

耐酸耐盐青霉菌产纤维素酶的研究

罗旭¹, 谭志远¹, 彭桂香², 黄桂华², 李刚²

(1 广东省植物分子育种重点实验室 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642;

2 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要:从广东省韶关市大宝山矿区土壤中,分离得到1株耐酸耐盐菌株 Huanghu3,经形态鉴定及18S rDNA 序列分析确定为青霉菌 *Penicillium* sp.. 对其生理生化特性、产纤维素酶培养条件和酶学特性的研究表明, Huanghu3 能分别在 pH 2.8 和含 200.0 g · L⁻¹ NaCl 的培养基中生长,说明 Huanghu3 是一株具较强耐酸耐盐特性的菌株. 产酶优化培养条件为:玉米秸秆粉作为培养基碳源, (NH₄)₂SO₄ 为氮源,培养基的起始 pH 为 7.0,培养 72 h 最为适宜. 该菌株产生的滤纸酶、C_x 酶和 C₁ 酶最适反应温度分别在 50 ~ 60、50 ~ 55 和 45 ~ 55 °C,纤维素酶系活力最适反应在 pH 4.5 ~ 5.5.

关键词:耐酸;耐盐;青霉菌;纤维素酶

中图分类号:Q939.9

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)02-0059-05

Study on Cellulase Produced by Acidresistant and Halotolerant Strain *Penicillium* sp.

LUO Xu¹, TAN Zhi-yuan¹, PENG Gui-xiang², HUANG Gui-hua², LI Gang²

(1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Acidresistant and halotolerant strain Huanghu3 was isolated from the soil of Dabaoshan Mining-area located in Shaoguan City, Guangdong Province. The morphology identification and 18S rDNA sequence analysis showed strain Huanghua3 was belonged to *Penicillium* sp.. The physiological and biochemical characters tests, culture conditions of cellulase produced and cellulase properties were performed. Strain Huanghu3 could grow in the medium at pH 2.8 and containing 200.0 g · L⁻¹ NaCl, respectively. The optimum conditions of cellulase produced are corn stalk pellets as carbon source, (NH₄)₂SO₄ as nitrogen source, pH 7.0 and fermentation for 72 h. The optimum reaction temperature of filter paper enzyme, C_x-enzyme and C₁-enzyme were 50 – 60, 50 – 55 and 45 – 55 °C, respectively. Additionally, cellulase activity showed more effective in the citric acid buffer system at pH 4.5 – 5.5.

Key words: acidresistant; halotolerant; *Penicillium* sp.; cellulase

纤维素是地球上最丰富、最廉价的可再生资源,植物体 50% 以上的组成为纤维素和半纤维素^[1]. 纤维素酶(Cellulase)是具有纤维素降解能力酶的总称,由起协同作用的多组分酶系组成^[2-4],在环境、能源危机十分严峻的今天,纤维素酶在生物质如秸秆等

处理、转化以及生物能源开发等方面已显示出巨大潜力,受到国内外学者高度重视^[5]. 尽管全世界的纤维素资源非常丰富,而且人类很早就开始利用纤维素,但由于纤维素中存在许多糖苷键,因此其水解、利用较困难. 目前只利用了其中很小的一部分,

收稿日期:2008-07-28

作者简介:罗旭(1982—),男,硕士研究生;通讯作者:彭桂香(1968—),女,副教授, E-mail: gxpeng@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30770001);华南农业大学校长基金(4200-K04021)

大部分的纤维素类物质都被弃置,既浪费资源又对环境造成极大的污染.因此合理开发利用纤维素类资源是一个亟待解决的问题^[6].针对发酵培养基中含高浓度的 NaCl 可抑制大多数微生物的生长繁殖,防止纤维素酶生产过程中易受杂菌污染,从韶关市大宝山矿区土壤中筛选出 1 株产纤维素酶且具有较强的耐酸耐盐的青霉菌,并对其产酶的培养条件以及酶学特性进行了研究.

1 材料与方法

1.1 培养基和试剂配制

查氏琼脂培养基、葡萄糖牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、孟加拉红培养基^[7],Dubos 纤维素液体培养基、刚果红纤维素琼脂培养基^[8].

粗酶固态培养基:不同比例的玉米秸秆粉与稻草粉(质量比为 0:4、1:3、2:2、3:1、4:0),并加 20.0 mL Mandel's 营养液. Mandel's 营养液: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, KH_2PO_4 2.0 g, CaCl_2 0.3 g, 尿素 0.3 g, 溶解定容到 1 000 mL 蒸馏水,加微量元素: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg $\cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.6 mg $\cdot \text{L}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 mg $\cdot \text{L}^{-1}$, CoCl_2 2.0 mg $\cdot \text{L}^{-1}$.

1.0 mg $\cdot \text{mL}^{-1}$ 葡萄糖标准液;3,5-二硝基水杨酸(DNS)溶液;0.05 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 4.5 的柠檬酸缓冲液;0.05 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 5.0 的柠檬酸缓冲液;质量分数为 0.51% 的羧甲基纤维素钠溶液.

1.2 菌种分离和产纤维素酶菌株筛选

采用稀释涂布法^[7]分离菌株,用加 100 g/L NaCl 的孟加拉红培养基筛选韶关市大宝山矿区土壤中耐盐真菌.

挑选培养 4 d 的菌落分别接种到 Dubos 纤维素液体培养基和刚果红纤维素琼脂培养基中,观察滤纸的溃烂程度和透明圈的大小,选取透明圈菌落直径比较大的菌株及滤纸条溃烂显著的菌株 Huanghu3 进行产酶发酵试验.

1.3 真菌菌株的鉴定

形态鉴定:将菌株接种到查氏琼脂培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 后,观察菌落形态并镜检其产孢结构和菌丝形态,根据文献^[9]进行鉴定.

18S rDNA 序列的测定:采用 CATB 法^[10]提取真菌 DNA,用 PCR 方法^[11]扩增,正引物 NS1:GTAGT-CATATGCTTGTCTC;反引物 NS8:TCCGCAGGT-TCACCTACGGA 扩增产物进行序列测定.

1.4 耐酸耐盐性测定方法

耐酸性的测定:用 K_2HPO_4 和柠檬酸配制 pH 为 2.8、4.4、6.0 和 7.6 的葡萄糖牛肉膏蛋白胨琼脂培

养基,用 NaOH 和硼酸配制 pH 为 9.2 和 10.0 的同样培养基,观察并记录菌株在温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中 7 d 后的生长情况.

耐盐性的测定:分别配制含 NaCl 25.0、50.0、100.0、150.0、200.0 和 250.0 g $\cdot \text{L}^{-1}$,pH 6.0 的葡萄糖牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,观察并记录菌株在温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中 7 d 后的生长情况.

1.5 发酵条件优化

取 1×10^7 mL⁻¹ 的菌株 Huanghu3 孢子悬液 3.0 mL,接入含有发酵培养基(不同比例的玉米秸秆粉与稻草粉 4 g,不加或另加不同氮源或碳源,并加 20.0 mL Mandel's 营养液,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min)的 250 mL 三角瓶中,水浴摇床培养(28 $^{\circ}\text{C}$, 150 r $\cdot \text{min}^{-1}$),优化发酵条件.

1.6 粗酶液制备、酶活力测定及计算方法

取 1.0 g 发酵固体曲,加 20.0 mL 蒸馏水,室温浸提 1 h,期间摇晃几次,中速定性滤纸过滤,滤液即为测定的粗酶液.测定滤纸酶活力、 C_x 酶活力和 C_1 酶活力.计算酶活力的方法参照文献^[12-14].

滤纸酶活力定义:以新华滤纸为底物,柠檬酸缓冲液稀释粗酶液,在反应条件(50 $^{\circ}\text{C}$, pH 4.5,恒温 1 h)下,每小时催化纤维素水解生成 1.0 mg 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(U).

C_x 酶活力定义:CMC 为底物,柠檬酸缓冲液稀释粗酶液,在反应条件(50 $^{\circ}\text{C}$, 恒温 30 min)下,每小时催化纤维素水解生成 1.0 mg 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(U).

C_1 酶活力定义:以脱脂棉为底物,柠檬酸缓冲液稀释粗酶液,在反应条件(45 $^{\circ}\text{C}$, pH 5.0,恒温 24 h)下,每小时催化纤维素水解生成 1.0 mg 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(U).

2 结果与分析

2.1 筛选产纤维素酶菌株

挑选培养 4 d 的菌落分别接种到 Dubos 纤维素液体培养基以及霉菌刚果红纤维素琼脂培养基中,发现菌株 Huanghu3 在 Dubos 纤维素液体培养基中,培养 3 d 时滤纸有溃烂,且在刚果红纤维素琼脂培养基中有明显的透明圈(图 1).

2.2 产酶菌株的鉴定

2.2.1 菌落形态观察 菌落在查氏琼脂平板上 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 后呈圆形或接近圆形、扁平.气生菌丝呈白色,经显微观察,菌丝及孢子梗光滑,初生孢子梗呈指状一级分枝,顶生 1~4 个柱状小梗,小梗顶串生 10~20 个分生孢子,分生孢子圆形或椭圆形.

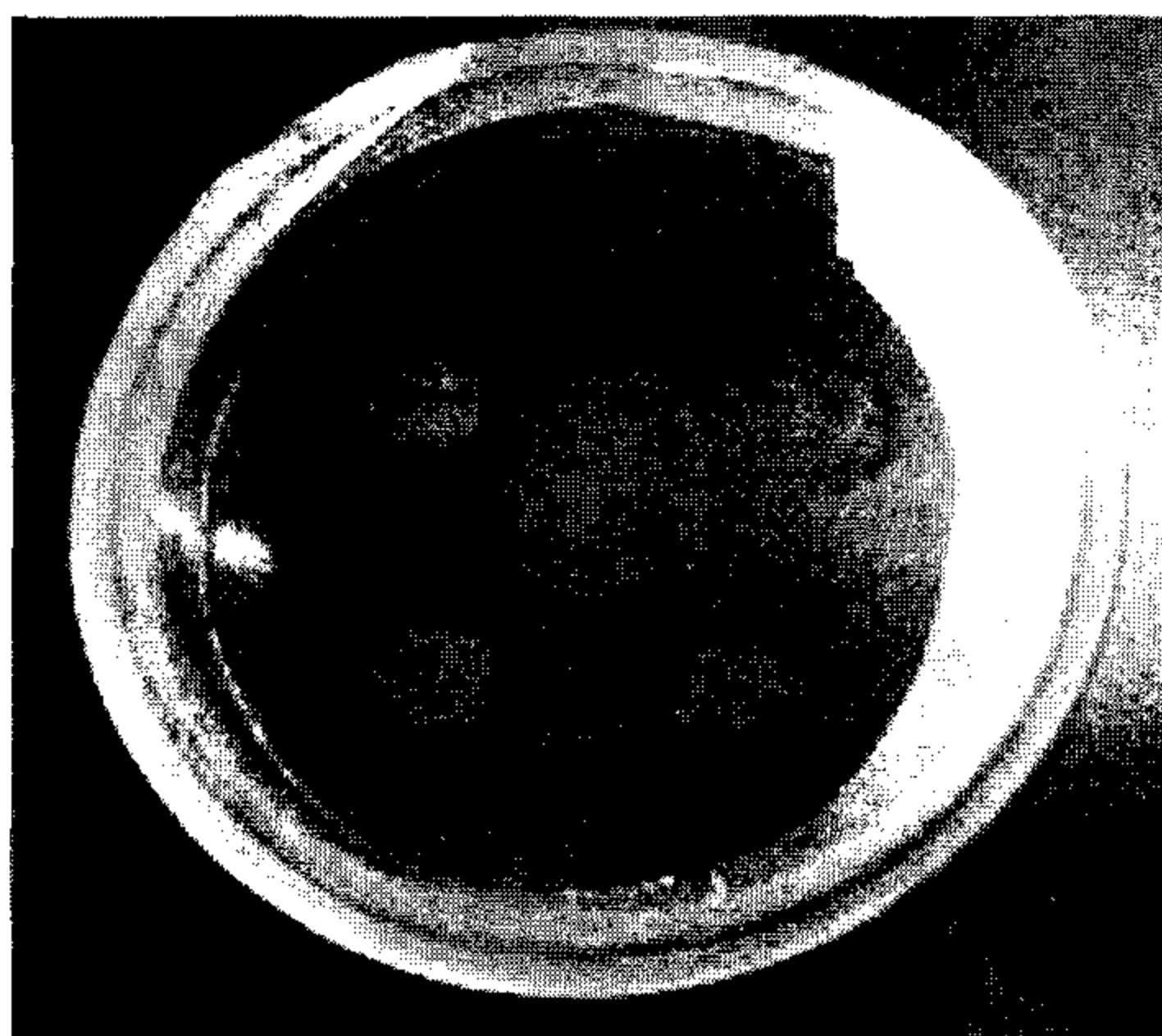


图1 菌株 Huanghu3 的刚果红纤维素琼脂培养

Fig.1 Strain Huanghu3 growing on the cellulose Congo red agar medium

2.2.2 18S rDNA 序列分析 将测定的序列在 NCBI 上用 Blast 软件与 GenBank 中已知的基因序列进行同源性比较,发现其与 17 株已报道的青霉菌株有 98% 以上的同源性. 其中,与 *Penicillium herquei* 的同源性达到 99%.

根据其菌落、孢子梗和孢子的着生方式以及 18S rDNA 序列分析结果,将该菌株归入青霉菌属 *Penicillium*.

2.3 菌株的耐酸和耐盐性

菌株 Huanghu3 在 pH2.8 ~ 7.6 葡萄糖牛肉膏蛋白胨琼脂培养基中生长旺盛,在 pH 为 9.2 和 10.0 的同样培养基上不能生长,表明 Huanghu3 为耐酸菌.

菌株 Huanghu3 在含 25.0 ~ 200.0 g · L⁻¹ NaCl 的葡萄糖牛肉膏蛋白胨琼脂培养基中都能生长,其中在含 NaCl 25 g ~ 50 g · L⁻¹ 的培养基中生长旺盛,在含 NaCl 100 ~ 150 g · L⁻¹ 的培养基中生长良好,在含 NaCl 200.0 g · L⁻¹ 的培养基中仍能生长,说明该菌具有很强的耐盐性.

2.4 不同因素对酶活力的影响

2.4.1 培养时间对酶活力的影响 培养时间的长短对青霉菌的生长及酶活力有着重要的影响,玉米秸秆粉与稻草粉各 2.0 g,其他条件不变,测定培养不同时间的纤维素酶系活力. 由图 2 可以看出,3 种酶活力在 24 ~ 72 h 均随着培养时间的延长而升高,在 72 h 均达到最大值,之后均有不同程度的下降,C_x 酶活力上升幅度最大,下降的幅度也大,C₁ 酶活力上升和下降较 C_x 酶平缓,而滤纸酶活力上升幅度和下降幅度均较前两者小.

2.4.2 不同碳源对酶活力的影响 稻草秸秆和玉米秸秆都是一种天然混合物,除含有大量纤维素外,还含有一定的半纤维素和木质素以及非常多的微量

矿物元素,这些矿物元素对纤维素酶解过程的影响是十分复杂的. 本试验通过改变碳源中稻草粉与玉米秸秆粉的比例,采用水浴摇床培养方式,28 °C,150 r · min⁻¹,培养 72 h 后,得到粗酶液,粗酶液的纤维素酶活力,见图 3.

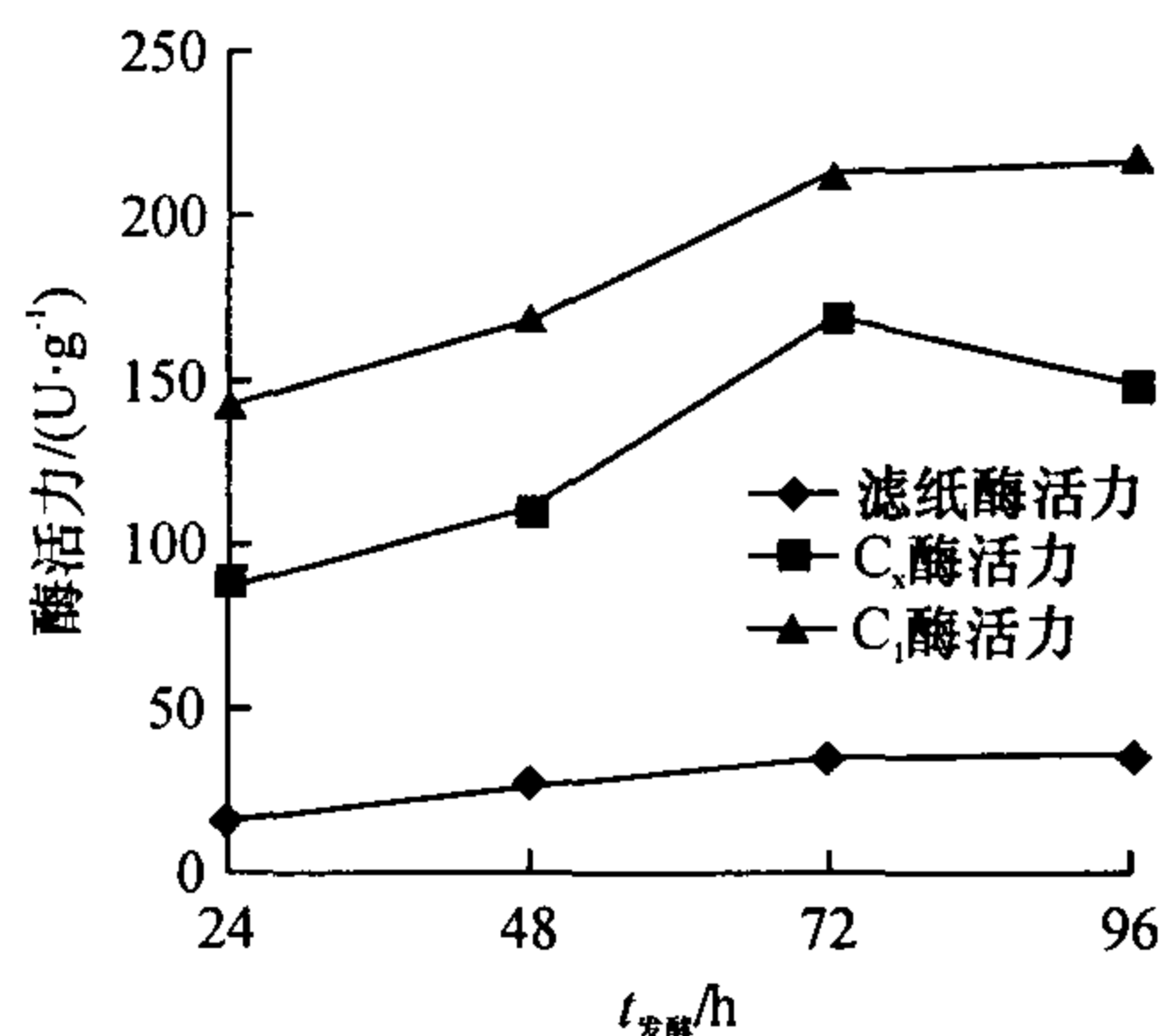
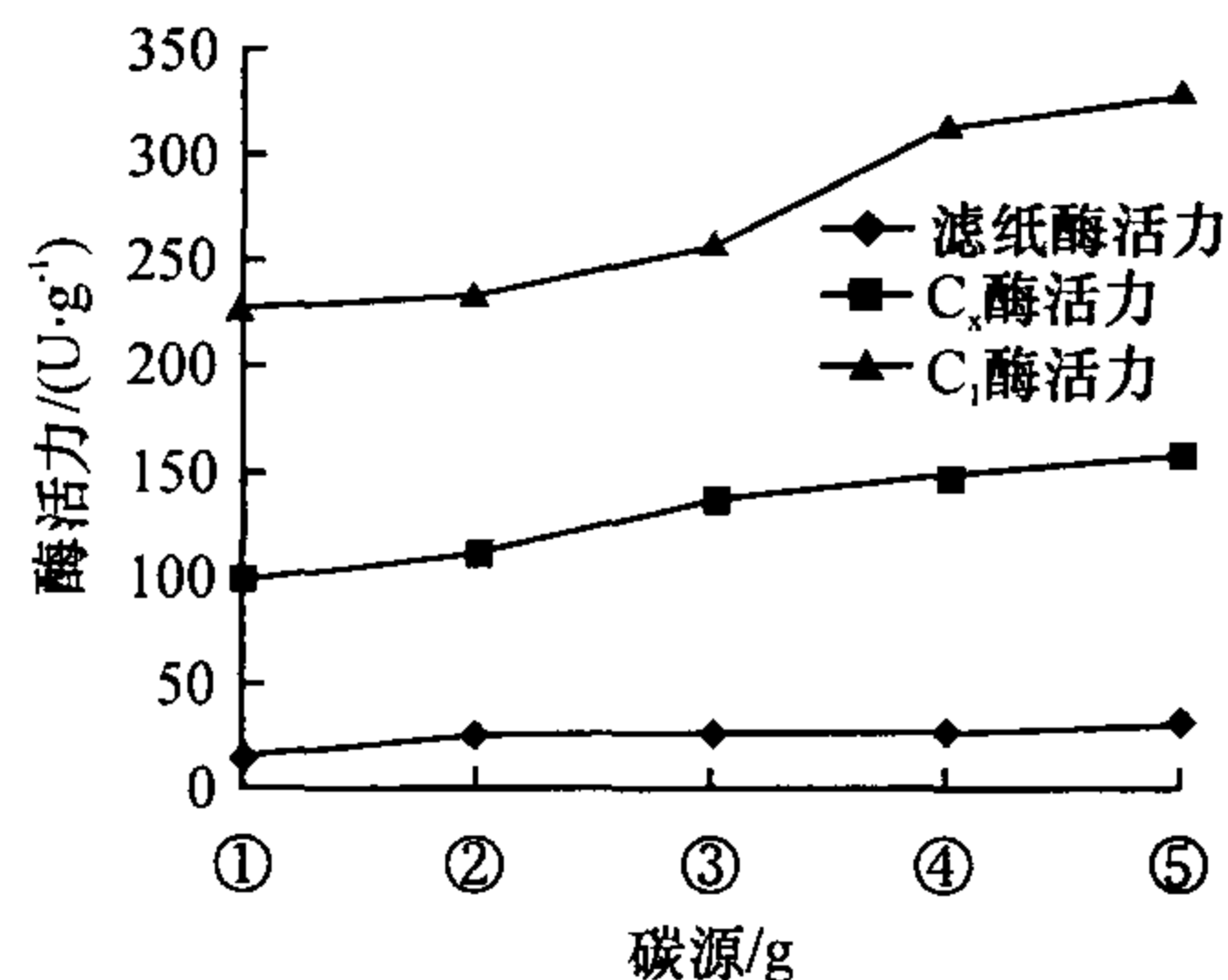


图2 培养时间对纤维素酶系活力的影响

Fig.2 Effects of incubation time on cellulase activity

图 3 的结果表明,滤纸酶、C_x 酶和 C₁ 酶明显随着碳源中玉米秸秆粉质量的增加而升高,当全部以玉米秸秆粉作为碳源时,所产滤纸酶、C_x 酶和 C₁ 酶活力均达到最高值,分别为 35.2、168.3 和 328.5 U/g.



① 4.0 g 稻草粉;② 3.0 g 稻草粉,1.0 g 玉米秸秆粉;③ 2.0 g 稻草粉,2.0 g 玉米秸秆粉;④ 1.0 g 稻草粉,3.0 g 玉米秸秆粉;⑤ 4.0 g 玉米秸秆粉. 每个处理加 20.0 mL Mandel's 营养液

图3 不同稻草粉与玉米秸秆粉比例对纤维素酶系活力的影响

Fig.3 Cellulase activity produced in different mass ratios of rice straw powder and corn stalk pellets

2.4.3 不同氮源对酶活力的影响 以 4.0 g 玉米秸秆粉作碳源,另加 $w = 2\%$ 的氮源,其他条件不变,培养 72 h 后得粗酶液,其纤维素酶活力,见表 1. 表 1 可知,在培养基中加了氮源之后,纤维素酶系活力有较大的提高,总体上无机氮优于有机氮,氨态氮优于硝态氮,以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时纤维素酶系活力最高, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 次之,尿素最低. 这一结果与崔福绵等^[15]的报道相一致,这可能和氮源本身的组分有关,因为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 不仅含有氮素,还含

有可供微生物生长的 S、P 元素,对微生物的生长有益,有机氮源所提供的纯氮量较少,尿素含氮量虽高,但其中的缩二脲对微生物有毒害作用,使得菌株 Huanghu3 产酶量相对下降。

表 1 不同氮源对菌株纤维素酶系活力的影响

Tab.1 Cellulase activity in different nitrogen sources

氮源	滤纸酶活力 $/(U \cdot g^{-1})$	C_x 酶活力 $/(U \cdot g^{-1})$	C_1 酶活力 $/(U \cdot g^{-1})$
硫酸铵	88.515	230.406	485.277
硝酸铵	36.029	114.314	265.546
氯化铵	56.045	137.888	338.493
磷酸铵	80.286	213.949	424.117
蛋白胨	67.165	191.264	391.869
牛肉膏	38.698	126.768	285.562
酵母膏	40.032	130.771	322.258
尿素	40.032	94.298	236.634

2.4.4 培养基初始 pH 对酶活力的影响 综合以上试验条件,分别调节培养基 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0,培养 74 h 后测酶活力,结果见图 4,3 种酶活力在 pH 5.0 ~ 7.0 均有较平稳的升高趋势,pH 7.0 之后滤纸酶活力以较小的幅度下降, C_x 酶活力下降的幅度大,而 C_1 酶活力在 pH 7.0 至 pH 8.0 之间却继续上升,且幅度较大,由此可见初始培养基 pH 对产纤维素酶系活力的影响很大。

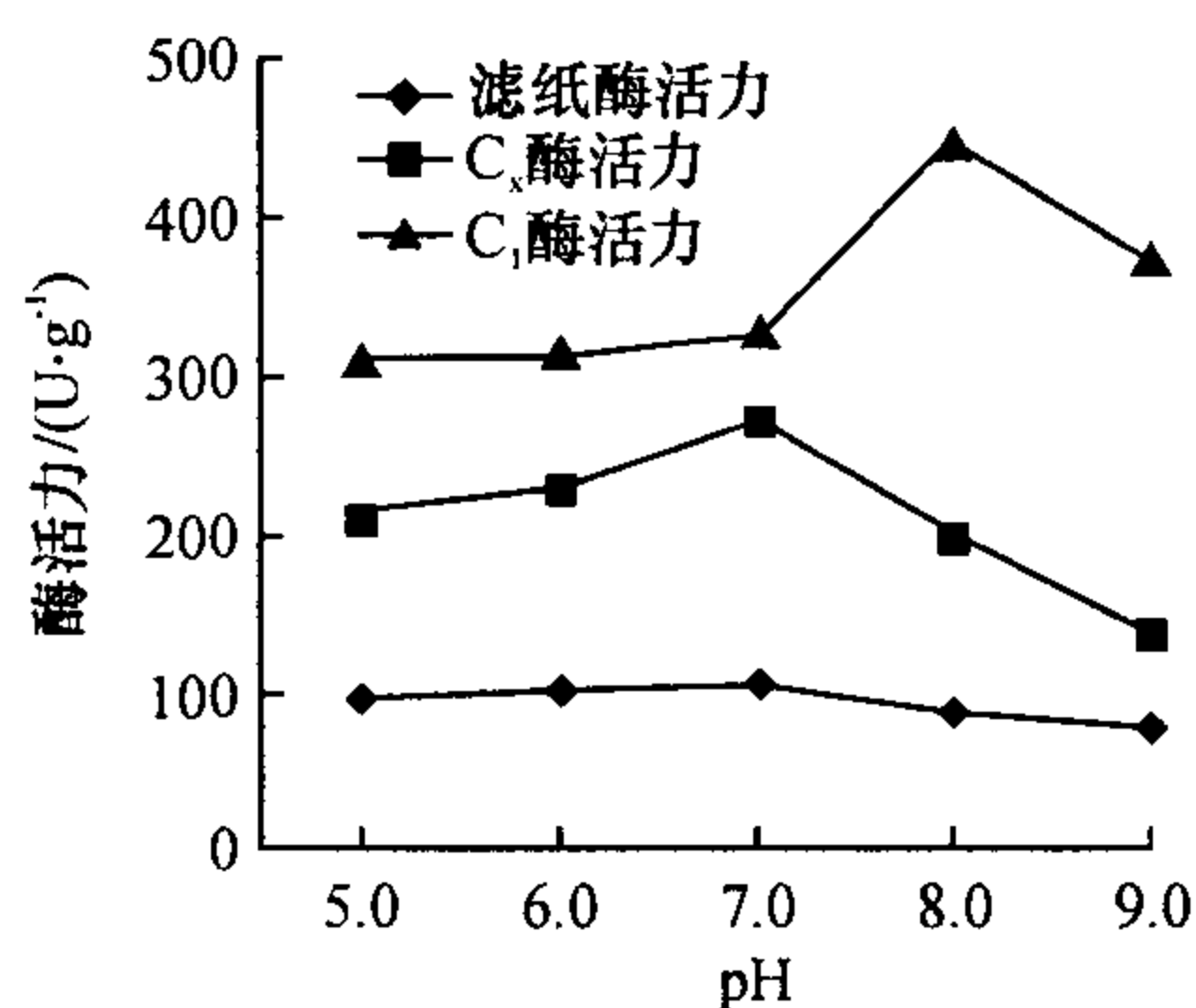


图 4 初始培养基 pH 对纤维素酶系活力的影响

Fig. 4 Cellulase activity in different initial pH value

2.4.5 温度对酶活力的影响 本试验滤纸酶活力的测定采用 pH 4.5 的柠檬酸缓冲液稀释粗酶液,水解反应在不同的温度下进行, C_x 酶和 C_1 酶活力的测定采用 pH 5.0 的柠檬酸缓冲液稀释粗酶液。图 5 的结果表明:滤纸酶、 C_x 酶和 C_1 酶作用的最适温度分别是 50 ~ 60、50 ~ 55 和 45 ~ 55 °C;在温度高于 60 °C 时 3 种酶活力均急剧下降,至 65 °C 时,几乎完全失活;滤纸酶和 C_x 酶在温度为 35 ~ 50 °C 之间时,酶活

力随着温度的增加而增加,在温度高于 60 °C 时,酶活力均以较大的幅度开始下降; C_1 酶在温度为 35 ~ 45 °C 之间时,酶活力随着温度的增加而增加,温度高于 55 °C 后,酶活力开始大幅度下降。因为,当温度较低时,酶促反应速度较慢,酶活力不高。当温度过高时,纤维素酶分子又会失去活性,影响了酶活力。

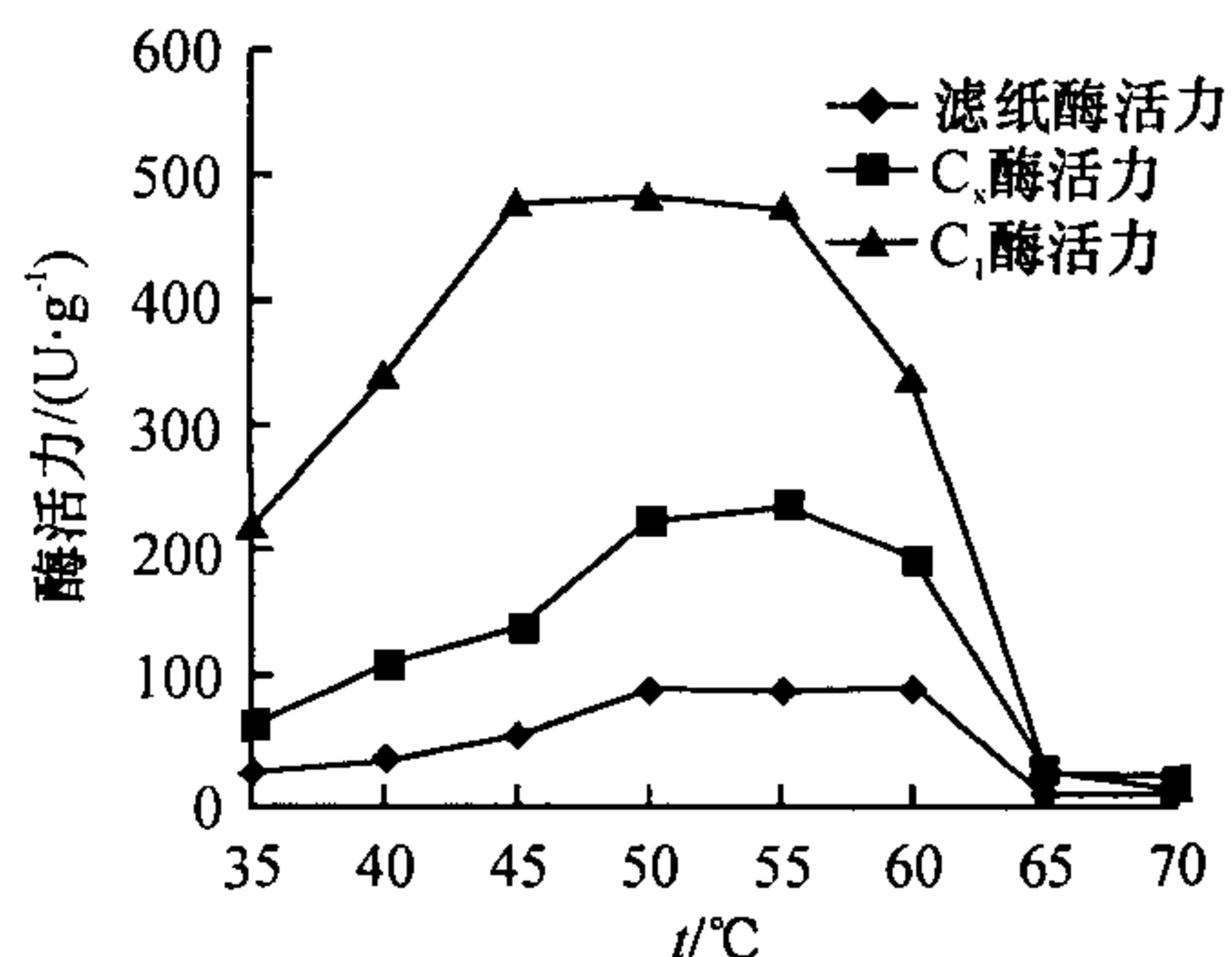


图 5 反应温度对纤维素酶系活力的影响

Fig. 5 Cellulase activity under different reaction temperature

2.4.6 缓冲液 pH 对酶活力的影响 大部分酶活力受环境 pH 的影响,在一定 pH 的条件下,酶反应具有最大速度,高于或低于此值酶反应速度下降。本试验使反应在不同 pH 的柠檬酸缓冲液系统中进行,结果如图 6。纤维素酶系活力在缓冲液 pH 4.5 ~ 5.5 时效果最佳,此外,还可以看出酶活力在 pH 3.5 ~ 5.0 之间随着 pH 的增高而逐渐上升,pH 超过 5.0 后纤维素酶系活力开始下降。因为一般的纤维素酶对 pH 比较敏感,只在很小的范围内起作用,不同的酶所适应的 pH 范围是不同的,过高或过低都不适应酶反应的进行,pH 的改变可以破坏酶的空间构象,引起酶活力的丧失,还能影响酶活性中心催化基团的解离,使底物转变成产物的过程受到影响,同时 pH 的改变影响酶活性中心结合基团的解离状态和底物的解离状态,使得底物不能与其结合或结合后不能生成产物。

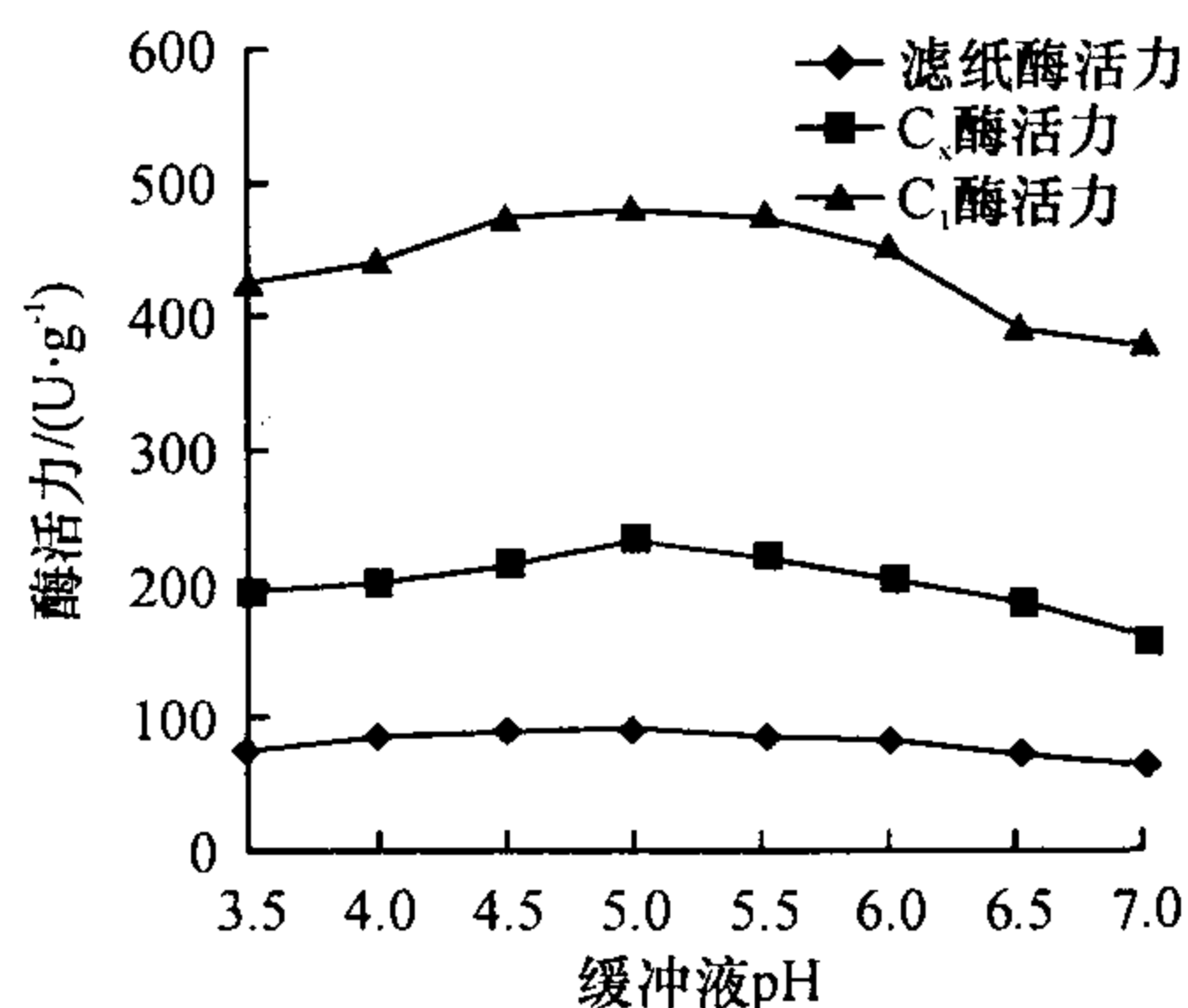


图 6 缓冲液 pH 对纤维素酶系活力的影响

Fig. 6 Effect of different pH buffer solutions on cellulase activity

3 结论

生长最适 pH 在 3.0 以下,中性条件不能生长的微生物称为嗜酸微生物. 能耐受 pH3.5 ~ 6.0,但最适 pH 接近中性的微生物则称为耐酸微生物. 极端嗜盐菌的生长最适 NaCl 质量浓度为 146.3 ~ 304.0 g/L,而耐盐菌则是指那些生长不需要 NaCl,但是可以在 NaCl 存在甚至是高浓度的情况下生长的微生物. 我们分离的青霉菌株 Huanghu3 具有很强的耐酸耐盐性,在 pH 2.8 以及含 NaCl 质量浓度达到 200.0 g · L⁻¹ 的极端环境中亦能生长,因为菌株 Huanghu3 来源于韶关市大宝山矿区酸性和重金属污染土壤,因此,菌株也很可能具有较强的耐重金属能力.

产酶优化培养条件试验结果表明,以玉米秸秆粉作为固体培养基碳源优于稻草粉或稻草粉和玉米秸秆粉的混合物;pH 7.0、培养 72 h 最为适宜;无机氮源下的酶活力优于有机氮,氨态氮优于硝态氮,另外,(NH₄)₂SO₄ 为氮源时,3 种纤维素酶活性最高,(NH₄)₃PO₄ 次之,尿素最低.

酶学特性研究发现:滤纸酶、C_x 酶和 C₁ 酶作用的最适温度分别在 50 ~ 60、50 ~ 55 和 45 ~ 55 ℃. 纤维素酶系最适反应在 pH 4.5 ~ 5.5.

由于从自然环境中分离筛选的产纤维素酶原始菌株产酶活力一般较低,所以下一步将着重研究如何提高该菌的产酶量,以达到生产上应用的要求.

参考文献:

- [1] 陈洪章,李佐虎. 纤维素原料微生物与生物量全利用[J]. 生物技术通报,2002,2:25-29.
- [2] SELBY K K, MAITLAND C C. Separation of the components involved in the solubilization of cotton[J]. Biochem

J, 1967, 104: 716-724.

- [3] WOOD T M, McCRASE S T. The cellulase of penicillium pinophilum synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically distinct cellobiohydrolases [J]. Biochem J, 1978, 171: 61-72.
- [4] 邬敏辰,李江华. 里氏木霉固体发酵生产纤维素酶的研究[J]. 江苏食品与发酵,1998(2):2-6.
- [5] 伍红,陆兆新,吕玫,等. 黑曲霉 AF-98 固体发酵产纤维素酶的产酶条件研究[J]. 菌物学报,2006,25(3):475-480.
- [6] 伍时华,徐雅飞,黄翠姬. 降解纤维素菌株的筛选[J]. 食品科技,2006(8):50-52.
- [7] 赵斌,何绍江. 微生物学实验[M]. 北京:科学出版社,2002: 69-71.
- [8] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京:科学出版社,1985: 25-28.
- [9] 魏景超,真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979: 511-512.
- [10] 刘少华,陆金萍,朱瑞良,等. 一种快速简便的植物病原真菌基因组 DNA 提取方法[J]. 植物病理学报,2005, 35(4):362-365.
- [11] 胡军,王静,卢新亚,等. 病原性真菌 PCR 检测方法的建立[J]. 郑州大学学报:医学版,2004,39(2):310-312.
- [12] 齐义鹏. 纤维素酶及其应用[M]. 长沙:湖南科技出版社,1990:77-78.
- [13] 赵亚华. 生物化学实验技术教程[M]. 广州:华南理工大学出版社,2000: 149-151
- [14] 张树政. 酶制剂工业:下[M]. 北京:科学出版社,1984: 619-623.
- [15] 崔福绵,刘菡,韩辉. 康宁木霉 CP88329 纤维素酶产生条件的研究[J]. 微生物学通报,1995, 22(2):72-76.

【责任编辑 周志红】

(上接第 58 页)

- [2] HOLLOWAY J D. The moths of Borneo (Noctuidae, Catocalinae) [J]. Malayan Nature Journal, 2005, 15/16: 187-188.
- [3] KONONENKO V S, PINRATANA B A. Moths of Thailand (Noctuidae) [M]. Bangkok: Brothers of Saint Gabriel in Thailand, 2005:53.
- [4] PARK K T, BAE Y S, CUONG N N, et al. Moths of North Vietnam [M]. Korea: Center for Insect Systematics, 2007: 28.
- [5] GALSWORTHY A C. New and revised species of Macrolepidoptera from Hongkong[J]. Memoirs of the Hong Kong Nature History Societ, 1997, 21: 127-150.
- [6] 陈永强,尤其傲,蒲天胜. 广西昆虫名录[M]. 南宁:广

西科学技术出版社,1994:195-214.

- [7] 陈一心. 中国动物志:昆虫纲:第 16 卷(鳞翅目:夜蛾科)[M]. 北京:科学出版社,1999:1-1596.
- [8] 陈一心. 鳞翅目:夜蛾科[M]//黄复生. 海南森林昆虫. 北京:科学出版社,2002:613-653.
- [9] HUA L Z. List of Chinese Insect (Lepidoptera): Vol III [M]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University Press, 2005: 195-256.
- [10] KOBES LUTZ W R, Eight new species of Noctuidae from the rain forest (Lepidoptera, Noctuidae: Catocalinae, Chloephorinae, Ophiderinae)[J]. Heterocera Sumatrana, 1989, 2(7): 153-168.

【责任编辑 周志红】