

绿色木霉合成纤维素酶部分培养条件的优化

邵喜霞¹, 韩大勇², 张力^{2*}

(1. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃兰州 730070; 2. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏泰州 225300)

摘要 [目的] 确定绿色木霉 ZJ 株产纤维素酶的最佳诱导时间和诱导物, 为其实际应用提供条件。[方法] 接种绿色木霉 ZJ 株 7 d 内, 每天取培养物样品, 采用 3, 5-二硝基水杨酸法检测产酶量。将绿色木霉 ZJ 株接种添加了不同碳源或氮源的基础培养基中, 观察绿色木霉的生长情况, 测定菌丝重量, 检测不同培养时间的培养物中 CMCase 酶的产量。[结果] 绿色木霉 ZJ 株的最适培养时间为 72~96 h; 绿色木霉在以单糖、双糖为碳源的培养基中均能迅速生长, CMCase 酶产量在 3~4 d 时达到高峰, 以纤维素粉的诱导效果最佳; 以硫酸铵与酵母膏组成的复合氮源最适合绿色木霉 ZJ 菌丝的生长, 产酶活力最高。[结论] 接种后 3~4 d 收获绿色木霉 ZJ 株培养物可获得最大产酶量; 以纤维素粉作为碳源, 以硫酸铵与酵母膏组成的复合氮源为氮源, 绿色木霉的产酶活力最高。

关键词 绿色木霉; 纤维素酶; 诱导合成; 碳源; 氮源

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)23-10893-02

Optimization of Some Culture Conditions for Biosynthesis of Cellulase by *Trichoderma viride*

SHAO Xi-xia et al (College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract [Objective] To determine the best culture time and inducer for the biosynthesis of cellulase by *Trichoderma viride* and thus provide the conditions for its practical application. [Method] Within the 7 d after the inoculation of *Trichoderma viride* ZJ strain, the cultures were collected once every day, and the enzyme yield was respectively determined by 3, 5-dinitrosalicylic acid assay. The *Trichoderma viride* ZJ strain was inoculated into basal medium added by different types of carbon sources or nitrogen sources, and the growth of *Trichoderma viride* was observed. And the mycelium weight as well as the yield of CMCase enzyme after different culture time was determined. [Result] The optimal culture time for *Trichoderma viride* ZJ strain was 72-96 h; it grew rapidly in the medium added by monosaccharide or disaccharide as carbon sources, and the production of CMCase enzyme reached a peak after 3-4 d post inoculation. Cellulose powder was the best carbon inducer. The compound nitrogen source composed of 1 g/L ammonium sulfate and 2 g/L yeast extract was the most suitable for the growth of ZJ strain and produced the highest enzyme activity. [Conclusion] The largest enzyme yield should be obtained after 3-4 d post the inoculation of *Trichoderma viride* ZJ strain. With cellulose powder as a carbon source and the complex substance composed of ammonium sulfate and yeast extract as a nitrogen source, *Trichoderma viride* has the highest enzyme activity.

Key words *Trichoderma viride*; Cellulase; Induced synthesis; Carbon source; Nitrogen source

纤维素酶(Cellulase)是降解纤维素生成葡萄糖的一种多酶体系,其制剂在食品、医药、洗涤剂、纺织、植物遗传育种、饲料等领域具有广泛的应用价值。但是,纤维素酶较低的产量和比活力影响了其实际应用^[1]。近年来,纤维素酶合成的调节机制成为纤维素酶研究的一个新的焦点^[2]。阐明纤维素酶诱导形成的机制和调节控制的原理,为改变培养条件、提高纤维素酶产量和设计筛选模型选育高效的菌种提供新的线索和手段。真菌纤维素酶是一种复杂的酶系,也是一种诱导酶。碳源、氮源均是纤维素酶诱导物的主要来源^[3],在纤维素酶合成的诱导调控中具有重要作用。笔者研究了不同培养时间以及不同碳源或氮源条件下绿色木霉(*Trichoderma viride*)的生长和合成纤维素酶的活力,确定了其最佳诱导时间和诱导物,为其在生产中的实际应用提供基础。

1 材料与与方法

1.1 菌种 绿色木霉 ZJ 株,由江苏畜牧兽医职业技术学院分子生物学实验室分离鉴定,于 PDA 斜面培养基上置 4℃ 保存。

1.2 培养基 PDA 斜面培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,水 1 L,自然 pH 值);种子培养基(7.5 g/L 羧甲基纤维素钠(CMC-Na),5 g/L 蛋白胨,2% (V/V) 吐温-80,0.3 g/L MgSO₄,0.3 g/L CaCl₂,5 mg/L FeSO₄,5 mg/L MnSO₄,1.7 mg/L ZnSO₄,1.7 mg/L CoCl₂,自然 pH 值);基础培养基 I(10 g/L (NH₄)₂SO₄,2% (V/V) 吐温-80,0.3 g/L MgSO₄,0.3 g/L CaCl₂,5 mg/L FeSO₄,5 mg/L MnSO₄,1.7 mg/L ZnSO₄,1.7

mg/L CoCl₂,自然 pH 值);基础培养基 II(7.5 g/L CMC-Na,2% (V/V) 吐温-80,0.3 g/L MgSO₄,0.3 g/L CaCl₂,5 mg/L FeSO₄,5 mg/L MnSO₄,1.7 mg/L ZnSO₄,1.7 mg/L CoCl₂,自然 pH 值)。以上培养基于 121℃、0.1 MPa 下灭菌 15 min 后,置 4℃ 保存。

1.3 绿色木霉的培养 挑取斜面孢子接于种子培养基中,于摇床中 30℃,280 r/min 振荡培养 24 h。

1.4 纤维素酶酶活力的测定 采用 3, 5-二硝基水杨酸(DNS)法^[4]测定纤维素酶的酶活力。以无水葡萄糖梯度溶液绘制标准曲线,检测酶液样品的 OD₅₄₀ 从而确定还原糖的含量,并计算羧甲基纤维素酶(CMCase)的酶活力。在 37℃,pH 值为 5.5 的条件下,每分钟从浓度为 4 mg/ml 的羧甲基纤维素钠溶液中降解释放 1 μmol 还原糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.5 不同培养时间纤维素酶酶活力的测定 挑取绿色木霉 ZJ 孢子接种于液体培养基,于摇床中 30℃,280 r/min 振荡培养。在接种后的 1 周内,每 24 h 取 10 ml 培养产物。所得培养物于 3 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液,检测其 CMCase 的活力。

1.6 碳源诱导物对绿色木霉生长和产酶活力的影响 分别于基础培养基 I 中,各加入终浓度均为 10 g/L 的葡萄糖、果糖、纤维二糖、蔗糖、纤维素粉、羧甲基纤维素钠。在添加了不同碳源的基础产酶培养基 I 中加入琼脂(15~20 g/L),制成固体培养基,接种绿色木霉 ZJ 斜面孢子,每隔 12 h 观察 1 次绿色木霉的生长情况。同时,将 5 ml 绿色木霉培养物分别接种 100 ml 含不同碳源的基础培养基 I,于摇床中 30℃,280

作者简介 邵喜霞(1982-),女,甘肃定西人,硕士研究生,研究方向:秸秆微生物的降解。*通讯作者。

收稿日期 2009-01-20

r/min 振荡培养, 每 24 h 取样测定 CMCase 酶活力的变化, 连续取样 6 d。

1.7 氮源诱导物对绿色木霉生长和产酶活力的影响 分别于基础培养基II中, 各加入终浓度为 10 g/L 的硫酸铵、酵母膏、蛋白胨、NaNO₃、10 g/L 硫酸铵 + 20 g/L 酵母膏、10 g/L 硫酸铵 + 20 g/L 蛋白胨。然后, 将 5 ml 绿色木霉培养物分别接种 100 ml 含不同氮源的基础培养基II, 于摇床中 30 °C, 280 r/min 振荡培养。培养基液态发酵 72 h 后, 用已知重量的滤纸收集菌丝, 烘至恒重, 收集滤液, 制成粗酶液, 测定 CMCase 酶活力。

2 结果与分析

2.1 培养时间对绿色木霉产酶量的影响 对绿色木霉 ZJ 株不同培养时间后 CMCase 的酶活力进行了测定, 结果如图 1 所示。由图 1 可知, 在整个生长过程中绿色木霉产酶活力的变化比较明显。初期是菌丝大量生长阶段, 产酶活力相对较低; 48 h 后, 酶产量迅速增加; 72 h 时进入产酶高峰期, 然后进入产酶稳定阶段; 96 h 后, 随着培养时间的延长酶产量下降。

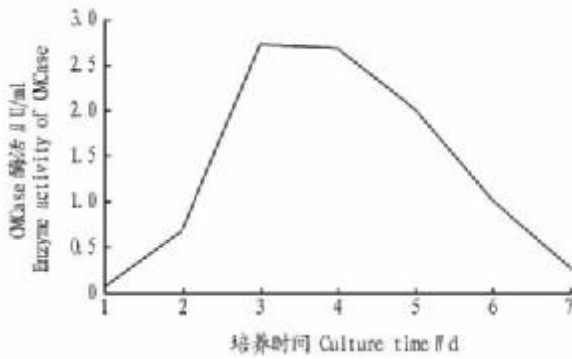


图 1 不同培养时间对绿色木霉 ZJ 株合成纤维素酶的影响

Fig. 1 Effects of different culture time on biosynthesis of cellulose by *Trichoderma viride* ZJ strain

2.2 碳源对绿色木霉生长和合成纤维素酶的影响

2.2.1 碳源对绿色木霉生长的影响。将绿色木霉 ZJ 株接种添加了不同碳源的固体培养基, 观察其生长情况。在以单糖、双糖为碳源的固体培养基上, 菌体均能迅速生长; 接种后 48 h, 在含有单糖的培养基上菌丝生长不明显, 而在含有双糖的培养基上, 96 h 后出现菌丝生长不明显的现象; 菌株在含有多糖的培养基上一开始生长缓慢, 有一定的生长停滞期, 48 h 后生长加快。

2.2.2 碳源对合成纤维素酶的影响。在基础产酶培养基I中分别添加了葡萄糖、果糖、纤维二糖、蔗糖、纤维素粉、羟甲基纤维素钠 6 种不同的碳源, 每 24 h 取样测定 CMCase 产量的变化, 结果如图 2 所示。在不同碳源的培养基中均有酶生成, 以纤维素粉的诱导效果最佳; 随着培养时间的延长, CMCase 产量不断增加, 均在培养 3~4 d 时达到高峰。

2.3 氮源对绿色木霉合成纤维素酶的影响 在基础产酶培养基II中分别添加 6 种不同的碳源或碳源组合, 接种绿色木霉 3 d 后称取菌丝重量并测定 CMCase 酶的活力 (图 3)。由图 3 可以看出, 在绿色木霉 ZJ 接种不同氮源的培养基 3 d 后, 以硫酸铵和酵母膏组成的复合氮源为氮源的菌株产酶活力最高, 这可能与其含有的丰富的营养因子有关^[5-6]。其次

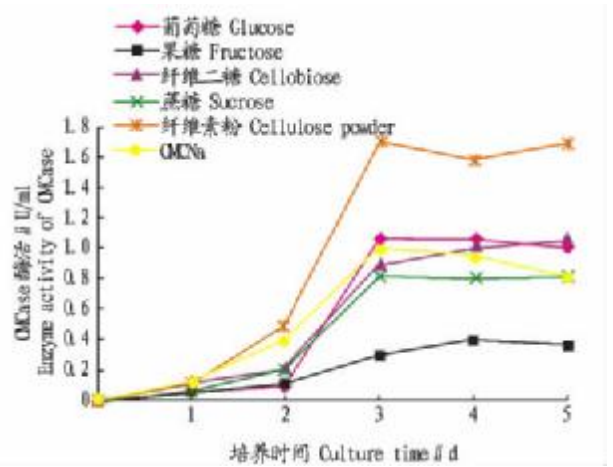


图 2 不同碳源对绿色木霉 ZJ 株合成纤维素酶的影响

Fig. 2 Effects of different carbon sources on biosynthesis of cellulose by *Trichoderma viride* ZJ strain

是以酵母膏为唯一氮源或硫酸铵和蛋白胨组成的复合氮源为氮源的菌株, 两者的产酶效果相当。此外, 菌体的生长情况与酶活力的大小成正比。复合氮源既有利于菌丝生长, 又有利于菌株发酵产酶。而硫酸铵是绿色木霉产酶和生长的最佳无机氮源, 可能是由于它能使生长环境变为酸性, 从而有利于菌体的生长。

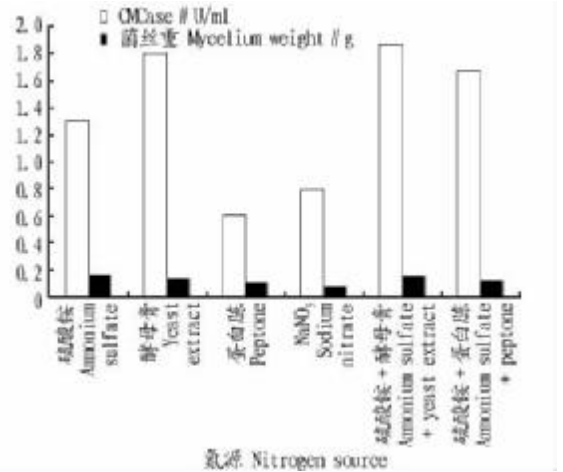


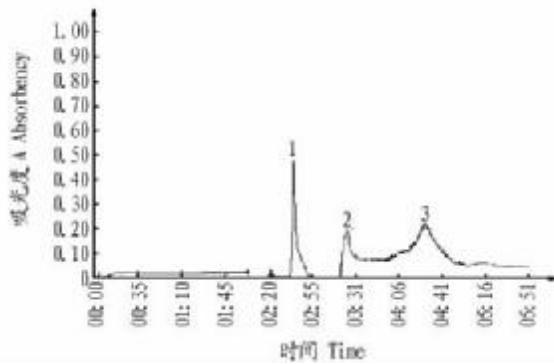
图 3 不同氮源对绿色木霉 ZJ 生长及产酶活性的影响

Fig. 3 Effects of different nitrogen sources on growth and enzyme activity of *Trichoderma viride* ZJ strain

3 结论与讨论

本研究以绿色木霉 ZJ 为产酶菌株, 探讨了不同培养时间纤维素酶产量的变化。接种后 72~96 h, 绿色木霉 ZJ 株的产酶量较高, 适宜收获制备酶液。此外, 在纤维素酶制备过程中, 酶的合成同时受诱导物和酶蛋白前体的调控, 诱导物主要来自于碳源, 而酶蛋白的前体则主要来自于氮源。该研究对不同碳源影响绿色木霉生长和合成 CMCase 酶的分析表明, 纤维素粉对酶的诱导活性优于其他碳源, 以结构比较完整的纤维类物质作为碳源时对纤维素酶的产生具有较强的诱导作用。和碳源一样, 氮源的种类和性质也影响酶的活力和产率^[7]。接种后 48 h 内, 虽然绿色木霉 ZJ 株在含有葡萄糖的培养基中能够快速生长, 但是其相应的酶产量却变化不大; 当葡萄糖被耗尽之后, 酶产量迅速增加。这表明葡萄糖的耗尽能够加速绿色木霉 ZJ 合成 CMCase 酶。但是与葡

(下转第 10896 页)



注:1 为 0.3 mol/L NaCl 缓冲液;2 为 0.6 mol/L NaCl 缓冲液;3 为 3.0 mol/L NaCl 缓冲液。

Note:1. 0.3 mol/L NaCl buffer; 2. 0.6 mol/L NaCl buffer; 3. 3.0 mol/L NaCl buffer.

图1 质粒 DNA 的 DEAE - 纤维素柱层析

Fig.1 DEAE fiber column chromatography of plasmid DNA

紫外分光光度计上测定柱层析后洗脱峰 1、2、3 在 260 nm、280 nm 波长处的 OD 值分别为 3.01 与 2.90、0.95 与 0.51、0.84 与 0.76, 其 OD_{260}/OD_{280} 分别为 1.04、1.86 与 1.10。

可以根据待测样品 A_{260}/A_{280} 估计核酸的纯度。一般认为纯的 DNA 样品, 该比值应在 1.80 ~ 2.00 之间, 小于此值, 说明有蛋白或酚等杂质的污染; 若大于此值, 说明有 RNA 污染^[3-5]。因此, 3.00 mol/L NaCl 洗脱峰 1 则是大部分蛋白质, 0.60 mol/L NaCl 的洗脱峰 2 则是质粒 DNA, 且浓度为 93.00 ng/ml, 3.00 mol/L NaCl 洗脱峰 3 则洗脱时牢固结合在柱上的杂质。

3 结论与讨论

由于经过 DEAE - 纤维柱层析纯化后, 将层析收集的各峰样品经浓缩, DNA 电泳检测, 结果表明, 浓度低的琼脂糖凝胶电泳检测不到, 但用紫外可见分光光度计检测质粒 DNA

的浓度及纯度。

质粒 DNA 在靶细胞中的基因表达效率低、持续时间短, 因此, 整个疗程需要数量可观的符合药理学规格的质粒 DNA^[6], 这就提出大规模制备质粒 DNA 的需要。大规模制备质粒 DNA 必须考虑下列问题: 产量、纯度、均一性、生物学功能、规范化和安全性^[7]。

现阶段大规模纯化质粒存在许多有待解决的问题。分离纯化主要除去 RNA, 宿主 DNA, 由于这些分子与质粒性质相似及分子量范围较宽, 分离纯化比较困难。该研究所得到的质粒 DNA 层析图谱清晰, 各个洗脱峰峰型较好, 分光光度法测定结果表明, 各个峰成分单一, 说明该法分离质粒 DNA 是可行的。该研究建立的工艺流程没有采用可能残留毒性物质的有机溶剂提取的方法, 但仅适用于实验室的中试规模, 若想进入大规模生产和质控流水线, 则还需摸索^[8]。

参考文献

- [1] FERREIRA N, MONTEIRO G A, PRAZERES D M, et al. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications [J]. Trends Biotechnol, 2000, 18 (9): 380 - 388.
- [2] PRATHER K J, SAGAR S, MURPHY J, et al. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production and purification [J]. Enzyme Microbial Technol, 2003, 33 (19): 865 - 883.
- [3] J. 萨姆布鲁克, EF. 弗里奇等. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 2.
- [4] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1.
- [5] 汪家政. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1.
- [6] 刘文华, 肖祥华, 施产甫, 等. pcDNA3 - 内皮抑素质粒的大规模纯化 [J]. 南京军医学院学报, 2003 (3): 148 - 150.
- [7] LEE S F, ANN P F, BLEIWEIS A S, et al. Molecular cloning and expression of a Streptococcus mutans major surface protein antigen P1 (V/D) in Escherichia coli [J]. Infect Immun, 1988, 56 (11): 2114 - 2119.
- [8] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 21 - 40.

(上接第 10894 页)

葡萄糖一样属于易利用型碳源的果糖却没有表现出这一特点, 仅有微量的酶产生。因此, 葡萄糖的耗尽是否解除了葡萄糖对产酶的阻遏作用, 或者葡萄糖在消耗过程中是否产生了某种诱导环境从而加速了酶的生成, 还有待进一步研究。

纤维二糖是纤维素降解的一个重要的中间产物, 一直以来对纤维二糖是否是纤维素酶的诱导物存在争议。曾有报道称纤维二糖主要抑制外切纤维素酶的水解活性^[8]。以纤维寡糖为底物的试验表明, 这种抑制作用是竞争性的, 也是可逆的, 胞外葡萄糖苷酶对纤维二糖的水解可有效解除它的抑制作用。对纤维性底物, 其抑制作用的机理还涉及到纤维二糖具有阻止纤维素酶吸附的作用。而纤维素酶的吸附又是其降解不溶性纤维素的必需阶段。在该研究中, 随着纤维二糖的消耗, 酶产量呈现出逐渐上升的趋势, 可以推断出纤维二糖是绿色木霉 ZJ 的有效诱导物。

此外, 氮源也是真菌纤维素酶合成的重要的诱导物之一。该研究的结果表明, 有机氮源比无机氮源更有利于产酶, 硫酸

铵和酵母膏组成的复合氮源促进菌株生长和诱导产酶的效果均比单一氮源的效果好。这可能是由于快速利用氮源和一般氮源的搭配使用有利于微生物的生长且有助于维持酶合成的最适环境。

参考文献

- [1] 曲音波, 高培基, 王祖农. 斜卧青霉纤维素酶系的酶学研究 [J]. 微生物学报, 1988, 28 (2): 121.
- [2] 杨永彬, 黄彦彦, 林跃鑫. 纤维素酶的结构和分子多样性 [J]. 生命的化学, 2004, 24 (3): 211 - 213.
- [3] 魏雅琴. 纤维素酶高产菌的筛选 [J]. 安全与环境学报, 2005, 5 (2): 82 - 86.
- [4] GILKES N R, HENRISSAT B, KILBURN D G, et al. Domains in microbial β -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families [J]. Microbiological Reviews, 1991, 55 (2): 303 - 315.
- [5] 刘颖, 张玮玮, 王魏. 绿色木霉产纤维素酶发酵条件的研究 [J]. 食品工业科技, 2008, (3): 128 - 130.
- [6] 纤维素降解菌绿色木霉 C-08 产酶条件研究 [J]. 哈尔滨工业大学学报, 2008, 40 (7): 1113 - 1115.
- [7] 勇强, 李树炎, 陈牧, 等. 氮源对里氏木霉木聚糖酶和纤维素酶生物合成的影响 [J]. 林产化学与工业, 2004, 24 (3): 7 - 11.
- [8] JUY M, AMITS G, ALXSTH P M, et al. Crystal structure of a thermotable bacterial cellulose degrading enzyme [J]. Nature, 1992, 357 (6373): 89 - 91.