

一株产纤维素酶镰刀菌的筛选、鉴定与酶学性质

韩寒冰,程水明,刘杰凤*,马超

(广东石油化工学院 生物工程系,广东 茂名 525000)

摘要:根据菌株菌落、菌丝体、孢子等形态特征及其生理特性,初步鉴定高产纤维素酶的丝状真菌为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),命名为XA-1。考察了不同碳源及氮源、培养温度、初始pH等因素对XA-1产酶的影响,并研究了该菌所产纤维素酶酶学性质及酶解性能。该菌的最适产酶条件为:分别以水葫芦和硫酸铵为碳、氮源,30℃,pH 5.0,培养6 d后,内切葡聚糖酶(CMCase)、 β -葡萄糖苷酶(β -Glucase)和滤纸酶活力(FPA)分别达到4 083.2、3 258.8 U/g和773.2 U/g(成熟曲)。CMCase、 β -Glucase最适反应温度为45℃,FPA则为55℃;CMCase、 β -Glucase和FPA的最适反应pH分别为5.0、4.5和5.0。菌株XA-1纤维素酶酶解香蕉秆或水葫芦32 h后,酶解得率分别达到27.3%和29.8%。菌株XA-1在纤维素酶开发及转化秸秆类纤维素为可发酵糖方面显示出较好的应用前景。

关键词:纤维素酶;尖孢镰刀菌;酶学性质;酶解

中图分类号:TQ920;Q93

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2014)07-0061-05

Screening and identification of cellulase-producing strain of *Fusarium* sp. and its enzymological properties

HAN Han-bing, CHENG Shui-ming, LIU Jing-feng, MA Chao

(Department of Biology Engineering, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000, China)

Abstract: A high cellulase-producing filamentous fungi is isolated from the soil of Banana plantations of maoming suburbs. According to its growth characteristics, colony morphology, cell and spore morphology, etc, the strain is preliminarily identified as *Fusarium oxysporum*. The effects of different carbon and nitrogen sources, incubation temperature and initial pH on enzyme production are investigated. Its cellulase enzymatic properties and enzymolysis properties are also studied. The optimum conditions for enzyme production by strain XA-1 are as follows: 30℃, pH 5.0, water hyacinth and ammonium sulfate as carbon and nitrogen, respectively. When the strain XA-1 is cultured under the optimum conditions, the maximum activity of CMCase, β -glucosidase and FPA concurrently obtained after 6 days of fermentation are 4 083.2 IU/g, 3 258.8 IU/g and 773.2 IU/g, respectively. The optimum reaction temperature for CMCase and β -glucosidase is 45℃ and that of FPA is 55℃. The optimum pH of CMCase, β -Glucase and FPA are 5.0, 4.5 and 5.0, respectively. The enzymes activity is stable in the range of pH 4.0 - 6.0. It indicates that it has good application prospects of strains XA-1 in transforming straw cellulose to fermentable sugars or in the textile.

Key words: cellulase; *Fusarium Oxysporum*; enzymatic properties; enzymolysis

纤维素酶广泛应用于食品及饲料、纺织印染、洗涤剂等行业,并在可再生资源利用^[1-2]、生物质能源开发^[3-4]、环境保护^[5-6]等领域显示出广阔的应用前景。

纤维素酶是一类多组份的复杂酶系,不同领域要求纤维素酶的组份比例不一样,如要求把纤维素彻底降解为葡萄糖,则需要纤维素酶系的内切葡聚糖酶(endo- β -1,4-glucanases, EC 3.2.1.4)、外切葡聚糖酶(exo- β -1,4-glucanases, EC 3.2.1.91)及 β -葡萄糖苷酶(β -1,4-glucosidases, EC 3.2.1.21)3组份的协同作用^[7]。

纤维素酶主要来自微生物,但不同的微生物所产纤维素酶系组成有较大差异,在目前得到的高产

纤维素酶菌株中,木霉纤维素酶的 β -葡萄糖苷酶活力较低,而黑曲霉纤维素酶的外切葡聚糖酶活力较低。商品纤维素酶一般都是根据应用领域要求而进行复配或进行混菌发酵而得到的复合酶。因此,寻找更多、更高效、应用范围更广泛的纤维素酶新菌源仍是纤维素酶研究的重要内容。

笔者从茂名市郊区香蕉园土壤分离到一株高产CMCase和 β -Glucase的镰刀菌。以南方常见植物秸秆如香蕉秆、稻草、水葫芦等为发酵原料,研究该菌固体发酵产纤维素酶的条件,并对其所产纤维素酶酶学性质及酶解性能进行了初步研究,以期对纤维素酶的开发与应用提供基础数据。

收稿日期:2014-02-05

基金项目:广东省科技计划项目资助(2010B030800017)

作者简介:韩寒冰(1964-),女,广东茂名人,硕士,副教授,主要从事生物技术相关专业课程的教学和科研工作, hhh05@126.com;刘杰凤(1965-),女,硕士,教授,应用微生物及酶,通讯联系人, gdmmlj@126.com。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

土壤样品采自茂名市郊的香蕉园。

1.2 培养基

羧甲基纤维素钠(CMC-Na)培养基: CMC-Na 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g, 琼脂粉 20 g, Mandels 无机营养液(含 1% 微量元素液)1 000 mL, 自然 pH。

液体发酵产酶培养基: 秸秆(香蕉秆粉: 麸皮 = 1:1)(未过筛)50 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, Mandels 无机营养液 1 000 mL, pH 为 6.0。

固体发酵产酶培养基: 秸秆粉或麸皮(未过筛)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、Mandels 无机营养液按一定比例配制, 自然 pH。

1.3 纤维素酶菌株的筛选

取泥样 2 g, 悬浮于 10 mL 无菌水中, 取 0.2 mL 悬浮液涂布于 CMC-Na 培养基平板上, 28℃ 培养, 直至长出菌落。选取生长较快、菌落较大的菌株, 在 CMC-Na 培养基中连续划线分离, 得到以羧甲基纤维素作唯一碳源快速生长的单菌落。取纯化的菌体分别接种于固体或液体发酵培养基中, 30℃, 160 r/min(液体培养), 培养至第 5~6 d, 提取粗酶液, 测定纤维素酶活力, 选取酶活力最高的菌株进行后续试验。

1.4 菌株鉴定

根据分离菌株的菌落及菌体形态等特征并参考文献[8-9], 初步鉴定归属。

1.5 最适产酶条件试验

150 mL 三角烧瓶中装 10 g 培养基, 接种量为 2 mL(孢子浓度约 10^7 CFU/mL, OD_{600} 约 1.3), 料液比为 1:2.5。接种后于霉菌培养箱 30℃ 培养, 湿度保持 80% 以上, 接种 48 h 后隔天翻曲 1 次。培养 5~6 d, 取发酵曲 1 g, 加蒸馏水 10 mL, 搅拌均匀, 30℃、100 r/min 振荡浸提 1 h, 双层纱布过滤, 滤液经 4℃、5 000 r/min 离心 15 min, 上清为粗酶液, 测

定粗酶液纤维素酶活力。分别改变碳源、氮源、温度、pH 等参数, 研究其最适产酶条件, 个别变动将在文中指出。

1.6 酶活力测定及酶活力定义

用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定还原糖含量, CMCCase、 β -Glucosidase、FPA 3 种酶活力测定具体方法参考文献[10]。木聚糖酶活力测定方法同 CMCCase, 底物为 1% 的木聚糖。

酶活力定义: 在上述反应条件下, 每克曲(或每 mL 粗酶液)每分钟催化底物水解生成 1 μg 葡萄糖(木糖)所需的酶量, 定义为 1 个酶活力单位(U), 以 U/g(或 U/mL)表示。下同。

1.7 纤维素酶酶学性质

在 50℃ 酶解时, 分别测定粗酶液在 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 下的酶活力, 确定其最适反应 pH。在缓冲液 pH 为 4.8 中, 分别测定 40~80℃ 不同温度下酶解时的酶活力, 确定其最适反应温度。

1.8 纤维素酶的酶解性能

按 1:10 比例, 用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 为 4.8)浸提 XA-1 发酵曲, 得粗酶液。按酶用量为每克秸秆加粗酶液 10 mL 的比例加入经 4% NaOH 溶液处理过的香蕉秆(或水葫芦)中, 50℃、100 r/min 振荡酶解, 每隔 4 h 取酶解液, 测定还原糖含量^[11]。

$$\text{酶解得率}(\%) =$$

$$(\text{还原糖生成量}(\text{g}) / \text{秸秆粉质量}(\text{g})) \times 0.9 \times 100\%$$

式中, 0.9 为纤维素和葡萄糖之间的转换系数。

2 结果与讨论

2.1 高产纤维素酶菌株的筛选结果

经羧甲基纤维素钠培养基平板涂布及划线分离纯化, 得到 4 株利用 CMC-Na 作碳源生长良好的菌株, 分别将其编号为 XA-1~XA-4, 其中 XA-1 菌株生长最快, 菌落最大。

对 4 株菌分别进行液体发酵和固体发酵复筛, 结果见表 1。

(5):412-416.

(上接第 60 页)

- [7] Zhao D Y, Sun J Y, Li Q Z, *et al.* Morphological control of highly ordered mesoporous silica SBA-15 [J]. *Chem Mater*, 2000, 12: 275-279.
- [8] 郭昌文, 戴维林, 曹勇, 等. W-SBA-15 的原位合成及其在环戊烯氧化反应中的催化性能研究[J]. *化学学报*, 2003, 61(9): 1496-1499.
- [9] 陈杨英, 韩秀文, 包信和. W-SBA-15 介孔分子筛的直接合成及其对环己烯环氧化反应的催化性能[J]. *催化学报*, 2005, 26

- [10] 刘英俊, 吴江平, 郭沁林, 等. XRD 和 XPS 法研究 WO_3/SiO_2 体系[J]. *催化学报*, 1987, 8(1): 14-19.
- [11] 胡林华, 季生福, 刘倩倩, 等. 含钨 SBA-15 介孔分子筛催化剂的表面酸性和羟基分布[J]. *催化学报*, 2007, 28(11): 980-986.
- [12] Deshpande A, Bassi A, Prakash A. Ultrasound assisted, base catalyzed oxidation of 4, 6-dimethyldibenzothiophene in a biphasic diesel acetonitrile system[J]. *Energy & Fuels*, 2005, 19(1): 28-34. ■

表1 4株产纤维素酶菌的复筛结果

菌株	纤维素酶活力			
	固体发酵/(U·g ⁻¹)		液体发酵/(U·mL ⁻¹)	
	CMCase	FPA	CMCase	FPA
XA-1	3425.1	623.5	318.44	61.35
XA-2	2643.1	492.7	236.33	25.86
XA-3	2112.6	452.3	191.69	41.03
XA-4	1316.7	242.4	130.65	11.09

由表1可见,菌株XA-1的纤维素酶活力最高,因此,选菌株XA-1作进一步试验。

2.2 菌株XA-1的鉴定

2.2.1 菌落形态

菌株XA-1在CMC平板上菌落呈白色、绒毛状,分布疏松,菌落高3~5 mm,气生菌丝在试管壁或菌落中央有编结成绳状的趋势。在PDA培养基中培养时,菌丝生长快速,随着培养时间延长,菌落由白色变粉红色,背面由白色变黄色,能产生紫红色色素,如图1所示。

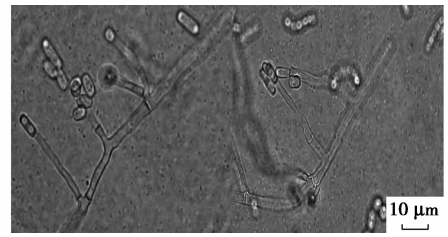


图1 XA-1在PDA培养基中的菌落形态变化

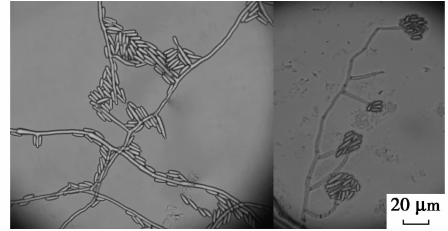
2.2.2 菌丝、孢子梗和孢子等形态

XA-1典型的形态特征如图2所示。气生菌丝有隔,分枝,透明,直径为3~7 μm。该菌产生大、小2种类型分生孢子,也容易形成厚坦孢子。小型分生孢子以假头状或链状着生,或生于单生瓶梗上;小型分生孢子呈纺锤形、卵形或椭圆形,具0~1隔,大小为4.0~7.5 μm×2.5~5.0 μm。大型分生孢子较小型分生孢子少,由气生菌丝或分生孢子座产生;大型分生孢子呈镰刀形、线型或纺锤形,具3~5隔,大小为19.6~29.4 μm×3.5~5.0 μm。厚坦孢子间生或顶生,单个或多个成串或成结节状,直径为5.0~11.5 μm。

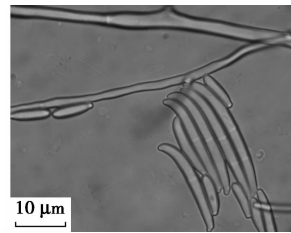
该菌具有镰刀菌属的典型特征,如产生大小2种形态分生孢子,大型分生孢子镰刀型或长柱型,有较多的分隔。结合菌株的孢子着生形式及色素生成等特性,菌株XA-1与文献[12-13]所述尖孢镰刀



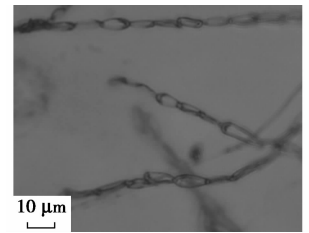
(a) 具横隔的菌丝及不同类型孢子



(b) 分生孢子着生方式



(c) 镰刀型大型分生孢子



(d) 厚坦孢子

图2 菌株XA-1的菌丝、孢子梗和孢子的形态特征

菌的形态特征一致,初步将菌株XA-1鉴定为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。

2.3 菌株XA-1的最适产酶条件试验

2.3.1 碳源种类对XA-1产纤维素酶的影响

利用南方常见农作物秸秆如香蕉秆、稻草、黄豆秆等及生长迅速的入侵植物水葫芦作唯一碳源,研究其对菌株XA-1生长及产酶的影响,如表2所示。由图2可见,菌株XA-1能高效利用试验的植物秸秆类天然纤维素合成纤维素酶,秸秆对该菌产纤维素酶作用大小次序为水葫芦>稻草>香蕉秆>黄豆秆>麸皮,以水葫芦作唯一碳源时,CMCase、β-Glucase、FPA 3种组份最大酶活分别达到3 783.2、3 158.8、773.34 U/g。

表2 碳源种类对菌株XA-1产酶的影响

碳源种类	CMCase/(U·g ⁻¹)	β-Glucase/(U·g ⁻¹)	FPA/(U·g ⁻¹)
水葫芦	3783.4	3158.8	773.34
香蕉秆	3423.8	2592.3	734.02
稻草	3588.5	2724.8	751.58
大豆秆	1696.4	1063.6	447.29
麸皮	1283.9	904.5	389.62

后续实验选取水葫芦作碳源进一步实验,并以 CMCCase 和 FPA 活力作为主要考察指标。

2.3.2 氮源种类对菌株 XA-1 产酶的影响

由于水葫芦含丰富的有机氮源,故仅改变铵盐种类,固定氮质量分数为 1%,考察了不同无机氮源对菌株产酶的影响,结果见表 3。由表 3 可知,在所考察的无机氮源种类中,硫酸铵的作用最好,CMCase、FPA2 种组份最大酶活分别达到 3 815.8、686.57 U/g,其次是脲素和硝酸铵。Mehta^[12]认为硝酸钠是尖孢镰刀菌产纤维素酶的最佳氮源,但本实验没有得到相似结论。

表 3 无机氮源种类对菌株 XA-1 产酶的影响

氮源种类	CMCase/(U·g ⁻¹)	FPA/(U·g ⁻¹)
硫酸铵	3947.5	766.55
脲素	3815.8	686.58
硝酸铵	3585.5	665.11
磷酸二氢铵	3471.8	648.99
氯化铵	2845.1	617.53
柠檬酸铵	2785.6	614.88
乙酸铵	2582.5	511.47
硝酸钠	2739.6	626.22

2.3.3 温度对菌株 XA-1 产酶的影响

不同温度下培养菌株 XA-1 所测定结果如图 3 所示。由图 3 可见,该菌的最适产酶温度在 30℃ 左右,此时,CMCase 及 FPA 分别达到 4 063.7 U/g 和 683.6 U/g。高于或低于 30℃ 培养时,产酶能力均迅速下降,菌丝生长速度与产酶能力随温度变化趋势相一致,最适温度也与常见霉菌一致(28 ~ 32℃)。

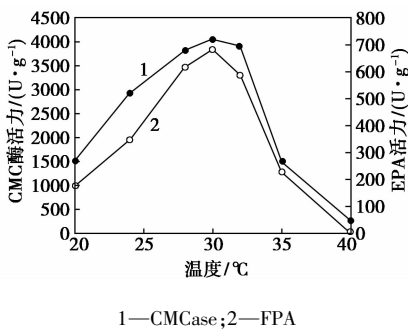


图 3 温度对菌株产酶的影响

2.3.4 初始 pH 对菌株 XA-1 产酶的影响

菌株 XA-1 在不同初始 pH 下培养产纤维素酶活力变化曲线如图 4 所示。由图 4 可见,当初始 pH 为 4~6 范围培养 XA-1 时,可以得到较高纤维素酶活力,当 pH = 5.0 时,CMCase 及 FPA 分别达到

4 017.5 U/g 和 713.4 U/g。因此,该菌产酶最适 pH 在 5.0~6.0 之间。

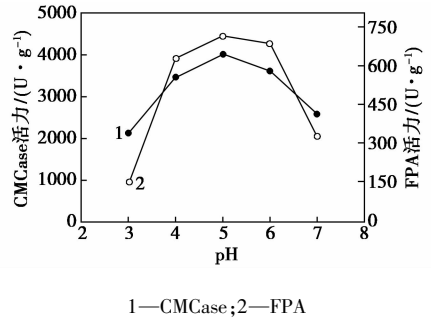


图 4 初始 pH 对菌株 XA-1 产纤维素酶的影响

2.4 菌株 XA-1 纤维素酶酶学性质初步研究

2.4.1 最适反应 pH

粗酶液在不同 pH 下测得的酶活力如图 5 所示。由图 5 可以看出,菌株 XA-1 纤维素酶系在 pH 4~6 之间有较高的酶活力, β -Glucose 的最适反应 pH = 4.5,CMCase 和 FPA 最适反应 pH = 5.0。结果与文献[14-15]报道的尖孢镰刀菌纤维素酶相似。

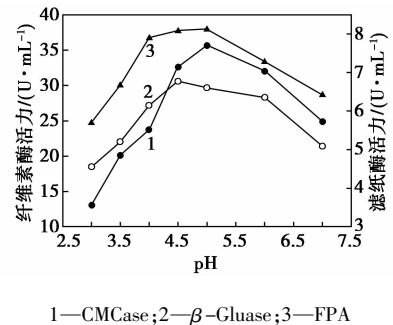


图 5 pH 对 XA-1 纤维素酶活力的影响

2.4.2 最适反应温度

酶活力随反应温度变化曲线如图 6 所示。由图 6 可见,菌株 XA-1 纤维素酶系在温度为 45~55℃ 范围具有较高的酶活力,其中 CMCase 与 β -Glucose 的最适反应温度为 45℃,而 FPA 最适反应温度为 55℃。

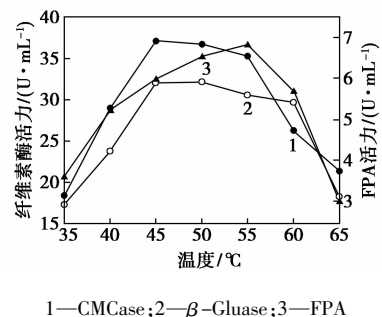


图 6 温度对 XA-1 纤维素酶活力的影响

2.5 XA-1 纤维素酶酶解秸秆的初步试验

由优化的产酶条件下得到的粗酶液(CMCase: 4 083.2 U/g, β -Glucose: 3 258.6 U/g, FPA: 773.2 U/g) 酶解香蕉秆和水葫芦, 测定酶解得率, 结果如图7所示。

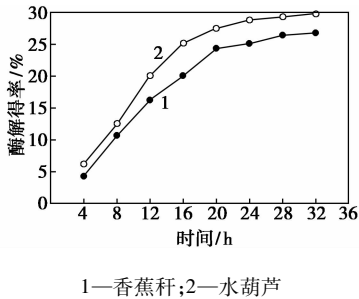


图7 XA-1 纤维素酶对香蕉秆和水葫芦的酶解效果

由图7可以看出, 酶解液的还原糖质量分数随着酶解时间的延长而增加, 在酶解前20 h, 酶解速度较快; 20 h后还原糖质量分数增加幅度逐渐平缓; 酶解32 h后, 酶解香蕉秆和水葫芦的还原糖得率分别为27.3%和29.8%。

3 结论

(1) 以CMC-Na作唯一碳源, 从茂名郊区香蕉园土壤中分离到一株高产CMCase和 β -Glucose的丝状真菌XA-1。菌落、菌体及孢子的形态特征与半知菌类、从梗孢目、瘤座孢科、镰刀菌属的尖孢镰刀菌相似, 故初步鉴定XA-1为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。

(2) 菌株XA-1能利用秸秆类天然纤维素作碳源产纤维素酶, 其产酶的最适条件为: 温度为30℃, pH为5.0~6.0, 以水葫芦为碳源, 硫酸铵作无机氮源。在此条件下, CMCase、 β -Glucose、FPA 3种酶活力分别达到4 082.2、3 258.6、773.2 U/g。

(3) XA-1所产CMCase、 β -Glucose最适反应温度为45℃, FPA则为55℃; CMCase、 β -Glucose和FPA的最适反应pH分别为5.0、4.5和5.0。在pH为4~6之间酶活力维持在较高水平。XA-1纤维素酶特性与常见丝状真菌纤维素酶特征相似。

(4) 优化条件下培养XA-1所得纤维素酶对香蕉秆及水葫芦酶解试验结果表明, 酶解速率最快的时间是在前20 h, 酶解32 h后, 酶解得率分别达到27.3%和29.8%。

菌株XA-1纤维素酶组份中的CMCase、 β -Glucose酶活力较高, 而且具有较高的产木聚糖酶能

力, 初步试验结果显示, 木聚糖酶活力达到1 325.8 U/g。可见, 该菌作为木质纤维素酶、半纤维素酶新菌源, 在纺织、洗涤剂工业或生产酶系全面的复合酶制剂等方面具有较大的应用前景, 值得进一步研究开发利用。

参考文献

- [1] Chen M, Zhao J, Xia L M. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(3): 411-415.
- [2] Gutierrez-Correa M, Portal L, Moreno P, et al. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse[J]. Bioresource Technology, 1999, 68(2): 173-178.
- [3] Sukumaran R K, Singhania R R, Mathew G M, et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production[J]. Renewable Energy, 2009, 34(2): 421-424.
- [4] Lever M, Ho G, Cord-Ruwisch R. Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulose from solid-state fermentation[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 7083-7087.
- [5] Kuhad R C, Mehta G, Gupta R, et al. Fed batch enzymatic saccharification of newspaper celluloses improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biomass and Bioenergy, 2010, 7: 1-6.
- [6] Wen Z Y, Liao W, Chen S L. Hydrolysis of animal manure lignocelluloses for reducing sugar production[J]. Bioresource Technology, 2004, 91(1): 31-39.
- [7] Schülein M. Protein engineering of cellulases[J]. Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2000, 1543(2): 239-252.
- [8] 邢来君, 李明春, 魏东盛. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 396-397.
- [9] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 435-441.
- [10] Liu J F, Xue D S, He K K, et al. Cellulase production in solid-state fermentation by marine *Aspergillus* sp. ZJUBE-1 and its enzymological properties[J]. Advanced Science Letters, 2012, 12: 381-386.
- [11] 刘杰凤, 尹爱国, 马超, 等. 里氏木霉和黑曲霉降解香蕉秆产可发酵糖的研究[J]. 可再生能源, 2012, 30(7): 93-97.
- [12] 谢俊, 张旭一, 陈银华, 等. 香蕉枯萎病菌的分离鉴定与形态学研究[J]. 热带生物学报, 2010, 1(4): 337-341.
- [13] 郭立佳, 彭军, 杨腊英, 等. 大蕉枯萎病菌病原菌的分离、鉴定和致病性测定[J]. 热带作物学报, 2013, 34(1): 105-110.
- [14] Yuan L, Wang W, Pei Y, et al. Screening and identification of cellulase-producing strain of *Fusarium Oxysporum*[J]. Procedia Environmental Sciences, 2012, 12B: 1213-1219.
- [15] Panagiotou G, Kekos D, Macris B J. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation[J]. Industrial Crops and Products 2003, 18(1): 37-45. ■