

康氏木霉液体摇瓶发酵产纤维素酶的初步研究

刘小杰¹, 何国庆¹, 袁长贵²

(1. 浙江大学食品科学与营养系, 杭州 310029)

(2. 杭州瑞霖食用化学研发中心, 杭州 311500)

摘要:本文以稻草为主要碳源,对几种真菌产纤维素酶的能力进行了比较研究,其中康氏木霉 zj4 产酶能力最强。研究了其纤维素酶的产生条件:以稻草粉为碳源、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源、稻草与麦麸比为 2:1 时,菌株产酶最高。该菌株产酶最适培养温度为 28℃,最适起始 pH 5.0,装液量 30ml,转速 200r/min,当培养时间为 144h 时,CMC 和滤纸酶活均达到最高值,分别为 453.2U/ml 和 45U/ml 发酵液。

关键词:康氏木霉 zj4; 纤维素酶; 稻草粉; 发酵

Abstract: This paper compared the ability of producing cellulase of several fungi. When straw powder was used as primary carbon source, *Trichoderma koningii* zj4 could produce relatively high cellulase. The medium made of straw powder as carbon source and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as nitrogen source with straw powder/bran = 2:1 was optimal for producing cellulase. The maximum cellulase activity reached at 28℃ and pH 5.0 when cultured 144 hours. The maximum cellulase activity of CMC and filter paper was 453.2U/ml and 45U/ml respectively.

Key words: *Trichoderma koningii* zj4; cellulase; straw powder; fermentation

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)01-0125-04

纤维素是自然界中存在最广泛的一类碳水化合物,同时它也是地球上数量最大的再生资源,通过植物的光合作用,地球上每年合成的植物总量约为 1×10^{11} t,其中纤维素占 40%。目前,自然界中纤维素只有一小部分得到了利用,绝大多数纤维素被白白浪费,并且还会造成环境污染。利用微生物生产的纤维素酶将其转化为人类急需的能源、食物和化工原料,对于人类社会解决环境污染、食物短缺和能源危机具有重大的现实意义。纤维素酶来源非常广泛,昆虫、软体动物、原生动物、细菌、放线菌、真菌等都能产生纤维素酶。目前用于生产纤维素酶的微生物大多属于真菌,研究较多的有木霉属、曲霉属、根霉属和漆斑霉属,其中丝状真菌 *Trichoderma* 是公认产纤维素酶最高的菌种之一^[1,2]。本研究以稻草为主要碳源,对几种真菌产纤维素酶的能力进行了比较研究,发现康氏木霉 zj4 产酶能力最强,初步研究了康氏木霉 zj4 的产酶条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

黑曲霉 (*Aspergillus niger* zj1)、绿色木霉 (*Trichoderma viride* zj2)、白腐霉 (*Panusconchatus* zj3): 购自浙江省微生物研究所; 康氏木霉 (*Trichoderma koningii* zj4): 来自中国科学院微生物研究所。

1.1.2 培养基

活化培养基: 黑曲霉、绿色木霉, PDA 培养基; 白腐霉,改良的 PDA 培养基; 康氏木霉: 麦芽汁琼脂培养基。

摇瓶发酵培养基: 黑曲霉^[3]: 稻草 5g、麦麸 1g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 KH_2PO_4 0.05g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g、水 100ml、自然 pH; 绿色木霉和白腐霉^[4]: 稻草 5g、1.5% NaNO_3 3ml、0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3ml、0.2% KH_2PO_4 3ml、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3ml, 加 0.1% 酵母粉, 调节 pH 5.0~6.0, 定容到 100ml; 康氏木霉^[5]: 稻草 5g、麦麸 0.9g、大麦粉 1.5g、0.5% 牛肉蛋白胨 100ml (自来水配制), 起始 pH 5.0。

1.1.3 培养方法

将上述菌种接种于活化培养基上, 在 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 4~6d 后使用或 4°C 下保存。250ml 摇瓶装 30ml 发酵培养基, 经 10^5Pa 灭菌 30min, 接种用生理盐水冲洗的孢子 1ml, 28°C 旋转式摇床上振荡 (200r/min) 培养

收稿日期: 2002-05-15

作者简介: 刘小杰 (1973-), 男, 博士生, 研究方向为食品微生物与发酵工程。

5~6d,离心上清液即为粗纤维素酶液。

1.1.4 主要仪器与设备

HYG-II 转式恒温调速摇瓶柜; 751-GW 分光光度计; LG10-4.2 台式高速冷冻离心机。

1.2 分析方法

pH 的测定: PHS-9V 型酸度计。

残余还原糖的测定: DNS 法^[6]。

酶活力的测定: CMC 酶活性测定方法: 取适当稀释的酶液 0.5ml, 加入 1ml 质量分数为 1% 的 CMC 溶液(溶于 pH4.8, 0.1mol/L HAc-NaAc 缓冲液中), 50℃ 保温 30min, 加入 3ml DNS 试剂, 沸水浴 5min, 冷却后加水稀释到 25ml, 在 520nm 测还原糖。滤纸酶活的测定: 取适当稀释的酶液 0.5ml, 加入 1ml (pH4.8, 0.1mol/L HAc-NaAc) 缓冲液中, 并加入 1 条 1cm × 6cm 的滤纸, 50℃ 保温 1h, 加入 3ml DNS 试剂, 沸水浴 5min, 冷却后加水稀释到 25ml, 在 520nm 测还原糖。
β-葡萄糖苷酶活性测定: 取适当稀释的酶液 0.5ml, 加入 1ml 质量分数为 1% 的水杨素溶液(溶于 pH4.8, 0.1mol/L HAc-NaAc 缓冲液中), 50℃ 保温 30min, 加入 3ml DNS 试剂, 沸水浴 5min, 冷却后加水稀释到 25ml, 在 520nm 测还原糖。

以上测定时, 要扣除发酵液中的还原糖含量。纤维素酶活力单位的定义: 在酶的催化下, 每 h 形成 1μmol 葡萄糖时所需该酶的量为一个酶活国际单位 U (1U/ml·h)。

2 结果与讨论

2.1 不同菌种产纤维素酶的比较

以稻草作为主要碳源, 对上述菌种摇瓶产纤维素酶进行了反复比较, 表 1 列举了实验结果。由表 1 可以看出, 康氏木霉 zj4 产 CMCCase 和滤纸酶活都比较高, 但黑曲霉 zj1 的 β-葡萄糖苷酶活很高, 综合考虑, 本文选择康氏木霉 zj4 做进一步的研究。

表 1 不同菌种产酶能力的比较

菌种	残余还原糖 (mg/ml)	CMCase (U/ml)	滤纸酶活 (U/ml)	β-葡萄糖苷 酶活(U/ml)
康氏木霉 zj4	0.236	466.6	54.96	22.10
黑曲霉 zj1	0.300	215.5	27.24	528.9
绿色木霉 zj2	0.437	59.88	11.16	13.02
白腐霉 zj3	0.379	345.5	17.34	17.26

2.2 不同碳源对康氏木霉 zj4 产酶活力的影响

分别以稻草粉、大麦杆、大麦粉、麦糟和麦麸(均过

80 目) 等取代发酵培养基中的碳源, 研究了碳源对产酶的影响(见表 2), 结果表明: 康氏木霉 zj4 在以稻草粉为碳源时酶活最高, 麦糟次之, 说明该菌株对稻草这类天然纤维素的分解利用能力较强, 但在实验中发现大麦粉有利于菌体生长, 因此在以后的实验中, 发酵培养基中添加了 0.5g 大麦粉。

表 2 不同碳源对康氏木霉 zj4 产酶活力的影响

碳源	残余还原糖 (mg/ml)	CMCase (U/ml)	滤纸酶活 (U/ml)	β-葡萄糖苷酶活 (U/ml)
稻草	0.236	466.6	54.96	22.10
大麦杆	0.403	250.3	33.84	16.51
大麦粉	1.078	221.1	45.78	18.80
麦糟	1.508	449.6	46.74	17.36
麦麸	0.856	232.7	36.76	12.78

2.3 稻草粉与麦麸比对康氏木霉 zj4 产酶活力的影响

为了进一步提高纤维素酶的活性, 接着研究了稻草粉和麦麸的不同配比对产酶的影响, 结果见表 3。其中当稻草: 麦麸 = 1.2: 0.6 时, 纤维素酶的三个组分酶活均为最高。

表 3 稻草/麦麸对康氏木霉 zj4 产酶活力的影响

稻草/麦麸 (g/g)	残余还原糖 (mg/ml)	CMCase (U/ml)	滤纸酶活 (U/ml)	β-葡萄糖苷酶活 (U/ml)
1.8:0	0.484	421.2	35.34	20.70
1.5:0.3	0.417	435.2	38.45	22.56
1.2:0.6	0.353	456.3	53.67	23.76
0.9:0.9	0.524	403.3	43.07	18.12
0.6:1.2	0.498	399.7	35.25	15.36
0.3:1.5	0.484	261.4	34.74	13.86
0:1.8	0.856	232.7	36.76	12.78

2.4 不同氮源对康氏木霉 zj4 产酶活力的影响

用待实验的各种氮源进行氮源对产酶影响的试验, 结果表明: 无机氮优于有机氮, 铵态氮优于硝态氮, (NH₄)₂SO₄ 为氮源时纤维素酶三组分活性最高, 这一结果与崔福绵等的报道相一致^[7]。但牛肉蛋白胨产酶活性也较高(表 4), 本研究选择了 (NH₄)₂SO₄ 为氮源。

2.5 起始 pH 对康氏木霉 zj4 产酶活力的影响

将发酵培养基 pH 调到不同的值, 进行培养。实验结果(见表 5)表明: 起始 pH 对产酶有很大的影响, 在 pH3~5 间, 随着 pH 升高, 纤维素酶三组分活性均出现上升趋势, 当起始 pH 为 5 时, 酶活最高; 当 pH 高于 5 后, 酶活又有下降。

表4 不同氮源对康氏木霉 zj4 产酶活力的影响

氮源	残余还原糖 (mg/ml)	CMCase (U/ml)	滤纸酶活 (U/ml)	β -葡糖苷酶活 (U/ml)
玉米浆	0.594	310.7	27.48	16.08
豆饼粉	0.612	235.4	11.52	11.94
牛肉蛋白胨	0.236	466.6	54.96	22.10
$(NH_4)_2SO_4$	0.283	525.8	52.54	20.12
NH_4Cl	0.585	394.9	32.34	16.22
NH_4NO_3	0.336	395.3	37.06	16.72
$(NH_4)_2HPO_4$	0.469	422.2	48.90	10.98
尿素	0.956	99.48	12.18	12.53

表5 起始 pH 对康氏木霉 zj4 产酶活力的影响

pH 值	终 pH	残余还原糖 (mg/ml)	CMCase (U/ml)	滤纸酶活 (U/ml)	β -葡糖苷酶活 (U/ml)
3	7.32	0.341	210.8	27.66	12.34
4	8.34	0.457	333.5	41.28	22.68
5	7.56	0.236	466.6	54.96	22.10
6	8.45	0.727	267.3	43.20	18.76
7	8.30	0.905	144.7	20.70	10.38
8	8.72	1.244	65.70	17.63	5.873

2.6 培养时间对康氏木霉 zj4 产酶活力的影响

根据上述实验结果,选择如下摇瓶发酵培养基进行发酵动力学研究:稻草 1.2g,麦麸 0.6g,大麦粉 0.5g, $(NH_4)_2SO_4$ 1%,装液量 30ml,起始 pH5.0,转速 200r/min,培养温度 28℃,每隔 12h 取样一次,测定 pH、残余还原糖及纤维素酶活,结果见图 1 和图 2。

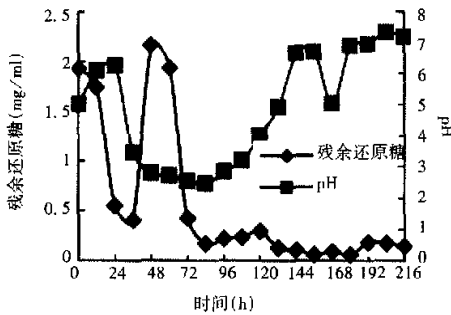


图1 摇瓶发酵过程中残余还原糖和 pH 的变化

从图 1 可以看出,康氏木霉 zj4 在摇瓶发酵过程中, pH 先略有升高,随后下降,在 84h 时达到最低值 2.48,接着上升,在 204h 达到最大值 7.33。残余还原糖先下降,这可能是菌体生长消耗的结果,最后又出现上升,说明康氏木霉产生了少量的纤维素酶,

将稻草粉降解为还原糖,但随着发酵的进行,还原糖会逐渐被菌体消耗。

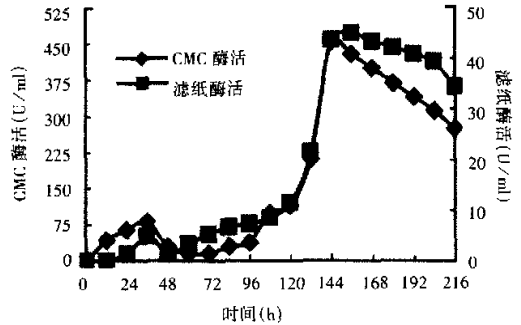


图2 摇瓶发酵过程中 CMCase 酶活和滤纸酶活曲线

从图 2 可以看出,康氏木霉 zj4 发酵过程中 CMCase 酶活曲线有两个峰。12h 前 CMCase 酶活很低,随后快速增长,在 36h 时 CMCase 酶活出现第一个高峰,酶活力达到 82.53U/ml。随后酶活力稍有下降,接着缓慢上升,从 120h 开始快速上升,至 144h 时,CMCase 酶活到达最高峰,其值为 453.2U/ml,随后缓慢下降。滤纸酶活的变化规律与 CMCase 酶活相似,这与李忠兴和谭宏的结果相一致^[8,9]。

3 结论

3.1 以稻草为主要碳源时,所试验的菌种中,康氏木霉 zj4 产 CMCase 酶和滤纸酶的活性均为最高,但黑曲霉 zj1 的 β -葡糖苷酶活性较高。现有的研究表明, β -葡糖苷酶是天然纤维素降解的关键酶,上述结果提示,可以将康氏木霉 zj4 和黑曲霉 zj1 混菌发酵,以期改善纤维素酶三组分之间的配比。

3.2 康氏木霉 zj4 液体摇瓶发酵的产酶培养基为:稻草 1.2g、麦麸 0.6g、大麦粉 0.5g、 $(NH_4)_2SO_4$ 1%、装液量 30ml、起始 pH5.0。液体摇瓶发酵产酶条件为:培养温度 28℃,转速 200r/min,当培养时间为 144h,CMCase 和滤纸酶活均达到最高值。

参考文献:

[1] Gupta JK, Das NB, Gupta YP. Effect of cultural conditions on cellulase formation by *Trichoderma viride*[J]. Agric Biol Chem, 1972,36(11):1961-1967.
 [2] Beguin P. Molecular biology of cellulose degradation[J]. Annu Rev Microbiol, 1990,44:219-248.
 [3] 赵小立,贺筱蓉,周红军等.黑曲霉产纤维素酶菌种的激光选育[J].中国激光,1996,23(7):667-672.

- [14] 张培德, 胡琛, 余文博. 添加蜗牛酶对纤维素酶产生菌发酵的影响初探[J]. 工业微生物, 2000, 30(4): 6-10.
- [15] 董志扬, 祝令香, 丁巍等. 纤维素酶高产菌株的诱变选育及产酶条件研究[J]. 核农学报, 2001, 15(1): 26-31.
- [16] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生华实验方法和技术[M]: 高等教育出版社, 1997.
- [7] 崔福绵, 刘茵, 韩辉. 康宁木霉 CP88329 纤维素酶产生条件的研究[J]. 微生物通报, 1995, 22(2): 72-76.
- [8] 李忠兴, 焦旭东, 郝志军. 康宁木霉液体深层发酵生产纤维素酶[J]. 微生物通报, 1999, 26(6): 403-405.
- [9] 谭宏, 谢小保, 莫勇等. 里氏木霉液体发酵产纤维素酶的研究[J]. 工业微生物, 1996, 26(1): 7-11.

大黄属三种植物不同部分提取物清除羟基自由基的体外实验研究

熊辉岩¹, 张晓峰¹, 谭大风², 巨震²

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

(2. 青海大学农牧学院农学系, 西宁 810003)

摘要: 利用 Fenton 反应产生的羟基自由基, 采用比色法对大黄属药用植物: 唐古特大黄、波叶大黄、穗序大黄不同部分提取液清除羟基自由基的活性进行了研究, 结果表明: 三种植物不同部分的提取液均有一定的清除羟基自由基的能力, 清除能力因种、植株部分和提取方法的不同而异。三种植物中清除率最高的部分分别是: 唐古特大黄根及根茎的水提液, 为 79.0%; 波叶大黄叶片的乙醇提取液, 为 84.5%; 穗序大黄叶片水提液和叶柄的乙醇提取液, 分别为 70.1% 和 70.7%。正品大黄植株地下部分清除率较非正品高, 但地上部分清除率却低于非正品。

关键词: 大黄; 不同部分; 提取物; 清除; 羟基自由基

Abstract: The hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$) scavenging capabilities of extracts produced in Fenton reaction from various parts of three Chinese Rheum species were studied by colorimetry method. The results showed that extracts produced from all of the three species had strong scavenging effect on hydroxyl radical while the scavenging rate varied with the difference in species parts and extracting methods. Among them the highest scavenging rates were: the water extract in roots and stems of *R. tanguticum* (79.0%), the ethanol extract in leaves of *R. undulatum* (84.5%), the ethanol extract in leaves and petioles of *R. spiciforme* (70.1% and 70.7% respectively); The hydroxyl radical-scavenging effect of roots from authentic Rheum species was higher than that of non-authentic Rheum species, but the effect of the aerial parts was lower than that of the non-authentic Rheum species.

Key words: rheum; various parts; extract; scavenging; hydroxyl free radical

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)01-0128-03

大黄, 藏名君木扎, 蓼科 (*Polygonaceae*) 大黄属 (*Rheum L.*) 多年生草本植物唐古特大黄 (*Rheum tanguticum Maxim. ex Regel*)、掌叶大黄 (*Rheum palmatum Linn.*) 和药用大黄 (*Rheum officinale Baill.*) 干燥的根及根茎, 是我国传统的中草药, 使用历史悠久, 始载于《神农本草经》, 具有泻下通便, 破积滞, 行瘀血, 外敷清热解毒功效^[1]。该属在我国分布的约有 45 种植物, 除 2~3 种外均有药效, 其中唐古特大黄、掌叶大黄、药用大黄为正品。在我国西藏、四川、青海和甘肃等地区,

少数民族群众不仅使用大黄的根及根茎做药材, 也食用地上部分的茎生叶柄和幼嫩的茎叶, 称为“秋久”, 在《四部医典》、《妙音本草等药典中亦有记载。山大黄 (包括华北大黄、波叶大黄等), 是我国华北地区的野生资源, 为食用大黄的一种, 当地群众用叶柄作蔬菜或食品加工的原料^[2], 所含营养成分与大多数水果蔬菜相似^[3], 味酸, 多汁。国外在十八世纪就有食用大黄叶柄的记载, 通常作为蔬菜食用或加工成酒类^[4]。大黄属植物含有蒽醌及甙类、苯丁酮甙类、芪类、鞣质类等生理活

收稿日期: 2002-09-18

作者简介: 熊辉岩 (1973-), 女, 硕士研究生, 主要从事药用植物化学成分及活性研究。