

纤维素酶水解糠醛渣生产酵母

I. 纤维素酶的形成和酶解糠醛渣

中国科学院微生物研究所 纤维素酶研究小组
北京日用化学二厂
(北 京)

本实验研究了康氏木霉 AS. 3.4290 (白色突变株) 纤维素酶产生和糠醛渣酶解的适宜条件。在稻草粉固体培养基上, 纤维素酶产生的最适条件是: 稻草粉细度为 0.35 厘米筛孔的筛下物; 培养基含水量 67% 左右; pH 6.0—6.5; 添加氮源是必要的, 其中以磷酸氢二铵(4%)和硫酸铵(2%)为佳; 培养温度 28℃; 时间为 3 天; 葡萄糖在浓度低时, 对纤维素酶产生有好处, 而浓度过高时(大于6%), 反而对酶形成有抑制作用。

上述培养物直接用于糠醛渣的酶水解, 其酶作用的最适条件是: pH 5.0, 温度 50℃, 作用时间 48 小时。葡萄糖和单宁对纤维素酶有抑制作用。

纤维素酶在适宜的条件下可将不溶性纤维素水解成可溶性的纤维素, 并且进一步水解成纤维二糖或葡萄糖。因此, 它在酿造、食品、医药、化纤等工业中有着广阔的应用前景^[1,2]。它也为纤维素废物的综合利用提供了一条有效的途径。

糠醛渣是由玉米芯经稀硫酸高压水解生产糠醛后所残余的废渣, 其中约含 30—35% 的纤维素, 7—10% 的还原糖(主要是葡萄糖和木糖)。目前, 这部分废渣大都作为燃料而烧掉了。为了贯彻毛主席关于“备战、备荒、为人民”的战略方针, 使这部分纤维素充分得到利用, 我们对纤维素酶的形成和糠醛渣的纤维素酶解作了探讨。本文报道这一研究结果。

材料和方法

(一) 试验菌株

康氏木霉 AS. 3.4290 (白色突变株) (*Trichoderma kōningi*), 培养在土豆葡萄糖琼脂斜面上, 28℃, 培养 7 天, 存放于冰箱中。

(二) 纤维素酶固体曲的制备

在 250 毫升三角瓶中加入 5 克干稻草粉 (0.35 厘米筛孔的筛下物, pH 6—7, 约含 3% 左右的还原糖), 再加入 10 毫升 1% 的硫酸铵溶液, 拌匀, 15 磅灭菌 30 分钟。冷后, 接入一接种环的斜面种子, 充分摇匀后于 28℃ 温箱中培养 3 天即成曲。

(三) 底物

北京日用化学二厂生产糠醛后的玉米芯废渣(简称糠醛渣), 原始 pH 2.0, 用氢氧化钠中和至 pH 5.0, 测水份后作酶解底物用。

(四) 含苯甲酸钠的缓冲液的配制

称 92.3 克十二合水磷酸氢二钠和 30.5 克柠檬酸钠, 溶于 1000 毫升蒸馏水中, 再加入 20 克苯甲酸钠(作防腐剂用), 配制后, 其缓冲液 pH 为 5.0。

(五) 3,5-二硝基水杨酸试剂的配制

称取 200 克酒石酸钾钠, 溶于一定量的水中, 加热溶解后添加 10 克 3,5-二硝基水杨酸、10 克氢氧化钠, 溶解后再加入 2 克重蒸酚和 0.5 克无水亚硫酸钠, 全部加热溶解后, 冷至室温, 定容至 1000 毫升。

(六) 纤维素酶活力的测定

于上述培养好的纤维素酶曲中加入15克(干重)上述底物,再加入缓冲液至总液量为100毫升,搅匀,密封瓶口后于50℃保温48小时,过滤,将滤液稀释40倍,取1毫升于20×200毫米的试管中,添加3毫升3.5-二硝基水杨酸试剂,于沸水中显色15分钟,迅速冷却再加蒸馏水21毫升。摇匀后于72型分光光度计上比色。在550毫微米读取O.D.值。用葡萄糖标准曲线查得糖浓度,按下式计算酶活力

$$\text{酶活力} = \frac{\left\{ \frac{\text{酶解液糖浓度} - \text{废渣}}{\text{对照糖浓度}} \times 100 \right\}}{\text{纤维素酶曲量}} \text{克葡萄糖/克}$$

以下所有图表的酶活力单位和糖化力均以克葡萄糖/克表示。

结 果

一、纤维素酶产生的条件

(一) 稻草粉细度

用3种不同细度的稻草粉分别做制曲试验,结果见表1。由表1看出,在试验范围内,稻草粉细度对酶活没有影响。从经济效果考虑,可选用较粗的稻草粉。

表1 稻草粉细度对产酶的影响

筛孔直径(厘米)	酶活力
0.18	0.56
0.25	0.56
0.35	0.56

(二) 培养基含水量

改变基础培养基的含水量,进行接种培养,结果如图1所示。结果表明,培养基最适含水量的范围为50%—75%。根据菌实际生长的需要和操作方便,我们选用67%的含水量,即稻草粉:水为1:2。

(三) 培养基 pH

将基础培养基用氢氧化钠或硫酸调pH至试验所需的酸碱度,然后进行制曲试验。结果如图2所示。从图中看出,产生纤维素酶的适宜pH值为5.0—7.0,其中

最适pH范围为5.5—6.5。因此,培养基pH选用自然pH(杀菌前为6.0—7.0,杀菌后为5.5—6.5)是适宜的。

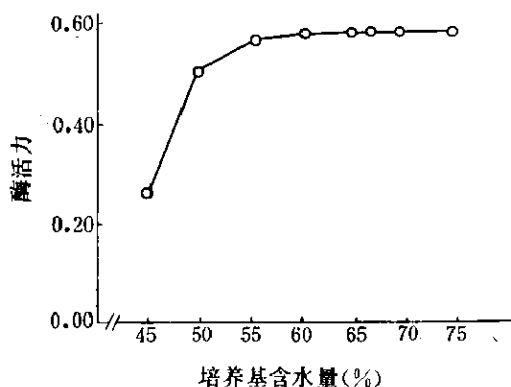


图1 培养基水份对产酶的影响

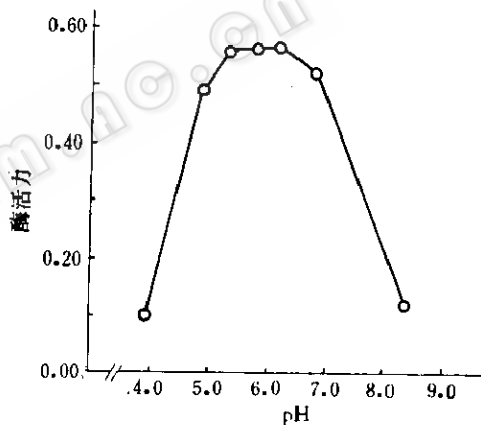


图2 培养基 pH 对产酶的影响

(四) 葡萄糖

在用正常稻草粉和霉变稻草粉(外观和正常稻草粉没有多少差别,但有霉味)制曲时,分别在其中加入不同量的葡萄糖,结果如表2所示。用正常稻草粉制曲时,酶活力随着葡萄糖量的增加而降低。而用霉变稻草粉制曲时,添加一定量的葡萄糖对产酶是有好处的,不加或加得过多(超过6%)都不利于产酶。

(五) 氮源

在稻草粉培养基中,分别添加不同量的磷酸氢二铵、硫酸铵、硝酸铵、氯化铵、尿素、碳酸铵、硝酸钠等进行试验,选择每种

氮源中的最适氮量列于表 3 中。表中表明,磷酸氢二铵最佳,硫酸铵次之,硝酸钠最差。但从实际生产考虑,磷酸氢二铵价格较高,用量又大。因此,选用硫酸铵作氮源是适宜的。

表 2 葡萄糖对产酶的影响

正常稻草粉			霉变稻草粉		
添加量* (%)	酶活力	菌的生长情况**	添加量* (%)	酶活力	菌的生长情况**
0	0.56	+++	0	0.36	+
0.5	0.50	+++	2.0	0.52	+++
1.0	0.46	+++	4.0	0.52	+++
2.0	0.46	+++	6.0	0.52	+++
3.0	0.45	+++	8.0	0.48	++++
4.0	0.43	++++	10.0	0.38	++++
6.0	0.42	++++			

* 葡萄糖添加量是相对于稻草粉的量而言。
** “+”培养基中有菌丝生长,但孢子很少。
“+++”培养基中长满孢子和菌丝。
“++++”培养基中长满菌丝,表面和底部都长满孢子。

表 3 氮源对产酶的影响

氮源种类	最适氮量 (占稻草粉%)	酶活力	菌的生长情况*
磷酸氢二铵	4.0	0.59	+++
硫酸铵	2.0	0.56	+++
氯化铵	2.0	0.54	+++
硝酸铵	3.0	0.53	+++
尿素	1.4	0.44	+++
碳酸铵	2.5	0.41	+++
硝酸钠	2.0	0.32	++
未添加	0.0	0.11	+++

* “+”培养基中有菌丝生长,但孢子很少。
“++”培养基长满菌丝,但孢子稀少,表面未长满。
“+++”培养基中长满菌丝,表面长满孢子。

(六) 培养温度

于不同温度下进行固体曲培养试验。结果如图 3 所示。该菌产酶的温度范围较宽,只是到了 38℃ 时,酶活力才明显下降。最适温度 28—30℃。

(七) 培养时间

于不同培养时间取样测定酶活力,结

果见图 4。在培养的第 1—3 天内,酶活力几乎成直线增加,第 3 天后酶活力不再增加,且随着培养时间的延长酶活力逐渐下降。据观察,酶活力增加在前期和菌的生长成平行关系。

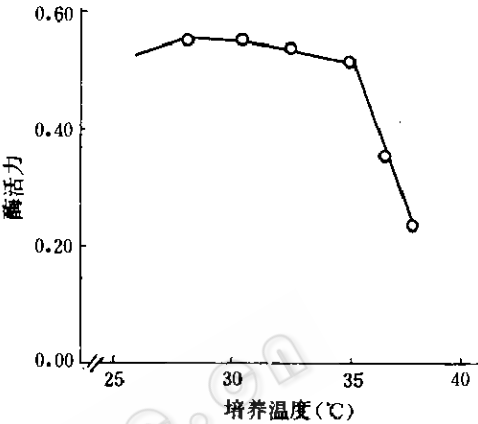


图 3 培养温度和酶活力的关系

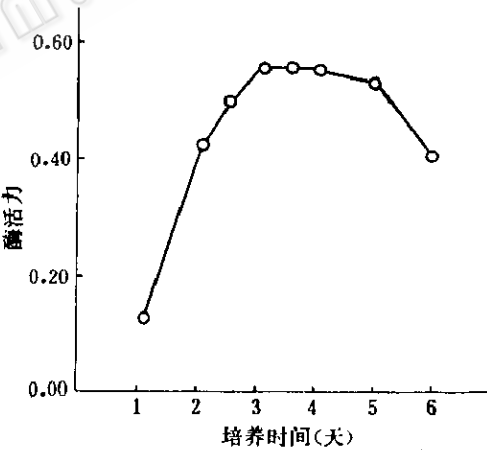


图 4 培养时间和酶活力的关系

二、纤维素酶的作用条件

(一) 温度

于不同的温度下进行酶解,结果如图 5 所示。温度对酶作用影响较大,最适为 50℃,过高或过低对酶作用都不利,高温尤其不利。

(二) pH

用不同 pH 的缓冲液使酶作用在相应

的 pH 下进行,结果如图 6 所示。酶作用最适 pH 范围在 4.5—5.5 之间。pH 高于 5.5 时糖化力显著下降。

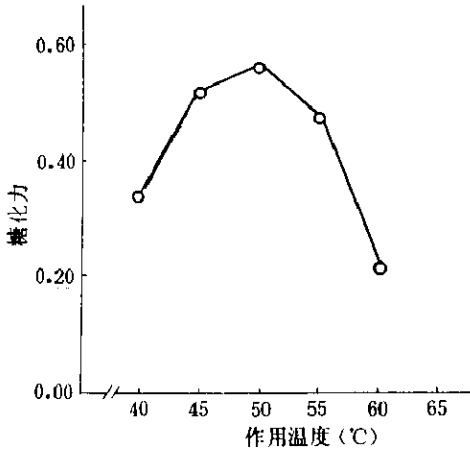


图5 温度对酶作用的影响

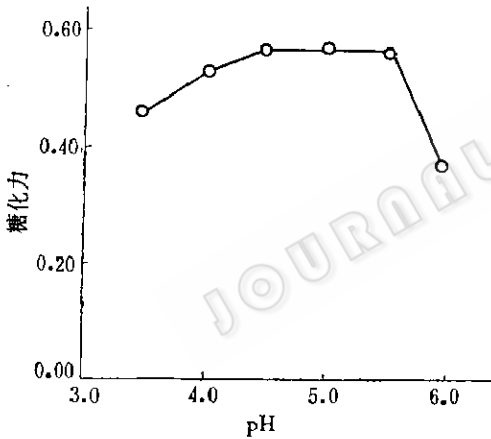


图6 pH对酶作用的影响

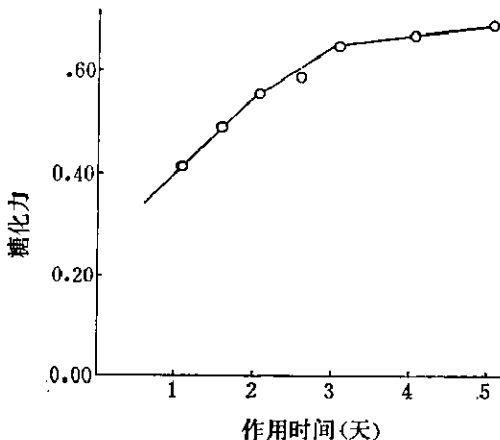


图7 作用时间和酶活力的关系

(三) 酶解时间

在不同的酶解时间取样测定,结果见图 7。酶作用效果随作用时间的延长而增加,3 天后增加速度变缓慢。

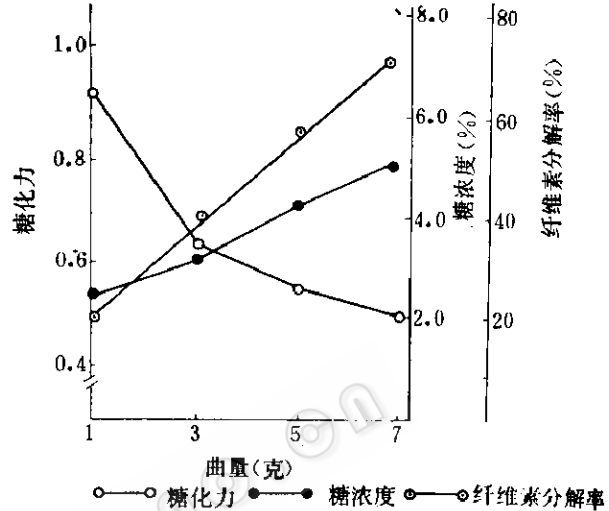


图8 曲量对酶作用效果的影响

(四) 酶量和底物量

固定底物量添加不同曲量作试验,结果如图 8 所示。随着曲量的增加,酶所显示出的活力就下降,糖浓度和纤维素分解率则上升。

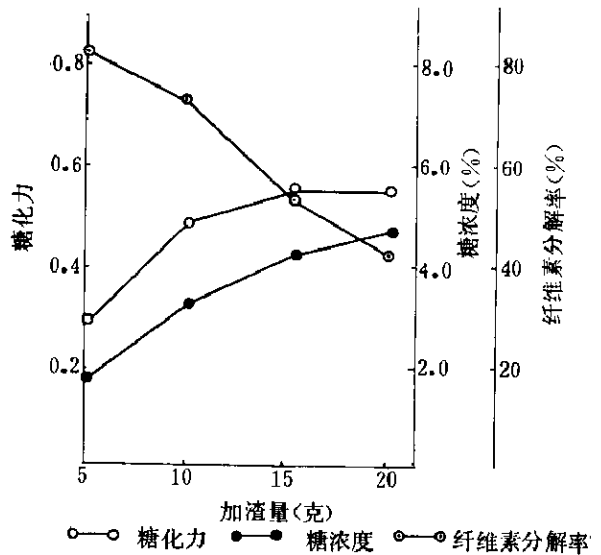


图9 渣量对酶作用效果的影响

另外,固定曲量,做不同底物量的试

验,结果如图 9 所示。在所试验的范围内,随着底物量的增加,酶所显示的作用效果也增加,当底物量达到某一定值(15 克)以后,即使底物量增加,酶所显示出来的活力也不再增加。另外,随着渣量增加,虽然糖浓度上升,但纤维素分解率却下降了。因此,在选定酶量和底物量的比例关系时,既要考虑充分发挥酶的作用效果,又要考虑到底物的有效利用率,同时还要考虑到产物的可利用性。在我们的试验条件下,曲量与底物量的比以 1:3—4 为宜。

(五) 作用系统的液量

在酶作用系统中添加不同的水量以确定酶作用的效果,结果如图 10 所示。虽然随着加水量的增加酶作用效果也增加,但增加量有限。而且,往往有时因水量加大,糠醛渣本身的防腐能力变差,从而导致酶解系统污染杂菌。因此,适宜的加水比,应考虑防腐和物料的流动性这两个因素。

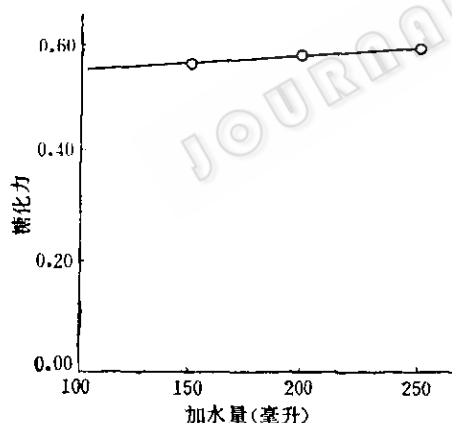


图 10 加水量对酶水解的影响

(六) 添加物的量

对糠醛渣产生过程中所涉及某些物质如糠醛、葡萄糖、单宁、铁锈等对酶作用的影响进行了研究。结果如图 11 所示。糠醛和铁锈不影响酶作用效果,而葡萄糖却对纤维素酶有抑制作用,单宁则强烈地抑制着纤维素酶的作用。

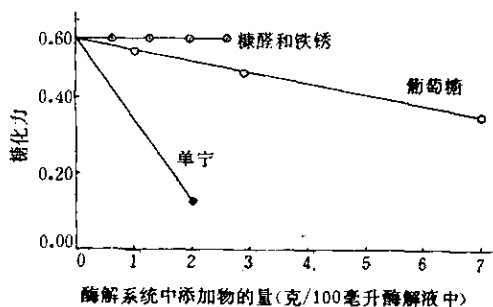


图 11 某些物质对纤维素酶的抑制作用

讨 论

一般认为,纤维素酶是一种诱导酶,在营养源以外添加适当的诱导剂,将能促使纤维素酶产量的增加^[3]。据报道^[4,5],在以纤维素作唯一碳源的培养基中,纤维素酶的真正诱导剂是纤维素的可溶性水解物,如纤维二糖和葡萄糖。我们的实验表明,纤维素水解的最终产物葡萄糖在木霉纤维素酶产生过程中起着重要作用。在正常稻草粉的培养基中葡萄糖的含量约 1.5%,这对纤维素酶产生是适宜的,若继续添加葡萄糖,虽然菌生长很好,但纤维素酶产生却受到阻遏(表 2)。可是,当稻草粉霉变时,由于糖被消耗,在基础培养基中必须补充足够量的葡萄糖,否则,菌的生长就比较差,酶产量也就低。因此,在以稻草粉为唯一碳源的基础培养基中,适量的葡萄糖有利于纤维素酶的产生,而过量的葡萄糖则又阻遏纤维素酶的生成。

氮源是菌生长发育和酶产生所不可缺少的一个因素。对于不同的菌来说,所需氮源的类型(有机氮、无机氮、氨态氮、硝态氮)和生理性质也各有不同。我们的实验表明,生理酸性的氮源要比中性的或生理碱性的好,氨态氮又比硝态氮好。而且,硝态氮难以被该菌所同化,甚至还抑制菌的生长(表 3),这一点和有些研究者的报道是一致的^[3]。

另外,据报道^[6],酶水解产物葡萄糖能与底物竞争酶的活性位点而引起竞争性抑制。有人曾报道^[5], 30% 浓度的葡萄糖可对酶作用产生 40% 的抑制。我们的研究表明,当作用系统的浓度由 4% 增加到 11% 时,酶作用效果便降低了 43%, 可见,葡萄糖对酶作用的抑制是相当明显的。此外,正如有人所报道的那样^[4,5], 单宁是纤维素酶作用的一种天然抑制剂。在我们的研究中,单宁对酶作用显示出强烈的抑制作用, 2% 的单宁能使酶活性降低 73%, 3% 的单宁几乎使酶失活 90%。

参 考 资 料

- [1] 外山信男: 化学と生物, 7(10): 630—35, 1969.
- [2] Ghose, T. K., Pathak, A. N.: *Proc. Biochem.*, 8(5): 20—21, 1973.
- [3] 张文雄: 发酵工学雜誌, 47(7): 447—456, 1969.
- [4] Mandels, M., et al.: *Adv. Chem. Ser.*, 95: 391—414, 1969.
- [5] Pathak, A. N., Ghose, T. K.: *Proc. Biochem.*, 8(4): 35, 1973.
- [6] Mandels, M., Reese, E. T.: *Advances in enzymatic hydrolysis of cellulose and related materials*, 115—157, ed. by E. T. Peese, Pergamon Press Ltd., London, 1963.

YEAST PRODUCTION FROM CELLULASE HYDROLYZED FURFURAL INDUSTRIAL WASTE

I. PRODUCTION OF CELLULASE AND ENZYMIC HYDROLYSIS OF FURFURAL INDUSTRIAL WASTE

Cellulase Research Group, Institute of Microbiology, Academia Sinica and
The Beijing Toilet Chemicals, Second Factory

(Beijing)

Cellulase was obtained by growing a white mutant of *Trichoderma koningi* on rice straw powder (particle size < 0.35 cm) solid medium with a moisture content of 67%, pH 6.0—6.5, at 28°C for 3 days. Addition of 4% (NH₄)₂HPO₄ or 2% (NH₄)₂SO₄ enhanced enzyme formation. Glucose in low level was bene-

ficial while in high level (> 6%) was inhibitory to enzyme formation. The solid culture was used for the hydrolysis of furfural industrial waste. The optimal conditions for enzyme action were: pH 5.0, 50°C, for 48 hrs. Both glucose and tannin were inhibitors of the enzyme.