

低温纤维素酶菌株 CNY086 发酵条件优化(II)

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: 本文是在前文(I)确定菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵培养基的基础上,通过单因素和正交实验研究温度、装液量、接种量及种龄对菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵影响。最适发酵温度、装液量、接种量和种龄分别为 15°C、250 mL/500 mL、15%、10 h。上述条件下 CNY086 菌株 5 L 发酵酶活力为 104.36 U/mL。

关键词: 低温纤维素酶, 发酵, 优化

Optimal Fermentation Conditions of Cold-active Cellulase Strain CNY086 (II)

CHEN Liang CHI Nai-Yu ZHANG Qing-Fang*

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

Abstract: Based on the research of text (I) which determined the fermentation medium, the fermentation condition of CNY086 including temperature, volume, inoculum and inoculum age had been studied by single factor and orthogonal experiment. The optimum temperature, liquid volume, inoculum and seed age were 15°C, 250 mL/500 mL, 15%, 10 h. Under the conditions above mentioned, enzyme activity reached 104.36 U/mL in 5 L fermentor.

Keywords: Cold active cellulase, Fermentation, Optimization

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,是一种复合诱导酶^[1]。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型纤维素酶^[2]。而高效的低温纤维素酶的研究报道较少。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^[3],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,对减少工艺流程、降低生产成本以及节能等方面应用具有相当大的优势^[4]。通过对发酵条件进行优化能够大幅度提高低温纤维素酶产量,本文在低温纤维素酶菌株 CNY086 最适发酵培养基确定的基础上,通过单因素和正交实验进一步研究发酵温度、装液量、接种量和种龄,以期为规模化生产低温纤维素酶制剂奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株

菌株 CNY086, 大连大学生物工程学院发酵工

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: 2009-07-09

程实验室保藏。

1.2 培养基

斜面活化培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、陈海水 1000 mL, 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。

发酵培养基: 秸秆粉 1.20%、麸皮 0.70%、硫酸铵 0.50%、磷酸二氢钾 0.55%, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.3 实验方法

1.3.1 粗酶液制备: 发酵 48 h 的发酵液于 4°C, 8000 r/min 离心 15 min, 上清液即粗酶液。

1.3.2 酶活测定法: 根据 Horikoshi 方法^[5]。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。

1.3.3 发酵条件单因素实验: 分别控制温度、装液量、接种量和种龄, 于 500 mL 锥形瓶装发酵培养基, 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。

1.3.4 发酵条件优化正交实验: 根据单因素实验结果, 采用 $L_{25}(5^4)$ 正交实验优化发酵条件, 正交实验设计见表 1。

表 1 发酵条件优化 $L_{25}(5^4)$ 因素和水平

Table 1 $L_{25}(5^4)$ factors and levels on fermentation condition

水平 Level	因素 Factor	A	B	C	D
		温度(°C) Temperature (°C)	装液量(mL) Volume (mL)	接种量%(V/V) Inoculum% (V/V)	种龄(h) Seed age (h)
1		10	100	5	10
2		15	150	10	15
3		20	200	15	20
4		25	250	20	25
5		30	300	25	30

2 结果与讨论

2.1 温度对菌株 CNY086 发酵影响

控制发酵温度分别为 10°C、15°C、20°C、25°C 和 30°C, 菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵结果见图 1。

图 1 表明, 当温度为 10°C~15°C 时, 酶活力随着温度升高而提高; 当温度为 15°C 时, 酶活力达到最大值 98.47 U/mL; 当温度高于 15°C 时, 酶活力呈下降趋势。因此, 确定菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵最适温度为 15°C。

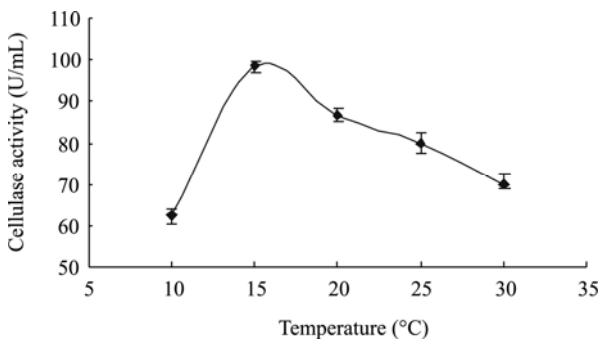


图 1 温度对菌株 CNY086 发酵影响

Fig. 1 The effect of temperature on fermentation

2.2 装液量对菌株 CNY086 发酵影响

在确定最适温度的基础上, 在 500 mL 控制装液量分别为 100 mL、200 mL 和 300 mL, 菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵结果见图 2。

图 2 表明, 当装液量为 100 mL~200 mL 时, 酶活力随装液量增加而提高; 当装液量为 200 mL 时, 酶活力达到最大值 103.58 U/mL; 当装液量大于 200 mL 时, 酶活力呈下降趋势, 此时酶活力下降是由于通气量减少, 即发酵液中溶氧量减少所致。因

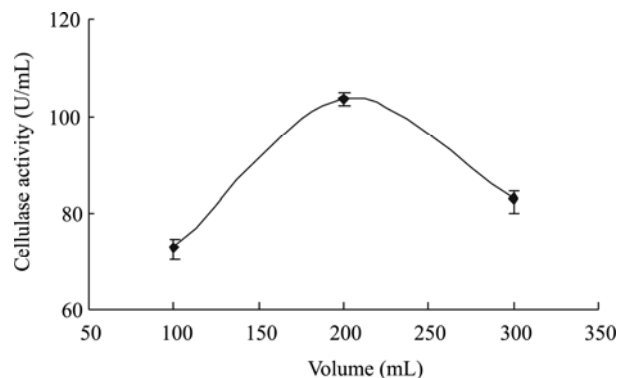


图 2 装液量对菌株 CNY086 发酵影响

Fig. 2 The effect of volume on fermentation

此, 确定菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵最适装液量为 200 mL。

2.3 接种量对菌株 CNY086 发酵影响

在最适温度、装液量的基础上, 控制接种量分别为 5%、10%、15%、和 20%, 菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵结果见图 3。

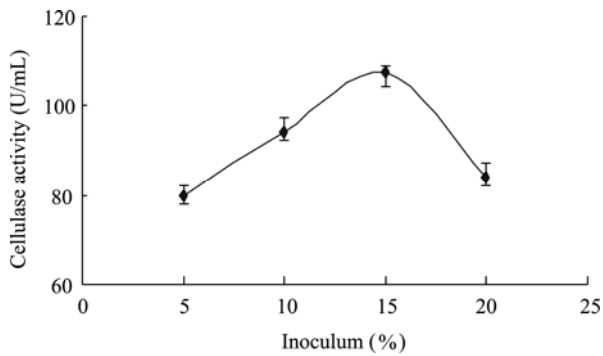


图 3 接种量对菌株 CNY086 发酵影响

Fig. 3 The effect of inoculum on fermentation

图 3 表明, 接种量为 5%~15% 时, 酶活力随接种量增加而提高; 接种量为 15% 时, 酶活力达到最大值 107.32 U/mL; 接种量高于 15% 时, 酶活力开始下降。因此, 确定菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵最适接种量为 15%。

2.4 种龄对菌株 CNY086 发酵影响

在确定最适温度、装液量、接种量的基础上, 控制种龄分别为 10 h、15 h、20 h、25 h 和 30 h, 菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵结果见图 4。

图 4 表明, 当种龄为 10 h~15 h 时, 酶活力随着种龄的增大而呈逐渐上升趋势; 当种龄为 15 h 时, 酶活力达到最大值 110.03 U/mL; 种龄大于 15 h 时, 酶活力呈下降趋势。因此, 确定菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵最适种龄为 15 h。

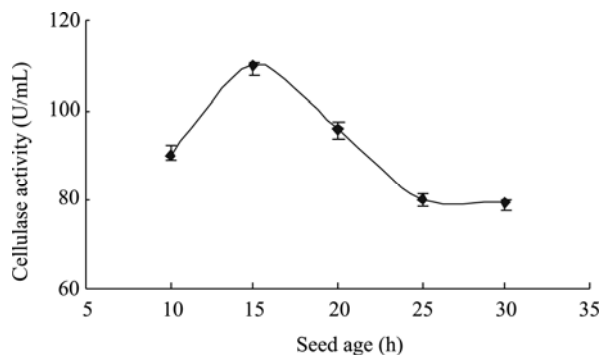


图 4 种龄对菌株 CNY086 发酵影响

Fig. 4 The effect of seed age on fermentation

2.5 发酵条件优化 $L_{25}(5^4)$ 正交实验

在单因素实验确定最适温度、装液量、接种量和种龄的基础上, 进行发酵条件优化 $L_{25}(5^4)$ 正交实验。结果如表 2。

Group	A	B	C	D	Result(U/mL)
1	1	1	1	1	62.32
2	1	2	2	2	95.20
3	1	3	3	3	78.36
4	1	4	4	4	89.86
5	1	5	5	5	86.26
6	2	1	2	3	77.55
7	2	2	3	4	87.65
8	2	3	4	5	99.04
9	2	4	5	1	114.26
10	2	5	1	2	88.35
11	3	1	3	5	74.87
12	3	2	4	1	67.20
13	3	3	5	2	69.18
14	3	4	1	3	68.48
15	3	5	2	4	56.98
16	4	1	4	2	81.15
17	4	2	5	3	82.66
18	4	3	1	4	87.19
19	4	4	2	5	79.52
20	4	5	3	1	88.82
21	5	1	5	4	65.46
22	5	2	1	5	91.14
23	5	3	2	1	98.92
24	5	4	3	2	97.64
25	5	5	4	3	86.84

由表 2 可以看出, 不同的发酵条件组合对菌株 CNY086 低温纤维素酶发酵影响显著, 发酵条件组合为 $A_3B_5C_2D_4$ 时, 酶活力最低 56.98 U/mL; 发酵条件组合为 $A_2B_4C_3D_1$ 时, 酶活力达到最大值 114.26 U/mL。

由表 3 直观分析可以看出, 发酵条件最优组合为 $A_2B_4C_3D_1$ 。

各因素在不同水平下的均值的趋势如图 5。

由方差分析表 4 可以看出, 在研究的 4 个因素中, A 因素和 B 因素是低温纤维素酶发酵的显著性影响因素。因此, 菌株 CNY086 生长和发酵过程中要严格控制 A 因素和 B 因素。

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

表3 直观分析
Table 3 Direct analysis

Serial number	A	B	C	D
1	82.40	72.27	79.50	89.30
2	93.37	84.77	81.64	86.30
3	67.34	86.54	85.47	78.78
4	83.87	89.95	84.82	77.43
5	88.00	81.45	83.56	86.17
R	26.03	17.68	5.97	8.87

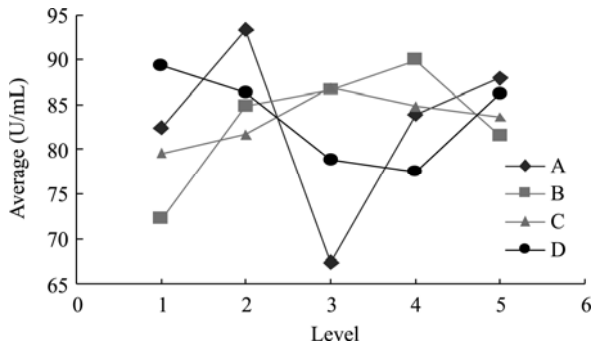


图5 各因素趋势

Fig. 5 Curve of factor trend

表4 发酵条件方差分析
Table 4 Fermentation analysis of variance

Factor	SS	df	F	$F_{0.05}$	Significance
A	1894.447	4	15.884	6.390	*
B	907.747	4	7.611	6.390	*
C	119.265	4	1.000	6.390	
D	403.597	4	3.384	6.390	
Error	119.265	4			

2.6 菌株 CNY086 低温纤维素酶 5 L 发酵

在菌株 CNY086 最适发酵培养基和最适发酵条件下, 进行 5 L 低温纤维素酶发酵。

实验结果表明: 菌株 CNY086 在 5 L 罐中低温纤维素酶发酵酶活力为 104.36 U/mL。比该菌株 500 mL 摇瓶发酵酶活力略有下降。

2.7 菌株 CNY086 低温纤维素酶 5 L 发酵

在菌株 CNY086 最适发酵培养基和最适发酵条件下, 进行 5 L 低温纤维素酶发酵。

实验结果表明: 菌株 CNY086 在 5 L 罐中低

温纤维素酶发酵酶活力为 104.36 U/mL。比该菌株 500 mL 摇瓶发酵酶活力略有下降。

3 讨论

CNY086 菌株低温纤维素酶发酵条件优化时, 单因素与 $L_{25}(5^4)$ 正交实验结果发现差异: 单因素确定装液量和种龄分别为 200 mL/500 mL 和 15 h。而正交实验确定装液量和种龄分别为 250 mL/500 mL 和 10 h。出现上述差异的原因主要是因素之间相互作用所致。

CNY086 菌株低温纤维素酶发酵条件优化是在 500 mL 摇瓶中进行的, 在进行 10 倍发酵放大, 即 5 L 发酵实验时, 酶活力下降, 分析原因可能是以下几方面: 500 mL 摇瓶和 5 L 发酵罐的基质消耗、产物生成、微生物生长等动力学发生变化; 发酵体积 10 倍放大, 导致发酵液溶氧量变化较大; 发酵罐通气及搅拌导致菌体生长状态及生长周期发生变化。本实验启示是: 在进行发酵实验放大时, 尤其是将摇瓶发酵条件上罐时, 应对发酵罐的条件再重新优化, 才能达到比较理想的效果。本文后续研究工作将进行 5 L 发酵罐条件优化。

参考文献

- [1] Wenshui Xia, Ping Liu, Jing Liu. Advance in chitosan hydrolysis by non-speci cellulases. *Bioresource Technology*, 2008, **99**: 6751-6762.
- [2] Prasad S, Singh A, Joshi HC. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour Conserv Recycl*, 2007, **50**: 1-39.
- [3] Runying Zeng, Pengjun Xiong, Jianjun Wen. Characterization and gene cloning of a cold-active cellulase from a deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. DY3. *Extremophiles*, 2006, **10**: 79-82.
- [4] 曾胤新, 俞勇, 陈波, 等. 低温纤维素酶产生菌的筛选、鉴定、生长特性及酶学性质. *高技术通讯*, 2005, **15**(4): 58-61.
- [5] Horikoshi K, Nakao M, Kurono Y, *et al.* Cellulase of an alkaliphilic *Bacillus* strain isolated from soil. *Microbiol*, 1984, **30**: 774-779.