

pH 值对绿色木霉合成纤维素酶的影响

季更生, 林弦, 曹阳, 朱婵 (江苏科技大学生物与环境工程学院, 江苏镇江212018)

摘要 以绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 为产酶菌, 研究了不同pH值控制方法对绿色木霉合成纤维素酶的影响。结果表明, 初始pH值对绿色木霉合成纤维素酶的影响较大, 当初始pH值为4.5时, 纤维素酶活力到第7天达到40.74 IU/ml; 而初始pH值为6.0时, 纤维素酶活力到第7天仅有29.02 IU/ml。采用产酶过程调控pH值, 当pH值7.5为最佳调控点, 此时纤维素酶活力最高可达41.35 IU/ml。采用0.1 mol/L的柠檬酸缓冲液调节产酶过程中的培养基pH值; 经过6 d培养; 纤维素酶活力可达58.70 IU/ml。

关键词 pH值; 绿色木霉; 纤维素酶

中图分类号 TQ25 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)27-08593-02

Effects of pH Value on the Production of Cellulase from *Trichoderma viride*

Ji Gengsheng et al (Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018)

Abstract The effects of pH value on production of cellulase from *Trichoderma viride* were investigated. The results showed that the cellulase activity was 40.74 IU/ml when the initial pH value of culture media was 4.5. And the cellulase activity was 29.02 IU/ml when the initial pH value of culture media was 6.0. While pH value of culture media was maintained at 7.5, the cellulase activity was 41.35 IU/ml. The maximal cellulase activity reached 58.70 IU/ml at the sixth day when the buffer solution of 0.1 mol/L citric acid was used to control pH value of culture media.

Key words pH value; *Trichoderma viride*; Cellulase

研究表明, 用酒精代替或部分代替汽油作为汽车燃料, 可提高燃烧值, 改善防爆性能, 减少有毒物质排放, 利于保护环境^[1]。我国有丰富的植物纤维资源, 通过适当预处理, 各种类型的生物质原料都可作为酒精发酵的底物^[2]。但要以生物质纤维原料来发酵生产酒精, 必须采用合适的方法来降解纤维素和半纤维素, 而纤维素酶解法具反应温和、环境污染小等特点。绿色木霉是生产纤维素酶的一种常用的菌株, pH值直接影响该菌的生长和酶的合成。笔者以绿色木霉为产酶菌, 研究不同pH值对合成纤维素酶的影响, 为经济有效地生产纤维素酶, 提供技术参数和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 菌种。绿色木霉 (*Trichoderma viride*), 可降解纤维素的菌种, 于4℃保存在木糖-马铃薯-琼脂斜面培养基上, 购于中国微生物菌种保藏管理中心(CICC, 编号

13047)。碳源物质。纸浆: 硫酸盐纸浆粉碎至60~100目备用, 由镇江造纸厂提供; 葡萄糖和纤维素: 分析纯AR, 购于上海化学试剂有限公司。产酶培养基。纤维素酶制备培养基采用如下配方(单位:g/L): 磷酸二氢钾2, 七水硫酸镁0.08, 二水氯化钙0.4, 七水硫酸亚铁0.005, 一水硫酸锰0.0016, 七水硫酸锌0.0014。纸浆、葡萄糖、尿素和蛋白胨等适量, 使碳氮比值控制在4.0~8.0。

1.2 方法 纤维素酶的制备。在250 ml三角烧瓶中, 加入50 ml产酶培养基和一定量的菌丝体, 在28~30℃、150~175 r/min的恒温振荡器上培养。取样于2000 r/min条件下离心10 min, 所得上清液即为纤维素酶粗酶液。可溶性蛋白质测定。采用Bio-Rad^[4]法。还原糖浓度测定。采用DNS(3,5-二硝基水杨酸)法^[6]。纤维素酶活测定。采用国际理论和应用化学协会(IUPAC)推荐的方法^[5]。

表1 初始pH值对合成纤维素酶的影响

初始 pH值	产酶过程培养基pH值				还原糖浓度 g/L				纤维素酶酶活力 IU/ml			
	1 d	3 d	5 d	7 d	1 d	3 d	5 d	7 d	1 d	3 d	5 d	7 d
4.0	4.22	4.78	5.77	7.57	1.035	0.981	1.328	1.497	4.06	20.40	32.23	34.45
4.5	5.00	5.01	6.52	8.17	0.095	0.087	1.401	1.631	4.41	24.95	37.57	40.74
5.0	6.23	6.67	7.33	8.84	1.023	1.007	1.374	1.518	4.10	22.73	29.26	35.23
5.5	6.43	6.75	7.85	9.00	1.213	1.065	1.241	1.411	3.58	21.74	25.23	30.29
6.0	6.67	7.92	8.26	9.73	1.253	1.175	1.242	1.398	3.39	17.27	25.19	29.02

2 结果与分析

2.1 初始pH值对合成纤维素酶的影响 采用酸碱调节产酶培养基的初始pH值, 结果表明(表1), 产酶培养基初始pH值对绿色木霉合成纤维素酶的影响较大。随着培养时间的增加, 产酶培养基溶液的pH值不断上升, 纤维素酶酶活力也随时间不断增大。培养7d后, 初始pH值为4.0、4.5、5.0、5.5和6.0的培养液纤维素酶酶活力分别为34.45、40.74、35.23、30.29和29.02 IU/ml。其中, 初始pH值为4.5的培养液在整个过程中, 纤维素酶活力始终保持最高, 到第7天达最大

值40.74 IU/ml。另外, 从培养液还原糖浓度来看, 当初始pH值为4.5时, 还原糖浓度在第3天的相对最低0.087 g/L上升到第7天的最高1.631 g/L, 说明在此期间, 酶液中纸浆的分解率最快。分析原因, 可能是培养基初始pH值4.5有利于菌丝细胞的生长, 在显微镜下也可观察到在此pH值条件下绿色木霉菌丝生长良好。

2.2 产酶过程控制pH值对产纤维素酶的影响 在整个培养过程中, 每隔8 h, 采用无菌酸碱调整控制产酶培养基的pH值, 结果表明(表2), 随着培养时间的增加, 产酶培养基溶液的纤维素酶酶活力不断增大。培养7d后, pH值为5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0和8.5的纤维素酶酶活力分别为12.45、17.63、21.83、29.96、33.78、41.35、27.89和19.24 IU/ml。其

作者简介 季更生(1973-), 男, 浙江义乌人, 博士, 讲师, 从事生物质资源生物转化研究。

收稿日期 2007-05-18

中,当培养基pH 值控制为7.5 时,在整个培养过程中纤维素酶活力始终保持最高,到第7 天达最大值41.35 IU ml。一般来说,绿色木霉等真菌生长最适pH 值范围为4.0 ~5.0,但从表2 结果来看却不利于绿色木霉的产酶。当控制培养基溶液pH 值为5.0 时,培养到第7 天时仅有12.45 IU ml,仅为控制pH 值为7.5 时的30.1 %。

2.3 采用缓冲液调控pH 值对产纤维素酶的影响 从图1 可见,尽管采用了不同浓度的柠檬酸缓冲液来控制溶液的pH 值,但随着培养时间的增加,培养液的pH 值却呈不断上升趋势。这种规律与仅控制培养基初始pH 值的产酶时的规

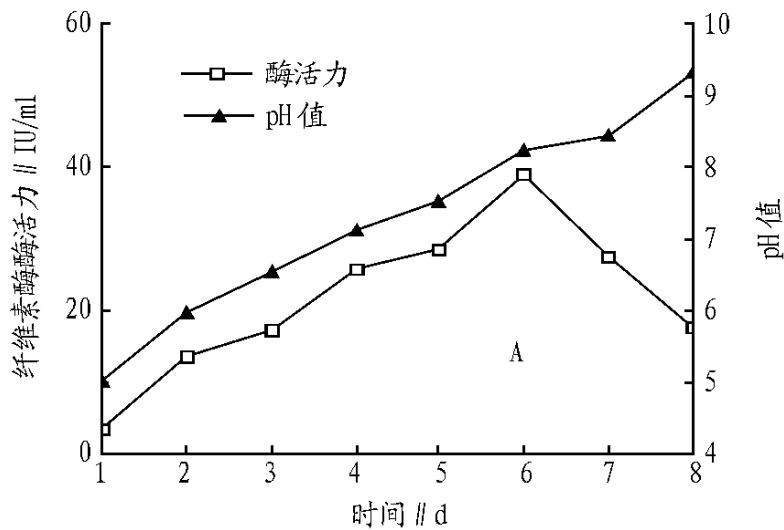
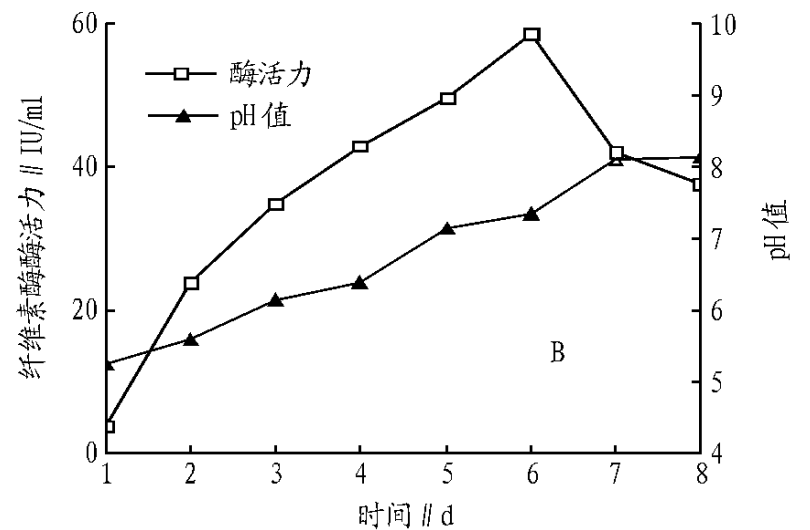


表2 过程控制pH 值对产纤维素酶的影响

控制pH 值	纤维素酶酶活力 IU ml				还原糖浓度 g/L			
	1 d	3 d	5 d	7 d	1 d	3 d	5 d	7 d
5.0	4.46	8.33	11.36	12.45	1.276	1.386	1.558	1.417
5.5	4.77	13.02	15.95	17.63	1.104	1.137	1.206	1.536
6.0	4.57	12.48	20.44	21.83	1.083	1.163	1.430	1.513
6.5	4.25	17.99	28.22	29.96	0.537	1.032	1.442	1.455
7.0	4.01	19.87	28.67	33.78	0.565	0.865	1.195	1.434
7.5	4.86	24.32	38.92	41.35	0.471	0.979	1.530	1.335
8.0	3.63	16.14	26.52	27.80	0.811	1.083	1.272	1.455
8.5	2.20	11.31	18.11	19.24	0.808	1.271	1.473	1.313



注:A. 采用0.05 ml/L 柠檬酸缓冲液;B. 采用0.10 ml/L 柠檬酸缓冲液。

图1 采用缓冲液调控pH 值对产纤维素酶的影响

律大致相同。说明绿色木霉在产酶培养过程中可能分泌一类碱性物质,使得培养液pH 值逐步上升。然而,培养液中纤维素酶酶活力变化却呈现“先上升后下降”的规律。仅培养了6 d,培养液中纤维素酶酶活力分别都达到了最大值,分别为38.92 和58.70 IU ml,此时培养基的pH 值分别为8.24 和7.36,两值和过程控制时的最佳pH 值7.5 相当接近。与前两种pH 值控制方法比较可发现,尽管前两种方法经7 d 培养后,纤维素酶活力仍有上升趋势,但明显变缓。而且依靠增加时间来提高酶产量,同样会增加成本。而通过合适浓度的缓冲溶液来控制培养基的pH 值,可在较短的时间内使纤维素酶活力达到最大值。总之,绿色木霉等真菌的纤维素酶是一种胞外酶,pH 值直接影响细胞膜所带的电荷,从而影响到细胞膜的通透性,最终影响到细胞纤维素酶向胞外分泌;而且绿色木霉生长状况也会影响酶的产量。因此,要获得较高的纤维素酶酶活力的培养方法,必须同时兼顾绿色木霉等微生物的生长和产酶的最适pH 值等条件。

3 结论

初始pH 值对绿色木霉合成纤维素酶的影响较大。初始

pH 值为4.5 的培养液在整个过程中,纤维素酶活力始终保持最高,培养7 d 后该值为40.74 IU ml。

采用产酶过程调控pH 值,当pH 值7.5 为最佳调控点,最高纤维素酶活力可达41.35 IU ml。

利用浓度为0.1 ml/L 柠檬酸缓冲液调节产酶过程中的培养基pH 值,可使pH 值保持在一定的范围内缓慢上升,其中纤维素酶活力最高为58.70 IU ml,分别为采用不同初始pH 值(4.5) 和过程调控pH 值(7.5) 时达到最高值的1.44 倍和1.42 倍。

参考文献

- [1] 勇强,徐勇,宋向阳,等.玉米秸秆生物法制取酒精的中间试验[J].纤维素科学与技术,2006,14(3):37-40.
- [2] HMANND,SHELL DJ,RILEY C J,et al. Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology[J]. Appl Biochem Biotechnol,1992,34/35:639-649.
- [3] 陈毓荃.生物化学实验方法和技术[M].北京:科学出版社,2002.
- [4] MILLER GI. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry,1959(3):426-428.
- [5] MANDELS M,ANDREOTTI R,ROCHE C. Measurement of saccharifying cellulose[J]. Biotechnology Bioengineering Symposium,1976(6):21-33.