# 绿色木霉9023利用废纸浆产生纤维素酶的研究*

陈兴吴　王杏君　杜秀英　刘德明　郑式云

（中国科学院环境化学研究所，北京）

纤维素酶在工业上有广泛的用途，绿色木霉9023菌株可以用废纸浆做碳源，在摇瓶中发酵产生纤维素酶。本文主要报道产酶活力的适宜条件及酶液水解废纸浆的试验结果。

## 材料和方法

### 一、菌株

绿色木霉（*Trichoderma viride*）9023，由中国科学院西北水土保持生物土壤研究所提供。

### 二、斜面培养基（%）和培养方法

可溶性淀粉2，葡萄糖1，蛋白胨1，纤维素粉1，酵母膏0.2，琼脂2，pH5.5—6.0。

将孢子接种在斜面上，于30℃培养7天，待长出均匀较厚的一层绿色孢子后，贮存于冰箱中备用。

### 三、摇瓶培养基

1. 种子培养基（%）：$(NH_4)_2SO_4$ 0.2，$KH_2PO_4$ 0.3，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5毫克，$MnSO_4 \cdot H_2O$ 1.6毫克，$ZnCl_2$ 1.7毫克，$CoCl_2$ 2毫克，玉米浆0.05，酵母膏0.05，蛋白胨0.05，Tween 80 0.1，自来水1000毫升，pH6.5。

2. 产酶活力培养基：同种子培养基，只是另外添加1%（重量/体积）麦草浆。

3. 产酶活力培养方法：用斜面上的孢子制成悬浮液，培养后作种子用，产酶培养基在250毫升三角瓶中装50毫升，15磅20分钟灭菌，接种后30℃，110转/分摇床上培养。

### 四、碳源

麦草浆（北京造纸七厂废纸浆，pH8.0），棉浆（保定造纸厂废浆渣，pH6.0），纤维素粉（德国制），木粉（70%通过400目筛），D-葡萄糖（化学纯），羧甲基纤维素钠（上海医药公司，pH6.0），甲基纤维素（中国科学院上海有机化学研究所）。

### 五、3，5-二硝基水杨酸的配制（简称DNS）

采用中国科学院微生物研究所纤维素酶组建立的方法[1]。

### 六、纤维素酶活力的测定

离心后的酶液1毫升稀释6倍，取1毫升稀释液加0.1 *M* pH4.5醋酸缓冲液于试管中，并放入一条1×6厘米$^2$的华特曼一号滤纸，置50℃水浴锅中保温酶解一小时，然后加入DNS试剂3毫升，沸水浴煮沸15分钟，速冷却后加入21毫升蒸馏水稀释摇匀，于550毫微米波长，721型分光光度计比色，以OD值表示。用葡萄糖制备标准曲线，酶活力单位以毫克葡萄糖/毫升·小时表示。

### 七、正交试验

第一次正交试验设计为四因素三水平计：纸浆浓度（%）为0.25、0.5、1.0；pH值为4.6，5.4，6.4；氮源为尿素、硫酸铵、硝酸铵；硝酸铵浓度（%）为0.1，0.2，0.3。第二次正交试验设计为三因素三水平计：纸浆浓度（%）为1.0，1.5，2.0；硫酸铵浓度（%）为0.05，0.10，0.5；pH值为3.0，4.6，6.0。发酵4天后测发酵液酶活力，计算结果。

### 八、糖化试验的转化率

参照文献[2]的方法进行，并按下式计算转

---

* 本研究承肖永澜先生指导。



© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

化率。

$$转化率(\%) = \frac{酶解产生的总还原糖}{底物量} \times 100\%$$

## 九、纸层析

展开剂：正丁醇:醋酸:水 = 4:1:5，上行展开二次。显色剂（1）邻苯二甲酸溶液（1.63克/100毫升饱和水的正丁醇溶液)(2)苯胺 0.93克。

# 实 验 结 果

## 一、影响纤维素酶活力的因素

1. *不同碳源对产酶活力的影响*：分别用 7 种不同含纤维素的物质作唯一碳源，酶活力测定结果见表 1。

表 1 不同碳源对产酶活力的影响

| 碳源 / 结果 / 酶活单位 | 纤维素粉 | D-葡萄糖 | 麦草浆 | 棉浆 | Na-CMC | 木粉 | 甲基纤维素 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 毫克葡萄糖/毫升·小时 | 4.402 | 3.851 | 3.302 | 2.751 | 2.385 | 1.415 | 0.393 |

碳源量为 1%（重量/体积），由表 1 可知，纤维素粉作碳源产酶活力最好。葡萄糖，麦草浆次之。

2. *纸浆浓度对产酶活力的影响*：通过二次正交试验，经计算结果表明，纸浆浓度不同，其产酶活力不一样。以 1%（重量/体积）的纸浆量产酶活力最好[3]。

3. *培养基起始 pH 对产酶活力的影响*：正交试验的结果表明，当培养基的起始 pH 分别为 4.6，5.4 和 6.4 时，对产酶活力影响不大，以 pH6.4 较好。当培养基 pH 分别为 3.0，4.6，6.0 时，影响产酶活力显著，以 pH6.0 产酶活力最好。我们在此基础上又作了 pH 分别为 5，6，7，8，9 的摇瓶产酶活力的发酵试验，结果见图 1。

图 1 表明，产酶活力的适宜 pH 范围是

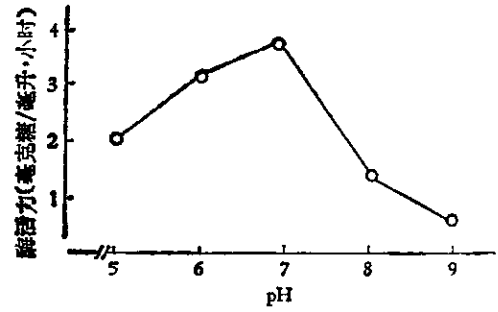


图 1 培养基起始 pH 对产酶活力的影响

6.0—7.5。因此我们的培养基起始 pH 选用自然 pH6.0—7.0。

4. *氮源及其用量对产酶活力的影响*：从第一次正交试验结果看，硝酸铵作氮源产酶活力最高，硫酸铵次之，尿素最差，而硫酸铵易得，故用硫酸铵作氮源，第二次正交试验结果其用量以 0.5% 产酶活力较高。

5. *发酵时间与产酶活力的关系*：在不同的发酵时间取样，测定酶活力，结果见图 2。

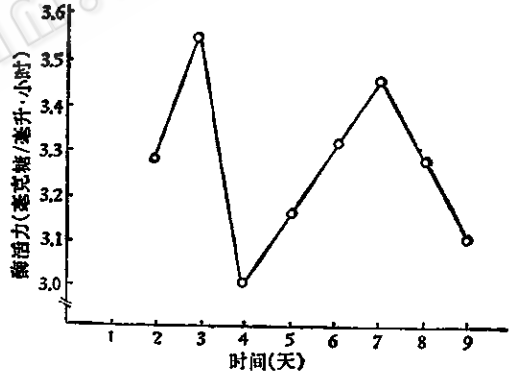


图 2 不同发酵时间与产酶活力的关系

图 2 表明，产纤维素酶酶活力有二个明显的高峰，分别在 72 小时和 168 小时。这与文献[4]报道的情况相似。

6. *接种量对产酶活力的影响*：试验用孢子悬浮液，在摇床上振荡培养 12 小时作种子，OD 值为 0.68（稀释 10 倍，波长 400 毫微米）。发酵五天，其酶活力见表 2。

表 2 说明，接种量对产酶活力影响不大，所以从实际价值考虑用 2%（体积/体积）接种量。

7. *不同种龄对产酶活力的影响*：用孢子悬



© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 2　接种量对产酶活力的影响

| 酶活结果 \ 接种量(%) / 种子 OD 值 | 2 | 5 | 10 | 20 | 30 |
|---|---|---|---|---|---|
| 0.68 | 5.66 | 5.97 | 5.50 | 5.42 | 5.50 |

浮液作种子，分别进行不同时间的振荡培养后再接种(接种量 5%)，结果见表 3。

表 3　不同种龄对产酶活力的影响

| 酶活力结果 \ 种龄(小时) / 单位 | 0 | 6 | 12 | 24 | 36 | 48 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 毫克葡萄糖/毫升·小时 | 1.34 | 2.21 | 3.93 | 3.62 | 3.85 | 3.64 |

表 3 表明，种龄 12 小时产酶活力最高，故在实验中选用 12 小时种龄。这与文献报道一致[5]。

8. *不同形式摇瓶及其装液量对产酶活力的影响*：我们用三种形式的三角瓶作实验设备，即普通 250 毫升、500 毫升三角瓶和 500 毫升带挡板三角瓶。实验结果见表 4。

表 4　不同形式摇瓶及装液量对产酶活力的影响*

| 摇瓶形式和容量 | 装液量(毫升) | 酶活力(毫克葡萄糖/毫升·小时) |
|---|---|---|
| 普通 250 毫升三角瓶 | 50 | 4.0 |
| | 100 | 3.53 |
| | 150 | 2.75 |
| 普通 500 毫升三角瓶 | 50 | 3.93 |
| | 100 | 3.22 |
| | 150 | 0.63 |
| 500 毫升挡板三角瓶 | 100 | 1.81 |
| | 150 | 0.39 |

* 发酵 140 小时

结果说明，随着摇瓶的装液量增加，产酶活力越低。带挡板的三角瓶产酶活力大大低于普通三角瓶。在普通三角瓶的试验中，以 250 毫升三角瓶的产酶活力为高。

9. *不同形式摇床对产酶活力的影响*：用麦草浆和纤维素粉为碳源，在旋转式摇床和往复式摇床上，进行产酶活力的比较，结果见表 5。

表 5　二种摇床对产酶活力的影响

| 酶活力(毫克葡萄糖/毫升·小时) \ 碳源 / 摇床形式 | 麦草浆 | 纤维素粉 |
|---|---|---|
| 旋转式 | 3.302 | 4.402 |
| 往复式 | 2.437 | 3.144 |

表 5 说明，旋转式摇床产酶活力较往复式为高。

## 二、纤维素酶水解废纸浆

用不同培养时间的酶液来酶解麦草浆，作用时间为 120 小时，结果见表 6。

表 6　不同发酵时间酶液对纸浆的酶解结果

| 培养时间(小时) | 酶解糖浓度(%) | 转化率(%) |
|---|---|---|
| 48 | 2.50 | 50 |
| 72 | 2.97 | 59.4 |
| 89 | 2.72 | 54.4 |
| 96 | 2.76 | 55.2 |
| 120 | 2.70 | 54 |
| 136 | 3.21 | 64.2 |
| 144 | 2.68 | 53.6 |
| 160 | 2.55 | 51 |
| 186 | 2.90 | 58 |
| 平均 | 2.78 | 55.5 |

从表 6 来看，平均酶解糖浓度为 2.78%，最高达 3.21%，转化率为 64.2%，国外这方面工作已有报道[1,6,7]，我们准备进行更深入的研究。

## 三、纤维素酶水解产物的纸层析

纤维素酶水解产物的纸层析结果见图 3。

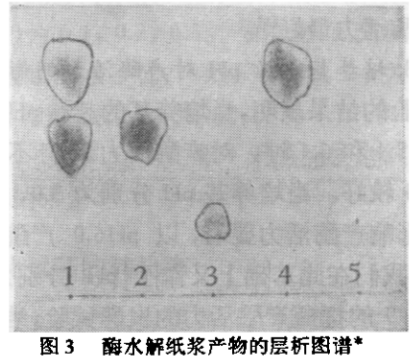


图 3　酶水解纸浆产物的层析图谱*

* 图中 1 为酶解液；2 为葡萄糖；3 为纤维二糖；4 为木糖；5 为酶液。



© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

图 3 结果说明，酶液中不存在葡萄糖、木糖和纤维二糖，但在酶解液中则有较多量葡萄糖和少量纤维二糖。这一结果与文献报道一致[3,8,9]。

## 讨　　论

试验表明，绿色木霉 9023 菌对纤维素粉的利用优于葡萄糖，麦草浆又比木粉、棉浆好。这可能是因为纤维素酶是诱导酶[1,3]，其作用机制有待进一步的工作。而以麦草浆为碳源，不同发酵时间所产生的纤维素酶活力不同，分别在 72 小时和 168 小时出现高峰，这与文献报道的情况有些不同[4]，因此很值得重视和研究。

有些研究者[4]认为振荡培养的产酶活力较静止培养的为高，充气比率或搅拌器的类型对产酶活力没有影响，只有搅拌速度影响产酶活力。但我们的实验说明，摇瓶的类型和装液量对产酶活力是有影响的，摇床的类型对产酶活力也有影响。

## 参 考 文 献


[1] 中国科学院微生物研究所纤维素酶研究小组等：微生物学报 17(2):137—142，1977。

[2] 中国科学院微生物研究所纤维素酶组：微生物学通报 6(3):16—21，1979。

[3] Mary mandels and James Weber: The Production of Cellulases, Cellulases and Their Application, (Advances in Chemistry Series Vol 95) American Chemical Society, 1969, 391—414.

[4] R. Pyē, A. Fiechter and Galas: *European Journal of Applied Microbiology* 4(3): 151—158, 1977.

[5] 张文雄，宇佐美昭次：発酵工学雑誌，47(7):447—455，1969。

[6] 西沢一俊：発酵工学雑誌：51(4):267—304，1973。

[7] Tarum, K. Ghose, Ashland Mass: US. Patent, 3642580, 1972.

[8] Surinder, Dhawan and J. K. Gupta: *J. Gen. Appl. Microbiol* 23(4): 155—161, 1977.

[9] 中国科学院微生物研究所纤维素酶研究小组等：微生物学报 17(3):231—238，1977。


© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn