	6
3	32	6	60	8
4	36	7	80	10

表 2 发酵 5d 的正交实验结果表						
Table 2 Results of orthogonal test fermented for 5 days						
所在列(Line)	1	2	3	4	5	6
因素(Factors)	pH	接种量 (Inoculation size)	装液量 (Liquid level)	温度 (Temperature)	E	实验结果 (Results)
实验 1(Test 1)	1	1	1	1	1	0.424
实验 2(Test 2)	1	2	2	2	2	0.873
实验 3(Test 3)	1	3	3	3	3	0.562
实验 4(Test 4)	1	4	4	4	4	0.077
实验 5(Test 5)	2	1	2	3	4	0.803
实验 6(Test 6)	2	2	1	4	3	0.124
实验 7(Test 7)	2	3	4	1	2	0.69
实验 8(Test 8)	2	4	3	2	1	0.957
实验 9(Test 9)	3	1	3	4	2	0.106
实验 10(Test 10)	3	2	4	3	1	0.762
实验 11(Test 11)	3	3	1	2	4	1.31
实验 12(Test 12)	3	4	2	1	3	0.735
实验 13(Test 13)	4	1	4	2	3	1.01
实验 14(Test 14)	4	2	3	1	4	0.869
实验 15(Test 15)	4	3	2	4	1	0.403
实验 16(Test 16)	4	4	1	3	2	0.595
均值 1(Average 1)	0.484	0.586	0.613	0.679	0.636	
均值 2(Average 2)	0.643	0.657	0.704	1.038	0.566	
均值 3(Average 3)	0.728	0.741	0.624	0.681	0.608	
均值 4(Average 4)	0.719	0.591	0.635	0.177	0.765	
极差(Range)	0.244	0.155	0.091	0.861	0.199	

实验结果表明,在这几个不同的因素中,以温度的极差最大为 0.861,结合方差分析(表 3),温度的 F 比高于 F 临界值,故该因素对黄绿木霉菌菌株产 CMC-Na 酶的影响最为突出。通过对效应曲线图的分析看出:该菌株发酵产酶最适温度为 28℃,最适 pH 为 6,最适接种量在 8%左右,最适装液量在 40 mL 范围内(图 1),该条件下产生的 CMC-Na 酶活性为 1356U。

2.1.2 不同发酵条件对该菌株产滤纸纤维素酶的影响:在测定该酶活的影响因素中,我们同样依据正交设计助手的方案进行,利用该软件对实验结果分析后表明,影响滤纸酶活的主要因素仍然为温度,最适温度为 28℃,其它 3 种因素对滤纸酶活性的影响比较小。综合分析得出,该菌株产滤纸酶的最适条件与 CMC-Na 酶比较相似,为 pH 6,接种量在 8%,装液量为 40 mL,温度在 28℃,该条件下产生的滤纸酶活为 2568 U。

2.1.3 不同发酵条件对该菌株产 β-葡萄糖苷酶的影响:依据正交设计助手的方案,利用该软件对实验结果分析后表明,影响该酶活的主要因素仍然为温度,最适温度为 28℃,其它因素对产酶的影响比

较小。综合分析得出,该菌株产 β-葡萄糖苷酶的最适条件与上述两种纤维素酶相似,均为 pH 6,接种量为 8%,装液量为 40 mL,温度为 28℃,在 6 此条件下发酵获得的 β-葡萄糖苷酶活性为 178.5 U。

2.1.4 不同发酵时间对该菌株发酵产酶的影响:在实验过程中,为了保证实验结果的准确性,我们跟踪测定了发酵培养 4~7 天的产酶情况,仅以其中第 4 天的实验结果与第 5 天的对比即可看出,在不同的发酵天数时,影响该菌株产酶的因素稍有变动,分析第 5 天的曲线图可以看出,不同影响因子均有一个最高拐点(图 1),而第 4 天的产 CMC-Na 酶的曲线图中,不同影响因素的走势不完全相同,在不同 pH,装液量,接种量的表现上出现不一致(图 2)。

2.1.5 不同发酵时间不同发酵条件下最高产酶高峰的比较:将在不同发酵时间,不同发酵条件的所有数据整理后,选择每个处理的最高产酶值利用正交设计软件分析,结果雷同于第 5 天,即温度对发酵产酶影响最大,最适温度仍为 28℃。但通过对不同天数的纵向比较发现,不同纤维素酶在不同条件下出现的最高峰并不一致。因而在进行纤维素酶生产时,需要将产酶条件了解清楚,这样有助于获得最

表 3 发酵 5d 的正交实验结果方差表					
Table 3 Variances of orthogonal test fermented for 5 days					
因素 (Factors)	偏差平方和 (Sum of squares of deviation from mean)	自由度 (Degree of freedom)	F 比 F ratio	F 临界值 (F critical value)	显著性 (Significance)
pH	0.153	3	0.419	3.290	*
接种量(Inoculation size)	0.063	3	0.173	3.290	
装液量(Liquid level)	0.020	3	0.055	3.290	
温度(Temperature)	1.500	3	4.112	3.290	
E	0.088	3	0.241	3.290	
误差(Error)	1.82	15			

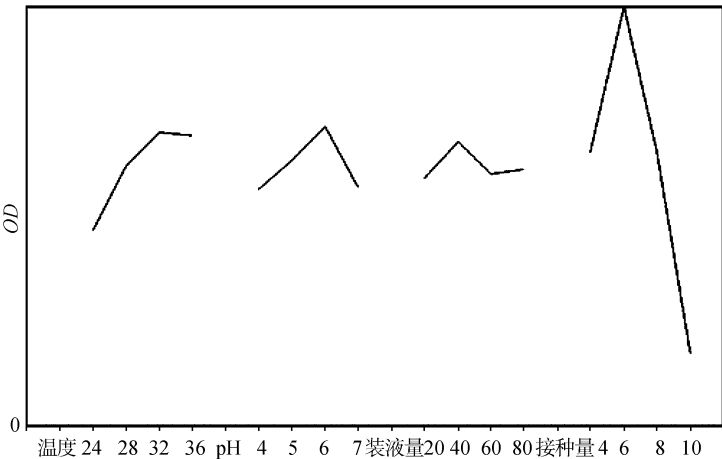


图 1 发酵第 5 天的不同发酵温度对黄绿木霉菌菌株产 CMC-Na 纤维素酶影响的效应曲线图
Fig. 1 Effect curve diagram of the different fermentation on CMC-Na enzyme activity fermented for 5 days

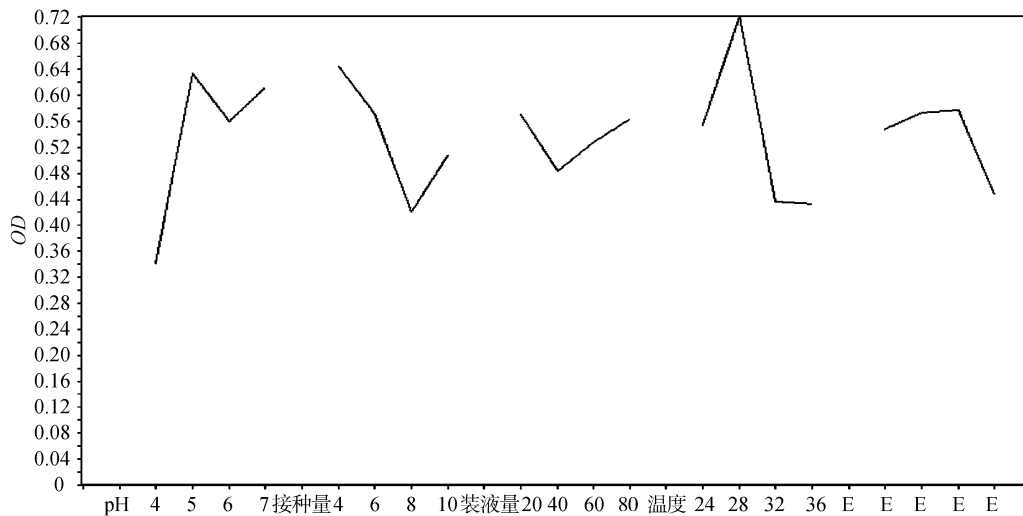


图2 发酵第4天的不同发酵条件对黄绿木霉菌株 CMC-Na 酶效应曲线图

Fig. 2 Effect curve diagram of the different fermentation on CMC-Na enzyme activity fermented for 4 days

高的纤维素酶产量。

2.1.6 最适发酵条件下, 不同发酵天数对产酶的影响: 选择正交实验结果中最适的发酵条件, 对黄绿木霉产纤维素酶能力进行研究, 分析实验结果发现, 在发酵的第5天各种酶的活力均比较高, 图中的羧甲基纤维素钠酶活粗酶液同等稀释的基础上稀释5倍后的实验结果, 而滤纸酶活为在羧甲基纤维素钠酶活粗酶液稀释的基础上又稀释1倍后的实验结果; 所以可以看出, 滤纸酶的活力比较高。而随着发酵时间的延长, 酶活呈现下降趋势(图3)。

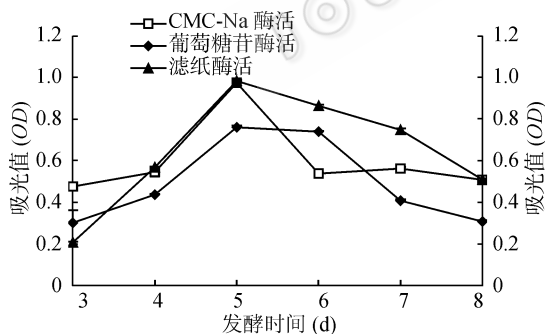


图3 不同发酵时间对产纤维素酶的影响

Fig. 3 Effect of the different fermentation time on cellulase activity

3 结论与讨论

产纤维素酶的微生物种类较多, 其中主要菌种为木霉菌, 很多学者对木霉菌产纤维素酶的条件进行了研究。在我们的研究中, 也得到了一些相同的结论, 即温度对产酶有影响, 且影响比较大。我们还发现利用正交助手对实验进行设计, 不同的发

酵天数, 供试几种因素对产酶能力影响不完全相同, 其中以发酵5天最适宜获得高产纤维素酶。

通过对不同纤维素酶的研究, 我们发现, 尽管在发酵第5天时, 不同影响因素的效应曲线图对每一种纤维素酶的表现并不完全一致, 但趋势比较接近。发酵第5天时, 对 CMC-Na 酶、 β -葡萄糖苷酶、滤纸酶的影响中均以温度影响最为突出, 而在发酵4天和6天的曲线效应图中, 各因素的走向并不一致。因而, 讨论影响纤维素酶产生的因素时, 需要定义具体的条件。

参考文献

- [1] 孙冬梅, 杨 谦, 宋金柱, 等. 黄绿木霉固定化生产纤维素酶及酶学特性的研究. 林产化学与工业, 2006, 26(2): 79-82.
- [2] 燕 红, 杨 谦, 王希国. 两株芽孢杆菌产纤维素酶的研究. 林产化学与工业, 2006, 26(2): 83-86.
- [3] 余永红, 邓泽元, 范亚苇, 等. 一种新型产纤维素酶菌种的分离鉴定. 食品工业科技, 2006, 27(6): 52-53.
- [4] 伍 红, 陆兆新, 吕 玫, 等. 黑曲霉 AF-98 固体发酵产纤维素酶的产酶条件研究. 菌物学报, 2006, 25(3): 475-480.
- [5] Ching-Fu Leswe, Daniel Yuen Teh Liu, Ming Tsong Lai, et al. Reidentification of cellulolytic enzyme-producing *Trichoderma* strains W-10 and G-39. *Canadian Journal of Microbiology*. 2006, 52(6): 570-575.
- [6] Kim TI, Jeong, KH Ham JS, et al. Isolation and Characterization of Cellulase Secreting Bacterium from Cattle Manure: Application to Composting. *Compost Science & Utilization*, 2004, 12(3): 242-249.