

绿色木霉产纤维素酶的研究进展

李文佳², 林亲录¹

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004)

(2. 湖南农业大学食品科技与技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 本文对绿色木霉产纤维素酶发酵条件的研究现状、分离纯化及生产应用做了简要的叙述。

关键词: 绿色木霉菌; 纤维素酶; 酶学; 发酵条件

中图分类号: Q814; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)05-0091-03

Research Progress of Cellulase Produced from *Trichoderma viride*

LI Wen-jia², LIN Qin-lu¹

(1. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410128, China)(2. College of Food Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: This paper briefly introduces the recent researches of the cellulose-producing conditions of *Trichoderma viride*. The purification and application of cellulase are also described here.

Key words: *Trichoderma viride*; cellulase; enzymology; fermentation

1 绿色木霉的生物特性^[1,2]

绿色木霉为好气菌, 其菌落在 PDA 平板上生长快, 最初为白色致密的基质菌丝, 然后出现棉絮状气生菌丝, 并形成密实丛束区。其菌丝透明、有隔、壁光滑、分枝繁复, 直径 1.5~1.8 μm , 厚垣孢子出现在菌丝中间, 球形, 壁光滑, 直径 10~14 μm , 分生孢子梗中大部分有侧枝、侧枝对生, 互生, 有二级、三级分枝, 分枝角度成直角。

2 绿色木霉纤维素酶制剂生产工艺研究现状

徐春厚^[3]以绿色木霉 X-13 株为研究对象, 对绿色木霉 X-13 株固态发酵产纤维素酶的优化条件进行了试验研究, 以稻草粉、麸皮、硫酸铵、自来水等作为固态发酵培养基的原料, 按不同比例配置成培养基, 通过扩大培养, 最后测定滤纸酶活, 棉花酶活, 羧甲基纤维素钠酶活, β -葡萄糖苷酶活, 半纤维素酶活和果胶酶活。集中分析了稻草粉和麸皮添加比例, 料水比, 硫酸铵添加量和不同氮源对产酶的影响, 确定了优化的产酶培养基: $m_{\text{稻草粉}}:m_{\text{麸皮}}:V_{\text{自来水}}=1.5:1:3.75$, 氮源为 2.0%~2.5%的硫酸铵, 培养基的起始 pH 值为 6.0~6.5, 培养时间为 60 h, 250 mL 三角瓶中装培养基

15~20 g。用 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS 于室温下浸提发酵培养 2 h, 所得粗酶液的酶活性最高。

张德强^[4]等人以绿色木霉纤维素酶 AS3.3032 进行了固体发酵试验, 以麦麸和爆破后的蔗渣为主要原料发酵生产纤维素酶, 研究了氮源, 碳源, 表面活性剂, 接种方式, 培养基含水量, 培养温度, 培养基起始 pH 值对绿色木霉产酶活力的影响。研究表明: 碳源以麸蔗比为 3:2 时, FPA, β -Case 和 CMC 酶活力均最高, 1 g 干曲分别高达 138.2 U, 134.6 U 和 1613.1 U; 以硫酸铵为氮源, 其 FPA, CMC 和 β -Case 酶活力较高, 1 g 干曲分别高达 122.5 U, 1470.0 U 和 119.3 U; 添加 0.1%的 Tweerr80 和 0.5%~0.7%的洗衣粉可分别为 FPA, β -Case 和 CMC 的酶活提高 2.3 倍、2.8 倍、2.3 倍和 3.1 倍、3.7 倍、3.0 倍; 培养基含水量、培养温度、培养起始 pH 分别为 250%, 28 $^{\circ}\text{C}$ 和 pH 3.5 时, 产酶活力最高。

张德强等人在采用绿色木霉 AS3.3032 固体发酵产酶研究的同时, 进行液体发酵生产纤维素酶的试验。研究了碳源, 氮源, 培养基起始 pH 值, 接种量, 摇床转速对绿色木霉产酶活力的影响, 结果表明: 以爆破后的甘蔗渣为碳源时, 滤纸酶活和酶活力分别高达 5.37 U/mL 和 4.89 U/mL; 不同氮源产酶活力大小顺序为: NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 尿素, NH_4Cl , 酵母膏; 培养起始 pH 为 3.5, 摇床转速为 150 r/min, 培养温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 时, 产酶活力最高, 接种量对产酶活

收稿日期: 2007-02-28

作者简介: 李文佳, 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工与贮藏

通讯作者: 林亲录, 博士生导师

力影响不大,以5%接种量即可。

鄢永琦,张素琴^[5]等分别从武汉和河北两个地方的泥土土壤中筛选获得一株产纤维素酶的优良菌株绿色木霉T-99,采用固体培养生产纤维素酶,以稻草粉和麸皮为固体基质,对培养基成分进行优化,其优化培养基为:稻草粉3.75 g、麸皮1.25 g、无机盐培养液30 mL、TW-80 0.05 g、微晶纤维素0.05 g。并分析酶的理化性质,研究了稻草酶解的适宜条件:接种量为6%,培养起始pH为7.0,培养时间为48h。在最优培养条件下,产酶活力 $\lambda(\text{FPA})_{\text{mdw}} \approx 120 \text{ U/g}$, $\lambda(\text{CMCase})_{\text{mdw}} \approx 110 \sim 125 \text{ U/g}$, $\lambda(\beta\text{-Case})_{\text{mdw}} \approx 90 \text{ U/g}$ 。在50℃,pH 4.0,底物浓度5%酶解36 h条件下,底物得糖率33.49%,全纤维转化率61.33%。

程驭宇^[6]等人用玉米粉,麸皮等作为培养基成分,通过正交试验研究了碳源,氮源,无机盐及料水比得不同组合对绿色木霉HB产纤维素酶活性的影响,得出了最佳组合。在此基础上,积极研究了其他外界条件如:碱预处理,吐温,翻曲等对该木霉产纤维素酶活性的影响,得到了最佳的产纤维素酶条件:玉米秸粉:麸皮=6:4,料:水=1:2, $(\text{NH}_2\text{SO}_4:\text{CO}(\text{NH}_2)_2)=7:1$, KH_2PO_4 0.1%;其中料水比对酶活性的影响最大。谷草秸粉用碱处理后酶活上升明显,达1264.1 U。表面活性剂与有机氮源对酶活的增长效果不明显。不适当的翻曲对酶活的不利影响较大;酶活最高值出现在第6天,不同材料及处理方式对酶活最高值的出现有影响;糖化后的1 g干曲中含还原糖11.2 mg;共同发酵试验得出干曲中粗蛋白含量为4.2 mg/g。

3 绿色木霉纤维素酶制剂的纯化

苏东平,旁延军^[7]等人用绿色木霉 926 液体发酵6~7 d后,获得纤维素酶中CMC酶活最高可达20U/mL,滤纸酶活最高可达5.5 U/mL;发酵液纤维素酶中的CMC酶组分经硫酸胺沉淀、Sephadex G-100柱层析后可提纯6倍左右,通过紫外光谱分析和红外光谱分析,发现纤维素酶及其组分在280 nm附近有最强的吸收峰;纤维素酶在O-H, N-H, C-N, C=O有吸收带;CMC酶学研究表明CMC酶作用的最适pH为5.0,最适反应温度为60℃,常温下稳定的pH最适范围为4.5~6.0。

等电聚焦电泳是一个连续、稳定、线性PH梯度的最佳分离体系,该方法分辨率高,又有高度的浓缩效应。余莲君^[8]等人试用了颗粒胶平板等电聚焦电泳方法来分离纯化纤维素酶,从其中的粗酶液中分离纯化了11种酶成分,并测定了它们的分子量、等电点及

其对羧甲基纤维素、微晶纤维素、对硝苯基葡萄糖苷和纤维二糖等的酶活性,获得了较满意的效果。

4 绿色木霉纤维素酶制剂的应用

饲料业:我国畜牧业结构目前尚属于“精料型”或“耗料型”,存在着严重的人畜争粮的矛盾。饲料紧缺,尤其是蛋白饲料紧缺。限制着畜牧业的进一步发展。作物秸秆和工业废渣等纤维素类粗饲料是我国尚未充分利用的一大饲料资源,其中仅作物秸秆每年就有7亿多吨,既造成资源浪费,又污染环境。因此,利用微生物发酵作物秸秆生产蛋白饲料,提高秸秆的营养价值和适口性,扩大秸秆的饲用范围,变粗饲料为精饲料^[9]。

酿酒工业:在酿酒工业中,利用纤维素酶对纤维素的降解作用,可以将高粱、小麦等原料淀粉中7%左右的纤维素和半纤维素转化成可发酵性糖,使原料的可利用碳源增加,进而提高出酒率。在发酵工业上利用木质纤维素的路线有两条:一是物理法预处理酶解、发酵,二是酸解、发酵^[10]。由于酸解对工艺条件和生产设备要求苛刻,成本高昂,至今未能在发酵工业中形成规模。利用木霉菌等纤维素酶产生菌生产纤维素酶,可分解经过处理的纤维素类材料并达到良好的效果。

食品工业:膳食纤维是一种具有潜在应用价值的生理活性物质,其主要成分包括纤维素、半纤维素、木质素、壳聚糖、果胶和微生物多糖等。对预防便秘与结肠癌,降低血清胆固醇,预防糖尿病等都有显著的疗效^[11]。目前主要是通过酸碱法和酶法提取膳食纤维,这样使水溶性膳食纤维大量的损耗,水溶性膳食纤维比水不溶性膳食纤维持水率高,具有更强的生理功能。现在可通过绿色木霉产的纤维素酶将纤维素,半纤维素等物质降解,能大大提高水溶性膳食纤维的含量。

5 展望

目前,我国无论是绿色木霉产纤维素酶的产酶条件研究,还是绿色木霉纤维素酶在作物秸秆和膳食纤维中的应用,都还处于研究试验阶段,耗时长,成本高,产量较小,没有进行工业化生产的条件。因此,进一步的进行高效绿色木霉产纤维素酶的植株的筛选,寻找最优的培养条件,以及节约成本是该领域扩展的方向。

(下转第95页)