

张雪辉,唐蕊,孟春燕. 纤维素酶产生菌 ZJW-11 培养条件的优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):399-401.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.134

纤维素酶产生菌 ZJW-11 培养条件的优化

张雪辉¹, 唐蕊¹, 孟春燕²

(1. 邢台学院化学工程与生物技术学院,河北邢台 054001;2. 邢台市林业局,河北邢台 054000)

摘要:对纤维素酶产生菌 ZJW-11 的培养条件进行优化研究,以期得到最佳培养条件,并在理论上丰富纤维素酶的研究材料,在实践中指导纤维素酶的生产应用。利用单因素法对培养方式、培养温度、培养时间、初始 pH 值、接种量和装液量进行研究,并通过 DNS 法测定不同溶液在 540 nm 处的吸光度,间接计算出酶活性。结果表明,纤维素酶产生菌 ZJW-11 最佳培养条件为 30 ℃、初始 pH 值为 7、装液量 60%、接种量 2.5%、140 r/min 振荡培养 120 h。试验初步确定了纤维素酶产生菌 ZJW-11 的培养条件,为工业化生产提供了理论依据。

关键词:纤维素酶;纤维素酶产生菌;酶活性;培养条件;优化

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0399-02

植物每年通过光合作用,可以产生大于 100 亿 t 的植物干物质,其中一半以上是纤维素和半纤维素。人类活动产生的废弃物中也含有大量的纤维素,但其中只有极少部分为人们所利用,造成资源的巨大浪费。随着化石燃料的短缺和枯竭,能源问题已成为人类面临的共同问题,寻找新能源是人类亟待解决的问题。微生物纤维素酶恰可以利用生物转化技术将纤维素转化成简单糖,再由酵母菌等微生物发酵产生乙醇等能源物质,缓解世界性能源危机,并避免化石燃料燃烧所带来的环境污染问题,在可再生资源利用方面具有非常广阔的应用前景^[1-5]。此外,纤维素酶还被广泛地应用在食品、酿造、饲料加工、纺织、洗衣等多个领域^[6]。

目前,纤维素酶主要来源于 3 个方面:微生物、动物和植物,而微生物是其最主要的来源。纤维素酶活性较低,且容易受到培养方式、培养温度、培养时间、初始 pH 值等多种因素的影响,这成为阻碍其大规模生产应用的瓶颈问题^[7],因此研究影响酶活的各个因素对提高纤维素酶活性具有重要意义。本试验对纤维素酶产生菌 ZJW-11 的培养条件进行优化研究,以期得到最佳培养条件,并在理论上丰富纤维素酶的研究材料,在实践中指导纤维素酶的生产应用。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

1.1.1.1 菌种 纤维素酶产生菌 ZJW-11(邢台学院微生物实验室保存菌种)。

1.1.1.2 培养基 (1) 液体富集培养基:羧甲基纤维素钠(CMC-Na)10 g,蛋白胨 10 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.2 g,氯化钠 10 g,水 1 000 mL,pH 值为 7^[8]。(2) 液体优化培养基:CMC-Na 10 g,蛋白胨 10 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.2 g,氯

化钠 10 g,水 1 000 mL。

1.2 方法

1.2.1 葡萄糖标准曲线的绘制 取 1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 分别加入到 7 只试管中,用蒸馏水补加到 2 mL,再加入 1.5 mL DNS 试剂。在沸水浴中煮沸 5 min 后流水冷却,加蒸馏水至 25 mL,充分混匀,以未加入葡萄糖溶液的空白管作对照,分别于 540 nm 波长下测定各溶液的吸光度,并记录各吸光度。以葡萄糖浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制葡萄糖标准曲线。

1.2.2 粗酶液的制备 菌种接种后分别置于不同的条件下培养,4 d 后取菌液用漏斗过滤,其滤液即为粗酶液。

1.2.3 酶活性的测定 参照文献^[9]采用 DNS 法测定酶活性。

1.2.4 培养条件的优化 采用单因素试验方法,在装有定量培养基的锥形瓶中接入定量菌液,在不同培养方式、培养温度、培养时间、初始 pH 值、接种量、装液量的条件下培养 4 d,取酶液测其酶活性^[10-11]。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

所绘葡萄糖标准曲线如图 1 所示。回归方程为 $y = 0.6223x - 0.0143$, $r = 0.9995$,此标准曲线可用。

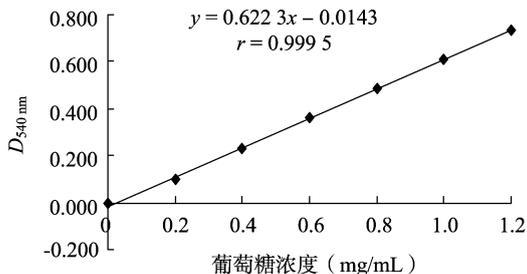


图1 葡萄糖标准曲线

2.2 培养条件的优化

2.2.1 培养方式对纤维素酶活性的影响 菌株 ZJW-11 在不同培养方式下的酶活性变化情况如图 2 所示。由图 2 可

收稿日期:2014-02-21

作者简介:张雪辉(1976—),男,河北邢台人,硕士,副教授,从事应用微生物教学与研究工作。Tel:(0319)3898060;E-mail:xtxyzxh@126.com。

知,纤维素酶活性在静置培养时达到 498 U/mL;80 r/min 振荡培养时达到 485 U/mL;在 80~140 r/min 范围内振荡培养时酶活性逐渐增大,而在 140 r/min 时达到最大值 1 013 U/mL;之后转速继续增大,使得菌丝断裂,导致酶活降低。由此可知,菌株 ZJW-11 的最适培养方式是 140 r/min 振荡培养。

2.2.2 培养温度对纤维素酶活性的影响 菌株 ZJW-11 在不同培养温度下的酶活性变化情况如图 3 所示。由图 3 可知,纤维素酶活性在 24~30 ℃ 范围内逐渐增大,在 30 ℃ 时达到最大值 563 U/mL;之后随着温度升高,菌体生长受到影响,

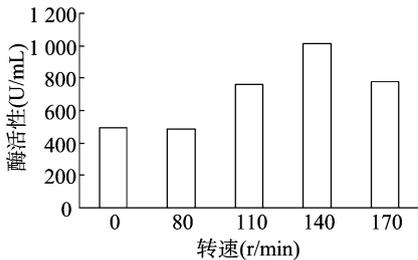


图2 培养方式对纤维素酶活性的影响

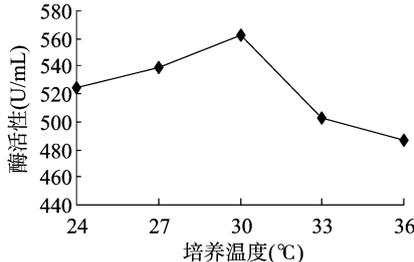


图3 培养温度对纤维素酶活性的影响

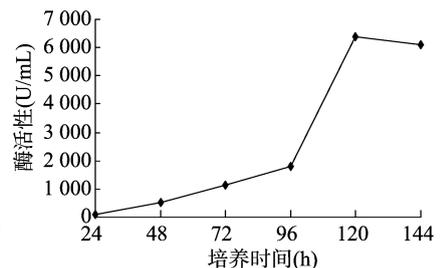


图4 培养时间对纤维素酶活性的影响

2.2.4 初始 pH 值对纤维素酶活性的影响 菌株 ZJW-11 在不同初始 pH 值下的酶活性变化情况如图 5 所示。由图 5 可知,菌株在初始 pH 值为 5 的培养基培养时酶活性达到 2 894 U/mL;之后随着 pH 值增大,产酶条件越来越合适,酶活性越来越高,且在 pH 值为 7 时达到最大值 5 353 U/mL;而后 pH 值继续增大则不利于菌体的生长,酶活降低。由此可知,菌株 ZJW-11 产酶的最适初始 pH 值为 7。

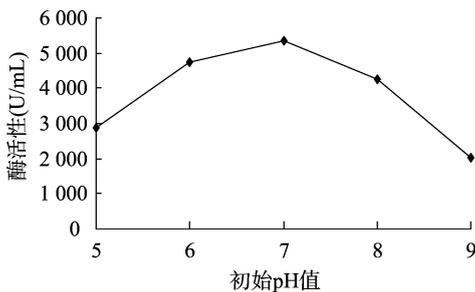


图5 初始 pH 对纤维素酶活性的影响

2.2.5 接种量对纤维素酶活性的影响 菌株 ZJW-11 在不同接种量下的酶活性变化情况如图 6 所示。由图 6 可知,接种量为 1.25% 时纤维素酶活性达到 5 521 U/mL;在接种量为 2.50% 时达到最大值 5 650 U/mL;而在接种量 3.75%~6.25% 范围内,随着接种量增大,酶活降低。由此可知,菌株 ZJW-11 产酶的最适接种量为 2.5%。

2.2.6 装液量对纤维素酶活性的影响 菌株 ZJW-11 在不同装液量下的酶活性变化情况如图 7 所示。由图 7 可知,装液量为 30%~50% 时,所产酶活性变化不大,且在 50% 时稍有降低;之后随着装液量增大酶活性明显升高,并在 60% 时达到最大值 3 447 U/mL;而后装液量继续增大,酶活性降低。由此可知,菌株 ZJW-11 的最适装液量为 60%。

导致酶活降低。由此可知,菌株 ZJW-11 产酶的最适培养温度是 30 ℃。

2.2.3 培养时间对纤维素酶活性的影响 菌株 ZJW-11 在不同培养时间下的酶活性变化情况如图 4 所示。由图 4 可知,纤维素酶活性在培养 24 h 后达到 102 U/mL;在培养 24~96 h 范围内逐渐增大;在培养 96~120 h 时间内骤然增大,且在培养 120 h 后达到了最大值 6 371 U/mL;之后随着培养时间延长,产生了较多的次级代谢产物而不利于菌体生长,因此酶活降低。由此可知,菌株 ZJW-11 产酶的最适培养时间是 120 h。

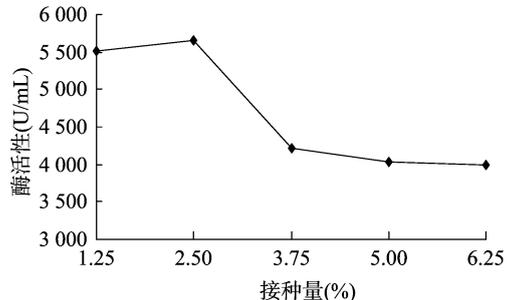


图6 接种量对纤维素酶活性的影响

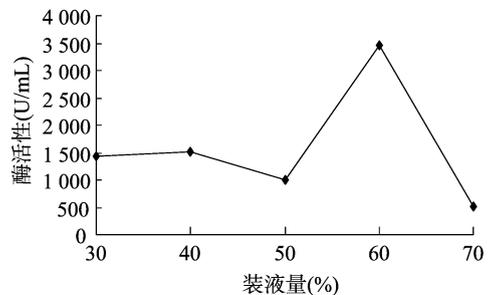


图7 装液量对纤维素酶活性的影响

液体培养条件的优化,并通过 DNS 法间接测定了不同条件下的酶活性,最终经分析比较得出其最佳培养条件为初始 pH 值为 7、60% 装液量、2.5% 接种量、30 ℃ 下以 140 r/min 的转速振荡培养 120 h。该试验充分说明了纤维素酶产生菌所产酶活性受多种因素的影响,与汤斌等的研究结论^[11-12]一致。本试验虽得出了纤维素酶产生菌 ZJW-11 培养的最优条件,但由于只设计了单因素试验而并未进行正交试验,忽略了各个条件之间的影响,只能为该菌株今后的开发应用提供了一定的理论依据。

另外,要想将菌株 ZJW-11 应用于工业化生产,还需从以下几个方面进行深入的研究:进行菌种的鉴定;利用基因工程技术将目的菌株 ZJW-11 编码纤维素酶的基因导入酵母

3 结论与讨论

本试验利用单因素法对纤维素酶产生菌 ZJW-11 进行

吴昊,管永祥,梁永红,等. 江苏省太湖流域畜禽养殖污染治理现状及政策建议[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):401-403.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.135

江苏省太湖流域畜禽养殖污染治理现状及政策建议

吴昊¹,管永祥¹,梁永红¹,王子臣^{1,2}

(1. 江苏省农业环境监测与保护站,江苏南京 210036; 2. 江苏省农业科学院循环农业研究中心,江苏南京 210014)

摘要:分析了江苏省太湖流域畜禽养殖污染现状,总结了江苏在太湖流域畜禽养殖污染治理中采取的主要工程措施、技术手段以及近年来所取得的成效。同时,深度剖析了畜禽养殖污染治理中存在的问题,进一步提出了贯彻落实治污条例,推进法制化治污;统筹编制治理方案,推进精准化治污;强化种养产业联动,推进资源化治污;强化污染减排考核,推进工程化治污;建立合力协作机制,推进长效化治污等政策建议。

关键词:江苏省;太湖流域;畜禽养殖;污染治理;环境保护;农业面源污染;水体富营养化

中图分类号: S181;X713 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0401-03

农业面源污染是水体富营养化的重要成因,而畜禽养殖污染又是农业源最为突出的问题。江苏省畜禽养殖年均产生粪尿废弃物 3 889 万 t,折合成猪粪当量约为 5 805 万 t^[1],污染物排放总量位居重点污染排放前列。从江苏省太湖水污染治理经验看,要彻底解决畜禽养殖污染治理难题,首先要解决好配套政策与激励机制的针对性、技术创新与实践应用的匹配性、治污责任与环保监管的关联性等一系列瓶颈制约,通过内外因结合推动畜禽养殖业转型升级。

1 太湖流域畜禽养殖现状

1.1 畜禽养殖生猪比重大,污染物排放量最多

据统计,江苏省太湖流域畜禽养殖以生猪、肉禽、蛋禽、奶牛为主,根据 GB18596—2001《畜禽养殖业污染物排放标准》换算比例,2011 年流域内养殖总量折合成标准生猪约为 659 万头,占全省比例的 15%^[2]。生猪养殖比重最大,占养殖总量 59.3%;其次为肉禽、奶牛、蛋禽,分别占 29.9%、5.8%、4.9%。根据污染源普查排污系数测算,畜禽养殖共产生粪尿废弃物近 400 万 t,生猪养殖排放量最大,畜禽粪污因雨淋漫溢、土壤渗透、直排偷排等对水体造成污染。

1.2 规模化养殖水平不断提高,中小型为主

参照农业部畜牧统计口径,太湖流域畜禽规模化养殖特征显著,各类大中小型规模畜禽场约有 9 700 多个,规模化养殖量折算为标准生猪约为 567 万头,占畜禽养殖总量 86%。生猪、肉禽、蛋禽、奶牛规模场数量分别占总畜禽场的 63.2%、25.2%、10.2%、1.4%,其中规模化养殖比例也分别达 81.0%、92.5%、91.5%、98.5%。江苏省苏州市规模化养

收稿日期:2014-03-27

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD14B12);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(13)4054];江苏省太湖治理科研(编号:TH2013306)。

作者简介:吴昊(1978—),男,江苏盐城人,高级农艺师,从事农业面源污染治理与生态环境保护工作。E-mail: njwh2001@163.com。

通信作者:管永祥,研究员,从事农业生态领域研究。E-mail: gyx5598@126.com。

菌体内,并使其表达,实现酵母菌发酵纤维素产乙醇的工业化生产;探究菌株 ZJW-11 与其他菌株混合发酵对酶活的影响。相信随着生物化学、分子生物学及基因工程等多种交叉学科的快速发展,人们对纤维素酶的研究会越来越深入,获得高比活力的纤维素酶,并将之更好地应用于环境、能源、食品、纺织等领域终将成为现实。

参考文献:

- [1]李燕红,赵辅昆. 纤维素酶的研究进展[J]. 生命科学,2005,17(5):20-25.
- [2]王璐,张海红,杨柳,等. 3株纤维素分解真菌的分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):51-53.
- [3]宋惠月,高建梅,卢月霞. 纤维素降解放线菌的筛选及其降解效果研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(4):331-333.
- [4]思斯,王明月,吴海波,等. 高效纤维素降解细菌的分离鉴定及酶学特性[J]. 江苏农业科学,2013,41(3):305-306.

- [5]何桂霞,张力,张君胜,等. 秸秆降解菌固态发酵酶活性研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):300-302.
- [6]高伦江,董全,唐春红. 纤维素酶的研究进展及前景展望[J]. 江苏食品与发酵,2007(4):14-17.
- [7]王景林,尹清强,吴东林,等. 高活力纤维素酶菌株康氏木霉 B-7 的选育与产酶条件的研究[J]. 生物技术,1996,6(6):14-17,20.
- [8]徐昶,龙敏南,邬小兵,等. 高产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2005,44(1):107-111.
- [9]赵凯,许鹏举,谷广焯. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学,2008,29(8):534-536.
- [10]崔琰,陈红漫,尚宏丽,等. 中性纤维素酶产生菌的筛选及其培养基的优化和酶学性质研究[J]. 浙江农业科学,2006(2):214-217.
- [11]汤斌,陈阿娜,张庆庆. 纤维素酶产生菌的筛选鉴定和产酶条件优化[J]. 食品与发酵工业,2007,33(6):6-8.
- [12]李旺,刘辉,李恒鑫,等. 纤维素酶产生菌 DR 的筛选和优化培养[J]. 江苏农业科学,2007(3):170-172.