

doi: 10.3969/j.issn.1672-3678.2018.04.012

间歇出酶对纸浆产纤维素酶的促进作用

王磊,王步成,勇强,余世袁

(南京林业大学 林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室,江苏 南京 210037)

摘要: 为了提高分批补料制备纤维素酶的生产能力,本研究采用间歇出酶的方法,定期将部分酶蛋白从培养液中分离出来,以达到高效产酶的目的。在以里氏木霉为产酶菌、以纸浆为碳源的分批补料产酶过程中,从第4天开始间歇出酶。当每天取出10.0%~20.0%的酶液时,总滤纸酶活和总 β -葡萄糖苷酶活分别提高26.3%~40.3%和69.8%~108.9%。为避免感染杂菌,菌丝体也可以不回收;当每天取出15.0%的酶液和菌丝体时,总滤纸酶活提高42.9%,总 β -葡萄糖苷酶活提高84.3%,菌丝体质量浓度维持在4~5 g/L。结果表明:只要菌丝体浓度维持在合理范围内,间歇出酶可以保护已产出的酶蛋白,降低培养液中的产物浓度,从而大幅度提高产酶能力。

关键词: 纤维素酶;分批补料;间歇出酶;里氏木霉;纸浆

中图分类号: TQ351

文献标识码: A

文章编号: 1672-3678(2018)04-0072-08

Periodical enzyme recovery to improve cellulase production from pulp

WANG Lei, WANG Bucheng, YONG Qiang, YU Shiyuan

(Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology of the Ministry of Education, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: Periodical enzyme recovery in a fed-batch cellulase production was investigated to improve the productivity. In the fed-batch cellulase production from pulp by *Trichoderma reesei*, periodical enzyme recovery was started on the fourth day. When 10.0% to 20.0% of cellulase was recovered daily, the total filter paper activity and β -glucosidase activity increased by 26.3% to 40.3% and 69.8% to 108.9%, respectively. When 15.0% of enzymes and mycelia were removed daily, the total filter paper activity and β -glucosidase activity increased by 42.9% and 84.3%, respectively, with mycelia kept at 4~5 g/L. Periodical enzyme recovery could reduce products inhibition or degradation, and thereby to improve the cellulase productivity significantly when the fungal cell concentration is kept within a suitable range.

Keywords: cellulase; fed-batch; enzyme recovery; *Trichoderma reesei*; pulp

能源是人类生存和发展的重要物质基础,随着不可再生能源的逐渐枯竭,开发可再生资源、寻找替代物成为社会发展的必然趋势^[1]。利用气态、热解和生物转化等途径将木质纤维素转化为能源,其

中,通过生物转化制取纤维素乙醇是最受关注的研究之一。纤维素乙醇作为一种可再生的清洁能源,既不与民争粮,又能避免燃烧秸秆带来的环境污染问题,还能增加农民的收入,具有广阔的应用前

收稿日期: 2017-10-30 修回日期: 2018-05-18

基金项目 “十二五”国家科技支撑计划(2015BAD15B09)

作者简介: 王磊(1993—),女,江苏泰州人,硕士研究生,研究方向:生物化工;余世袁(联系人),教授,E-mail: syu@njfu.edu.cn

引文格式: 王磊,王步成,勇强,等.间歇出酶对纸浆产纤维素酶的促进作用[J].生物加工过程,2018,16(4):72-79.

WANG Lei, WANG Bucheng, YONG Qiang, et al. Periodical enzyme recovery to improve cellulase production from pulp[J]. Chin J Bioprocess Eng, 2018, 16(4): 72-79.

景^[3]。我国政府要求到2020年在全国范围推广车用乙醇汽油,需要燃料乙醇1200万t以上,除适度发展粮食燃料乙醇外,还需要大力发展纤维素燃料乙醇等先进生物液体燃料,这为纤维素乙醇提供了发展机遇。

纤维素乙醇的生产工艺包括原料预处理、纤维素酶水解、戊糖己糖发酵等步骤。经济分析表明,在整个生产工艺中,纤维素酶水解的成本占总成本的40%以上^[4],高昂的纤维素酶成本是制约木质纤维素转化乙醇产业化发展的一个瓶颈^[5]。所以,使用廉价的木质纤维原料为碳源并提高纤维素酶产率,是降低纤维素酶生产成本、实现纤维素乙醇工业化生产的关键技术之一。

工业化酶制备主要有间歇产酶、分批补料产酶和连续产酶等3种方式。其中,分批补料产酶可以大幅度提高底物浓度,获得较高的酶活力,因而得到广泛应用。但是,分批补料产酶需要较长的操作时间才能完成。在长时间的产酶过程中,许多物理、化学及生物学因素,如搅拌的剪切力、酶蛋白和固体底物的碰撞、气-液相的接触、代谢产物的抑制作用等,都可能使细胞降低产酶能力,或者使酶蛋白失活。因此,改进分批补料工艺,提高产酶能力,是纤维素酶研究领域的重要课题。

本研究中,笔者在分批补料制备纤维素酶时,提出了间歇出酶的方法,即在产酶过程中定期取出部分已产出的酶蛋白,既保护酶蛋白不受长时间操作的损伤,又可降低培养液中的产物浓度,以提高产酶能力。为避免感染杂菌,同时考察菌丝体不返回培养液对产酶的影响,以期工业化生产工艺的改进提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

里氏木霉(*Trichoderma reesei*) Rut C30,纤维素酶生产菌株,接种于马铃薯-琼脂斜面培养基上,于30℃培养7d,4℃下保存备用,由南京林业大学生物化工实验室提供。

针叶材纸浆由南京林业大学造纸系提供。物料用粉碎机粉碎成粉末状,10g纸浆加入100mL 15g/L的H₂SO₄溶液,搅拌均匀后于121℃水解1h,用温水洗涤直至洗出液呈现中性,4℃下保存备用。按照NREL方法^[6]对物料进行成分分析,主要成分如下:未经过稀酸水解的纸浆中,纤维素质量分数

为80.31%,半纤维素质量分数为17.22%,木质素质量分数为0.95%;经过稀酸水解之后,纤维素质量分数上升至85.37%,半纤维素质量分数为14.64%,木质素质量分数为0.65%。

稀酸蒸汽爆破的玉米秸秆由南京林业大学生物化工实验室提供。筛选粒度为3~5cm的玉米秸秆,用0.5%~1.0%(质量分数)的稀酸浸泡2h,然后于170℃、1.5~2.2MPa下处理5min,经大量蒸馏水洗涤呈中性后,于4℃下保存备用。按照NREL方法^[6]进行成分分析,得到酸爆玉米秸秆的纤维素质量分数为54.90%,半纤维素质量分数为6.93%,木质素质量分数为36.61%。

1.2 试验方法

1.2.1 纤维素生产

活化培养基为Mandels培养基^[7]。分批补料产酶培养基组分:1g/L葡萄糖,2g/LKH₂PO₄,0.3g/LMgSO₄,0.3g/LCaCl₂,1g/L蛋白胨,3.7mg/LCoCl₂·6H₂O,1.4mg/LZnSO₄·7H₂O,1.6mg/LMnSO₄·H₂O,5mg/LFeSO₄·7H₂O和2mL/L吐温80,培养基用柠檬酸-NaOH缓冲液调节初始pH为4.8±0.1。

起始碳源为纸浆,纤维素质量浓度为8g/L,起始氮源为1.83g/L的(NH₄)₂SO₄和0.13g/L的尿素;补加的碳源为稀酸水解纸浆(纤维素质量浓度为6g/L),补加的氮源为1.153g/L的(NH₄)₂SO₄和0.262g/L的尿素。

将里氏木霉试管斜面孢子接入250mL锥形瓶中,瓶中装有50mL活化培养基,在30℃、170r/min的活化条件下培养36h。活化后的菌丝体按接种量10%(体积分数)接入装有50mL产酶培养基,产酶第1天温度控制在30℃,第2天之后控制在28℃,摇床转速为170r/min。

1) 分批补料产酶。起始碳源为纸浆,产酶过程中每隔24h补加稀酸水解纸浆。

2) 间歇出酶。在分批补料的实验基础上,从产酶第4天开始,每隔24h进行间歇出酶实验。模式1:在800r/min、10min的条件下将酶液与菌丝体离心分离,然后取出不同体积分数的酶液,剩余的酶液和菌丝体回收,并向培养体系中补加相同体积的填补液,进行后续产酶直至第8天结束。模式2:由于取出的酶液和菌丝量是一样的,直接摇匀取出所需量的发酵液,然后补加相同体积的填补液继续产酶,第8天结束产酶收取全部酶液。

1.2.2 纤维素酶水解

称取 2.5 g 的绝干酸爆玉米秸秆于酶解瓶中,按实验要求加入纤维素酶 20 FPU/g(以 1 g 纤维素计)、1 mol/L 的柠檬酸缓冲液 2.5 mL 以及适量蒸馏水,使酶水解体系的总体积为 50 mL,在 pH 为 4.8、150 r/min、50 °C 条件下酶水解 48 h。

酶水解得率 = $(0.9\rho V) / (mw) \times 100\%$ (1)
式中: ρ 为水解液中还原糖质量浓度, g/L; V 为水解液体积, L; 0.9 为纤维素和葡萄糖、纤维二糖之间的转换系数; m 为原料的绝干质量, g; W 为原料中纤维素的质量分数, %。

1.3 分析方法

滤纸酶活力和 β -葡萄糖苷酶活力是采用国际理论和应用化学协会(IUPAC)推荐的标准方法^[9]测定。一个滤纸酶活力的国际单位(FPU)等于在标准反应条件下每分钟生成 1 μmol 葡萄糖量所需的酶量。一个 β -葡萄糖苷酶活力国际单位(U)定义为标准条件下每分钟转化 1 μmol 底物(即生成 2 μmol 葡萄糖)的酶量。

蛋白质含量通过 Bradford 法^[9]进行测定,Bradford Reagent 购于 Sigma-Aldrich 公司。

由于存在纤维素,菌丝体浓度无法直接测量,只有通过测定细胞内蛋白质浓度来计算得到^[9]。培养液离心得到固体渣,将固体渣用蒸馏水定容至 50 mL,混合均匀后得到测定液。取 10 mL 测定液,经 G3 玻砂漏斗过滤后,用 15 mL、0.2 mol/L 的 NaOH 溶液将固体转移至 25 mL 刻度试管中,100 °C 沸水中煮 20 min,取出后加蒸馏水定容至 25 mL,用 Bradford 法测定蛋白质浓度。

采用高效液相色谱(HPLC)法测定酶水解液中的糖浓度。在色谱仪 Agilent 1100 型高效液相色谱仪上,采用 Bio-Rad Aminex HPX-87H(300 mm×7.8 mm)色谱柱,以 0.005 mol/L 的 H_2SO_4 作为流动相,流速为 0.6 mL/min,色谱柱温为 55 °C,采用示差折光检测器(RI)检测,进样量为 10 μL 。

2 结果与讨论

2.1 分批补料产酶

采用间歇方式生产纤维素酶时,滤纸酶活最高可达到 2.45 FPU/mL, β -葡萄糖苷酶活达到 0.92 U/mL。纤维素在第 2 天被大量消耗,用以支持菌丝体的生长以及纤维素酶的合成;第 3 天后,培养基中的纤维素所剩无几,此时没有足够的碳源来维持菌丝

体的生存和产酶,所以菌丝体开始逐渐死亡,pH 逐渐升高。当培养基中再无纤维素可利用时,滤纸酶活开始下降。提高底物浓度可以促进菌丝体的生长,增加纤维素酶的产量。

为了提高纤维素酶的产量和得率,采用分批补料方式确保体系中有足够的碳源支持菌丝体的生长以及纤维素酶的合成。以纸浆为底物,起始碳源为纸浆,纤维素质量浓度为 8 g/L,每隔 24 h 补加稀酸水解纸浆(纤维素质量浓度为 6 g/L),第 8 天收样,产酶结果如图 1 所示。

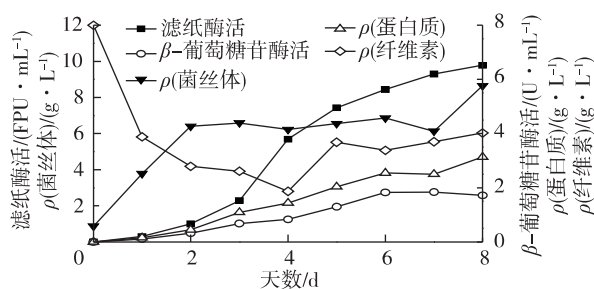


图1 分批补料产酶时各参数的变化情况

Fig. 1 Changes of parameters during fed-batch cellulase preparation

由图 1 可知:每天补加 6 g/L 纤维素的稀酸水解纸浆,纤维素酶活逐渐增加,至第 8 天收样时,滤纸酶活达到 9.78 FPU/mL,此时 β -葡萄糖苷酶活为 1.72 U/mL,与间歇产酶相比,滤纸酶活增加了 3 倍, β -葡萄糖苷酶活增加了 86.96%。胞外蛋白的浓度随着酶活的增加而稳定上升,第 8 天蛋白质量浓度可以达到 3.14 g/L。但随着纤维素的不断补加,菌丝体持续生长,收样时菌丝体质量浓度可以达到 8.65 g/L,此时培养液比较黏稠,传质比较困难。

目前,很多学者都采用分批补料的方式生产纤维素酶,得到了较高的纤维素酶产率。Ma 等^[10]以微晶纤维素为碳源,Shibuya 等^[11]以蒽醌烧碱法纸浆为碳源,采用分批补料的培养方式生产纤维素酶,均得到了 10 FPU/mL 以上的滤纸酶活。由于滤纸酶活是综合酶活力的代表, β -葡萄糖苷酶活因含量低而受到普遍关注,因此本实验主要测定这 2 种酶活。滤纸酶活采用沃特曼(Watman)1 号滤纸为底物, β -葡萄糖苷酶活采用对硝基苯基 β -D-葡萄糖苷为底物,这 2 种底物质量稳定,实验数据的重复性比较好。其他酶活(如,微晶纤维素酶活和羧甲基纤维素酶活)的测定,由于不同批次的底物质量不

够稳定,测定数据的重复性较差,所以本实验没有采用。本实验所用的纸浆是大宗工业产品,纤维素含量高,且价格不高,是诱导纤维素酶的较好原料。但是,纸浆纤维素的结晶度较高,无定形区较少,影响了里氏木霉菌分泌的纤维素酶对纤维素的降解作用。经过稀酸处理后的纸浆纤维长度变短、分丝帚化程度提高,有利于纤维素酶的攻击。实验证明,这2种纸浆的合理搭配使用,能大幅度提高纤维素酶的产率。

分批补料产酶能够有效解决碳源不足的问题,提高纤维素酶的产量,但是在纤维素酶生产上仍然存在问题。第一,在分批补料过程中,随着碳源的逐渐添加,菌丝体不断生长,产酶后期菌丝体生长过多,导致反应液黏稠,体系传质困难。第二,分批补料发酵生产纤维素酶需要延长培养时间,但在此过程中,力学、化学以及热力学因素都有可能对已经产出的酶蛋白产生负面影响,从而影响纤维素酶

的生产^[3]。因此,出于保护培养液中酶蛋白的目的,本研究中,笔者提出了间歇出酶的方法,即定期将已产出的酶蛋白从培养液中分离出来,并考察取出的菌丝体不返回培养液的情况对产酶的影响。

2.2 间歇出酶

在产酶进行一段时间后取出部分酶液,离心分离后,菌丝体返回锥形瓶中继续产酶,同时补加等量的填补液以保持培养液体系不变^[3]。为减少在产酶过程中各种负面因素对纤维素酶活的影响,实验中采用不同的间歇出酶方式。在分批补料的实验基础上,从产酶第4天开始出酶,分为3种方式:①每天出酶,每次出酶15.0%即7.5 mL(1—15.0%);②每隔2天出酶,每次出酶30%即15 mL(2—30.0%);③每隔3天出酶,每次出酶45.0%即22.5 mL(3—45.0%)。第8天结束产酶、收样,产酶结果见表1。本文表中测得的酶活是当天出酶前的数据,总酶活则包括前期出酶所收获的总量。

表1 间歇出酶方式对纤维素酶生产的影响

Table 1 Cellulase preparation with enzyme recovery on different intervals

出酶方式	出酶时间/ d	滤纸酶活		β -葡萄糖苷酶活	
		体积酶活/ (FPU·mL ⁻¹)	总酶活/ FPU	体积酶活/ (U·mL ⁻¹)	总酶活/ U
1—15.0%	4	4.67	233.50	0.82	41.00
	5	5.49	309.53	0.87	49.65
	6	7.32	442.20	1.40	82.68
	7	8.25	543.60	1.92	119.18
	8	10.01	693.48	1.93	134.08
2—30.0%	4	4.45	222.50	0.95	47.50
	6	6.68	400.75	1.91	109.75
	8	6.72	502.95	1.71	128.40
3—45.0%	4	4.46	223.00	0.80	40.00
	7	5.27	363.85	1.68	102.00
	8	4.43	440.43	1.29	120.30

由表1可知:当每天回收15.0%的酶液时,总滤纸酶活达到693.48 FPU,和分批补料对照实验的489.00 FPU相比,提高了41.82%,总酶活提高率较明显;当每2天出酶30.0%时,总滤纸酶活提高率只有2.85%;而当每3天出酶45.0%时,总滤纸酶活与对照实验相比下降了12.00%。结果表明,出酶量的大小对纤维素酶的生产影响较大。

里氏木霉被认为是不善于生产 β -葡萄糖苷酶的。一般情况下,里氏木霉生产的 β -葡萄糖苷酶和

纤维素酶的比例在0.3~0.5,而纤维素降解成葡萄糖所需的最佳比例是1:1^[4]。分批补料生产的 β -葡萄糖苷酶总酶活为86.00 U,而间歇出酶总酶活最高可达到134.08 U,相比提高了55.91%。定期酶回收可以有效保护已生产的 β -葡萄糖苷酶,这可能就是回收酶后总酶活提高的原因。

2.3 间歇出酶量的优化

出酶量的大小对于纤维素酶的产量有较大的影响,为研究不同的出酶量对纤维素酶生产的影响,在

分批补料的基础上,从产酶第 4 天开始,每天将培养液离心后取出部分酶液,取出量分别为 10.0%、12.5%、15.0%、17.5% 和 20.0%,剩余组分全部转入

锥形瓶中,补加等量的填补液以保持培养液体积不变,之后继续产酶。第 8 天结束产酶、收样。不同出酶量对纤维素酶生产的影响如表 2 所示。

表 2 间歇出酶过程中每天不同出酶量对纤维素酶生产的影响

Table 2 Effects of the enzyme amounts on the preparation of cellulase and β -glucosidase with daily enzyme recovery

出酶量/ %	滤纸酶活/(FPU·mL ⁻¹)					总滤纸酶活/ FPU	滤纸酶活 提高率/%
	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d		
10.0	5.10	5.50	6.98	8.54	9.74	617.60	26.30
12.5	4.53	5.87	7.64	8.24	9.37	632.75	29.40
15.0	4.77	6.05	7.50	8.16	9.75	686.10	40.31
17.5	5.01	5.42	7.03	7.64	8.90	664.63	35.92
20.0	4.50	5.36	6.53	7.69	8.86	683.80	39.84

出酶量/ %	β -葡萄糖苷酶活/(U·mL ⁻¹)					总 β -葡萄糖 苷酶活/U	β -葡萄糖苷酶活 提高率/%
	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d		
10.0	1.07	1.67	2.02	2.54	2.19	146.00	69.77
12.5	1.04	1.44	2.01	2.58	2.71	179.69	108.94
15.0	1.11	1.47	1.90	2.37	2.38	170.38	98.12
17.5	1.11	1.16	1.42	1.99	2.24	161.70	88.02
20.0	1.05	1.21	1.54	2.00	1.99	157.50	83.14

由表 2 可以看出: 滤纸酶活在第 8 天可以达到最大,出酶量为 10.0%时滤纸酶活为 9.74 FPU/mL,当出酶量逐渐增加时最大酶活逐渐减小,这可能是因为取出大量的酶之后培养体系受到影响。当每天回收 10.0%~20.0%的酶液时,与分批补料相比,总的滤纸酶活提高了 26.30%~40.31%。其中,每天回收 15%的酶液时,总滤纸酶活提高率最大,可以达到 40.31%。

分批补料时 β -葡萄糖苷酶总酶活为 86.00 U,而采用间歇出酶方式生产的总 β -葡萄糖苷酶酶活均达到了 146.00 U 以上,提高了 69%以上。当每天回收酶液为 12.5%时, β -葡萄糖苷酶总酶活提高率最大,达到了 108.94%。饶庆隆等^[13]以亚硫酸盐纸浆为碳源,采用分批补料方式生产纤维素酶,得到的 β -葡萄糖苷酶活最高为 0.27 U/mL。赵士明等^[14]用绿液处理得到的玉米秸秆为碳源生产 β -葡萄糖苷酶,其最高酶活为 1.31 U/mL。由表 2 可以得出结论,间歇出酶有利于 β -葡萄糖苷酶的生产。

在长时间的培养中酶容易失活,定期酶回收可以保护已生产的酶,尤其是分子量较大的 β -葡萄糖苷酶,从而提高纤维素酶的生产效率,改善酶系结构。

2.4 不回收菌丝体时的间歇出酶量比较

在以上实验中,间歇出酶时取出部分酶液后,将离心得到的菌丝体返回培养液继续产酶,此过程易使培养液染菌。在出酶时不返回菌丝体,可以避免杂菌的感染以及离心力对菌株造成的影响,但对菌丝体浓度可能有影响。本实验在间歇出酶的基础上,每次出酶出菌时菌丝体不返回培养液,之后补加相同体积的填补液,培养至第 8 天结束,研究不同出酶出菌量对里氏木霉产纤维素酶的影响,结果见表 3。

由表 3 可知: 对照实验的分批补料产酶的总滤纸酶活为 489.00 FPU,总 β -葡萄糖苷酶活为 86.00 U。当每天同时出酶出菌丝 15.0%时,总滤纸酶活达到 698.98 FPU,比对照提高了 42.94%,提高率最大;总 β -葡萄糖苷酶活达到 158.53 U,比对照提高了 84.33%。改变每天出的出菌丝量,滤纸酶活提高率在 37%~43%,而 β -葡萄糖苷酶活提高率在 66%~100%,这表明不同的出菌丝量对滤纸酶活的影响较小,但会控制 β -葡萄糖苷酶的生产。当每天取出 10.0%的酶液和菌丝体时,总 β -葡萄糖苷酶活最高,可达到 171.85 U,酶活提高率为 99.83%。随着取出量的增加, β -葡萄糖苷酶总酶活下降,这可能是因为

出酶出菌量增加,取出的酶液和菌丝体会相应变多,对培养体系造成的影响较大,导致酶活逐渐下降。

表3 间歇出酶出菌量对产酶的影响

Table 3 Fed-batch cellulase preparation with enzyme and mycelia removal on different enzyme amounts

出酶出菌量/%	总滤纸酶活/FPU	滤纸酶活提高率/%	总 β -葡萄糖苷酶活/U	β -葡萄糖苷酶活提高率/%	m (总蛋白质)/mg	纤维素酶体积产率/(FPU $\cdot$ L $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$)	纤维素酶得率
10.0	688.90	40.88	171.85	99.83	278.25	51.26	13.78
12.5	687.88	40.67	163.88	90.56	208.75	47.77	13.76
15.0	698.98	42.94	158.53	84.33	180.00	45.51	13.98
17.5	672.00	37.42	145.30	68.95	187.96	41.18	13.44
20.0	691.10	41.33	143.00	66.28	213.00	39.99	13.82

注: 纤维素酶得率为1 g 纤维素产 FPU 的酶活。

综合分析表2和3的数据可以看出: 取出少量的菌丝体并不会对纤维素酶的生产造成大的影响, 滤纸酶活的提高率基本维持在37%~43%, 而且将菌丝体与酶液一起取出可以避免离心这一步骤, 不仅方便生产, 更可以减少感染杂菌的风险。Mandels等^[7]认为在生产纤维素酶的过程中, 纤维素酶的基础表达可以将不溶性的纤维类碳源降解成可溶性的, 从而大量诱导纤维素酶的生产, 因此, 无论是仅取出酶液还是菌丝体与酶液一起取出, 出酶所得到的纤维素酶产率均高于不出酶时, 纤维素酶的产量可以得到有效的提高。本实验结果表明, 间歇出酶可以有效保护已经产出的酶蛋白, 特别是分子量较大的 β -葡萄糖苷酶, 从而提高纤维素酶的产率。只要菌丝体浓度维持在合理的水平, 菌丝体也可以不回收, 以防止染菌。

2.5 典型反应历程

以未经稀酸水解的针叶材纸浆为初始碳源诱导里氏木霉产纤维素酶, 产酶期间补加稀酸水解的纸浆, 补加的纤维素质量浓度为6 g/L。从产酶第4天开始, 每天出酶出菌量为15.0%, 第8天收样, 此过程中各参数随时间的变化如图2所示。

由图2可知: 滤纸酶活随着培养时间的延长而增加, 第8天时达到最大值9.70 FPU/mL, 此时 β -葡萄糖苷酶活为2.11 U/mL。纤维素酶为胞外酶, 胞外蛋白质的浓度随着滤纸酶活和 β -葡萄糖苷酶活的增加而稳定增加, 最高时可达2.72 g/L, 但当酶活下降时, 蛋白质浓度也会有所下降。虽然每天都补加6 g/L的纤维素, 但是其仍在快速消耗, 第7天培养基中的纤维素几乎被完全利用。

在里氏木霉诱导纤维素酶合成的过程中, 培养体系的pH是影响菌丝体生长和纤维素酶生产的重要

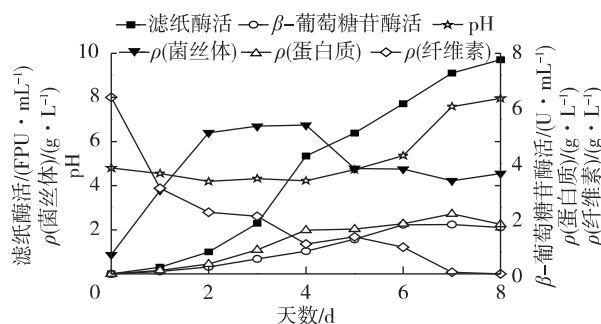


图2 出酶出菌量为15.0%时的反应历程

Fig. 2 Reaction process when 15.0% of enzyme and mycelia were removed daily

因素之一^[8]。培养基的初始pH是4.8, 在产酶初期氮源被利用, 而且纤维结构打开后产生一些酸性物质, 这些都会导致pH下降^[8]。第4~6天, 培养基的pH基本维持在里氏木霉的最适pH左右, 此时菌丝体强壮, 生产稳定, 所以纤维素酶活能快速增加。第6天之后, pH随着纤维素酶的大量合成而迅速上升, 这是因为菌体开始自溶, 胞内的碱性物质以及蛋白分泌出来, 导致培养基的pH超出缓冲液的缓冲范围^[8]。

由图2可知: 菌丝体的起始质量浓度为0.87 g/L, 经过初始培养阶段的快速生长后, 在第4天菌丝体质量浓度达到4.74 g/L。从第4天开始, 每天定时移出15.0%的培养液, 并且其中的菌丝体不返回。在之后几天中, 菌丝体质量浓度一直维持在4~5 g/L, 产酶能够顺利进行。分批补料产酶培养基中的菌丝体浓度较高, 但纤维素酶生产能力并不是很高。本实验中菌丝体质量浓度维持在4~5 g/L, 纤维素酶仍能正常生产, 并不影响产酶能力, 说明高的细胞浓度在纤维素酶生产中并不是必须的。产

酶的主体是菌丝体,合理控制碳源和 O_2 的供给以及酶的存留量,使得碳源酶水解得到的葡萄糖能满足菌丝体正常的新陈代谢,这是一个合理产酶体系的关键。因此,本实验提出的间歇出酶出菌方法,不但保护了酶蛋白,而且有效控制了菌丝体浓度,从而提高了纤维素酶的产率。

2.6 酶水解

为了评估各种纤维素酶的水解能力,对不同的纤维素酶酶解酸爆玉米秸秆的性能进行了研究。酶解 48 h 后,取样 1 mL,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液适当稀释后测其中的还原糖浓度,由此计算酶水解得率,结果见表 4。

表 4 不同纤维素酶酶解 48 h 后酶解得率比较

Table 4 Yields of enzymatic hydrolysis with various cellulases for 48 h

纤维素酶	酶水解效率/%
商品酶 Novozymes CTec2	93.04
分批补料产纤维素酶	91.22
分批补料出酶产纤维素酶	90.97
分批补料出酶出菌丝产纤维素酶	88.89

表 4 中商品酶 Novozymes CTec2 是一种复合酶,酶系结构比较合理,通常用于纤维素酶水解实验,但价格也较昂贵。由表 4 可知:本实验以纸浆为碳源分批补料生产的纤维素酶酶水解得率为 91.22%,接近商品酶的水平。间歇出酶和间歇出酶出菌丝的实验大幅度提高了纤维素酶的产率,其酶水解得率也高达 90.97% 和 88.89%。研究表明,3 种自产纤维素酶的水解能力几乎相同,这说明在分批补料生产中采用间歇出酶和出菌丝的方式并不会影响酶的水解能力。宋娜娜等^[4]对里氏木霉和黑曲霉混菌所产的纤维素酶进行酶水解实验,底物质量浓度为 100 g/L,其余条件与本研究相同,最终得到的酶水解得率为 70.00%,其水解性能不如本研究所产的纤维素酶性能好。纤维素酶将纤维素转化为可利用的糖是通过其不同组分酶之间的协同作用完成的,它受产物纤维二糖的抑制作用,而这种抑制作用可以通过添加 β -葡萄糖苷酶来缓解,Tang 等^[24]通过实验证明高 β -葡萄糖苷酶活性的纤维素酶水解效率比里氏木霉所产纤维素酶的高。本试验所用的商品酶中添加了大量的 β -葡萄糖苷酶,其 β -葡萄糖苷酶活与纤维素酶活之比远高于自产酶,这可能就是自产酶的酶水解效率比商品酶略

低的原因。

3 结论

在以里氏木霉(*Trichoderma reesei*) RUT C30 为产酶菌株,以针叶材漂白硫酸盐纸浆为碳源,分批补料制备纤维素酶的过程中,采用间歇出酶的方法,定期将部分酶蛋白从培养液中分离出来。从第 4 天开始间歇出酶,当每天取出 10.0%~20.0% 的酶液时,总滤纸酶活和总 β -葡萄糖苷酶活分别提高了 26.3%~40.3% 和 69.8%~108.9%。为避免感染杂菌,菌丝体也可以不回收。当每天取出 15.0% 的酶液与等量的菌丝体时,与分批补料对照实验相比较,总滤纸酶活提高 42.9%,总 β -葡萄糖苷酶活提高 84.3%,菌丝体质量浓度维持在 4~5 g/L,结果表明,只要菌丝体浓度维持在合理范围内,里氏木霉的产酶能力不受影响。

对自产的纤维素酶进行酶水解性能的研究,结果表明间歇出酶和出菌丝不会对纤维素酶的水解能力产生影响,自产酶对酸爆玉米秸秆的酶水解能力相当,酶水解效率均达到 90% 左右。

本文提出的间歇出酶方法,既保护了酶蛋白不受长时间操作的损伤,又降低了培养液中的产物浓度,从而显著提高产酶能力。间歇出酶出菌方法在工业生产上可以进一步简化成连续抽提分离,即用泵将部分培养液连续抽出,用离心或超滤装置予以分离。本技术操作简单,新增成本低,感染杂菌机会少,有工业应用价值。

参考文献:

- [1] PRASAD S, SINGH A, JOSGI H C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues [J]. Resour Conserv Recy, 2007, 50(1): 1-39.
- [2] 陈尚钊. 木质纤维素原料制取燃料乙醇的预处理研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2009.
- [3] 张晓萍. 低聚糖和纤维类碳源对里氏木霉合成纤维素酶的诱导作用 [D]. 南京: 南京林业大学, 2010.
- [4] 宋安东, 任天宝, 张百良. 玉米秸秆生产燃料乙醇的经济性分析 [J]. 农业工程学报, 2010, 26(6): 283-286.
- [5] SLUITER A, HAMES B, RUIZ R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass [J]. Lab Anal Proc, 2008, 1617: 1-16.
- [6] MANDELS M, MEDEIROS J E, ANDREOTTI R E, et al. Enzymatic hydrolysis of cellulose: evaluation of cellulase culture filtrates under use conditions [J]. Biotechnol Bioeng, 1981, 23(9): 2009-2026.
- [7] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities [J]. Pure Appl

- Chem, 1987, 59(2) : 257-268.
- [8] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72(1/2) : 248-254.
- [9] ZHANG Q, LO C M, JU L K. Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30 [J]. Bioresour Technol, 2007, 98(4) : 753-760.
- [10] MA L, LI C, YANG Z, et al. Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation [J]. J Biotechnol, 2013, 166(4) : 192-197.
- [11] SHIBUYA H, MAGARA K, NOJIRI M. Cellulase production by *Trichoderma reesei* in fed-batch cultivation on soda-anthraquinone pulp of the Japanese cedar [J]. Bulletin FFPRI, 2015, 14: 29-35.
- [12] GUNJIKAR T P, SAWANT S B, JOSHI J B. Shear deactivation of cellulase, exoglucanase, endoglucanase, and β -glucosidase in a mechanically agitated reactor [J]. Biotechnol Prog, 2010, 17(6) : 1166-1168.
- [13] 白合超, 蒋露, 王步成, 等. 间歇出酶对里氏木霉产纤维素酶的影响 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2016, 40(1) : 87-91.
- [14] JUHÁSZ T, EGYHÁZI A, RÉCZEY K. β -Glucosidase production by *Trichoderma reesei* [C] // DAVIDSON B H, EVANS B R, FINKELSTEIN M, et al. Proceedings of Twenty-six Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Totowa: Humana Press, 2005: 243-254.
- [15] 饶庆隆, 杭志喜, 赖晨欢, 等. 纸浆浓度及分批补料对里氏木霉产纤维素酶的影响 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2008, 32(3) : 57-60.
- [16] 赵士明, 陆青山, 谷峰, 等. 绿液预处理玉米秸秆产纤维素酶的研究 [J]. 生物质化学工程, 2012, 46(3) : 13-19.
- [17] MANDELS M, PARRISH F W, REESE E T. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride* [J]. J Bacteriol, 1962, 83(2) : 400.
- [18] JUHÁSZ T, SZENGYEL Z, SZIJÁRTÓ N, et al. Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30 [C] // FINKELSTEIN M, MCMILLAN J D, DAVISON B H, et al. Proceedings of the Twenty-fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Totowa: Humana Press, 2004: 201-211.
- [19] 宋娜娜, 宋向阳, 欧阳嘉, 等. 里氏木霉与黑曲霉混合发酵产纤维素酶及其水解特性 [J]. 生物加工过程, 2010, 8(5) : 5-10.
- [20] TANG H T, HOU J, SHEN Y, et al. High β -glucosidase secretion in *Saccharomyces cerevisiae* improves the efficiency of cellulase hydrolysis and ethanol production in simultaneous saccharification and fermentation [J]. J Microbiol Biotechnol, 2013, 23(11) : 1577-1585.

(责任编辑 荀志金)

(上接第 60 页)

参考文献:

- [1] 倪学文. 海洋微藻应用研究现状与展望 [J]. 海洋渔业, 2005, 27(3) : 251-255.
- [2] CIFERRI O. Spirulina, the edible microorganism [J]. Microbiol Rev, 1983, 47(4) : 551-578.
- [3] SOGAWA K, KODAMA E, MATSUDA M, et al. Marine microalgal polysaccharide induces apoptosis in human lymphoid cells [J]. J Marine Biotechnol, 1998, 6(1) : 35-38.
- [4] USUI N, IKENOUCHI M. The biological CO₂ fixation and utilization project by RITE(1) : highly-effective photobioreactor system [J]. Energy Convers Manage, 1997, 38: 487-492.
- [5] FALLOWFIELD HJ, GARRETT M K. The treatment of wastes by algal culture [J]. J Appl Microbiol, 1985, 14: 187-205.
- [6] LEE Y K. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential [J]. J Appl Phycol, 2001, 13(4) : 307-315.
- [7] MOLINA GRIMA E, BELARBI E H, ACIÉN FERNÁNDEZ F G, et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics [J]. Biotechnol Adv, 2003, 20(7/8) : 491-515.
- [8] JODŁOWSKI A. Effect of pre-oxidation on flocculated algal cells autoflotation [J]. Environ Protect Eng, 2002, 28(2) : 57-68.
- [9] CHEN Y M, LIU J C, JU Y H. Flotation removal of algae from water [J]. Colloids Surf B: Biointerfaces, 1998, 12(1) : 49-55.
- [10] TEIXEIRA M R, ROSA M J. Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of *Microcystis aeruginosa*: part I. the key operating conditions [J]. Sep Purif Technol, 2006, 52(1) : 84-94.
- [11] 王九思, 陈学民, 肖举强, 等. 水处理化学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [12] JIANG J Q, GRAHAM N, ANDRE C, et al. Laboratory study of electro-coagulation-flotation for water treatment [J]. Water Res, 2002, 36(16) : 4064-4078.
- [13] 黄义松, 毛祥, 汪俊文. 用于处理高浓度有机废水的絮凝剂及其制备方法: 103641220A [P]. 2014-03-19.
- [14] 徐梁冰. 一种污水处理用的絮凝剂: 102701365A [P]. 2012-10-03.
- [15] 杨嘉, 朱毅. 原生态椰子油的研究进展 [C] // 海南省药学会二〇一〇年学术年会会议论文集. 海南: 海南省药学会, 2010.
- [16] XIE Y, HO S H, CHEN C N, et al. Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus* sp for lutein production: effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation [J]. Bioresour Technol, 2013, 144: 435-444.

(责任编辑 荀志金)