

瑞氏木霉 QM9414 利用蔗渣发酵产纤维素酶的研究*

伍红^{1,2}, 秦天莺¹, 谭德勇², 农向³

(1. 西南民族大学 生命科学与技术学院, 四川 成都 610041; 2. 云南大学 生命科学学院, 云南 昆明 650091; 3. 乐山师范学院 化学与生命科学学院, 四川 乐山 614000)

摘要: 以蔗渣为培养基料, 通过单因子及正交试验, 对瑞氏木霉 QM9414 固体发酵产纤维素酶的产酶条件进行了探讨. 其优化的产酶条件为: 甘蔗渣 2.5 g, 麸皮 1 g, 加含 7.5 g/L (NH₄)₂SO₄ 的 Mandels 营养液 14 mL (干物质(g)与水(mL)的比例为 1:4), 调初始 pH 4.0, 30 °C 发酵 120 h. 在此优化条件下, 每克干曲产纤维素酶酶活力可达 8.26 U.

关键词: 蔗渣; 瑞氏木霉 QM9414; 正交实验; 固态发酵; 培养条件优化

中图分类号: Q 936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2008)06-0620-05

甘蔗渣是制糖工业的主要副产品, 是甘蔗机械压制后的剩余部分. 蔗渣的主要成分为 50.4% 的纤维素, 28.5% 的半纤维素, 14.9% 的木质素, 2% 的灰分以及 1.59% 的粗蛋白^[1]. 由于其木质化程度高, 难以消化, 因此很难作为动物饲料加以利用. 长期以来大量的甘蔗渣都作为燃料烧掉或废弃, 既浪费资源又污染了环境.

纤维素酶是降解纤维素为葡萄糖的一组酶的总称, 在食品、医药、饲料、洗涤等行业中有广泛的应用. 纤维素酶生产中常利用纤维素含量高的秸秆、玉米芯等作为培养基, 以微生物发酵获得纤维素酶. 与秸秆、玉米芯相比, 蔗渣富含纤维素, 且成本更低, 资源更丰富, 因此更适合用做纤维素酶生产的培养基料. 本文以瑞氏木霉 QM9414 为产酶菌株, 探讨了利用蔗渣作为培养基料生产纤维素酶的最佳条件, 为甘蔗渣的有效利用和开发提供一条新的途径.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*) QM9414 菌株, 中科院微生物所保存并友情赠送.

1.1.2 甘蔗渣 收集榨汁后的蔗渣, 60 °C 烘箱烘干, 粉碎机粉碎后过孔径为 0.301 mm 铜筛, 塑料

袋封装备用.

1.1.2 培养基

斜面培养基: 麦芽提取物 2 g, 琼脂粉 2 g, H₂O 100 mL, pH 3.5.

固体发酵培养基: 以麸皮 1.5 g, 甘蔗渣 2 g, Mandels^[2] 营养液 14 mL 作为基础培养基. 培养基以 121 °C 灭菌 30 min 后备用.

1.1.3 主要仪器与设备 721B 分光光度计(上海第三分光仪器厂), sartorius 电子精密天平(北京赛多利斯天平有限公司), ceritrifuge 5804R 高速冷冻离心机(日本日立), 水浴锅, 培养箱, 酸度仪, 血球计数板.

1.1.4 主要试剂 0.1 mol/L pH 4.8 醋酸缓冲液, DNS 试剂按文献[3]配制.

1.2 方法

1.2.1 培养条件 斜面培养条件为 30 °C 培养 192 h. 固体发酵培养条件为每个处理接入孢子悬液含量为 1.2×10^9 L⁻¹ 的菌液 0.6 mL, 30 °C 培养 120 h.

1.2.2 粗酶液的提取 向固体发酵培养物中加入 10 倍 0.1 mol/L, pH 4.8, HAc- NaAc 缓冲液 35 mL, 加入 10 颗玻璃珠, 30 °C 摇床上振荡提取 1 h. 提取物经 8 层纱布初过滤, 除去固体培养物后, 5 000 r/min 离心 5 min 除菌体, 上清即为备用粗酶液.

* 收稿日期: 2008-03-20

基金项目: 西南民族大学自然科学基金项目资助(23444).

作者简介: 伍红(1965-), 女, 四川人, 博士生, 副教授, 主要从事酶工程方面的研究工作.

1.2.3 酶活力测定(FPA) 滤纸条(1 cm×6 cm)置于试管中,加入 1.2 mL 缓冲液,再加入 0.1 mL 粗酶液,50 ℃作用 1 h,加入 DNS 试剂 2 mL,再补加蒸馏水至 10 mL,540nm 处测光密度值.酶活用滤纸酶活(FPU)表示.

1.2.4 葡萄糖含量标准曲线的制定 取 6 支试管分别加入浓度为 2 μmol/L 的葡萄糖标准溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 然后加入 DNS 显色液,沸水浴 5 min,于 540nm 测定吸光度.以不同浓度(y)的标准葡萄糖溶液和对应的吸光度(x)为坐标得到葡萄糖含量标准曲线: $y = 0.448 2x - 0.0033$, $R^2 = 0.996$.

1.2.5 条件优化方法 选取菌种活化时间、固体培养时间、培养基含水量、培养基初始 pH、培养基中甘蔗渣与麸皮的质量添加比例、培养基不同氮源以及硫酸铵添加量等因素,进行单因子对产酶活性影响的实验.再选取初始 pH、含水量、硫酸铵添加量以及甘蔗渣与麸皮的质量添加比例等对产酶有较大影响的因素,进行 $L_9(3^4)$ 的正交实验分析,从而获得产酶的优化条件.每个实验重复 3 次,实验结果按常规统计方法进行统计分析.

2 结果

2.1 菌种活化时间对发酵产酶的影响 为了获得最好的产酶发酵效果,本研究首先对菌种活化时间进行优化.取在斜面培养基上活化培养了 96, 120, 144, 168, 192, 216, 360 h 的菌种制成孢子悬液,分别接种在一个装有固体培养基的 150 mL 三角瓶中,30 ℃培养 120 h,测定各培养瓶里发酵产纤维素酶的酶活性.结果见图 1,菌种活化 192 h,其发酵产酶活力最大,说明此时菌种生命活力恢复至最

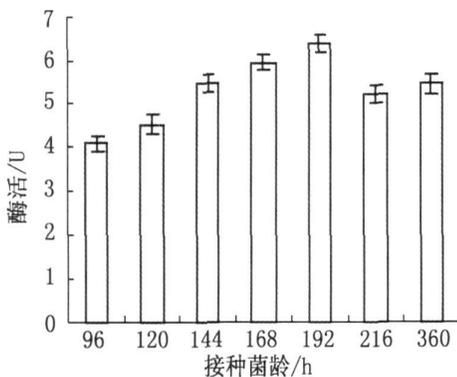


图 1 菌种活化时间对发酵产酶的影响

Fig. 1 Effect of different activation time on enzyme production

佳状态.活化时间过短,则菌种细胞的生命力未完全复苏,时间过长(192 h 以上),则菌种生长处于衰退期,或可能发生孢子分化,产酶能力将逐渐下降.因此本试验选择活化 192 h 的菌种进行发酵产纤维素酶的研究.

2.2 培养时间的确定 向固体产酶培养基(麸皮 1.5 g,甘蔗渣 2 g, Mandels 营养液 14 mL, 121 ℃灭菌 30 min)中接入孢子悬液浓度为 $1.2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的菌液 0.6 mL,混匀后于 30 ℃,静置倾斜培养.每隔 24 h,定期取出一瓶新鲜曲,测其酶活,以确定后续试验中的培养时间.结果见图 2,在接种后的最初 24 h,为微生物生长的适应期,接入的孢子开始萌发,产酶活力低,此时进行翻曲,使孢子在培养基内分布均匀.在 48~96 h,微生物生长进入对数生长期,菌丝在固体培养基上迅速生长繁殖,固体培养基表面被绿色的孢子所覆盖.发酵至 120 h,微生物生长转入对数生长中后期,此时纤维素酶活力达到最高,每克干曲产酶酶活可达 5 U. 120 h 之后,纤维素酶活力开始下降.这一实验结果表明 120 h 是产酶最高的发酵时间,故后续试验中均以 120 h 作为发酵时间.

2.3 培养基不同含水量对产酶的影响 配制固体培养基中干物质(g)与水(mL)的比例分别为 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7 的培养基,接入孢子悬液进行产酶发酵,提取粗酶液,测酶活力.结果见图 3,固体培养基的含水量对产酶有很大的影响,以干物质(g)与水(mL)的比例为 1:4 的培养基产酶活力最高.水分含量太少,无法满足霉菌孢子萌发菌丝生长所需湿度;而加水量过多,则不利于固体培养基的通气和散热.

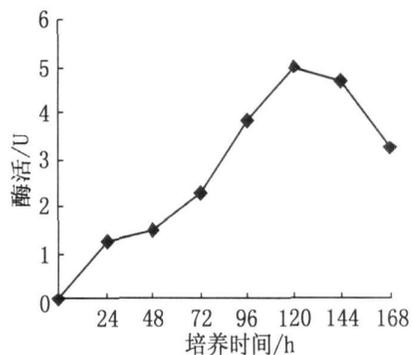


图 2 培养时间对产酶的影响

Fig. 2 Effect of different incubation time on enzyme production

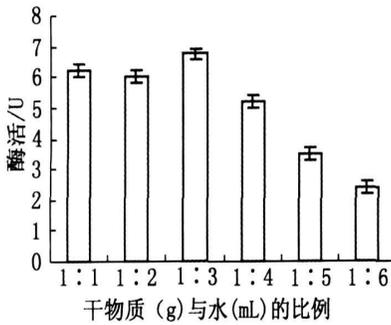


图 3 培养基不同含水量对产酶的影响

Fig. 3 Effect of different moisture content on enzyme production

2.4 培养基不同的初始 pH 对产酶的影响 产酶发酵中,不同的菌种对 pH 的要求是不同的,求得最适发酵 pH 对提高产酶量有重要的作用.调节培养基的初始 pH 为 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 测定发酵产酶量,结果见图 4,培养基初始 pH 为酸性时对该菌株发酵产酶影响不大,在 pH 3~6 的范围内都能生长产较高的酶,说明该菌株有良好的耐酸特性,而以初始 pH 为 5 的培养基产酶活力最高.但该菌株不适应在碱性的环境中培养. pH 大于 7 以后,产酶量显著降低,只有最优 pH 时 1/4~1/3.所以,在大量发酵产纤维素酶的工业生产中适宜选偏酸的培养基.

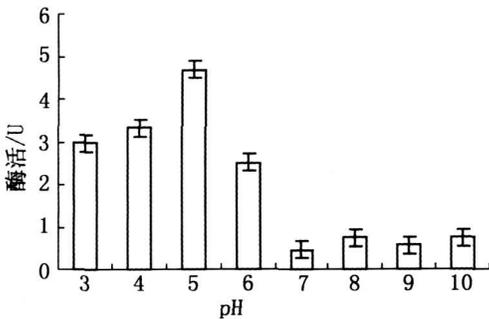
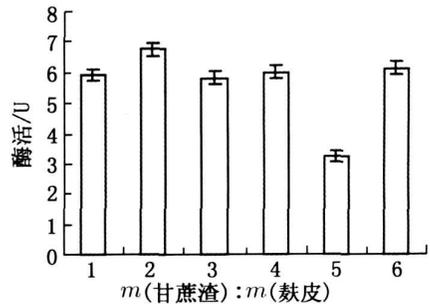


图 4 培养基不同初始 pH 对产酶的影响

Fig. 4 Effect of different initial medium pH on enzyme production

2.5 培养基成分中不同的 $m(\text{甘蔗渣}):m(\text{麸皮})$ 对产酶的影响 尽管甘蔗渣和麸皮均含有较高的纤维素,但甘蔗渣还是需要一定的麸皮进行混合发酵才能获得较高的产量,为了得到一个甘蔗渣与麸皮的最佳比例,甘蔗渣与麸皮按不同比例混合(见图 5),然后再加入 14 mL 的 Mandels 营养液,接入 0.6 mL 菌种,30 °C 培养 120 h,提取粗酶液,测酶活力.结果

见图 5, $m(\text{甘蔗渣}):m(\text{麸皮})$ 为 2.5:1.0 的时候产酶量最高.除处理 5 ($m(\text{甘蔗渣}):m(\text{麸皮})$ 为 1.0:2.5) 的产酶较低外,其它处理比较接近.

1~6: 分别表示 $m(\text{甘蔗渣}):m(\text{麸皮})$ 为 3.0:0.5,

2.5:1.0, 2.0:1.5, 1.5:2.0, 1.0:2.5, 0.5:3.0

图 5 培养基不同的 $m(\text{甘蔗渣}):m(\text{麸皮})$ 对产酶的影响

Fig. 5 Effect of the proportion of bagasse and wheat bran on enzyme production

2.6 培养基不同氮源对产酶的影响 向培养基中加入不同的氮源,调初始 pH 为 5,接入孢子悬液进行产酶发酵,以探讨不同氮源对产酶的影响.结果见表 1,以硫酸铵为氮源的培养基产酶活力最高.为了探讨硫酸铵的不同质量浓度对产酶的影响,调节营养液中硫酸铵质量浓度分别为 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 g/L, 初始 pH 为 5,接入孢子悬液进行产酶发酵,取粗酶液测酶活力.结果见图 6,以 10 g/L 硫酸铵的培养基产酶活力最高,硫酸铵添加量较低或高,产酶量都有下降的趋势.

表 1 不同氮源对产酶的影响

Tab. 1 Effect of different nitrogen sources on enzyme production

氮源	质量浓度/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	酶活力/U
尿素	2.5	3.492
蛋白胨	2.5	3.567
硫酸铵	2.5	4.183
硫酸铵+尿素	12.5+12.5	2.953
硫酸铵+蛋白胨	12.5+12.5	2.921

2.7 各因素对产酶的综合影响 从单因子实验发现,培养基的初始 pH、含水量、硫酸铵添加量以及蔗麸比例等因素变化会对产酶带来较大的影响.为

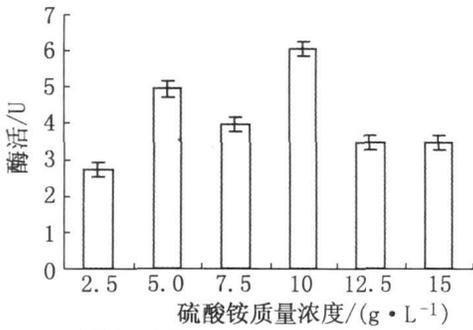


图 6 硫酸铵质量浓度对产酶的影响

Fig. 6 Effect of different ammonium sulfate content of enzyme production

了获得一个最佳的产酶发酵条件, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表试验进一步探讨初始 pH、含水量、硫酸铵添加量以及蔗麸比例对产酶的综合影响. 实验结果见表 2. 从极差 R 的大小看, 因素 B (硫酸铵质量浓度) 是影

响瑞氏木霉 QM9414 产纤维素酶的最大因素. 其次是因素 A (初始 pH), 对产酶也有较大影响, 再次是因素 D (蔗麸比值), 因素 C (初始含水量) 极差最小, 是四因素中相对不重要的因素, 实验的主次顺序为 $B > A > D > C$. 产酶最高的组合是 $A_1B_1C_2D_2$, 即称取 2.5 g 甘蔗渣和 1 g 麸皮, 硫酸铵的添加量为 7.5 g/L, 干物质(g) 与水(mL) 的比例为 1: 4, 初始 pH 为 4 的条件是产酶最优条件.

按上述优化条件, 在 150 mL 三角瓶中, 取 2.5 g 甘蔗渣和 1 g 麸皮按固态基质干重的 4 倍加入 14 mL 含 7.5 g/L 硫酸铵的 Mandels 营养液, 调初始 pH 4, 灭菌后, 接入活化了 192 h 的菌种孢子悬液 0.6 mL, 30 °C 发酵 120 h. 进行发酵产酶实验, 纤维素酶的酶活可达到每克干曲 8.26 U, 验证了正交试验的结果.

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果分析

Tab. 2 Design and results analysis of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

试验号	A 初始 pH	B 硫酸铵/ (g · L ⁻¹)	C 干物质(g) 与 水(mL) 的比例	D m (甘蔗渣): m (麸皮)	纤维素酶活/U				
					1	2	3	平均酶活	标准差
1	4	7.5	F 3	3 0.5	6.018	5.602	5.982	5.867	0.230 489
2	4	10	F 4	2.5 1	5.558	5.253	5.491	5.433	0.160 29
3	4	12.5	F 5	2 1.5	6.725	6.681	6.071	6.492	0.365 548
4	5	7.5	F 4	2 1.5	6.949	7.015	6.770	6.911	0.126 769
5	5	10	F 5	3 0.5	4.316	3.505	3.669	3.830	0.428 802
6	5	12.5	F 3	2.5 1	5.609	5.699	5.625	5.644	0.048 014
7	6	7.5	F 5	2.5 1	6.116	6.665	6.517	6.433	0.284 459
8	6	10	F 3	2 1.5	3.654	3.059	3.446	3.386	0.301 954
9	6	12.5	F 4	3 0.5	5.364	5.401	4.457	5.074	0.534 964
$\sum K_1$	53.381	57.634	44.694	44.314					
$\sum K_2$	49.157	37.951	52.258	52.533					
$\sum K_3$	44.679	51.632	50.265	50.37					
R	8.702	19.583	7.564	8.219					

3 讨论

本研究从单因子试验并经过正交分析确定了菌种最佳活化时间为 192 h; 产酶最佳发酵时间为 120 h, 干物质(g) 与水(mL) 的比例为 1: 4, 最佳初

始 pH 为 4; 最佳 m (甘蔗渣): m (麸皮) 比例为 2.5 : 1.0; 最佳的氮源为硫酸铵, 其使用质量浓度为 7.5 g/L. 其中最佳初始 pH、硫酸铵添加量以及 m (甘蔗渣): m (麸皮) 与单因子试验结果比较都有一定差异, 表明多种因素综合作用的效应是明显的.

以此最佳条件进行发酵,产酶量达每克干曲 8.26 U,表明蔗渣用于纤维素酶生产的固体培养基是可行的。

在利用蔗渣作为培养基产纤维素酶时也需要加入一定量的麸皮,因为纤维素酶属于诱导酶,需在诱导物存在下才能大量产生。许多不溶性纤维素、可溶性纤维素衍生物、一些低聚糖及某些单糖和二糖均可作为诱导物。研究证明,麸皮中含有丰富的纤维素、半纤维素以及戊聚糖(低聚糖),是纤维素酶产生的一种良好的诱导剂。另外,若只以蔗渣作为单一碳源,因为蔗渣含有的纤维素没有被分解,发酵前期需要的碳源满足不了菌体生长的需要。所以,在培养基中添加适量的麸皮,在发酵初期利用麸皮中的小分子葡聚糖分解较快,提供菌体需要的碳源,并产生纤维素酶,分解蔗渣中的纤维素获得后续产酶阶段需要的碳源,因此添加麸皮可以大大提高产酶效率。合适的 m (甘蔗渣): m (麸皮),可以收到既经济又高产率的双重效果。培养基中的氮源对产酶有重要的影响,不同的菌株对氮源有一定的选择性。康氏木霉(*Trichoderma koningi*)产纤维素酶的最佳氮源是硫酸铵或谷氨酸钠^[4],而本试验发现,瑞氏木霉 QM9414 的最佳氮源亦为硫酸铵。这表明木霉类菌株对硫酸铵这种无机氮源比较适应。硫酸铵的含量对产酶的影响也是比较显著的,在单因子实验中,10 g/L 硫酸铵质量浓度最有利于产纤维素酶,而高于这个水平反而不利于酶的高产。曾有报道认为,尿素对纤维素酶活性有抑制作用^[9],故在发酵产纤维素酶的培养基中,以尿素为氮源时,需特别注意其添加量。本试验中高浓度的硫酸铵也降低酶的产量,可能也具有同样的理由。

我国是世界上仅次于巴西、印度的第三产糖大国,资料报道^[5]我国年产蔗渣可高达 1 亿 t 以上,因此开发利用蔗渣资源,是近来很多研究者探讨的

热点^[6]。而将蔗渣作为微生物发酵的基料,生产有用的产品是对其利用的一个有效途径之一。有报道利用蔗渣发酵获得单细胞蛋白^[7],也有将蔗渣作为黑曲霉(*Aspergillus niger*)发酵的培养基料,生产纤维素酶系中的 β -葡萄糖苷酶^[8]。但未见蔗渣在瑞氏木霉产纤维素酶的生产中的应用报道。本研究以甘蔗渣和适量的麦麸混合后作为营养基料,用瑞氏木霉 QM9414 进行固体发酵产纤维素酶,并获得了高产纤维素酶的优化条件,这对于寻找纤维素酶产生菌的最佳培养条件,促进纤维素酶制剂的研究和生产无疑是一次有价值的探索,也对有效地开发和利用了蔗渣这种农业废弃物具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 林清华,李常建,李雁.用甘蔗渣产单细胞蛋白的初步试验[J].氨基酸和生物资源,1998,20(1):16-18.
- [2] GALLO B, ANDREOTTI R, ROCHE C, et al. Cellulase production by a new mutant strain of *Trichoderma reesei* MCG77[J]. Biotechnol Bioeng Symp, 1978, 8: 89-101.
- [3] GHOSE T K. Measurement of cellulose activities. International union of pure and applied chemistry[J]. 1987, 59(2): 257-268.
- [4] 孙君社,李雪,董秀芹.纤维素酶高产菌株的选育及产酶条件的研究[J].北京林业大学学报,2002,24(2): 83-85.
- [5] 梁坤,谭京梅,孙可伟.甘蔗渣的综合利用现状及展望[J].中国资源综合利用,2005,23(5): 26-29.
- [6] 聂艳丽,刘永国,李娅,等.甘蔗渣资源利用现状及开发前景[J].林业经济,2007,25(5): 61-63.
- [7] 吴萍,李正鹏.甘蔗渣产单细胞蛋白优良菌株筛选的研究[J].中国林副特产,2007,89(4): 19-21.
- [8] 杨胜远.黑曲霉(*As. n.* XD-1) β -葡萄糖苷酶产酶条件研究[J].食品科学,2002,23(11): 59-62.

Study on production of cellulase using bagasse by *Trichoderma reesei* QM9414

WU Hong^{1,2}, QIN Tian-ying¹, TAN De-yong², NONG Xiang³

(1. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

2. School of Life Sciences; Yunnan University; Kunming 650091 China;

3. College of Chemistry and Life Science, Leshan Normal University, Leshan 614000, China)

rbcl 基因序列分析[J]. 药学学报, 2003, 38(2): 147-152.

[14] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning, a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[15] QISHI SONG, DARONG YANG, GUANGMING ZHANG. Volatiles from *Ficus hispida* and their attractiveness to fig wasps[J]. Journal of Chemical Ecology, 2001, 27(10): 1929-1942.

[16] 李庆康, 马克平. 植物群落演替过程中植物生理生态学特性及其主要环境因子的变化[J]. 植物生态学报, 2002, 26(增刊): 9-19.

Comparison of different total RNA isolation methods for four *Ficus* species

LAI Han^{1,2}, YU Di-qiu¹

(1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;
2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Using Trizol, SDS- LiCl and improved CTAB methods, total RNA were isolated from four *Ficus* species that they are *F. hispida*, *F. racemosa*, *F. altissima* and *F. oligadon*. Via OD value and Gel electrophoresis test, the results showed that Trizol method is applicable for total RNA isolation only for *F. hispida* in the four species, while the SDS- LiCl method failed to extract total RNA from *F. oligadon* and the yield and the quality for the other three species were low, the improved CTAB method can isolate high quality total RNA from all the four species, and further Northern blot analysis testified the integrity of RNA isolated by the improved CTAB method. It was also found that the improved CTAB method could get high quality total DNA during RNA isolation. In all, the improved CTAB method is simple, economical and suitable for isolating total RNA from the *Ficus* species.

Key words: total RNA isolation method; four species of *Ficus*; improved CTAB method; Trizol method; SDS- LiCl method

(上接第 624 页)

Abstract: Utilizing bagasse as substrate the culture conditions for *therma reesei* QM9414 was studied through single factor experiments and orthogonal test. The results showed that the optimal culture conditions were as follows: medium prepared from 1g bagasse, 2.5 g wheat bran and 14mL Mandels nutritional liquid containing 7.5 g/L (NH₄)₂SO₄, adjustment of initial pH to 4.0, at 30 °C for 120h. Under these optimal fermentation conditions, cellulase activity reached 8.26 U/g dry medium.

Key words: bagasse; *Trichoderma reesei* QM9414; orthogonal test; solid-state fermentation; optimization of culture condition