

里氏木霉纤维素酶生产工艺的优化

王 涓¹,王明钰²,穆子铭²,侯少莉²,张 杰²,伏小平¹,方 诤²

(1. 甘肃农业大学 动物医学院,甘肃 兰州 730070;2. 山东大学 生命科学学院,山东 济南 250100)

摘要:提高纤维素酶生产效率,降低纤维素酶生产成本是纤维素乙醇生产技术的关健之一。而碳源、氮源和无机盐等产酶培养基成分以及接种时间、产酶温度、培养初始 pH 等产酶条件是纤维素酶生产过程中的关键因素。为充分利用里氏木霉生产纤维素酶,研究了纤维素酶高产菌株里氏木霉 FST-1 产酶培养基和产酶条件对纤维素酶产酶的影响。结果表明:麸皮、蛋白胨和磷酸二氢钾的含量对于纤维素酶的生产影响较大,并且确定了最优产酶培养基为 4 号培养基。通过对不同产酶条件的研究,确定最佳接种时间为 24 h、最佳产酶温度为 32℃、最佳初始 pH 为 5.5,优化后的生产工艺可以将滤纸酶活力和蛋白含量提高 3 倍。

关键词:里氏木霉;纤维素酶;pH;温度;优化

中图分类号:Q815

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)05-0108-04

进入 21 世纪,中国经济在高速发展的同时,石油的需求也在快速增长。至今,中国已经成为当今世界第二大石油消耗国。然而,我国人均可采石油资源量仅为世界平均水平的 12%。伴随着不可再生的化石能源的不断消耗,传统能源将会逐渐枯竭,人类也即将面临能源枯竭带来的生存危机^[1-2]。为了经济的可持续发展和人类的生存,我们必须寻求新兴能源来代替不可再生性能源。木质纤维素是地球上最丰富的可再生资源,其年产量高达 1 000 亿 t,这些能量相当于全球人类每年能源消耗量的 20 倍,食物所含能量的 200 倍,是可以永续提供的生物资源^[3-4]。但在我国,大部分含有丰富木质纤维素的农作物残渣像玉米秸秆、玉米芯、稻秆和麦秸等都没有被充分利用起来,而是被就地焚烧处理,造成了一定的环境污染。秸秆等木质纤维素转化成生物乙醇是解决这一问题的有效途径^[5-6],通过生物乙醇工业的发展,可以缓解我国石油资源短缺的危机,减轻我国对进口石油的依赖,增加农作物的产值,发展秸秆燃料乙醇工业是实现我国经济可持续发展的有效途径之一^[7]。

将秸秆转化成乙醇必须把秸秆中的纤维素降解成可发酵性糖。目前将纤维素降解成糖主要有两种途径:酸水解和酶水解。酸水解法产生的发酵抑制物浓度较高,乙醇得率较低,设备和废液处理成本较高。虽然技术较为成熟,但是缺乏经济竞争性^[8]。与之相比,酶水解法具有对环境友好、效率高和产量高的优点,是国际上重点研究的生生产工艺^[9-12]。但是由于在纤维素乙醇生产中纤维素酶的用量是淀粉乙醇中淀粉酶的 50~200 倍^[13],纤维素酶的价格也高于淀粉酶,所以改进纤维素酶生产工艺,提高纤维素酶生产效率,降低纤维素酶生产成本是纤维素乙醇生产技术的关健之一^[14]。

国内外对纤维素酶生产条件的优化报道很少,对某一菌株进行研究时培养基及培养条件也纷杂不一^[15-16]。现对纤维素酶高产菌株里氏木霉 FST-1 的产酶培养基和产酶条件进行了优化。通过对接种时间、产酶温度和培养基初始 pH 进行研究,旨在寻求较优的产酶条件,以提高其纤维素酶活和产量,为其进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

供试菌种为里氏木霉(*Trichoderma reesei*) FST-1 由山东大学微生物技术重点实验室提供。

1.2 培养方法

在装有 50 mL 种子培养基的 300 mL 三角瓶中加入活化后的 FST-1 菌株,在恒温摇床(上海福玛实验设备公司)30℃、200 r·min⁻¹条件下预培养 24~60 h,作为液体种子(种子液)。

收稿日期:2012-03-26

基金项目:国家重点基础研究发展计划“973”资助项目(2011CB707403);科技部国际科技合作计划资助项目(2010DFA32560);新世纪优秀人才支持计划(NECT)资助项目

第一作者简介:王涓(1986-),男,山东省青岛市人,硕士,从事纤维素酶生产研究工作。E-mail:wgrjx@163.com。

通讯作者:方诤(1974-),男,辽宁省沈阳市人,博士,教授,博士生导师,从事微生物生产、酶学和生物质能研究。E-mail:fangxu@sdu.edu.cn。

采用摇瓶产酶培养时,按体积比 10% 的接种量接入盛有 100 mL 产酶培养基(见表 1)的 500 mL 三角瓶中,在 30℃、200 r·min⁻¹ 的恒温摇床上进行产酶培养,约间隔 24 h 取样进行分析。

利用发酵罐(1 L, Infors Biotechnology Co., 瑞士)产酶培养时,按 10% 的接种量接入盛有

500 mL 产酶培养基的发酵罐中。在培养过程中,溶氧控制在 30% 以上,28~32℃ 条件下进行产酶培养,约间隔 24 h 取样进行分析。试验共采用 6 种不同配方(见表 1)的培养基,分别将里氏木霉 FST-1 放在发酵罐中,在 30℃ 下培养 5 d,每隔 24 h 检测它们的滤纸酶活力和蛋白质含量。

表 1 供试 6 种培养基配方

Table 1 The tested six culture media of the cellulose production

培养基 Culture media	麸皮/% Wheat bran	木糖渣*/% Corncob residues	蛋白胨/% Tryptone	NaNO ₃ /%	KH ₂ PO ₄ /%	尿素/% Urea
1	1	2	0.3	0.2	0.3	0.6
2	2	1	0.4	0.1	0.4	0.5
3	3	6	0.5	0.3	0.2	0.2
4	6	3	0.6	0.4	0.5	0.1
5	4	5	0.2	0.5	0.1	0.4
6	5	4	0.7	0.1	0.6	0.3

注: * 是指玉米芯粉在用稀酸处理后生产木糖的工业废渣。
Note: * means corncob with acid treatment industrial waste residue after xylose production.

1.3 分析方法

滤纸酶活力(Filter paper activity, FPA)按工业行业标准(QB2583-2003)测定。采用 UV-2550 紫外分光光度计(SHIMADZU Co., 日本)测定 OD 值,计算酶活力^[9]。

Bradford 法测定蛋白量:将蛋白质溶液转移至试管中(最大体积 100 μL),补加试验用 0.15 mol·L⁻¹ NaCl 至终体积 100 μL,加入 1 mL Bradford 工作液并震荡均匀,在 2 min 后以 100 μL 0.15 mol·L⁻¹ NaCl 溶液作为对照,用 UV-2550 紫外分光光度计测 OD₅₉₅ 值^[17]。

2 结果与分析

2.1 对产酶培养基的优化

从图 1 可知,4 号培养基配方产酶效果最好。可见,适当增加麸皮、蛋白胨和磷酸二氢钾的含量可以提高纤维素酶的生产。据文献报道,麸皮是纤维素酶产生的诱导物,因此提高培养基中麸皮的量有利于纤维素酶的产生^[18]。蛋白胨含量的提高,增加了培养基中的氮源,有利于里氏木霉的生长和产酶。

2.2 不同接种时间对里氏木霉发酵产酶的影响

在利用里氏木霉产纤维素酶的过程中,种子液生长的时间对纤维素酶的生产是一个关键的参

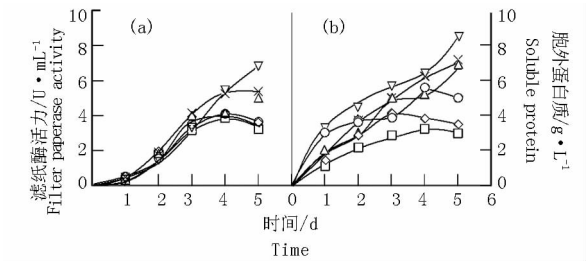


图 1 不同培养基对于滤纸酶活力和胞外蛋白质生产的影响

Fig. 1 The influence of different culture media on filter paperase activity and soluble protein concentration

(a)滤纸酶活力;(b)胞外蛋白质;□1 号培养基;◇2 号培养基;△3 号培养基;▽4 号培养基;×5 号培养基;○6 号培养基

(a)Filter paperase activity;(b)Soluble protein concentration; □No. 1 media; ◇No. 2 media; △ No. 3 media; ▽ No. 4 media; ×No. 5 media; ○No. 6 media

数:生长时间过短则种子液中生物量过低,不利于产酶培养基中里氏木霉的生长;生长时间过长菌种则可能已经开始衰退,同样不利于产酶培养基中里氏木霉的生长。从图 2 可看出,种子液生长的时间对里氏木霉产酶阶段有一定的影响:在种子液生长 24 h 后接种,产酶培养基中的 FPA 和蛋白质含量最高,分别为 12 U·mL⁻¹ 和 10 g·L⁻¹,因此 24 h 是最优的种子液生长时间,种子液的生长期缩短的同时也节约了生产成本。

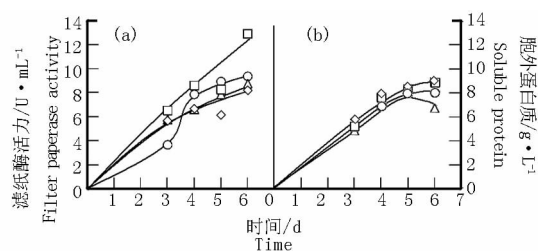


图2 不同接种时间对于滤纸酶活力和胞外蛋白质生产的影响

Fig. 2 The influence of different inoculation time on filter paperase activity and soluble protein concentration

(a)滤纸酶活力;(b)胞外蛋白质;□前培养 24 h;◇前培养 36 h;△前培养 48 h;○前培养 60 h

(a)Filter paperase activity;(b)Soluble protein concentration;
□Inoculation time 24 hours;◇Inoculation time 36 hours;
△Inoculation time 48 hours;○Inoculation time 60 hours

2.3 不同产酶发酵温度对里氏木霉发酵产酶的影响

从图3可以看出,产酶阶段的温度对产酶有明显的影响。当温度为32℃时,发酵液中的酶活和蛋白质含量均为最高。分别为13.5 U·mL⁻¹和13 g·L⁻¹。虽然有文献报道,里氏木霉的最适生长温度是30℃^[19]。但从试验结果来看,在发酵温度26℃和28℃的情况下,里氏木霉的生长速度较慢,从而使得其FPA和蛋白质产量明显降低,而32℃培养下的FPA和蛋白质产量远远高于30℃,可能是由于温度高促进其转录翻译水平。

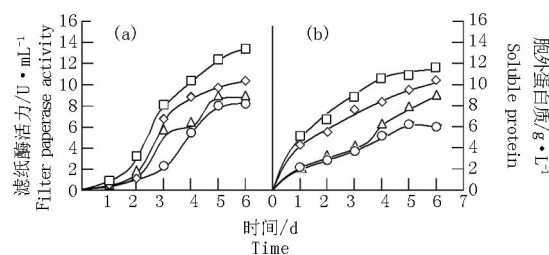


图3 不同培养温度对于滤纸酶活力和胞外蛋白质生产的影响

Fig. 3 The influence of different culture temperature on filter paperase activity and soluble protein concentration

(a)滤纸酶活力;(b)胞外蛋白质;□培养温度 32℃;◇培养温度 30℃;△培养温度 28℃;○培养温度 26℃

(a)Filter paperase activity;(b)Soluble protein concentration;
□Culture temperature 32℃;◇Culture temperature 30℃;
△Culture temperature 28℃;○Culture temperature 26℃

2.4 不同初始 pH 对里氏木霉发酵产酶的影响

从图4可看出,培养基的不同初始 pH 对里氏木霉产酶有明显影响,其中初始 pH 为4.0和

5.5的情况下,酶活力基本一致,比初始 pH 为5.0的酶活力高约50%。但是与初始 pH 为4.0相比,pH 为5.5的条件下胞外蛋白质的生产速率较快,可能是由于其跟种子 pH 相近,缩短了产酶培养基的适应时间,所以产酶较早。因此可以认为 pH 5.5 是产酶过程中最优的初始 pH。

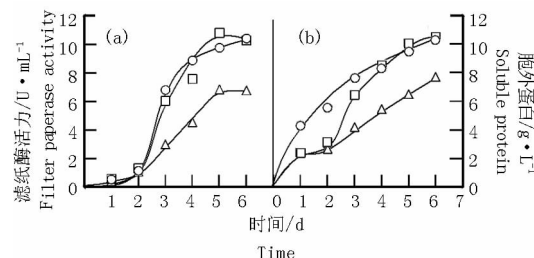


图4 不同初始 pH 对于滤纸酶活力和胞外蛋白质生产的影响

Fig. 4 The influence of different initial pH on

filter paperase activity and soluble protein concentration

(a)滤纸酶活力;(b)胞外蛋白质;□初始 pH 为 4.0;△初始 pH 为 5.0;○初始 pH 为 5.5

(a)Filter paperase activity;(b)Soluble protein concentration;
□Initial pH 4.0;△Initial pH 5.0;○Initial pH 5.5

2.5 优化前后的比较

优化后的工艺条件,微生物的前培养时间从48 h 缩短到 24 h,产酶温度从30℃提高到32℃,初始 pH 从4.0改为5.5。从表2可看出,优化前的产酶工艺和国内相关报道的数据^[15]接近。工艺的优化使纤维素酶生产的滤纸酶活力从优化前的4.2 U·mL⁻¹提高到13.0 U·mL⁻¹,而胞外蛋白质从原来的3.8 g·L⁻¹提高到11.8 g·L⁻¹,提高幅

表2 培养条件优化前后及国内外报道的滤纸酶活力和胞外蛋白质生产的比较

Table 2 Comparison of cellulase production among the optimized culture condition and other references

项目	滤纸酶活力 /U·mL ⁻¹ Filter paperase activity	胞外蛋白质 /g·L ⁻¹ Soluble protein concentration
优化后	13.0	11.8
After the optimization		
优化前	4.2	3.8
Before the optimization		
国内报道 ^[15]	5.3	4.1
National report		
国外报道 ^[16]	13.0	26.0
Foreign report		

度均在 3 倍以上。通过光学显微镜观察微生物的生长状态,优化后条件培养下的菌丝不仅较优化前的更粗壮,菌丝的密度也更密集,说明优化后工艺条件更有利于里氏木霉的快速生长,从而促进了纤维素酶的生产(见图 5)。但是,与日本 Ikeda 等报道的文献数据^[16]相比较,虽然滤纸酶活力相当,但是胞外蛋白质产量却低很多。Ikeda 等在产酶培养基配方中所用的碳源是纤维素粉(Solka floc),纤维素的含量约为 88.0%,远远高于木糖渣的 62.6%^[9]。由此可见,碳源中纤维素的含量对于胞外蛋白质的产量有很大的影响。

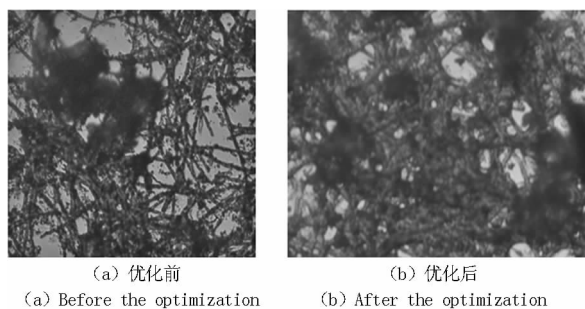


图 5 培养条件优化前后的菌丝生长状态的比较

Fig. 5 Comparison on growth condition of mycelial state before and after optimized

3 结论与讨论

该文主要围绕纤维素酶的高产菌株里氏木霉 FST-1 进行了产酶工艺优化,首先确定了最优培养基为 4 号培养基,即麸皮 6%,木糖渣 3%,蛋白胨 0.6%, NaNO_3 0.4%, KH_2PO_4 0.5%,尿素 0.1%。并确定其最适菌种前培养时间为 24 h,最适产酶温度为 32℃,最适初始 pH 为 5.5。经过优化,该菌株滤纸酶活力和蛋白质产量都有较大的提高,最终滤纸酶活力达到 $13.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,胞外蛋白质含量达到 $11.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,达到了国外文献报道的水平。而且研究发现,菌种前培养时间、产酶温度、初始 pH 以及碳源中的纤维素含量是影响纤维素酶生产的主要因素。工艺中采用工业废弃物-木糖渣作为碳源,平均价格在 $50 \text{ 元} \cdot \text{t}^{-1}$ 以下,远比 Ikeda 等^[16]使用的纤维素粉($15\ 000 \text{ 元} \cdot \text{t}^{-1}$)价格低廉,因此该生产工艺具有很强的经济竞争力。为利用纤维素酶生产廉价的秸秆乙醇提供了经济可行的工业化技术。

参考文献:

- [1] 张艾莉,王成军. 燃料乙醇工业的发展对我国环境保护的贡献[J]. 全球科技经济瞭望,2007(2):54-55.
- [2] 郭平. 多因素影响纤维沥青胶浆流变性能研究[J]. 广西大学学报:自然科学版,2010,35(1):105-109.
- [3] 邓勇,房俊民,陈方,等. 生物燃料最新发展态势分析[J]. 中国生物工程,2008,28(8):142-147.
- [4] 冯健玲,姚晓华,韦秉兴,等. 稻草秸秆纤维素分解菌的分离筛选[J]. 基因组学与应用生物学,2009,28(3):477-480.
- [5] Qu Yinbo, Zhu Mingtian, Liu Kai, et al. Studies on cellulosic ethanol production for sustainable supply of liquid fuel in China[J]. Biotechnol Journal, 2006, 1(1):1235-1240.
- [6] Fang Xu, Shen Yu, Zhao Jian, et al. Status and prospect of lignocellulosic bioethanol production in China [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(13):4814-4819.
- [7] 匡廷云,白克智,杨秀山. 我国生物质能发展战略的几点意见[J]. 化学进展,2007,19(7):1060-1063.
- [8] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition[J]. Bioresource Technology, 2000, 74(1):25-33.
- [9] Liu Kai, Lin Xiaohui, Yue Jun, et al. High concentration ethanol production from corn cob residues by fed-batch strategy [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(13):4952-4958.
- [10] Ouyang Jia, Dong Zhenwei, Song Xiangyang, et al. Improved enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose (Avicel PH101) by polyethylene glycol addition[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(17):6685-6691.
- [11] Zhang Mingjia, Su Rongxin, Qi Wei, et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by optimizing enzyme complexes[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(5):1407-1414.
- [12] Wang Mingyu, Li Zhonghai, Fang Xu, et al. Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production[J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2012, DOI: 10. 1007/10_2011_131.
- [13] Himmel M E, Ding S Y, Johnson D K, et al. Biomass recalcitrance engineering plants and enzymes for biofuels production[J]. Science, 2007, 315(5813):804-807.
- [14] Sanchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi[J]. Biotechnology Advance, 2009, 27(2):185-194.
- [15] 张辉,桑青. 响应面法优化黑曲霉 HQ-1 产纤维素酶固体发酵条件[J]. 中国酿造,2011(7):17-22.
- [16] Ikeda Y, Hayashi H, Okuda N, et al. Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus* [J]. Biotechnol Prog, 2007, 23(2):333-338.
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical biochemistry, 1976, 72(1-2):248-254.
- [18] Yamanobe T, Mitsuishi Y, Takasaki Y. Isolation of a cellulolytic enzyme producing microorganism, culture conditions and some properties of the enzyme[J]. Agricultural Biology and Chemistry, 1987, 51 (1):65-74.
- [19] 刘凯,林建强,曲音波. 纤维素酶生产技术[J]. 生物产业技术, 2008, 1(4):54-60.

侧孢芽孢杆菌 HBL-26 发酵条件的优化研究

赵云彤

(黑龙江省农业科学院 牡丹江分院,黑龙江 牡丹江 157041)

摘要:为对拮抗菌株 HBL-26 的发酵培养基进行优化,通过正交试验设计对发酵液的 4 个单因子进行优化筛选,经软件分析后确定发酵培养基最佳配方为:葡萄糖 6 g·L⁻¹、牛肉膏 14 g·L⁻¹、NaCl 6 g·L⁻¹、MnSO₄ 0.05 g·L⁻¹。同时,得到回归方程: $Y=5.34X_1-1.72X_2+14.44X_3-6.43X_4+8.35$,其标准差 $S=14.23$; $F=4.202$;显著值 $\text{Sig.}=0.019<0.05$ 。最后通过单因子试验对菌株 HBL-B26 的发酵条件进行了优化,确定的最优培养条件为:培养基初始 pH 8、发酵温度 30℃、发酵最佳时间为 48 h。

关键词:侧孢芽孢杆菌;发酵条件;优化

中图分类号:TQ920.6

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)05-0112-05

侧孢芽孢杆菌是具有多种功能的微生物^[1-3]。国内外许多文献相继报道侧孢芽孢杆菌具有杀虫、抗菌、抗肿瘤和降解污染物等多种生物功能^[4-8],在微生物农药研究方面前景十分广阔。研究表明其发酵上清液对多种植物病原真菌具有抑制作用,如小麦赤霉、烟草赤星病菌等,因此该试验对其发酵培养基与发酵条件进行优化,旨在提高抑菌物质浓度,达到更好的防治效果,同时为其抑菌物质的结构性质分析提供研究基础,为其无

公害农药的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株为侧孢芽孢杆菌 HBL-26 (*Brevibacillus laterosporus*);甜瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Snyder & Hansen)。

1.2 主要培养基及试剂

1.2.1 牛肉膏蛋白胨培养基 牛肉膏 3 g, NaCl 1.0 g, 蛋白胨 5 g, 水 1 000 mL, pH7。

1.2.2 PDA 培养基 200 g 已去皮的马铃薯切成块,煮沸 0.5 h,纱布过滤后滤液中加 20 g 蔗糖、20 g 琼脂融化后,加蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 自然。

收稿日期:2012-03-12

作者简介:赵云彤(1983-),女,黑龙江省双鸭山市人,硕士,研究实习员,从事微生物和植物保护研究。E-mail:zyt-37@163.com。

Optimization of Cellulose Production by *Trichoderma reesei*

WANG Guan¹, WANG Ming-yu², MU Zi-ming², HOU Shao-li², ZHANG Jie², FU Xiao-ping¹, FANG Xu²

(1. Veterinary Medicine College of Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070;

2. Life Science College of Shandong University, Jinan, Shandong 250100)

Abstract: Reducing cellulose production cost through improving cellulose titers during the fermentation is a key strategy for developing economically competitive bioethanol production from lignocellulosic biomass. Medium composition and inoculate time, temperature, initial pH and other factors were key factors to cellulose production. For the purpose to fully used *Trichoderma reesei* to produce cellulose, the influence of medium composition and growth condition of the cellulose-producing strain *Trichoderma reesei* FST-1 on its enzyme production was investigated. The result showed that the contents of wheat bran, peptone and KH₂PO₄ had the significant effect on cellulose titer, the No. 4 medium was the best medium. Through the study on different enzyme production condition, it found that the optimum inoculation time was 24 hours, the optimum temperature was 32℃ and the optimum initial pH was 5.5. Cellulose titer and soluble protein content were increased 3 times with optimized culture condition.

Key words: *Trichoderma reesei*; cellulose; pH; temperature; optimization