

杨培新, 郑锐东, 罗集丰, 等. 1株产纤维素酶真菌的筛选鉴定及其产酶条件优化[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 186-191.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.01.029

1 株产纤维素酶真菌的筛选鉴定及其产酶条件优化

杨培新¹, 郑锐东², 罗集丰¹, 谢桂勉¹, 郑钢勇², 方培炜³, 蔡佳维³

(1. 揭阳职业技术学院生物工程系, 广东 揭阳 522000; 2. 揭阳职业技术学院实训中心, 广东 揭阳 522000; 3. 揭阳职业技术学院师范教育系, 广东 揭阳 522000)

摘要: 为筛选新的高产纤维素酶真菌, 从长期堆放生物质废弃物土壤中分离到1株产纤维素酶真菌。经形态特征观察、ITS分析, 初步鉴定为曲霉属, 暂定名为 *Aspergillus cel403*。通过单因素试验研究了不同碳源、氮源浓度和培养初始 pH 值对该菌在液体发酵中产纤维素酶的影响, 在此基础上运用响应面法分析其最佳发酵条件。结果表明, *Aspergillus cel403* 产纤维素酶最佳条件: 培养基组分为 CMC-Na 15.60 g, KH_2PO_4 1.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g, NaCl 0.10 g, NaNO_3 2.50 g, FeCl_3 1 mg, CaCl_2 0.10 g, 酵母膏 1.09 g, H_2O 1 000 ml, pH 7.1; 30 °C、140 r/min 摇床培养 6 d。该条件下发酵产纤维素酶活性为 89.66 U/ml, 比未经优化发酵条件对照提高了 15.02%。可见, *Aspergillus cel403* 在纤维素降解利用方面具备进一步开发潜力。

关键词: 纤维素降解菌; 筛选; 鉴定; ITS; 产酶条件; 响应面法

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)01-0186-06

Identification of a cellulase-decomposing fungus and its enzyme-producing conditions

YANG Pei-xin¹, ZHENG Rui-dong², LUO Ji-feng¹, XIE Gui-mian¹, ZHENG Gang-yong², FANG Pei-wei³, CAI Jia-wei³

(1. Bioengineering Department, Jieyang Vocational and Technical College, Jieyang 522000, China; 2. Training Center, Jieyang Vocational and Technical College, Jieyang 522000, China; 3. Normal Education Department, Jieyang Vocational and Technical College, Jieyang 522000, China)

Abstract: To screen and characterize novel fungi with powerful cellulose degradation capability, a cellulase-decomposing fungus was isolated from soil rich in biomass wastes. Based on morphology and ITS sequence analysis, the fungus was initially classified into the genus of *Aspergillus* and temporarily named as strain cel403. The influence of carbon and nitrogen sources concentrations, and initial pH were studied through single factor experiment on the cellulase production. The response surface method was used to analyse its optimum fermentation condition for cel403, which was shown as follows: the medium was comprised of CMC-Na 15.60 g, KH_2PO_4 1.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g, NaCl 0.10 g, NaNO_3 2.50 g, FeCl_3 1 mg, CaCl_2 0.10 g, yeast extract 1.09 g, H_2O 1 000 ml, with pH value at 7.1, and cel403 was cultured at 30 °C

for 6 d. The cellulose production under above conditions was 89.66 IU/ml, increased by 15.02% compared to control. *Aspergillus cel403* is a candidate strain for the degradation of cellulose.

Key words: cellulase-decomposing fungus; screening; identification; ITS; enzyme-producing condition; response surface method

收稿日期: 2014-08-29

基金项目: 广东省 2012 科技计划项目(2012B020420003); 揭阳职业技术学院 2013 科研重点课题(JYCKZ1306); 揭阳职业技术学院 2014~2016 年“创新强校”自主能力提升项目

作者简介: 杨培新(1971-), 男, 广东揭阳人, 硕士, 教授, 主要从事农业生物技术相关教学与研究工作。

通讯作者: 郑锐东, (E-mail) superzrd@163.com

纤维素是地球上分布最广、数量最大的可再生资源^[1-5]。据统计,仅中国每年即产生约 6.9×10^8 t 农作物秸秆和纤维素废弃物^[6],然而受限于化学、生物转化技术,大量纤维素废弃物只能通过堆积、焚烧等落后方式直接进入环境,造成严重的污染和资源浪费。随着微生物资源的逐步开发、微生物技术的日趋成熟,利用微生物降解纤维素进而转化成高附加值产品成为可能^[7],中国科学院、山东大学等机构先后对此领域开展了大量研究,并取得突破^[6]。目前,微生物转化因具有经济、高效、节约等优点而成为开发利用纤维素资源的热门课题^[8-10]。随着研究的推进,大规模纤维素微生物转化工艺的发展,将有效解决粮食危机、资源危机、环境污染等全球性难题。但纤维素酶用量大、成本高是限制其应用的一个重要因素^[11],因此选育出产酶高、生长快的合适菌株,优化发酵条件,提高纤维素酶产量具有重要的意义^[8]。

自然界中存在能够降解纤维素的众多微生物资源。近些年关于产纤维素酶菌株的筛选研究也很多,但真正高产量的菌株并不多见。本研究从常年堆积废气竹笋壳的土壤中筛选产纤维素酶真菌,并在单因素试验基础上对其发酵产酶条件进一步优化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 采自广东省揭阳市埔田镇长期堆积竹笋壳废弃物的土壤。

1.1.2 培养基^[1] CMC-Na(羧甲基纤维素钠)培养基、纤维素刚果红培养基、赫奇逊培养基。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离与筛选^[1] 样品用无菌水进行系列稀释并涂布于纤维素刚果红培养基上,30℃培养,菌落呈红色且能在周围形成透明水解圈的菌株即为能产纤维素酶的菌株。挑出其中生长快、颜色深且水解圈直径大的菌落,分别接种于含滤纸条的赫奇逊培养基中,30℃,140 r/min培养5 d。挑选滤纸条崩解充分的菌株,并于CMC-Na培养基上涂板、划线,反复筛选纯化菌株。

1.2.2 菌株的鉴定 形态鉴定:菌株在PDA培养基上培养5 d后,进行菌落形态观察,同时取少量菌丝于显微镜下观察菌丝及孢子形态。ITS分析:采用CTAB法抽提菌株基因组DNA,以其为模板,以

通用引物 ITS1 (5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCG-TAGG-3')、ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGCT-TAA-3')为扩增引物。PCR反应条件:95℃ 5 min, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 s, 24个循环, 72℃ 10 min, 10℃。PCR产物经电泳检测合格后进行测序(由上海美吉生物公司完成)。将所得序列通过Blast程序和GenBank核酸数据进行比对,采用ClustalW进行多序列匹配排列,通过MEGA6.06软件包中的Kimura 2-parameter方法计算进化距离,用N-J法构建系统进化树。

1.2.3 纤维素酶活测定方法 采用DNS法^[12]。酶活定义:在pH5.0、50℃下每1 ml酶液在1 min内水解CMC-Na生成1 μg葡萄糖的酶活性为1个纤维素酶活性(CMC酶活)单位(IU)。酶活的计算:CMC酶活性 $=[(G \times B)/(2.5 \times 30)] \times 10^3$,式中G为样品中葡萄糖含量(μg),B为酶液稀释倍数,2.5为吸取酶液的体积(ml),30为糖化时间(min)。

1.2.4 标准曲线 标准曲线参照文献^[13]。

1.2.5 单因素试验^[14] 在前期培养基各组分、各发酵条件单因素试验基础上,选取其中对发酵产纤维素酶影响较明显的3个因素(初始pH值、CMC-Na浓度和酵母膏浓度)作为重点研究对象。以CMC-Na培养基为基础发酵培养基,接种量为10%,发酵温度为30℃,以纤维素酶活为指标,分别研究不同初始pH值(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、CMC-Na浓度(5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L、25 g/L)和酵母膏浓度(0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L、2.5 g/L)对菌株发酵产纤维素酶活性的影响。

1.2.6 优化方法 根据前期单因素试验所筛选的最佳初始pH值、CMC-Na和酵母膏浓度,应用3因素3水平的Box-Behnken设计^[15],以纤维素酶活性为响应值,采用响应面法进行分析,试验因素及水平见表1。响应面试验结果运用Design Expert7.0分析软件进行方差分析。为了验证所得结果的可靠性,结合实际试验条件,在优化条件下进行验证试验,做3次平行试验,取平均值。

2 结果与分析

2.1 筛选结果

从埔田地区长期堆放竹笋壳废弃物土壤中经过刚果红透明圈法筛选分离到1株具有较强降解纤维素能力、生长速度较快且长势旺盛的产纤维素酶真

菌(暂定名为 cel403)。该菌株在 PDA 培养基上培养 5 d,菌落呈圆形,边缘平整,有白色菌丝,表面粗糙,布满一层孢子粉,孢子呈暗绿色(图 1)。在纤维素刚果红培养基平板上有透明圈(图 2)。

表 1 Box-Behnken 试验因素水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken experiments

因 素	水 平		
	-1	0	1
X_1 :初始 pH	6.5	7.0	7.5
X_2 :CMC-Na 浓度(g/L)	13.0	15.0	17.0
X_3 :酵母膏浓度(g/L)	0.5	1.0	1.5

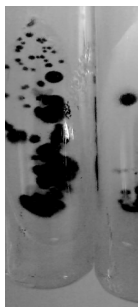


图 1 产纤维素酶真菌 cel403 在 PDA 斜面上的生长

Fig. 1 Growth of cellulase-producing fungus cel403 on PDA medium

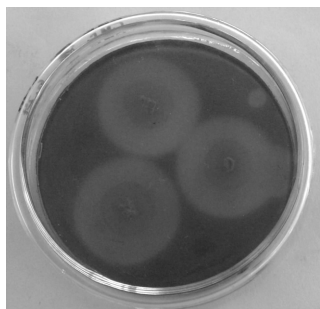


图 2 cel403 在纤维素刚果红培养基平板上形成的透明圈

Fig. 2 Transparent zones of cel403 on the congo red plates

通过显微镜观察,菌体呈丝状,菌丝发达,多分枝,菌丛呈黑褐色,顶囊球形,小梗双层,分生孢子梗从膨大的菌丝细胞上垂直生出(图 3),分生孢子为球形(图 4)。根据菌落形态观察及显微镜镜检结果,参考《真菌鉴定手册》^[16],初步确定该菌为曲霉属。

2.2 ITS 分析结果

提取菌株 cel403 基因组 DNA 并进行 PCR 扩



图 3 cel403 菌丝形态(×1 000)

Fig. 3 Mycelium morphology of cel403 (×1 000)

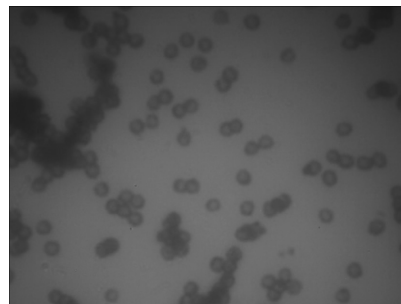
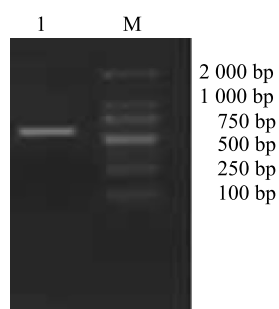


图 4 cel403 孢子形态(×1 000)

Fig. 4 Spore morphology of cel403 (×1 000)

增,1% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果如图 5。PCR 扩增获得 1 条约 550 pb 的亮带。测序后,使用 BIOEDIT 软件进行拼接,得到该菌的 ITS 序列,长度为 564 pb,序列如下:TCCGTAGGGGAACCTGCGGAAG GATCATTACTGAGTGCGGGCTGCCTCCGGGCGCCCA ACCTCCCACCCGTGAATACCTAACACTGTTGCTTCG GCGGGGAACCCCTCGGGGCGAGCCGCCGGGGAC TACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAG TCTGAATATAAAATCAGTCAAACTTTCAACAATGG ATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA ACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGA ATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGG CATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCT GCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTC CCCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGC ACCGTGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCA CCCGCTCGACTAGGGCCGGCCGGGCGCCAGCCGAC GTCTCCAACCATTTTTCTTCAGGTTGACCTCGGATCA GGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAA GCGG。



M:DL2000;1:菌株 ITS rDNA。

图5 电泳检测 ITS PCR 扩增产物电泳图

Fig.5 Electrophoresis of PCR product of ITS rDNA

将该序列提交 GenBank,登录号为 KM233157。

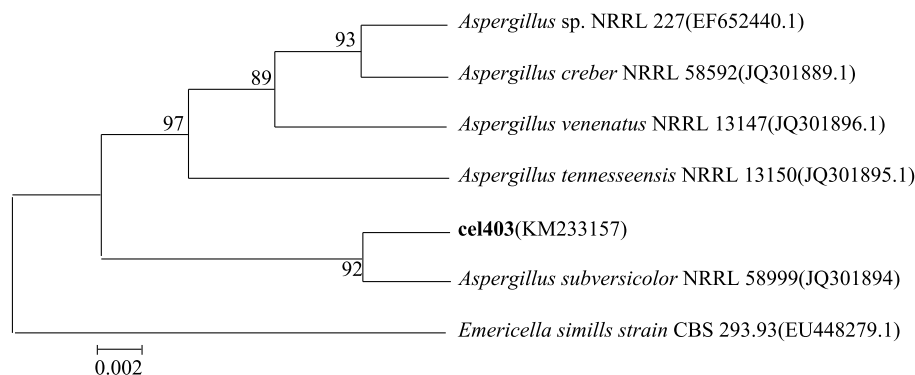


图6 菌株 cel403 ITS 系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of strain cel403 and related strains based on ITS

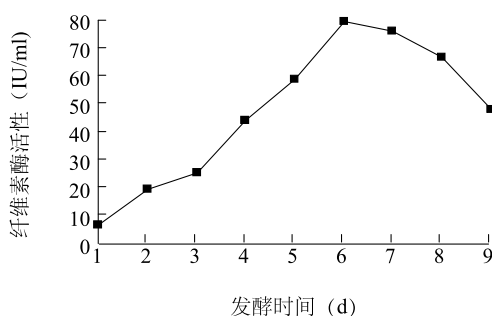


图7 不同发酵时间对菌株 cel403 发酵产纤维素酶活性的影响

Fig.7 Influence of different fermentation time durations on the activity of cellulase produced by strain cel403

2.3.2 碳源和氮源含量及初始 pH 值 由图 8、9、10 可直观看出,不同的初始 pH、CMC-Na 浓度和酵母膏浓度均会对菌株 cel403 发酵产纤维素酶产生

影响,其中以初始 pH、CMC-Na 浓度尤为显著。在选取的范围内,分别在 pH7、CMC-Na 浓度 15 g/L、酵母膏浓度 1.0 g/L 时,发酵产纤维素酶活性出现峰值,故以上述数值为中心值,并围绕该值选择自变量范围进行 Box-Behnken 试验设计。

2.3 单因素试验结果

2.3.1 发酵时间 发酵时间的长短直接影响纤维素酶活性。发酵时间对菌株发酵产纤维素酶活性的影响如图 7 所示。纤维素酶活性随发酵时间的延长而提高,至发酵第 6 d 达到最高点,之后逐渐下降。为减少发酵成本,降低染菌概率,选择 6 d 为最佳发酵时间。

影响,其中以初始 pH、CMC-Na 浓度尤为显著。在选取的范围内,分别在 pH7、CMC-Na 浓度 15 g/L、酵母膏浓度 1.0 g/L 时,发酵产纤维素酶活性出现峰值,故以上述数值为中心值,并围绕该值选择自变量范围进行 Box-Behnken 试验设计。

2.3.3 Box-Behnken 试验设计结果与分析^[17-18]

综合分析单因素试验结果,确定初始 pH、CMC-Na 浓度和酵母膏浓度 3 个因素为自变量,根据 Box-Behnken 设计原理,以纤维素酶活性为响应值设计试验。响应面试验设计及结果见表 2。

采用 Design-Expert7.0 软件对表 2 试验结果进行二次多项回归拟合,获得发酵产纤维素酶活性对初始 pH、CMC-Na 浓度和酵母膏浓度的二次多项回归方程: $Y = 81.92 + 5.75X_1 + 4.75X_2 + 2.23X_3 + 0.56X_1X_2 - 2.05X_1X_3 + 1.10X_2X_3 - 12.79X_1^2 - 8.05X_2^2 -$

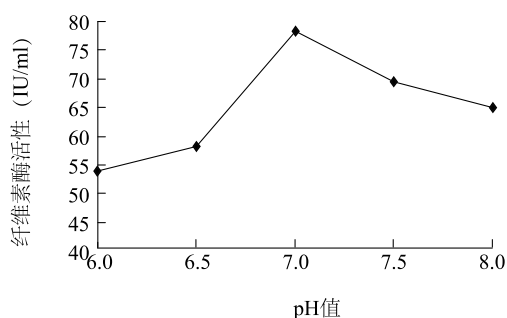


图8 不同培养基初始 pH 值对菌株 cel403 产纤维素酶活性的影响

Fig. 8 Effects of different initial pH values of the medium on the activity of cellulase produced by strain cel403

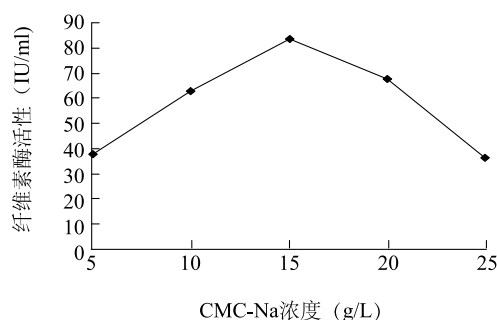


图9 不同 CMC-Na 浓度对菌株 cel403 产纤维素酶活性的影响

Fig. 9 Effects of different CMC-Na concentrations on the activity of cellulase produced by strain cel403

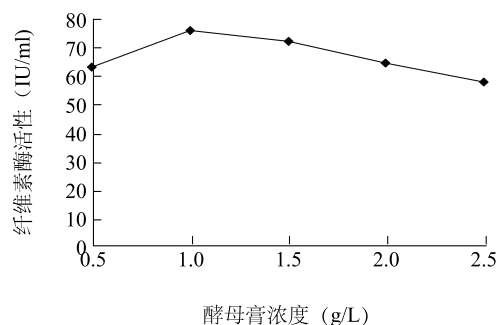


图10 不同酵母膏浓度对菌株 cel403 产纤维素酶活性的影响

Fig. 10 Effects of different yeast extract concentrations on the activity of cellulase produced by strain cel403

6.17 X_3^2 。方差分析结果表明,该模型显著($P=0.0013$),失拟项不显著($P=0.0868$)。该模型确定系数 $R^2=0.9443$,校正系数 $Radj^2=0.8726$,说明模型与实际情况拟合较好,可有效预测 *Aspergillus* cel403 发酵产纤维素酶活性情况。对回归方程取一

阶偏导等于 0 并整理可得模型极点坐标为: $X_1=7.11$, $X_2=15.60$ g/L, $X_3=1.09$ g/L。此时,模型预测最大纤维素酶活性为 83.44 IU/ml。从初始 pH、CMC-Na 浓度和酵母膏浓度交互影响纤维素酶活的响应面图(图 11)可直观看出各因素对响应值影响的变化趋势。

表2 Box-Behnken 设计及结果

Table 2 Design and results of Box-Behnken

试验号	因素			纤维素酶活性 实测值 (U/ml)
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	0	54.72
2	1	-1	0	60.63
3	-1	1	0	59.50
4	1	1	-1	67.63
5	-1	0	-1	52.07
6	1	0	1	72.15
7	-1	0	1	57.86
8	1	0	-1	69.74
9	0	-1	-1	58.18
10	0	1	1	69.08
11	0	-1	1	63.20
12	0	1	1	78.52
13	0	0	0	82.47
14	0	0	0	85.73
15	0	0	0	79.65
16	0	0	0	80.04
17	0	0	0	81.69

X_1 、 X_2 、 X_3 见表1。

2.4 验证试验

经过上述响应曲面优化,得到菌株 cel403 发酵产纤维素酶的最优方案如下:培养基组成为 CMC-Na 15.60 g、 KH_2PO_4 1.00 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50 g、NaCl 0.10g、 $NaNO_3$ 2.50 g、 $FeCl_3$ 1 mg、 $CaCl_2$ 0.10 g、酵母膏 1.09 g、 H_2O 1 000 ml, pH7.1; 30 °C、140 r/min摇床培养 6 d。以未经优化的发酵条件作为对照,进行方案验证。结果表明发酵条件未经优化和优化后获得纤维素酶活性分别为 77.95 U/ml 和 89.66 U/ml,通过优化酶活性提高了 15.02%。

3 结论

从长期堆放竹笋壳废弃物土壤中经过刚果红透明圈法筛选分离到 1 株具有较强降解纤维素能力并生长速度较快且长势旺盛的产纤维素酶真菌。经形

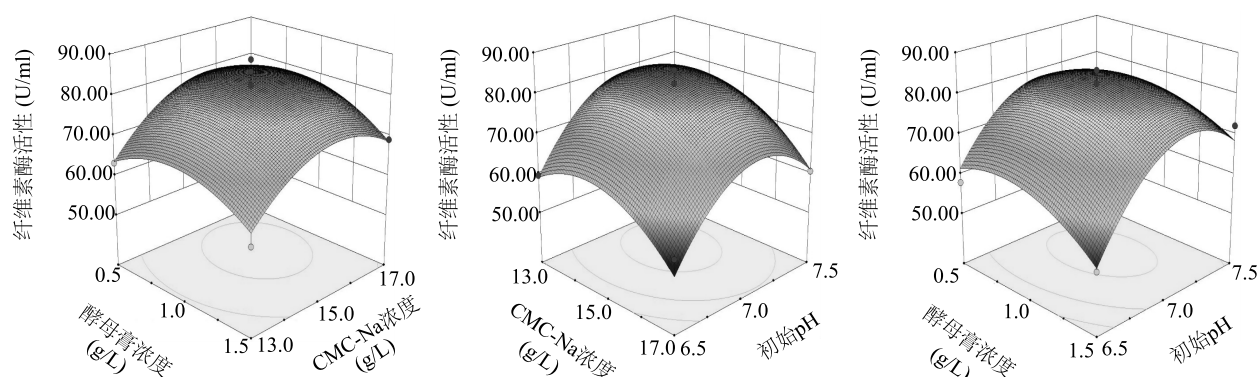


图 11 初始 pH、CMC-Na 浓度和酵母膏浓度交互影响纤维素酶活性的响应面图

Fig. 11 Response surface of cellulase activity produced by cel403 affected by the interaction between initial pH, CMC-Na concentration and yeast extract concentration

态特征观察、ITS 分析,并构建该菌株系统进化树,初步鉴定该菌为曲霉属,暂定名为 *Aspergillus* cel403。采用单因素试验研究了初始 pH、CMC-Na 浓度和酵母膏浓度对菌株 cel403 发酵产纤维素酶活性的影响,在此基础上运用响应面分析得出最佳发酵条件:培养基组成为 CMC-Na 15.60 g、 KH_2PO_4 1.00 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g、NaCl 0.10g、 NaNO_3 2.50 g、 FeCl_3 1 mg、 CaCl_2 0.10 g、酵母膏 1.09 g、 H_2O 1 000 ml,pH7.1;30℃、140 r/min 摇床培养 6 d。在该条件下,菌株 cel403 发酵产纤维素酶活性为 89.66 IU/ml,比石文卿等^[12]分离到的纤维素酶真菌 D1 产酶活性(CMC 酶活 31.12 IU/ml)高,具备进一步开发潜能。

参考文献:

- [1] 孟建宇,冯福应,刘向红,等. 1 株纤维素降解菌的筛选及产酶条件研究[J]. 微生物学杂志,2011,31(4):47-49.
- [2] 范晓娟,朱红梅,韩士群,等. 白腐菌对水葫芦木质纤维素的降解及对厌氧发酵的影响[J]. 江苏农业学报,2013,29(5):1043-1050.
- [3] 王明月,毕荣璐,王金华,等. 板栗苞壳纤维素降解真菌的筛选及降解效果[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):290-293.
- [4] 陈华,廖崇静,冯珊,等. 酸碱处理提取水稻秸秆纤维素的研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(6):252-254.
- [5] 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.
- [6] 林海龙,武国庆,罗虎,等. 我国纤维素燃料乙醇产业发展现状[J]. 粮食与饲料工业,2011(1):31.
- [7] REGINA V, ALGIMANTAS P, VITA R. Cellulose degradation in rye straw by micromycetes and their complexes[J]. Ekologija, 2008, 54(1):29.
- [8] 杨晓宸,卢雪梅,黄峰. 木质纤维素微生物转化机理研究进展[J]. 纤维素科学与技术,2007,15(1):52-57.
- [9] 费岚,邵飞,贾睿,等. 浒苔纤维素分解菌株的筛选、鉴定与纤维素酶活性研究[J]. 上海海洋大学学报,2014,3(23):412.
- [10] 方翊,秦玉琪,李雪芝,等. 纤维素酶与木质纤维素生物降解转化的研究进展[J]. 生物工程学报,2010,26(7):865.
- [11] PHITSUWAN P, LAOHAKUNJIT N, KERDCHOECHUEN O, et al. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology and bioenergy[J]. Folia Microbiologica, 2013, 58(2):163-176.
- [12] 石文卿,陶能国,刘跃进,等. 一株高产纤维素酶真菌的分离及产酶特性研究[J]. 环境工程学报,2011,6(5):1435-1440.
- [13] 张黎,武改红,赫荣琳,等. 纤维素酶高产菌株松状青霉 9-3 的诱变选育及产酶条件研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2014,33(3):568-569.
- [14] 朱晓媛,胡铁,张蕾,等. *Penicillium* sp. 1407 产纤维素酶的发酵条件优化[J]. 中国粮油学报,2014,29(5):115-117.
- [15] 黄达明,张雪,管国强,等. 响应面法优化混菌发酵豆粕的条件研究[J]. 食品工业科技, 2014(13):224-228.
- [16] 张纪忠. 真菌鉴定手册[M]. 上海:复旦大学出版社,1990.
- [17] AKHIR S M, ABD-AZIZI S, SALLEH M M, et al. *Bacillus licheniformis* TH-1 by response surface methods[J]. Biotechnology, 2009, 8(1):120-125.
- [18] SHI L E, YING G Q, ZHANG X Y, et al. Medium optimization for 5'-phosphodiesterase production from *Penicillium citrinum* using response surface methodology[J]. Food Technol Biotechnol, 2007, 45(2):126-133.

(责任编辑:张震林)