

转化蔗髓 P2 菌株的鉴定及其产酶条件

张发群 刘淑华 徐云泉 郝 军 侯明贞

(中国科学院成都生物研究所,成都)

摘要 从蔗髓纸浆中分离筛选出一株霉菌,经鉴定,定名为康氏木霉 (*Trichoderma koningii*) P2 菌株。在蔗髓 70g、麸皮 30g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2g、 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 0.8g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g、 KH_2PO_4 0.1g、 MnSO_4 3.2mg、葡萄糖母液 2g、水 300ml, pH5, 温度 28—30℃ 条件下,培养 4 天, P2 菌株 CMC 酶活达 2400 mg 还原糖/g·0.5h, FP 酶活达 200mg 还原糖/g·h。

关键词 康氏木霉;纤维素酶;蔗髓

提高纤维分解菌酶活力的研究,是开发纤维素资源的重要课题。按 Mandles 和 Reese 建议,选择适当的底物,改良菌株以及改变培养条件可获得有充分活性和廉价的纤维素酶。目前国内外较有成效的手段仍是采用诱变育种和产酶条件的选择^[1]。并获得了纤维素酶高产突变株^[2-4]。本文报道 P2 菌株的鉴定及培养条件对其纤维素酶形成的影响。

材料和方法

(一) 菌株

康氏木霉 (*Trichoderma koningii*) P2 菌株由中国科学院成都生物研究所从蔗渣纸浆中分离。

(二) 培养基

1. 斜面培养基: 蔗渣纸浆麸皮斜面培养基^[2]。

2. 三角瓶培养基: 蔗髓 70 g, 麸皮 30 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, KH_2PO_4 0.1g, 水 300 ml, 自然 pH。将上述培养基装入 250 ml 三角瓶内。高压蒸气灭菌 ($1.2\text{kg}/\text{cm}^2$) 半小时,每瓶接 1 ml 孢子悬液, 28—30℃ 培养 4 天,测定酶活。

(三) 酶液制备及酶活力测定^[3]

结果与讨论

(一) P2 菌株的鉴定

1. 形态特征: 菌丝具有横隔,孢子浅绿色,且呈粘质团块,自始至终聚成小球状。分生孢子梗分枝不规则,菌落亮绿色。按 Mason 的分类系统, P2 菌株应属于木霉属。

2. 毒性试验: 将该菌的发酵滤液,浓缩 15 或 30 倍,对 4 组共 80 只小白鼠进行试验,无急性毒性。腹腔注入孢子悬液, 1898×10^4 个/只,进行了三次共 8 组,每组 20 只小白鼠,也无急性毒性。

(二) 产酶条件

1. 底物浓度

比较了蔗髓与麸皮的不同配比与 P2 菌株的产酶关系。从表 1 可看出,随麸皮用量增加, P2 菌株 CMC 与 FP 酶活逐渐递增,而麸皮用量为 70% 时, CMC 酶活与 FP 酶活开始下降。麸皮用量增至 80% 时,酶活急剧下降。从生长情况看,随麸皮用量增加菌株生长繁殖加快,培养 4 天铺满绿色孢子。因此,加大麸皮用量可以缩短培养时间,对于繁殖孢子是有利的,但用量不宜超过 70%,否则,不利于产酶。

随蔗髓用量减少, P2 菌株的 CMC 与 FP

表1 不同底物浓度与 P2 菌株的产酶关系

蔗糖:麸皮 (%)	CMC 酶活 mg 还原糖/g·0.5h	FP mg 还原糖/g·h	滤纸崩溃
85:15	950	103	++
80:20	1245	128	++
70:30	1400	139	++
60:40	1530	141	++
50:50	1700	186	++
40:60	1905	250	+++
30:70	1301	175	++
20:80	355	59.5	+
10:90	330	49	+

酶活逐渐增加。但当蔗糖用量减少至30%时, CMC与FP酶活开始下降。

P2菌株在生长繁殖及产酶过程中,对碳氮比有一定的要求。微量元素也会影响它们的生长繁殖及生理代谢^[4],从而影响产酶能力。本试验表明,采用70%蔗糖和30%麸皮时对产酶有利。

2. 氮源: 7种无机氮源对P2菌株产酶的影响结果见表2。以硫酸铵作氮源时,其CMC与FP、滤纸崩溃三种酶活指标都比其他6种氮源好,氯化铵和磷酸氢二铵次之。最终pH均呈酸性。

以尿素和亚硝酸钠作氮源时,培养物终pH常偏碱性。以硝酸钠、硝酸钾作氮源时,培养物

终pH常偏中性。在这两种情况下,菌株生长差,酶活也低。

上述结果表明,最终pH对P2菌株产酶的影响很大。采用硫酸铵与尿素作混合氮源,在总氮量固定的情况下,硫酸铵与尿素比为3:2和4:1时,培养物终pH为5,CMC、FP、滤纸崩溃三项酶活指标均较高。其他配比的最终pH偏碱,酶活指标均低(表3)。

3. 培养时间、培养过程中 pH 的变化

试验结果表明(表4),以纤维素作碳源培养P2菌株时,需要14小时延迟期后才开始旺盛生长。生长旺盛时,培养基的pH迅速下降到3。随培养时间增加(培养3天时),pH又回升到4.5—5。继续培养到4天,pH保持在

表2 无机氮源与 P2 菌株产酶的关系

氮源名称	浓度 (%)	CMC 酶活 mg 还原糖/g·0.5h	FP 酶活 mg 还原糖/g·h	滤纸崩溃	终 pH
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	1510	236	+++	4—5
NH ₄ Cl	2	1405	215	+++	5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2	1310	168	++	6
NH ₂ CONH ₂	2	286	87	++	7.5
NaNO ₂	2	293	48	++	7.5
NaNO ₃	2	293	66	++	7
KNO ₃	2	280	65	++	7

表3 混合氮源用量与产酶关系

硫酸铵:尿素 (总氮量 2%)	CMC 酶活 mg 还原糖/g·0.5h	FP 酶活 mg 还原糖/g·h	滤纸崩溃	终 pH
4:1	1580	202	+++	5
3:2	1520	197	+++	5
2:3	206	61	+	7—7.5
1:4	196	58	+	7.5

4.5—5 范围,此时, P2 菌株酶活最高。培养到 5 天以后, pH 已趋于平衡。如果纤维素被消耗尽,则纤维素酶形成也停止,即使延长时,酶产量也不会增加。当培养至 7 天, CMC 和 FP 酶活急剧下降。因此,选择适当的培养时间,控

制其产酶的高峰是很重要的。

4. 微量元素: 采用 4 种不同浓度的微量元素,每瓶加入 1 ml。对照以 1 ml 蒸馏水代替。从表 5 可以看出, Fe^{3+} 对 P2 菌株的 CMC、FP 酶活有抑制作用,而 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 和 Zn^{2+} 有激活作用,可提高 P2 菌株的 CMC 和 FP 酶活,其效果以加 Mn^{2+} 2.4—3.2mg/L 为宜。该结果与 Mizukoshi 等人的报道相一致^[6,3]。

5. 葡萄糖母液的影响: 在培养基中加入不同量的葡萄糖母液,产酶明显加快,酶产量亦增加(表 6)。当添加量为 0.1—0.3 ml 时,对产生纤维素酶有诱导效应,添加量超过 0.5 ml 时, P2 菌株产酶能力逐渐下降。这表明, P2 菌株纤维素酶的形成,一方面可能受诱导机制的调节,另一方面受到降解物阻遏机制的控制。因此,如葡萄糖母液添加到 1—1.5 mL 时, P2 菌

表 4 培养时间与培养过程中 pH 的变化与产酶关系

培养时间(天)	CMC 酶活 mg 还原糖/g·0.5h	FP 酶活 mg 还原糖/g·h	pH
0	29	26	6
1	148	55	3
2	1510	178	4
3	1990	207	4.5—5
4	2420	360	4.5—5
5	2275	241	5
6	2325	190	5
7	1790	128	6
8	1530	141	6

表 5 微量元素对 P2 菌株产酶的影响

微量元素	浓度 mg/L	CMC 酶活 mg 还原糖/g·0.5h	FP 酶活 mg 还原糖/g·h	微量元素	浓度 mg/L	CMC 酶活 mg 还原糖/g·0.5h	FP 酶活 mg 还原糖/g·h
Mn^{2+}	0.8	1400	170	Co^{2+}	1	1475	178
	1.6	1450	180		2	1710	202
	2.4	1800	177		3	1800	214
	3.2	1880	196		4	1575	190
	4	1600	212		5	1406	178
对照		1400	162	对照		1400	174
Zn^{2+}	0.7	1520	152	Fe^{3+}	2.5	580	117
	1.4	1520	147		5	1161	130
	2.1	1460	143		7.5	1220	113
	2.8	1440	150		10	1155	75
	3.5	1425	140		12.5	1350	106
对照		1400	140	对照		1400	145

表 6 葡萄糖母液的影响

葡萄糖母液(ml)	CMC 酶活 (mg 还原糖/g·0.5h)	FP 酶活 (mg 还原糖/g·h)
CK	1206	190
0.1	1416	199
0.3	1536	218
0.5	1403	217
0.7	1380	197
1	745	161
1.5	180	未测出

葡萄糖母液由四川内江制药厂提供(即玉米经酸水解后葡萄糖结晶的第一次离心液)

株的 CMC 与 FP 酶活受到强烈抑制,阻遏了纤维素酶的形成。添加适当浓度的葡萄糖母液 P2 菌株生长繁殖快,能缩短培养时间,提高产酶能力^[7]。这可能是葡萄糖母液中含有较高的槐糖杂质,并提供前期菌丝生长的碳源及微量的钙、铁、镁等离子,促进 P2 菌株的生理代谢。

通过上述试验表明,康氏木霉 P2 菌株是一株分解蔗髓纤维能力强的野生型菌株。其最适培养基成分: 蔗髓 70g, 麸皮 30g, $(NH_4)_2SO_4$

(下转第 126 页)

(上接第 83 页)

1.2 g, NH_2CONH_2 0.8g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, KH_2PO_4 0.1g, MnSO_4 3.2mg/L, 葡萄糖母液 2g, 水 300 mL, pH 5。培养温度 28—30℃, 培养时间 96 小时。在此条件下, CMC 和 FP 酶活可分别达到 2400 mg 还原糖/g · 0.5h 和 200mg 还原糖/g · h。

康氏木霉 P2 菌株不含黄曲霉毒素 B_1 , 小白鼠毒性试验无急性毒性。

参 考 文 献

1. Mandels M: *Biotech. Bioeng. Symp.*, **5**:81, 1975.
2. 西北水土保持生物土壤研究所: 微生物学通报, **4**(4): 15—17, 1974。
3. 张发群等: 调味副食品科技, **3**: 21—22, 1981。
4. Micheel J et al.: *Can. J. Microbiol.*, **27**:8, 1981.
5. Enari T M et al.: *Advances in Biochemical Engineering*, **5**:3—24, 1977.
6. Mizukoshi S et al.: *J. Ferment. Technol.*, **55**(5): 548—552, 1977.
7. Gallo B J et al.: *Biotech. Bioeng. Symp.*, **8**:89—101, 1978.