

里氏木霉 Rut C-30 产非淀粉多糖酶发酵条件的研究

单达聪, 王雅民, 张董燕

(北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京, 100097)

摘要 在接种量与培养温度分别为 8% 和 30℃ 条件下, 采用正交试验表 $L_9(3^4)$ 设计对培养基组成、发酵时间、培养基湿度和发酵容器 4 个试验因子进行产酶影响力排序和条件组合优化, 同时分析各指标间相关性。结果: 对纤维素酶, 培养基组成 > 发酵时间 > 发酵容器 > 初始湿度, 最优组合酶活力 456.3 u/g; 对木聚糖酶, 发酵时间 > 培养基组成 > 发酵容器 > 初始湿度, 最优组合酶活力 5529.9 u/g; 对 β -甘露聚糖酶, 发酵容器 > 培养基组成 > 初始湿度 > 发酵时间, 优化组合酶活力 367.6 u/g; 对果胶酶, 培养基组成 > 发酵容器 > 发酵时间 > 初始湿度, 最优组合酶活力为 544.6 u/g; 培养基发酵失重与 β -甘露聚糖酶活力极显著正相关 ($r=0.811, P<0.01$)、纤维素酶与木聚糖酶活力显著正相关 ($r=0.724, P<0.05$)。结论: 通过改变发酵条件可调控该菌株产饲用 NSP 酶谱的酶活水平与比例, 指标之间相关性可用于监测发酵过程中的酶活力状态。该菌株较适合作为饲用 NSP 复合酶制剂生产的菌株。

关键词 里氏木霉 Rut C-30, 固态发酵, 非淀粉多糖酶, 发酵条件, 影响力, 相关性

非淀粉多糖酶(NSP 酶)是一类可广泛应用于降解饲料中抗营养因子非淀粉多糖, 提高饲料消化率、动物日增重及经济与环境效益的复合酶, 其中包括纤维素酶、木聚糖酶、 β -葡聚糖酶、 β -甘露聚糖酶和果胶酶, 由各种曲霉、木霉等菌种生产。工业用酶多采用液态深层发酵技术, 成本偏高, 生产饲用酶经济性较差^[1]。但研究发现在生产 α -淀粉酶、脂肪酶、果胶酶、木聚糖酶和纤维素酶工艺上, 固态发酵具有较好经济和环境效益, 甚至在酶的活性与稳定性、酶的性能、以及木霉和青霉产木聚糖酶与纤维素酶的工艺适用性等方面还具有独特的优势^[1]。里氏木霉 Rut C-30 是野生的里氏木霉 QM6a 的诱变株, 是一种腐生丝状真菌, 对该菌株固态发酵产 NSP 酶的初步研究表明该菌株 NSP 酶系较全, 其中木聚糖和 β -葡聚糖酶活性较高, 不同的碳源基料发酵产生的各种 NSP 酶比例不同^[2]; 关于此菌株产木聚糖酶方面的研究较多, 认为在稻草麦麸培养基中提高麦麸比例对木聚糖酶活力不利, 培养基氮源以硫酸铵为优^[3]; 该菌株的紫外诱变株产木聚糖酶酶活力提高 41.9%^[4]; 高碳氮比使木聚糖酶的合成滞后而提高木聚糖酶和纤维素酶的比值^[5]; 以粗制木聚糖为碳源及该碳源浓度可以诱导选择合成木聚糖酶, 使木聚糖酶和纤维素酶活力比值达到 177.5^[6]。研究结果显示该菌株具有作为生产饲用 NSP 复合酶产品的较好酶系特点,

但关于固态发酵条件对其产 NSP 酶酶谱, 以及发酵结果各指标之间相关性的研究还鲜见报道。试验采用正交试验方法, 以培养基组成、初始湿度、发酵时间和发酵容器为试验因子, 酶活力为指标, 对里氏木霉 Rut C-30 固态静止发酵条件影响力进行排序和优选, 同时研究发酵条件与发酵结果以及各指标之间相关性, 为该菌株高效利用定向生产不同酶谱水平的饲用 NSP 复合酶提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌种、检测底物与培养基

菌种: 里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) Rut C-30, CICC13052, 购于中国工业微生物菌种保藏中心(CICC)。

检测底物: 羧甲基纤维素钠、木聚糖 (Sigma)、魔芋精粉 (武汉强森)、果胶粉 (Sigma)。

斜面培养基: 马铃薯汁, 葡萄糖, pH6.8, 2% 琼脂。

液体培养基: 马铃薯汁, 葡萄糖, pH6.8。

固体发酵培养基: 麦麸, 带皮豆粕, 玉米粉, 无机盐。

1.2 仪器设备

UV4802 型双光束紫外可见分光光度计, 尤尼柯上海仪器有限公司; HZQ-F160 全温振荡培养箱, 哈尔滨东明医疗仪器厂; YX-208D 手提式压力蒸汽灭菌锅, 合肥华泰医疗设备有限公司; 78-2 双向磁力搅拌器, 金坛市新航仪器有限公司; QL-901 漩涡混

第一作者: 硕士, 副研究员。

收稿日期: 2008-12-08, 改回日期: 2009-03-04

合器,海门市其林贝不仅器制造有限公司;超净工作台,水浴锅、量杯、三角瓶,不锈钢曲盘等。

1.3 操作方法

将冻干菌种加无菌水活化混匀后制成菌悬液,无菌台中接种于斜面培养基上。24℃,培养7 d,见斜面培养基布满绿色菌丝,置4℃冰箱中备用。

用接种环于斜面培养基挑取3环孢子与菌丝混合物分别接种到3只三角瓶液体培养基中。24℃,摇瓶培养6 d,培养基中布满菌丝团,置4℃冰箱中备用。将配制好的固态发酵培养基置于700 mL烧杯中用牛皮纸密封,高压灭菌锅内灭菌20 min后,分别装入固态发酵容器中接种液体菌种;接种量8%,培养温度30℃,发酵结束后称重。由于发酵结束时不同容器中培养基水分含量差异较大,而后续酶活测定需要较长时间,为防止保存样品过程中继续发酵造成酶活力变化,故将样品置40℃烘干4 h降低培养基过高水分后再4℃冰箱中保存备用。

1.4 试验设计

采用四因子三水平的正交试验 $L_9(3^4)$ 表设计,二次重复。试验因子与水平组合如下:

培养基组成:①麦麸95 g+玉米粉5 g+ $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.1 g+ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.16 g,C/N 21;②麦麸85 g+玉米粉5 g+ $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.1 g+ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.16 g+带皮豆粕10 g,C/N 18;③麦麸83 g+玉米粉5 g+ $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.1 g+ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.16 g+带皮豆粕10 g+ $(NH_4)_2SO_4$ 2 g,C/N 16。

C/N 计算方法是依据天然培养基组分中麦麸、玉米粉和豆粕的碳、氮含量或比值数据,以及培养基中各组分的含量,计算出培养基中的总碳含量和总氮含量,计算其比值即培养基的碳氮比。参考数据引自文献^[7,8]。

发酵时间:①5 d;②6 d;③7 d。

培养基初始湿度:①41.3%;②55.9%;③64.7%。

发酵容器:①500 mL三角瓶,透气棉塞,通气量较小且散失水分速度较慢;②700 mL烧杯,牛皮纸覆盖,通气量和散失水分速度大于三角瓶,但小于不锈钢曲盘;③不锈钢曲盘(34 cm×24 cm×3 cm),牛皮纸覆盖,通气量最大且散失水分最快。选择3种不同的发酵容器的原因是:固态发酵规模生产过程中通气量和保持培养基适宜水分含量存在矛盾,同时翻曲通气和补水是费工费时又难以准确掌握的操作,为使未来生产中可以进行固态静止发酵,同时又保持培养基

适宜通风量和水分含量的平衡,故选取不同通气量的容器发酵考察对产酶活性的影响。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 培养基水分与失重

初始湿度:培养基发酵过程开始时水分含量。测定方法为40℃烘干至恒重。

终结湿度:发酵过程结束时培养基水分含量。测定方法同上。

过程均值:初始湿度与终结湿度的均值。

培养基失重:发酵初始与终结后的干重之差。

1.5.2 酶活力单位定义与测定方法

纤维素酶酶活力单位定义:1 g酶粉在pH 5.5、37℃条件下,1 min从浓度为4 mg/mL的羧甲基纤维素钠溶液中降解释放1 μ mol还原糖所需要的酶量为1个酶活力单位(u/g)。测定方法采用国家农业行业推荐标准 NY/T 912-2004。

木聚糖酶活力酶活力单位定义:1 g酶粉在pH 5.5、37℃条件下,1 min从浓度为4 mg/mL的木聚糖溶液中降解释放1 μ mol还原糖所需要的酶量为1个酶活力单位(u/g)。测定方法参照 NY/T 912-2004,将底物更换为木聚糖溶液。

β -甘露聚糖酶酶活力单位定义:1 g酶粉在pH 5.5、37℃条件下,1 min从浓度为1%的魔芋精粉溶液中降解释放1 μ mol还原糖所需要的酶量为1个酶活力单位(u/g)。测定方法参照 NY/T 912-2004,将底物更换为魔芋精粉溶液。

果胶酶酶活力定义:1 g酶粉在 $(50 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 、pH 3.5条件下,1 h分解果胶产生1 mg半乳糖醛酸为1个酶活力单位(u/g)。测定方法采用国家轻工行业标准 QB 1502-1992。

1.6 数据处理

采用极差分析表对试验因子影响力排序,以最高酶活力值优选发酵条件组合。采用 Excel 2007 软件计算指标相关系数,查阅 r 临界值表检验相关显著性。

2 结果与分析

2.1 产酶活力结果及其极差分析

试验中里氏木霉 Rut C-30 发酵条件处理组合的产酶活力与极差分析结果见表1和表2。

比较表1中产酶活力均值可知,不同酶种之间差异较大,其中以木聚糖酶活力最高(4170.4 u/g), β -甘露聚糖酶活力最低(153.4 u/g)。分析标准误差可

见,以 β -甘露聚糖酶活力在不同发酵条件组合中变异最为显著(74.8%),而果胶酶最低(36.2%)。说明该菌株更适合生产木聚糖酶,但改变发酵条件组合对 β -甘露聚糖酶活力的影响最为突出,而对果胶酶的影响较低。

表1 培养基中酶活力检测结果 u/g

样品编号	产酶活力均值			
	纤维素	木聚糖	β -甘露聚糖	果胶酶
1	456.3	5 529.9	123.4	259.3
2	261.5	5 387.5	64.8	285.3
3	283.5	5 196.7	66.7	363.1
4	155.8	5 491.8	83.8	207.5
5	128.3	1 045.3	367.6	389.0
6	227.6	5 199.2	86.2	181.5
7	267	5 227.2	154.1	285.3
8	48.7	508.6	103.5	466.8
9	175.5	3 947.7	330.7	544.6
平均值	222.7	4 170.4	153.4	331.4
标准误差/%	52.1	47.6	74.8	36.2

表2 发酵条件对产酶活力影响力极差分析结果 u/g

发酵条件处理	培养基组成	发酵时间	初始湿度	发酵容器
产纤维素酶	170.0	146.9	46.6	90.7
R 值 产木聚糖酶	2 143.5	3 102.5	1 196.4	1 763.7
产 β -甘露聚糖	111.1	58.2	91.8	189.2
产果胶酶	172.9	129.7	43.3	146.9

表2中纤维素酶活力的极差分析结果表明,试验处理因子影响力排序为:培养基组成>发酵时间>发酵容器>初始湿度。按培养基①、②、③计算的纤维素酶活力平均值分别为333.7、170.6和163.7(u/g),表明培养基组成及其碳氮比是影响纤维素酶活力的主要因素;发酵时间(5 d、6 d和7 d)酶活均值分别为293.0、146.2、228.9(u/g),表明发酵时间超过5d对产品酶活力无益;培养基初始湿度(41.3%、55.9%和64.7%)酶活均值分别为244.2、197.6、226.3(u/g),表明高于41.3%不能提高纤维素酶活;发酵容器使用三角瓶和烧杯无差别,平均酶活分别为253.4和252.0 u/g,但使用浅盘则大幅度降低酶活力(162.7 u/g),原因是失水过快影响发酵进程。发酵条件最优组合为样品1(456.3 u/g),①号培养基、5 d发酵时间、41.3%的初始湿度、使用保水性较好的三角瓶,对酶活力最为有利。可见,选择以麦麸组成为主、碳氮比较高的发酵培养基,较低的水分含量,以及保水较好的容器对纤维素酶活力有益。

表2中木聚糖酶活力极差分析结果表明,影响力

排序结果为:发酵时间>培养基组成>发酵容器>初始湿度。延长时间和降低碳氮比值则降低酶活力,使用烧杯作为发酵容器更好地满足了产酶对培养基保水与通气的要求。发酵条件优选组合为样品1,即采用①号培养基、5 d发酵时间、41.3%的初始湿度和三角瓶组合条件,其酶活为5529.9 u/g。使用浅盘作为发酵容器因其失水过快影响发酵进程而大幅度降低酶产量。该结果与纤维素酶活力优化工艺条件的结果相同,表明使用该菌株生产以上2种酶的工艺条件与产品酶活力存在相似性与相关性。

从表2中 β -甘露聚糖酶活力极差分析结果可知,影响力排序为:发酵容器>培养基组成>初始湿度>发酵时间。表明产该酶活力对培养基初始湿度和过程失水率最为敏感,最优发酵条件组合是样品5,即采用②号培养基、6 d发酵时间、初始湿度64.7%、三角瓶为发酵容器的发酵条件最为有利,酶活为367.6 u/g。与前2种酶活力极差分析结果不同的是该酶需要较高而稳定的培养基水分以及较低的碳氮比,该酶与前2种酶活力似乎存在一定的负相关。

表2中果胶酶活力的极差分析表明,影响力排序为:培养基>发酵容器>发酵时间>初始湿度,优化发酵条件组合为样品9,即采用③号培养基、6 d发酵时间、初始湿度为55.9%、三角瓶发酵容器为最优的组合,其酶活为544.6 u/g。与产纤维素酶相比,产果胶酶的培养基要求较低的碳氮比,发酵容器应保水性能好,使用浅盘则失水过快而大幅度降低酶产量。

2.2 产酶活力结果的方差分析

里氏木霉 Rut C-30 菌株在发酵条件处理组合中产酶活力的方差分析结果见表3。

表3 发酵条件对产酶影响力方差分析结果表

试验处理因子	培养基组成	发酵时间	初始湿度	发酵容器
产纤维素酶	69.14**	40.46**	4.12 ^{ns}	20.17**
F 值 产木聚糖酶	55.61**	124.61**	20.8**	42.75**
产 β -甘露聚糖	14.9**	3.71 ^{ns}	8.87**	45.53**
产果胶酶	33.64**	20.59**	2.59 ^{ns}	23.07**

注: $F_{(2,8)0.05}=4.46$, $F_{(2,8)0.01}=8.65$, *表示影响显著, **表示影响极显著, ns表示影响不显著。

从表3中可见,培养基组成、发酵时间和发酵容器发酵条件对产纤维素酶活力均具有极显著的影响,而初始湿度的影响则没有达到显著水平;4种发酵条件对产木聚糖酶活力均存在极显著影响;对产 β -甘露聚糖酶活力,只有发酵时间影响不显著,其他则均

为极显著;发酵条件对产果胶酶活力中,只有初始湿度影响不显著,其他则极显著。F 值大小排序结果则与极差分析结果相同。

2.3 各指标之间相关性分析

分析表 4 的相关系数表明,初始水分、终结水分和过程水分均值均与培养基失重相关性较高($r = 0.693, P < 0.05$; $r = 0.850, P < 0.01$; $r = 0.927, P < 0.01$),表明在试验培养基设置的水分含量范围内,维持较高而稳定的含水量更利于提高发酵程度,而增加培养基发酵失重;培养基发酵失重与 NSP 酶活力之间的相关性多数较低,但与 β -甘露聚糖酶活力存在极显著的相关性($r = 0.811, P < 0.01$),可见产 β -甘露聚糖酶要求培养基较高初始湿度(64.7%),培

养基失重量在一定程度上指示了该酶的活力水平;各酶种之间的相关系数多为较低,但纤维素酶和木聚糖酶之间相关性显著($r = 0.724, P < 0.05$),说明该菌株生产纤维素酶和木聚糖酶的发酵条件趋向一致,产品中纤维素酶活力一定程度上指示了木聚糖酶的活力;产 β -甘露聚糖酶和果胶酶的工艺条件要求相似,2 种酶活力存在一定程度的正相关($r = 0.594, P > 0.05$); β -甘露聚糖酶和果胶酶活力与纤维素酶和木聚糖酶活力分别存在一定程度的负相关(-0.293 和 $-0.507, P > 0.05$; -0.451 和 $-0.635, P > 0.05$),虽没有达到显著程度,但可以看到 2 组酶对发酵培养基湿度和碳氮比有相反方向要求的趋向,在优化酶谱方向与酶种在产品中的主次关系时应考虑这些因素。

表 4 固态培养基发酵产酶各指标之间相关系数(r)

项目	固态发酵培养基水分含量%			培养基	固态发酵培养基酶活力		
指标	初始	终结	过程均值	失重	纤维素	木聚糖	β -甘露聚糖
终结	0.387**						
过程均值	0.645**	0.955**					
培养基失重	0.693*	0.850**	0.927**				
纤维素酶	-0.089**	0.161**	0.104**	0.075**			
木聚糖酶	0.058**	-0.082**	-0.050**	-0.040**	0.724*		
β -甘露聚糖	0.349**	0.746*	0.731*	0.811**	-0.293**	-0.507**	
果胶酶	0.167**	0.202**	0.226**	0.247**	-0.451**	-0.635**	0.594**

注:① $r_{0.05(7)} = 0.666, r_{0.01(7)} = 0.798$;②*表示相关显著,**表示相关极显著,ns表示不显著。

3 小结与讨论

(1)里氏木霉 Rut C-30 在固态静止发酵条件下 NSP 酶系较全,木聚糖酶活性较高,可以通过调控发酵条件改变酶种活力比例生产定向酶谱的产品。该菌株酶谱较适合生产饲用 NSP 酶,更适合针对麦类谷物比例高导致木聚糖含量高的饲料配方生产 NSP 酶。

(2)保持培养基湿度稳定有利于提高 NSP 酶的活性。试验中将保持培养基水分与通气量统一于不同发酵容器作为处理因子,不加水不翻曲,结果全部以采用三角瓶为优选,说明静止固态发酵过程中解决水分蒸发量和通气量的矛盾中发酵容器具有决定性影响。

(3)麦麸为主的培养基发酵时,较高的碳氮比和较低的湿度利于产纤维素酶和木聚糖酶活力,而 β -甘露聚糖酶和果胶酶则要求较低的碳氮比和较高的湿度。通过改变发酵条件可以调控产 NSP 酶谱的活力水平与比例。

(4)用麦麸为主的培养基发酵产饲用 NSP 复合

酶时,可用产纤维素酶活力指标估计产木聚糖酶活力状态,用培养基发酵失重指标估计 β -甘露聚糖酶活力状态,而 β -甘露聚糖酶活力可在一定程度上反映产果胶酶活力状态,指标间的相关性可为研究或生产过程实时监控提供便利。

(5)为使酶活力测定的温度和 pH 值与动物消化道实际条件更为接近,而采用或参照国家农业行业推荐标准,这与其他研究采用轻工业标准或酶最高活力温度与 pH 值的测定结果可能存在数据偏低的现象,不同试验结果之间可进行趋势比较,酶活力数值比较则存在误差。

参 考 文 献

1 徐桂转,马俊军,张百良. 固态发酵技术在酶生产中的应用研究进展[J]. 河南农业科学,2007(12):13~16
2 程池,乐易林,熊涛,等. 对里氏木霉 Rut C30 所产非淀粉多糖酶系的分析[J]. 食品与发酵工业,2004,30(6):64~67
3 熊涛,乐易林,程池,等. 里氏木霉以稻草和麸皮为基质产木聚糖酶的研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(7):141~143

- 4 乐易林,熊涛,曾哲灵,等. 紫外诱变里氏木霉 Rut C30 提高木聚糖酶活力及发酵条件的研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31 (1):74~76
- 5 毛连山,宋向阳,勇强,等. 碳氮比对里氏木霉合成木聚糖酶的影响[J]. 林产化学与工业,2002,22 (3):41~44
- 6 刘超纲,勇强,余世袁. 里氏木霉诱导合成木聚糖酶的调控[J]. 南京林业大学学报,1999,23 (3):29~32
- 7 郑林用,刘本洪. 食用菌培养料碳氮比(C/N)的计算方法[J]. 四川农业科技,1997(3):37
- 8 Tsai CL, 高长健. 源供应和库容量对玉米籽粒碳氮比的影响[J]. 国外农学:杂粮作物,1991(4):21~45

Study on the Fermentation Conditions of Producing Non-starch Polysaccharides Enzymes in *Trichoderma reesei* Rut C-30

Shan Dacong, Wang Yamin, Zhang Dongyan

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine ,Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science,Beijing 100097, China)

ABSTRACT To optimize the solid-state fermentation conditions of producing fodder non-starch polysaccharides enzymes in *Trichoderma reesei* Rut C-30. The inoculation and the culture temperature was in 8% and 30℃, optimized and ordering for the medium, the duration, the Initial humidity and container with the orthogonal table of $L_9(3^4)$. And the same time, correlation among index was analyzed. Result showed: for the cellulase, medium > duration > container > Initial humidity; the enzymes activity of optimal combination was 456.3 u/g; for the xylanase, duration > medium > container > Initial humidity, the enzymes activity of optimal combination was 5529.9 u/g; for the β -mannase, container > medium > Initial humidity > duration, the enzymes activity of optimal combination was 367.6u/g; for the pectinase, medium > container > duration > Initial humidity, the enzymes activity of optimal combination was 544.6 u/g. The results of Index correlation: positive correlation was statistically significant between the weight loss of the medium and the activity of the β -mannase($r=0.811, P<0.01$) and between the activity of the cellulase and the xylanase($r=0.724, P<0.05$). Conclusion: It is possible to adjust the level and ratio of zymogram by changing the ferment notation condition, when we want to produce the fodder NSP enzymes in this strain. It is also possible to estimate the activity state of enzymes by the correlation among index. This strain is better in terms of suitability for producing the fodder NSP compound enzymes.

Key words *Trichoderma reesei* Rut C-30, solid-state fermentation, non-starch polysaccharides enzymes, fermentation conditions, influence, correlation

会
讯

酿酒及装瓶机械设备国际展览会 SIMEI

2009年11月24~28日在意大利米兰将举行第23届酿酒及装瓶机械设备国际展览会 SIMEI,该展会每两年举办一届,专业致力于饮料生产、装瓶和包装机械、设备、产品和服务的世界最大的展览会,包括:葡萄酒、啤酒、烈酒、白兰地酒、醋、果汁、酒精、油、矿泉水、汽饮料等等。

届时,展会可展出世界最先进的生产和灌装设备,适用于所有饮料,包括葡萄酒、啤酒、利口酒、白兰地、果汁、糖浆、矿泉水、软饮料、食用油及醋。预计本届展览将会有很多创新技术的产品亮相,同时还将举办针对世界饮料市场的国际会议,特别是世界不同地区的软饮料、矿泉水、葡萄酒、啤酒及果汁的生产和消费趋势。SIMEI展览已获得了巨大的国际影响力。

联系人:李小姐;电话:021-51531106;地址:上海市徐汇区长乐路989号世纪商贸广场3102室;

Email:chinasas@mi.camcom.it.