

低温纤维素酶菌株 CNY086 选育及 发酵培养基优化(I)

陈 亮 迟乃玉 张庆芳*

(大连大学生物工程学院 辽宁 大连 116622)

摘 要: 自渤海湾海泥中分离 21 株低温纤维素酶产生菌。其中菌株 CNY01 为绿色木霉 (*Trichoderma viride*), 酶活力为 67.30 U/mL。以该菌株为出发菌株, 经 UV、DES 等诱变, 选育出高产突变菌株 CNY086, 酶活力为 92.17 U/mL。该突变菌株低温纤维素酶发酵具有遗传稳定性。通过单因素和正交实验确定突变菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵最适培养基: 秸秆粉 1.20%、麸皮 0.70%、硫酸铵 0.50%、磷酸二氢钾 0.55%, 上述条件下 CNY086 菌株酶活力达到 108.55 U/mL。
关键词: 低温纤维素酶, 选育, 优化

Breeding and Fermentation Medium Optimization of Cold-active Cellulase Strain CNY086 (I)

CHEN Liang CHI Nai-Yu ZHANG Qing-Fang*

(College of Bioengineering, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

Abstract: 21 cold-active strains which produced cold-active cellulase were isolated from Bohai Bay. One of the strains CNY01 was a kind of *Trichoderma viride* and its cellulase activity was 67.30 U/mL. Through UV and DES mutation, the strain CNY086 was bred and its cellulase activity was 92.17 U/mL. The strain CNY086 had stable ability to produce cellulase. Through orthogonal experiment, the optimal condition of the fermentation medium had been tested. The suitable medium was that straw power 1.20%, bran 0.70%, (NH₄)₂SO₄ 0.50%, KH₂PO₄ 0.55%, in this condition the cellulase activity came to 108.55 U/mL.

Keywords: Cold-active cellulase, Breeding, Optimization

纤维素是植物光合作用的主要产物, 全球年产量 1.5×10^6 万吨。高效纤维素酶的研究开发是可再生性资源利用的关键, 对解决工农业原料、能源、环境等问题十分重要^[1]。纤维素酶是指能降解纤维素分子生成纤维二糖和葡萄糖等小分子物质的一组酶的总称, 是复合诱导酶^[2]。目前广泛应用于纺

织、食品、可再生资源利用等领域的纤维素酶几乎都是中温纤维素酶^[3]。而高效的低温纤维素酶的研究文献报道较少。低温纤维素酶(最适作用温度 15°C~25°C)与中温纤维素酶(最适作用温度 45°C~55°C)相比在应用上更具优势和潜力, 其在自然条件下具有高酶活力及高催化效率, 可大大缩短处理

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA091505, 2007AA021306); 辽宁省自然科学基金(No. 2050775)

*通讯作者: Tel: 86-411-87402624; 信箱: zqf7566@126.com

收稿日期: 2009-05-22; 接受日期: 2009-06-09

过程的时间并节省昂贵的加热或冷却费用, 经过温和的热处理即可使其活力丧失, 不会影响产品品质。因此, 其应用对于减少工艺流程、降低生产成本以及节能方面有相当大的优势^[4-6]。本文通过低温纤维素酶菌株选育及发酵培养基优化的研究, 拟为低温纤维素酶规模化生产和应用奠定研究基础。

1 材料和方法

1.1 菌株

绿色木霉 CNY01(*Trichoderma viride*): 分离自渤海湾海泥, 大连大学发酵工程实验室保藏。

1.2 培养基

分离培养基: CMC-Na 双层平板培养基, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

种子培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、陈海水 1000 mL, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

液体发酵培养基: 秸秆粉 2.00%、麸皮 1.50%、硫酸铵 0.60%、磷酸二氢钾 0.60%, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株分离: 样品稀释涂布于 CMC-Na 双层平板, 20°C 培养 3 d~5 d, 然后 0.2% 刚果红染色 1 h, 1 mol/L NaCl 脱色 2 h^[7]。

1.3.2 粗酶液制备: 发酵液于 4°C, 8000 r/min 离心 15 min, 上清液即粗酶液。

1.3.3 酶活力测定: 根据 Horikoshi 方法^[8]。酶活力定义为每分钟水解底物产生 1 μ g 还原糖的酶量为一个酶活力单位(U/mL)。

1.3.4 诱变选育: 1) UV 诱变选育: 将出发菌株孢子悬液调整为 1.0×10^7 个/mL, 在 30 W 紫外灯、距离 15 cm 条件下诱变一定时间, 稀释涂平板, 测定酶活力。2) DES 诱变选育: 将 UV 诱变选育到的正突

变菌株孢子悬液调整为 1.0×10^7 个/mL, 2% DES, 100 r/min 诱变一定时间, 硫代硫酸钠终止反应, 稀释涂平板, 测定酶活力。

1.3.5 发酵培养基单因素实验: 分别控制碳源、麸皮、氮源和无机盐含量, 于 500 mL 锥形瓶装基础培养基 200 mL, 接种量 5%, 温度 20°C, 145 r/min 发酵 48 h; 取发酵液于 4°C、8000 r/min 离心 15 min, 测定上清液酶活力。

1.3.6 培养基优化正交实验: 根据单因素实验结果, 采用 $L_{25}(5^4)$ 正交实验优化发酵培养基组份, 正交实验设计见表 1。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

渤海湾海泥稀释涂布 CMC-Na 双层平板, 15°C 培养 3 d, 分离得到 21 株低温纤维素酶产生菌。其中一株为霉菌, 酶活力最高为 67.30 U/mL; 鉴定为绿色木霉(*Trichoderma viride*)^[9], 命名 CNY01。

2.2 诱变选育

2.2.1 UV 诱变选育: 设定紫外线诱变不同时间, 稀释涂布 CMC-Na 双层平板, 刚果红染色, 分别挑选其中透明圈与菌落直径比大的 7 个诱变菌株, 取 D/d 比的平均值, 并对诱变后得到的突变菌株进行低温纤维素酶发酵, 测定酶活力。实验结果见表 2。由表 2 可以看出, 紫外线诱变 9 min 时得到的突变株其透明圈与菌落直径比平均值最大, 同时酶活力最高为 76.95 U/mL, 比出发菌株酶活力提高了 14.34%, 命名为 CNY08。

2.2.2 DES 诱变: 设定 DES 诱变不同时间, 稀释涂布 CMC-Na 双层平板, 刚果红染色, 分别挑选其中透明圈与菌落直径比大的 7 个诱变菌株, 取 D/d 比的平均

表 1 培养基优化 $L_{25}(5^4)$ 因素和水平
Table 1 $L_{25}(5^4)$ factors and levels on fermentation medium

水平 Level	因素 Factor	A	B	C	D
		秸秆粉(%) Straw powder (%)	麸皮(%) Bran (%)	硫酸铵(%) (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	磷酸二氢钾(%) KH ₂ PO ₄ (%)
1		0.60	0.50	0.50	0.50
2		0.80	0.60	0.55	0.55
3		1.00	0.70	0.60	0.60
4		1.20	0.80	0.65	0.65
5		1.40	0.90	0.70	0.70

表 2 UV 诱变时间与酶活力关系
Table 2 The relationship between UV mutagenesis time and activity

Mutation time (min)	1	3	5	7	9	11	0
Ratio	1.16	1.18	1.15	1.26	1.43	1.05	1.16
Activity (U/mL)	67.30	68.43	66.26	69.87	76.95	60.77	67.30

表 3 DES 诱变时间与酶活力关系
Table 3 The relationship between DES mutagenesis time and activity

Mutation time (min)	10	20	30	45	60	120	0
Ratio	1.41	1.09	1.65	1.52	1.37	1.19	1.42
Activity (U/mL)	75.42	63.74	92.17	83.35	72.18	68.76	76.87

值, 并对诱变后得到的突变菌株进行低温纤维素酶发酵, 测定酶活力。实验结果见表 3。

由表 3 可以看出, 2% DES 对菌株 CNY08 诱变 30 min 时得到的突变株其透明圈与菌落直径比平均值最大, 同时酶活力最高为 92.17 U/mL, 比出发菌株酶活力提高了 36.95%, 命名为 CNY086。

2.3 突变菌株 CNY086 遗传稳定性研究

对突变菌株 CNY086 连续传代培养 15 代, 自第 5 代起每间隔一代, 进行低温纤维素酶发酵, 测定酶活力, 结果见图 1。

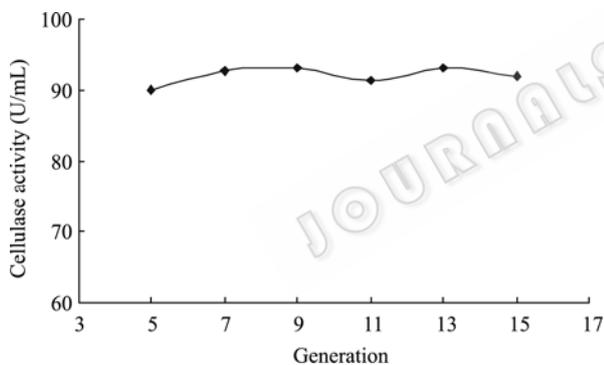


图 1 突变菌株 CNY086 遗传稳定性研究
Fig. 1 Genetic stability of strain CNY086

图 1 表明: 突变菌株 CNY086 经 15 代代发酵, 其酶活力始终保持在 89.87 U/mL~93.65 U/mL 之间, 与第一代酶活力(92.17 U/mL)相比变化不大, 酶活力变化为 0~2.30 U/mL, 说明突变菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵遗传具有稳定性。

2.4 碳源对突变菌株 CNY086 发酵影响

以秸秆粉为碳源, 控制其浓度分别为 0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4%, 突变菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵实验结果如图 2。

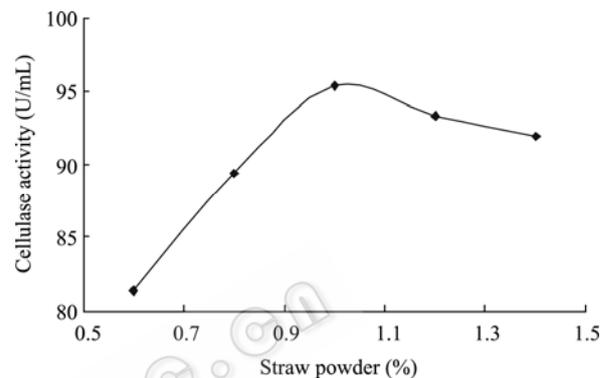


图 2 秸秆粉对突变菌株 CNY086 发酵影响
Fig. 2 The effect of straw powder on fermentation of strain CNY086

图 2 表明, 秸秆粉含量在 0.6%~1.0% 之间, 随着碳源含量增加, 突变菌株 CNY086 发酵酶活力增大; 当秸秆粉含量为 1.0% 时, 酶活力达到最大值 95.31 U/mL; 随着秸秆粉含量继续增加, 酶活力开始下降, 此时可能是底物抑制, 使低温纤维素酶合成量下降。因此, 确定突变菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵秸秆粉最适用量为 1.0%。

2.5 麸皮对突变菌株 CNY086 发酵影响

在优化碳源最适用量为 1.0% 的基础上, 控制液体发酵培养基中麸皮含量分别为 0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%, 突变菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵实验结果如图 3。

图 3 表明, 麸皮含量在 0.4%~0.5% 之间, 随着麸皮含量增加, 突变菌株 CNY086 发酵酶活力增大; 当麸皮含量为 0.5% 时, 酶活力达到最大值 97.40 U/mL; 随着麸皮含量继续增加, 酶活力开始下降。因此, 确定突变菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵麸皮最适用量为 0.5%。

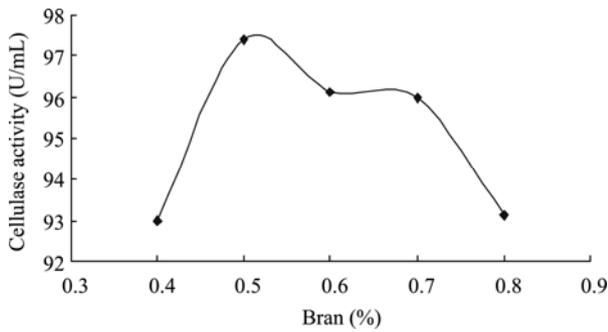


图3 麸皮对突变菌株 CNY086 发酵影响

Fig. 3 The effect of bran on fermentation of strain CNY086

2.6 氮源对突变菌株 CNY086 发酵影响

在优化碳源最适用量为 1.0%、麸皮最适用量为 0.5%的基础上,控制液体发酵培养基中硫酸铵浓度分别为 0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%,突变菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵实验结果见图 4。

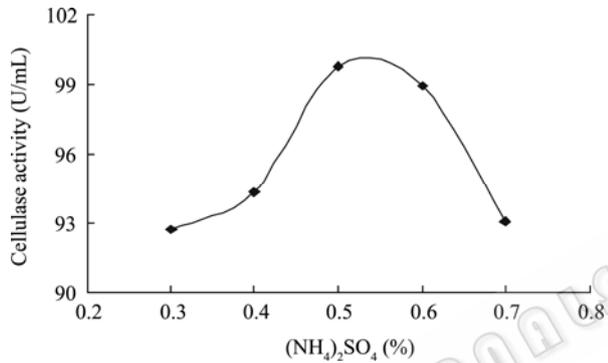
图4 (NH₄)₂SO₄对突变菌株 CNY086 发酵影响

Fig. 4 The effect of (NH₄)₂SO₄ on fermentation of strain CNY086

图 4 表明,硫酸铵含量在 0.3%~0.5%之间,随着氮源含量增加,突变菌株 CNY086 发酵酶活力增大;当硫酸铵含量为 0.5%时,酶活力达到最大值 99.87 U/mL;随着硫酸铵含量继续增加,酶活力开始下降,这是由于碳氮比例失调所致。因此,确定突变菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵硫酸铵最适用量为 0.5%。

2.7 磷酸二氢钾对突变菌株 CNY086 发酵影响

在优化碳源最适用量为 1.0%、麸皮最适用量为 0.5%、氮源最适用量为 0.5%的基础上,控制液体发酵培养基中磷酸二氢钾含量分别为 0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%,此时其自然 pH 分别为 5.37、5.13、5.06、4.98、4.77,突变菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵实验结果见图 5。

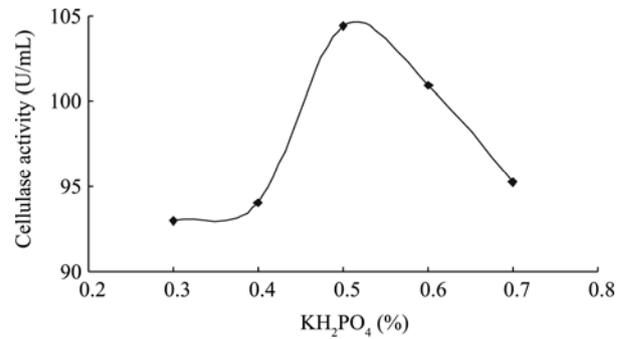
图5 KH₂PO₄对突变菌株 CNY086 发酵影响

Fig. 5 The effect of KH₂PO₄ on fermentation of strain CNY086

图 5 表明,磷酸二氢钾含量在 0.3%~0.5%之间,随着含量增加,突变菌株 CNY086 发酵酶活力增大;当磷酸二氢钾含量为 0.5%时,酶活力达到最大值 104.37 U/mL;随着磷酸二氢钾含量继续增加,酶活力开始下降。因此,确定突变菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵磷酸二氢钾最适用量为 0.5%。

2.8 培养基优化 L₂₅(5⁴)正交实验

在单因素实验确定了碳源 1.0%、麸皮 0.5%、氮源 0.5%、无机盐 0.5%的基础上,进行培养基优化 L₂₅(5⁴)正交实验。结果如表 4。

由表 4 可以看出,发酵培养基不同的因素组合对菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵影响显著,从上述分析看来,发酵培养基因素组合为 A₃B₅C₂D₄ 时,酶活力最低 53.96 U/mL,说明该组合最不适合突变菌株 CNY086 发酵产酶;当培养基因素组合为 A₄B₃C₁D₄ 时,酶活力最高 108.55 U/mL,说明该组合有利于突变菌株 CNY086 发酵。

对 A 因素均值 4 为最大值,此时 A 因素水平为 1.20%; B 因素均值 3 达到最大值,此时 B 因素水平为 0.70%; C 因素均值 1 达到最大值,此时 C 因素水平为 0.50%; D 因素均值 2 达到最大值,此时 D 因素水平为 0.55%。最适合菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵的培养基因素组合为 A₄B₃C₁D₂。各因素在不同水平下的均值的趋势如图 6。

图 6 表明:最适合菌株发酵 CNY086 发酵产低温纤维素酶的培养基因素组合为 A₄B₃C₁D₂。发酵培养基正交实验方差分析,见表 5。

由表 5 可以看出,秸秆粉是低温纤维素酶发酵的显著性影响因素。因此,在发酵产酶过程中要控制好秸秆粉的用量。

表 4 培养基优化 $L_{25}(5^4)$ 正交实验结果
Table 4 Results of the experiment $L_{25}(5^4)$ on fermentation medium

Group	A	B	C	D	Result (U/mL)
1	1	1	1	1	87.99
2	1	2	2	2	85.55
3	1	3	3	3	79.40
4	1	4	4	4	67.90
5	1	5	5	5	66.04
6	2	1	2	3	75.80
7	2	2	3	4	86.13
8	2	3	4	5	80.44
9	2	4	5	1	71.53
10	2	5	1	2	88.92
11	3	1	3	5	69.87
12	3	2	4	1	63.37
13	3	3	5	2	71.27
14	3	4	1	3	59.00
15	3	5	2	4	53.96
16	4	1	4	2	92.52
17	4	2	5	3	94.15
18	4	3	1	4	108.55
19	4	4	2	5	99.37
20	4	5	3	1	63.83
21	5	1	5	4	91.59
22	5	2	1	5	83.23
23	5	3	2	1	88.57
24	5	4	3	2	80.56
25	5	5	4	3	67.32
μ_1	77.38	83.55	85.54	75.06	
μ_2	80.56	82.47	80.65	83.76	
μ_3	63.49	85.65	75.96	75.13	
μ_4	91.68	75.67	74.31	81.63	
μ_5	82.25	68.01	78.92	79.79	
R	28.19	17.64	11.23	8.70	

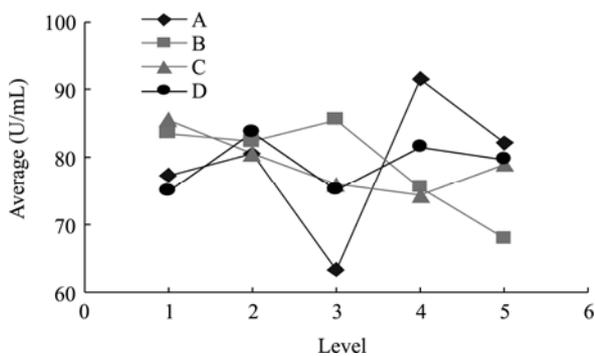


图 6 各因素趋势
Fig. 6 Curve of factor trend

表 5 发酵培养基方差分析
Table 5 Fermentation analysis of variance

Factor	SS	df	F	$F_{0.05}$	Significance
A	2084.821	4	6.872	6.390	*
B	1044.003	4	3.441	6.390	
C	383.486	4	1.264	6.390	
D	303.370	4	1.000	6.390	
Error	303.370	4			

综上所述, 菌株 CNY086 液体发酵产酶培养基最适组合是: $A_4B_3C_1D_2$ 。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

3 讨论

本文以渤海湾海泥分离的 CNY01 菌株为出发菌株, 采用 UV、DES 诱变时, 常规诱变方法效果不明显。后来在基础培养基中孢子 2 h 萌发并将孢子悬液浓度调整至 1.0×10^7 个/mL 时, 两种诱变效果均较好。

CNY086 菌株低温纤维素酶发酵培养基优化时, 单因素与 $L_{25}(5^4)$ 正交实验结果发现差异: 单因素确定碳源、麸皮、无机盐用量分别为: 1.0%、0.5%、0.5%。而正交实验确定碳源、麸皮、无机盐用量分别为: 1.20%、0.70%、0.55%。出现上述差异原因, 主要是因素之间相互作用结果。

本文的后续研究工作是对 CNY086 菌株发酵条件温度、时间等条件进行优化以及最适条件下 5 L 发酵结果, 拟在另文中报道。

参 考 文 献

[1] Runying Zeng, Pengjun Xiong, Jianjun Wen. Characterization and gene cloning of a cold-active cellulase from

deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. DY3. *Extremophiles*, 2006, **10**: 79–82.

[2] 王 玢, 汪天虹. 产低温纤维素酶海洋嗜冷菌的筛选及研究. *海洋科学*, 2003, **27**(5): 42–45.

[3] Leonardo Faria Martins, Daniel Kolling, Marli Camassola, et al. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(5): 1417–1424.

[4] Mussatto SI, Dragone G, Roberto IC. Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential applications. *J Cereal Sci*, 2006, **43**: 1–14.

[5] 汪天虹, 王春卉, 高培基. 纤维素酶纤维素吸附区的结构和功能. *生物工程进展*, 2000, **20**(2): 37–40.

[6] 刘桂荣, 张 鑫, 郑明珠. 纤维素酶的生产及应用前景. *食品研究与开发*, 2004, **1**(25): 14–16.

[7] 陈燕勤, 毛培宏, 金 湘, 等. 纤维素酶及其分子生物学研究. *化学与生物工程*, 2004, **2**: 1–3.

[8] Horikoshi K, Nakao M, Kurono Y, et al. Cellulase of an alkaliphilic *Bacillus* strain isolated from soil. *Microbiol*, 1984, **30**: 774–779.

[9] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 科学技术出版社, 1979, pp.493–494.

2010 年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-1)

刊物名称	邮发代号	刊 期	年价(元)	网 址	E-mail
大豆科学	14-95	双月刊	60		dadoux@sina.com
动物学研究	64-20	双月刊	150	www.zoores.ac.cn	zoores@mail.kiz.ac.cn
动物学杂志	2-422	双月刊	210	http://dwzzz.ioz.ac.cn	journal@ioz.ac.cn
激光生物学报	42-194	双月刊	120	www.jgswxb.net	jgswxb@hunnu.edu.cn
菌物学报	2-499	双月刊	480	http://journals.im.ac.cn/jwxtcn/	jwxt@im.ac.cn
昆虫知识	2-151	双月刊	150	www.ent-bull.com.cn	entom@ioz.ac.cn
林业科学	82-6	月刊	300	www.linyekexue.net	linyix@forestry.ac.cn
人类学学报	2-384	季刊	100	www.ivpp.ac.cn	acta@ivpp.ac.cn
山地农业生物学报	66-66	双月	100	http://web.gzu.edu.cn/jou/jou/	Sd.xb@163.com
生命科学	4-628	月刊	360	www.lifescience.net.cn	cbis@sibs.ac.cn
生物工程学报	82-13	月刊	780	http://journals.im.ac.cn/cjbcn/	cjb@im.ac.cn
生物技术通报	18-92	月刊	300		bio-tech@mail.caas.net.cn
生物技术通讯	82-196	双月	150	http://swtx.chinajournal.net.cn	swtx@263.net
生物信息学	14-14	季刊	48	xxsw.chinajournal.net.cn	cjbioinformatics@yahoo.cn
微生物学报	2-504	月刊	660	http://journals.im.ac.cn/actamicrocn/	actamicro@im.ac.cn
微生物学通报	2-817	月刊	576	http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn/	tongbao@im.ac.cn

http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn