



里氏木霉发酵法制备纤维素酶粗酶液及其酶促打浆的应用

张正健¹, 韩雨彤¹, 陈蕴智¹, 胡惠仁²

(1. 天津科技大学包装与印刷工程学院, 天津 300222;

2. 天津市制浆造纸重点实验室, 天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457)

摘要: 采用里氏木霉为发酵菌种, 通过液体深层发酵的方法, 制备纤维素酶粗酶液, 并用于酶促打浆。在温度 30 ℃、转速 120 r/min 条件下培养 96 h, 系统研究了氮源和碳源种类、碳源用量、麸皮用量、微量元素液和营养元素液加入量对纤维素酶各组分酶活的影响。结果表明, 在以 0.2% 硫酸铵为氮源, 1% 思茅松漂白硫酸盐浆为碳源, 微量元素液和营养元素液加入量分别为 0.2%、8%, 麸皮加入量为 1% 的条件下, 能够获得较高的纤维素酶酶活。酶促打浆研究结果表明: 当纤维素酶用量为 7 U/g 时, 思茅松漂白硫酸盐浆的打浆度提高 40%, 且纸浆强度性能损失小。

关键词: 里氏木霉; 纤维素酶; 酶促打浆; 思茅松漂白硫酸盐浆

中图分类号: TS752

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2013)02-0023-05

Production of Crude Cellulase from *Trichoderma reesei* under Submerged Fermentation and its Application in the Enzymatic Beating

ZHANG Zhengjian¹, HAN Yutong¹, CHEN Yunzhi¹, HU Huiran²

(1. College of Packaging and Printing Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China;

2. Tianjin Key Laboratory of Pulp & Paper, College of Material Science and Chemical Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The production technology of crude cellulase by using submerged fermentation with *Trichoderma reesei* and its application in the enzymatic beating of Simao Pine bleached kraft pulp were investigated in this study. Under the conditions of 30 ℃ temperature, 120 r/min rotating speed and 96 h culture time, the effects of different kinds of nitrogen and carbon sources, the dosage of carbon source, microelement liquid, bran and nutrition element liquid dosage on the activity of every component of the cellulase were studied. The results show that the optimum submerged fermentation conditions of *Trichoderma reesei* for cellulase production were as follows: 0.2% ammonium sulfate, 1% Simao Pine bleached kraft pulp, 0.2% microelement liquid, 1% bran and 8% nutrition element liquid. In the enzymatic beating process, compared with the control pulp, the beating degree of the pulp treated with the enzyme dosage of 7 U/g could be increased by 40% and the physical properties of the pulp treated with enzyme were close to those of the control pulp.

Key words: *Trichoderma reesei*; cellulase; enzymatic beating; Simao Pine bleached kraft pulp

里氏木霉所产生的纤维素酶是胞外酶, 发酵完成后, 纤维素酶容易与菌体分离; 里氏木霉及其代谢物安全无毒, 不会影响生产人员和环境, 也不会对纤维素酶的生产造成不良影响; 里氏木霉生产纤维素酶的产量高、容易培养和控制、生长环境粗放、适应性较强^[1-3]。商品纤维素酶用于酶促打浆能够有效地改善

纸浆的打浆或磨浆性能^[4-6], 但由于使用成本较高, 使其工业化应用受到影响。因此, 本研究以里氏木霉为发酵菌种, 通过液体深层发酵的方法制备纤维素酶粗酶液, 用于酶促打浆。先对其发酵培养条件进行了优化, 以便制得活性较高的纤维素酶粗酶液; 再用所制纤维素酶粗酶液对思茅松漂白硫酸盐浆(BKP)进行

收稿日期: 2012-10-21; 修回日期: 2012-12-30

基金项目: 天津科技大学科学研究基金资助项目(20110118)

作者简介: 张正健(1981—), 男, 江苏人, 副教授, zhangzj@tust.edu.cn.

打浆前的预处理,研究该纤维素酶对打浆性能和纸浆物理性能的影响。

1 材料与方法

1.1 原料与仪器

里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) DWC11, 天津科技大学微生物实验室提供; 思茅松 BKP, 云南云景林纸股份有限公司提供。羧甲基纤维素钠(CMC)、无水葡萄糖、乙酸钠、硫酸镁、冰醋酸、硫酸锰、盐酸、磷酸二氢钾、硝酸钠、磷酸氢二钾、碳酸氢钠、3,5-二硝基水杨酸(DNS)、氢氧化钠、硫酸、亚硫酸氢钠、苯酚、氯化钴、氯化钙、氯化锌、氯化钾、硫酸亚铁、酒石酸钾钠、牛肉膏、蛋白胨、酵母粉、硫酸铵、硝酸铵、尿素、微晶纤维素、蔗糖、麦芽糖、麸皮、麦秆粉、柠檬酸钠、柠檬酸、水杨素, 市售。

恒温培养箱, 江苏正基仪器有限公司; 恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; 高速冷冻离心机, 日本日立公司; 高压灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; 紫外分光光度计, LabTech 公司; Valley 打浆机, 陕西科技大学机械厂; 真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; PFI 磨, 挪威制浆造纸研究院; 肖伯氏打浆度仪, 宜宾造纸厂; 快速纸页成形器, EStanit Gbmh 公司; 抗张强度测试仪、撕裂度测试仪、耐破度测试仪, Lorentzen & Wettre 公司。

1.2 培养基和相关溶液的配制

1.2.1 培养基

里氏木霉试管斜面培养基: 1 g CMC、4 g 营养元素液、0.1 g 微量元素液、2 g 琼脂, 加入蒸馏水至总质量为 100 g, pH 6.0。里氏木霉种子发酵培养基: 1 g 葡萄糖、4 g 营养元素液、1 g 麸皮、0.1 g 微量元素液, 加入蒸馏水至总质量为 100 g, pH 5.5~6.0。里氏木霉基础发酵培养基: 1 g 麸皮、4 g 营养元素液、0.2 g 微量元素液、1 g 碳源, 加入蒸馏水至总质量为 100 g。

1.2.2 相关溶液的配制

营养元素液: 6.25 g 柠檬酸钠、12.5 g 磷酸二氢钾、5 g 硫酸铵、1 g 硫酸镁和 0.5 g 氯化钙溶解后定容至 100 mL。微量元素液: 2.5 g 硫酸亚铁、0.98 g 硫酸锰、0.83 g 氯化锌、1 g 氯化钴和 5 mL 2 mol/L HCl 溶解后定容至 100 mL。

1.3 实验方法

在温度 30 °C、摇床转速 120 r/min 条件下培养

96 h, 通过改变氮源和碳源种类、碳源加入量、麸皮加入量、微量元素液加入量和营养元素液加入量, 以发酵粗酶液的吸光度为评价依据, 系统考察上述各种条件变化对纤维素酶各组分酶活的影响。在考察加入量对产酶的影响时, 其加入量是相对于培养基总量(含自身)的质量百分比。在一定温度和 pH 条件下, 1 mL 酶液(1 g 酶粉)每分钟水解相应底物产生 1 μg 还原糖(以葡萄糖计)的酶量定义为 1 个酶活单位。滤纸酶活(FPA)表示酶的总体活性、Cx 酶活表示内切葡萄糖苷酶活性、C1 酶活表示外切葡萄糖苷酶活性、Cb 酶活表示 β-葡萄糖苷酶活性, 对应的降解底物分别为 1 cm × 6 cm 的滤纸、1% CMC 溶液、50 mg 脱脂棉球和 1%水杨素溶液。取一定量稀释酶液, 与相应底物反应一定时间, 反应液经 DNS 显色, 测定 530 nm 的吸光度, 根据标准曲线(以葡萄糖为标准物)确定还原糖产生的量, 从而确定出酶的活力, 吸光度越大, 表明酶活性越强。通过改变酶用量, 考察其对打浆性能和纸浆物理性能的影响, 具体方法见参考文献[7]。

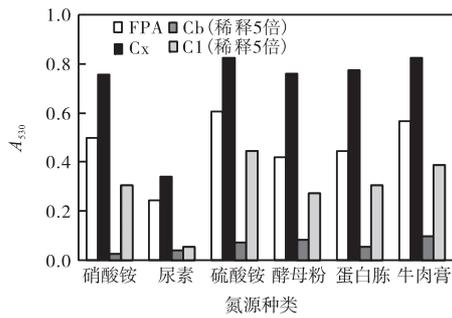
2 结果与讨论

2.1 里氏木霉发酵培养条件对产酶的影响

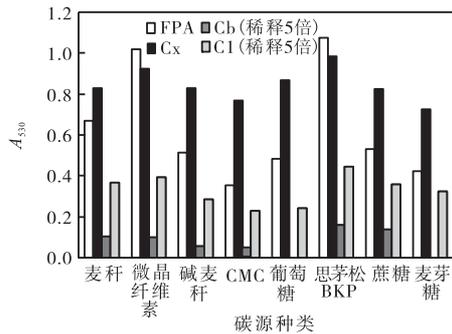
2.1.1 氮源和碳源种类

氮源和碳源种类对产酶的影响如图 1 所示。由图 1(a)可以看出, 氮源不同对各组分酶活有显著影响, 无机氮源以硫酸铵为最佳, 有机氮源以牛肉膏为最佳。产酶高低依次是硫酸铵 > 牛肉膏 > 硝酸铵 > 蛋白胨 > 酵母膏 > 尿素。以尿素为氮源, 酶活很低, 这是由于尿素使液体培养基的 pH 增加所致。硫酸铵所对应的各组分酶活都较高, 并且价格较低, 原料易得, 故采用硫酸铵为培养基的氮源。

从图 1(b)中可以看出, 固体碳源的产酶效果要比可溶性碳源好, 这是因为纤维素酶是诱导酶, 受碳源种类的影响较大, 纤维材料能够产生更好的诱导效果。当采用思茅松 BKP 和微晶纤维素为碳源时, 各组分酶活都比以麦秆和碱处理麦秆为碳源时要高, 这是因为麦秆和碱处理麦秆的木素和半纤维素含量高, 阻碍了里氏木霉菌体与纤维的接触, 因此其产纤维素酶活性较低。由于本发酵所制纤维素酶最终目的是用于思茅松 BKP 的酶促打浆研究, 所以为了能够获得针对性更强的纤维素酶, 本研究采用思茅松 BKP 为发酵碳源。



(a) 氮源(用量为0.2%)



(b) 碳源(用量为1%)

图 1 不同氮源和碳源对产酶的影响

Fig. 1 Effect of different nitrogen and carbon sources on cellulase production

2.1.2 碳源加入量

碳源加入量对产酶影响较大, 如果加入量过低, 则不能够提供菌体生长所需要的碳源量; 如果加入量过高, 会导致发酵液的固含量过高, 不易摇动起来, 从而导致溶氧量不足, 菌体无法正常生长, 最终使得产酶活性较低. 碳源加入量对产酶的影响如图 2 所示.

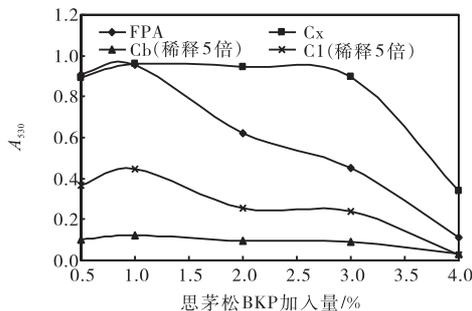


图 2 碳源加入量对产酶的影响

Fig. 2 Effect of carbon source dosage on cellulase production

从图 2 中可以看出, 当思茅松 BKP 加入量为 0.5% ~ 1% 时, FPA 和 C1 酶活相对较高, 当思茅松 BKP 加入量大于 1% 时, FPA 和 C1 酶活明显降低; 当思茅松 BKP 加入量为 0.5% ~ 3% 时, Cb 和 Cx 酶活相对较高, 当思茅松 BKP 加入量大于 3% 时, Cb 和 Cx

酶活迅速降低. 这表明 FPA 和 C1 酶活受思茅松 BKP 加入量的影响较大, 而 Cb 和 Cx 酶活受其影响较小. 当思茅松 BKP 加入量为 1% 时, 各组分酶活都达到最大值, 因此本研究采用的思茅松 BKP 加入量为 1%.

2.1.3 麸皮加入量

麸皮加入量对产酶的影响如图 3 所示. 可以看出, 当麸皮添加量为 1% 时, 各组分酶活均达到最大值, 随着其加入量的继续增加, 活力反而逐渐下降, 这说明麸皮添加量过大对发酵不利, 因此在发酵过程中添加 1% 的麸皮来提高发酵产酶活力.

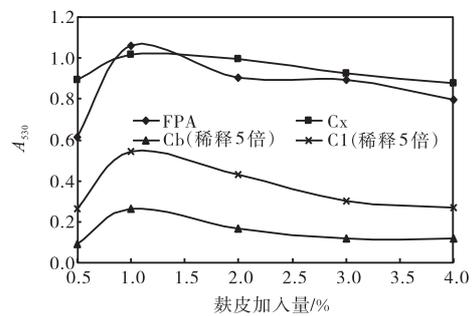


图 3 麸皮加入量对产酶的影响

Fig. 3 Effect of bran dosage on cellulase production

2.1.4 微量元素液加入量

微量元素液含有 Fe²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺和 Co²⁺, 这些金属离子在一定的浓度下对纤维素酶的合成以及酶活性有促进作用, 比如 Fe²⁺离子在酶与底物之间起着连桥作用, 从而更有利于底物与酶的活性中心必需基团的结合. 但是, 如果上述离子浓度过大, 则对产酶有抑制作用. 微量元素液加入量对产酶的影响如图 4 所示.

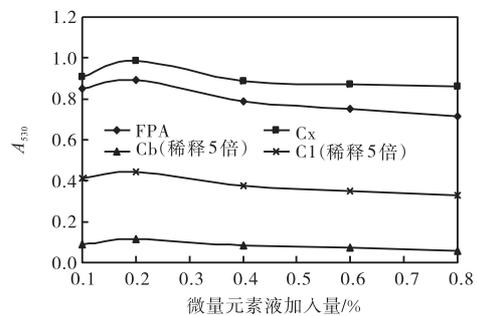


图 4 微量元素液加入量对产酶的影响

Fig. 4 Effect of microelement liquid dosage on cellulase production

从图中可以看出, 当微量元素液用量为 0.2% 时, 各组分酶活都达到最大, 大于或小于 0.2% 都对产酶

不利,因此确定发酵培养基中的微量元素液加入量为0.2%.

2.1.5 营养元素液加入量

营养元素液中包含发酵所必需的氮源(硫酸铵)、磷酸氢二钾-柠檬酸钠缓冲溶液、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} . 由于微生物在代谢过程中不断地向培养基中分泌代谢产物,影响培养基的pH变化,对大多数微生物来说,主要产生酸性产物,所以在培养过程中常引起pH的下降,影响微生物的生长繁殖速度. 为了尽可能地减缓培养过程中pH的变化,在配制培养基时,加入一定的缓冲物质可以起到调节pH的作用. 营养元素液中的钾、钙和镁离子还参与细胞结构物质的组成,并有能量转移、细胞透性调节等功能. 营养元素液用量对产酶的影响如图5所示.

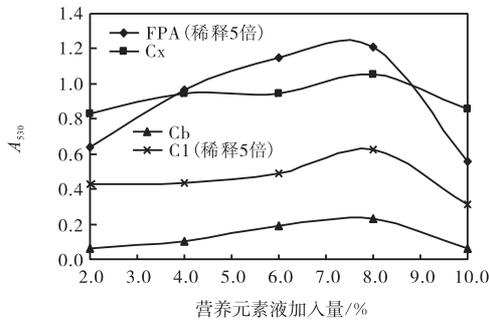


图5 营养元素液用量对产酶的影响

Fig. 5 Effect of nutrition element liquid dosage on cellulase production

由图5可知,随着营养元素液用量的增加,纤维素酶各组分酶活先上升后下降,在用量为8%时均达到最高值. 当用量小于8%时,不能满足菌体的生长所需,但是用量过大时则对产酶有抑制作用. 因此确定发酵培养基中的营养元素液加入量为8%.

2.2 酶促打浆

在氮源(硫酸铵)0.2%、碳源(思茅松BKP)1%、麸皮1%、微量元素液0.2%、营养元素液8%,温度30℃、摇床转速120 r/min条件下发酵培养96 h,其各组分酶活为:FPA酶活471.42 U/mL, Cx酶活3 083.19 U/mL, C1酶活471.42 U/mL, Cb酶活为27.79 U/mL. 通过改变酶用量,研究其在酶促打浆中的作用.

酶用量(按FPA酶活计算,下同)对纸浆打浆度和物理性能的影响见表1. 从中可以看出,在打浆时间均为4 min的条件下,当酶用量在0~5 U/g之间时,打浆度增加较平缓;酶用量大于5 U/g时,打浆度明显上升,酶用量为7 U/g时,打浆度比空白样高出10°SR. 打浆度的增加是由酶解作用造成的. 酶解作用使纸浆纤维细胞壁的结构受到破坏,使纤维产生内部和外部细纤维化,从而使其易于打浆. 在相同打浆时间内,酶处理后的浆样比空白样的打浆度要高,酶用量越大提高程度越大,即在达到相同打浆度的情况下,酶处理后的浆样能有效降低打浆时间,酶用量越大所需的打浆时间就越少,从而降低打浆能耗.

表1 酶用量对打浆和纸浆物理性能的影响

Tab. 1 Effect of cellulase dosage on beating degree and the pulp physical properties

酶用量/(U·g ⁻¹)	打浆度/°SR	抗张指数/(N·m·g ⁻¹)	耐破指数/(kPa·m ² ·g ⁻¹)	撕裂指数/(mN·m ² ·g ⁻¹)
0	25	67.24	5.03	12.55
3	28	64.74	5.04	11.74
5	29	70.27	4.45	11.00
7	35	67.89	4.61	12.01
9	37	65.30	4.36	11.25

在研究酶用量对纸浆物理性能的影响时,空白样和酶处理样都需达到同一打浆度,即控制在48°SR. 纸浆的物理性能的变化是纤维间结合力、纤维内在强度和纤维平均长度综合影响的结果. 从表1中可以看出,抗张指数只在酶用量为5 U/g时略有增加;耐破指数和撕裂指数随着酶用量增加都呈逐渐下降趋势,但下降的幅度都不大. 因此,采用里氏木霉自制纤维素酶进行酶促打浆,不仅能够有效地提高打浆性能,而且还能够最大程度地保持纸浆的强度性能,这对降低酶促打浆生产成本、推广其工业化应用具有一

定实用价值.

3 结论

里氏木霉发酵制备纤维素酶粗酶液的发酵培养条件如下:氮源(硫酸铵)0.2%、碳源(思茅松BKP)1%、麸皮1%、微量元素液0.2%、营养元素液8%,温度30℃、摇床转速120 r/min,培养96 h. 随着里氏木霉所制纤维素酶用量的增加,打浆度逐渐上升,思茅松BKP的打浆性能得到明显提高;纸浆的

物理强度性能有所下降,但下降幅度不大。

参考文献:

- [1] 张继泉,王瑞明,孙玉英,等. 里氏木霉生产纤维酶的研究进展[J]. 饲料工业,2003,24(1):9-13.
- [2] Xu J, Nogawa M, Okada H, et al. Regulation of *xyn3* gene expression in *Trichoderma reesei* PC-3-7 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 54(3): 370-375.
- [3] 胡彩静,代淑梅,李秋园. 里氏木霉(*Trichoderma reesei*)产纤维素酶液态发酵条件的研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(9):45-48.
- [4] 杨博,秦梦华,刘娜,等. 纤维素酶和木聚糖酶改善杨木 CTMP 强度性能的研究[J]. 造纸科学与技术,2010,29(2):59-63.
- [5] 张正健,胡惠仁,徐建峰,等. 漂白硫酸盐思茅松浆酶促打浆的研究[J]. 中国造纸学报,2009,24(1):35-41.
- [6] 刘姗姗,徐永建,王志杰,等. 纤维素酶处理对阔叶木浆打浆性能的影响[J]. 陕西科技大学学报:自然科学版,2009,27(6):29-31.
- [7] 张正健,胡惠仁. 纤维素酶改性提高思茅松漂白 KP 浆打浆性能[J]. 中国造纸,2008,27(12):1-5.
- [9] Alkorta I, Aizpurua A, Riga P, et al. Soil enzyme activities as biological indicators of soil health [J]. Reviews on Environmental Health, 2003, 18(1): 65-73.
- [10] 卢显芝,金建华,郝建朝,等. 不同土层土壤酶活性对重金属汞和镉胁迫的响应[J]. 农业环境科学学报,2009,28(9):1844-1848.
- [11] 黄永杰,杨红飞,张栋,等. 锌胁迫对水花生生长和土壤酶活性的影响[J]. 上海交通大学学报:农业科学版,2009,27(4):403-408.
- [12] 闫峰,吴雄平,梁东丽,等. 外源重金属 Cr、Cu、Se 和 Zn 对土壤酶活性的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(7):91-98.
- [13] 黄峥,闵航,吕镇梅,等. 铜离子与铜镉离子复合污染对稻田土壤酶活性的影响研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2006,32(5):557-562.
- [14] 杨春璐,孙铁珩,和文祥,等. 汞对土壤酶活性的影响[J]. 应用生态学报,2007, 18(3):620-624.
- [15] 关松荫. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京:农业出版社,1986:274-340.
- [16] Yang Zhixin, Liu Shuqing, Zheng Dawei, et al. Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities[J]. Journal of Environmental Sciences, 2006, 18(6): 1135-1141.
- [17] Huang Shunhong, Peng Bing, Yang Zhihui, et al. Chromium accumulation, microorganism population and enzyme activities in soils around chromium-containing slag heap of steel alloy factory [J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2009, 19(1): 241-248.
- [18] Belyaeva O N, Haynes R J, Birukova O A. Barley yield and soil microbial and enzyme activities as affected by contamination of two soils with lead, zinc or copper [J]. Biology and Fertility of Soils, 2005, 41(2): 85-94.
- [19] Khan S, Cao Q, Hesham A E L, et al. Soil enzymatic activities and microbial community structure with different application rates of Cd and Pb [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19(7): 834-840.

责任编辑:周建军

责任编辑:周建军

(上接第22页)