

研究报告

纤维素降解菌 L-06 的筛选、鉴定及其产酶条件的分析

刘韞滔¹, 禩淑霞¹, 龙传南¹, 龙敏南², 胡忠¹

1 汕头大学生物学系 汕头 515063

2 厦门大学生命科学学院 厦门 361005

摘要: 从用于堆肥的水稻秸秆中初筛出一株高效纤维素降解菌 L-06, 根据 18S rRNA 基因序列和菌株形态分析, 初步鉴定该菌为斜卧青霉(*Penicillium decumbens*)。研究了液体发酵培养基中氮源、碳源、表面活性剂、培养温度、起始 pH 以及接种量对该菌株各纤维素酶活力的影响。在最适条件下, 该菌的 β -葡萄糖苷酶(BGL)、外切纤维素酶(CBH)于培养第 3 天酶活力分别达到 1662 u/mL 和 2770 u/mL; 内切纤维素酶(EG)、滤纸糖化力(FPase)于培养第 4 天酶活力分别达到 18064 u/mL 和 4035 u/mL。在产酶优化实验中, 该菌的 EG 和 CBH 在 pH10 的培养条件下分别保持了 70% 和 43% 的酶活性; 在 50°C 培养条件下 EG 和 CBH 分别保持了 68% 和 59% 的酶活性。表现出了耐热, 耐碱的特性。

关键词: 纤维素酶, 斜卧青霉, 培养条件优化

Screening, Identifying of Cellulose-Decomposing Strain L-06 and Its Enzyme-Producing Conditions

Yuntao Liu¹, Shuxia Xuan¹, Chuannan Long¹, Minnan Long², and Zhong Hu¹

1 Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China

2 College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: Cellulases are relatively costly enzymes that are sold in large volumes for use in different industrial applications, and a significant reduction in cost will be important for their commercial use in biorefineries. The production of cellulase is a major factor in the hydrolysis of cellulosic materials. Hence it is essential to make the process economically viable. A strain (L-06) with high cellulase activity was screened from rice straw compost and classified as *Penicillium decumbens* by the analysis of its morphology and 18S rRNA gene sequences. Different conditions of liquid fermentation medium including nitrogen source, carbon source, surfactant, temperature, initial pH, inoculation quantity for the production of cellulase had been studied. The maximal β -1, 4-glucosidase(BGL) activity was 1662 u/mL which is 1.49 times of the previous and the maximal exo- β -1, 4-glucanases(CBH) activity was 2770 u/mL which is 1.36 times of the previous, cultured in the optimal condition for three days. And the maximal endo- β -1, 4-glucanases (EG) activity was 18064 u/mL which is 1.87 times of the previous and the maximal filter paper enzyme(FPase) activity was 4035 u/mL which is 1.47 times of the previous, cultured in the optimal condition for four days. In the optimization experiments, the EG and CBH in the culture condition (pH10) maintained 70% and 43% activity. In the culture condition(50°C) EG and CBH maintained 59% and 68% activity, which showed heat and alkali resistant characteristics.

Keywords: cellulase, *Penicillium decumbens*, cultural condition optimization

Received: March 16, 2008; **Accepted:** April 10, 2008

Supported by: the Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2006AA05Z111), Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 06300998) and Science and Technologies resource Project of Fujian Province (No. 2006H0091).

Corresponding author: Zhong Hu. Tel: +86-754-82902081; E-mail: hzh@stu.edu.cn

国家高技术研究与项目(No. 2006AA05Z111), 广东省自然科学基金(No. 06300998)和福建省科技平台项目(No. 2006H0091)资助。

纤维素是世界上最为丰富的可再生生物高分子, 其不断通过光合作用得以补充^[1]。因为糖是能量、食品、化工产品等的重要来源, 所以将纤维素这些生物高分子降解成糖, 便成为十分有意义的事情^[2]。事实上所有的纤维素材料均可转化为具有商业价值的产品, 例如: 乙醇、乙酸、单细胞蛋白等^[3]。纤维素的生物转化近些年受到了极大的重视, 大规模纤维素生物转化工艺的发展, 将有效解决或减轻食品和动物饲料的不足、废弃物处理、矿石燃料依赖性等一系列问题^[1]。

利用微生物产生的纤维素酶来分解和转化纤维素则是纤维素利用的有效途径。一个完整的纤维素酶系, 通常由作用方式不同而能相互协同催化水解纤维素的三类酶组成: 内切葡聚糖酶(EC 3.2.1.4)、外切葡聚糖酶(EC 3.2.1.91)、 β -葡萄糖苷酶^[4,5]。因此, 分离和筛选具有较完整酶系的高效纤维素降解菌便显得至关重要。本研究在大量采集样品的基础上, 分离和筛选出一株具有较高降解活性的斜卧青霉 L-06, 并对其产酶条件进行了优化。

1 材料和方法

1.1 培养基

鉴别培养基: 滤纸条摇瓶培养基和刚果红培养基^[6,7]; 分离培养基: 羧甲基纤维素培养基^[2]; 液体发酵培养基^[8]。

1.2 菌株的分离筛选

在汕头郊区采集用于堆肥的水稻秸秆、泥样以及牛羊粪便。将得到的样品经适当稀释, 取少量接种于鉴别培养基中培养, 挑取具有纤维素降解能力的菌落划线培养于分离培养基中进行初筛, 重复以上步骤直至获得纯培养菌株。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 菌株形态鉴定^[9]

1.3.2 18S rRNA 基因分析^[10]

真菌 18S rRNA 通用引物由 Sangon 公司合成; 测序由 Invitrogen 公司完成。

1.4 粗酶液的制备

将浓度为 10^7 cfu/mL 的菌液接入发酵培养基中, 培养适当时间后, 取发酵液用单层纱布过滤, 滤液离心(9000 r/min, 4°C, 20 min), 上清液即为粗酶液。

1.5 酶活力的测定方法^[2,11,12]

1.5.1 内切纤维素酶(EG)的测定

取经适量稀释的粗酶液 0.5 mL, 加入含 1% CMC_{Na} 的醋酸缓冲液(pH 4.8, 0.1 mol/L)1.5 mL, 经 50°C 恒温水浴 30 min 后, 立即按 DNS 法测定还原糖(加入 2 mL DNS 显色液, 沸水浴中显色 10 min 后。快速冷却终止反应, 540 nm 处测定 OD 值, 对比标准曲线计算酶活)。

1.5.2 外切纤维素酶(CBH)的测定

取经适量稀释的粗酶液 1 mL, 加入含 2% Avicel 的醋酸缓冲液(pH 4.8, 0.1 mol/L)1 mL, 经 50°C 恒温水浴 2 h, 立即按 DNS 法测定还原糖。

1.5.3 β -葡萄糖苷酶(BGL)的测定

取经适量稀释的粗酶液 0.5 mL, 加入含 0.5% 水杨苷的醋酸缓冲液(pH 4.8, 0.1 mol/L)2 mL, 经 50°C 恒温水浴 30 min, 立即按 DNS 法测定还原糖。

1.5.4 滤纸糖化力(FPase)的测定

取粗酶液 1 mL, 加入醋酸缓冲液(pH 4.8, 0.1 mol/L) 2 mL, 然后加入一张(1 cm × 3 cm)新华滤纸, 经 50°C 恒温水浴 1 h 后, 立即用 DNS 法测定还原糖。

1.5.5 酶活定义

在上述条件下 1 mL 粗酶液所产生的 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活单位(u)。注: 以上各酶的测定, 均已扣除了粗酶液中所含有的还原糖量。

2 结果

2.1 纤维素降解菌筛选结果

在菌株的筛选中, 初筛得到 78 株纤维素降解菌, 经过 DNS 法复筛得到了 5 株具有较高纤维素酶活的菌株。如表 1 所示, 菌株 L-06 的 EG、CBH、BGL、FPase 均高于其他菌株, 因此选定 L-06 作为进一步研究对象。

表 1 不同菌株酶活力比较

Table 1 Comparison of cellulase activity of various strain

Strains	Enzyme activity (u)			
	EG	CBH	BGL	FPase
L-06	8442	2117	1048	2135
L-07	4394	1103	650	1297
L-12	644	3	164	76
L-23	2994	548	48	483
L-49	1724	204	30	249

2.2 纤维素降解菌 L-06 鉴定结果

菌株 L-06 在羧甲基纤维素培养基的菌落形态呈圆形, 边缘光滑, 菌落平整, 初期呈淡黄色、表面湿润, 逐渐以白色絮状扩散, 最终呈绿色, 绒毛状; 菌丝有隔膜; 分生孢子穗绿色, 椭圆形, 串生于小梗顶端呈不分枝的链状。

分析菌株 L-06 的 18S rRNA 基因序列结果表明, 其序列与 GenBank 数据库中的斜卧青霉 (*Penicillium decumbens*) 18S rRNA 基因序列具有 99% 的同源性。

根据以上结果, 初步鉴定该菌为斜卧青霉 (*Penicillium decumbens*), 其 GenBank 接受号为 EU273880。

2.3 菌株 L-06 发酵条件的优化

2.3.1 碳源对菌株产酶能力的影响

在以 1% CMC_{Na}、秸秆、乳糖、麸皮、葡萄糖为唯一碳源的液体发酵培养基中, 对菌株 L-06 进行发酵培养。

如图 1 所示, 各种纤维素酶的合成都有其相对应的最适碳源, 菌株的 EG 以 CMC_{Na} 为唯一碳源时酶活最高; CBH 则以乳糖为唯一碳源时酶活最高; FPase 和 BGL 酶活均在葡萄糖为唯一碳源的情况下达到最高。对于纤维素降解微生物来讲, 纤维素酶的产生需要进行诱导才能产生, 而在有容易利用的糖, 如葡萄糖存在时, 纤维素酶的生产则被抑制^[5]。该菌呈现出较好的抗葡萄糖阻遏效应。

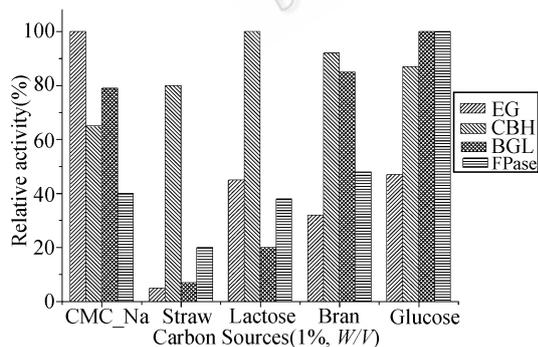


图 1 碳源对纤维素酶活力的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on cellulase activity

2.3.2 氮源对菌株产酶能力的影响

在发酵培养基中分别加入 0.25%、不同的氮源(胰蛋白胨、酵母粉、大豆蛋白胨、酵母提取物、尿素), 考察氮源对产酶的影响。从图 2 可以看出, 菌

株的 EG 和 FPase 均在以胰蛋白胨为唯一氮源的情况下酶活达到最高; CBH 则在酵母粉为唯一碳源酶活最高; 而酵母提取物最有利于 BGL 的合成。

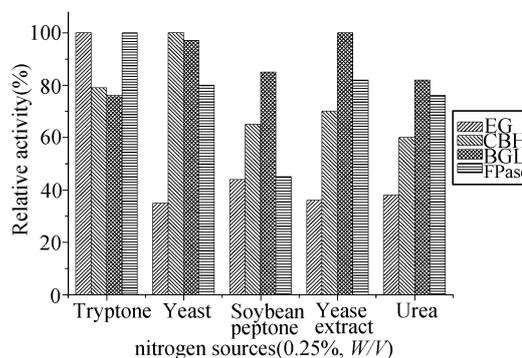


图 2 氮源对纤维素酶活力的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources on cellulase activity

2.3.3 表面活性剂对菌株产酶能力的影响

在液体发酵培养基分别添加 0.02% 的 TW-80、肥皂、洗衣粉、TW-20(以初始液体发酵培养基作为对照), 进行菌株 L-06 的发酵培养, 3 d 后各种酶的活力如图 3 所示。除了 CBH 活力有所提高之外, EG、FPase 和 BGL 均受到各表面活性剂的抑制。表面活性剂虽然可以提高纤维素分子的溶解度, 使酶和纤维素分子更有效的进行接触, 但其可能通过改变离子强度、螯合金属离子等方式影响酶活性部位微环境或者是表面活性剂改变了细胞膜的通透性, 造成菌体内外环境失衡, 从而影响其菌体生长和产酶^[1,13]。

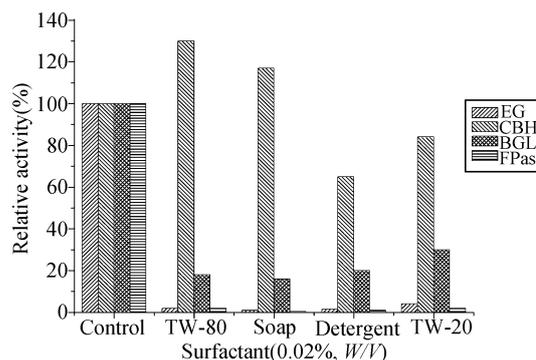


图 3 表面活性剂对纤维素酶活力的影响

Fig. 3 Effect of different surfactant on cellulase activity

2.3.4 培养温度对菌株产酶能力的影响

不同培养温度(25°C、30°C、35°C、40°C、45°C)下, 菌株 L-06 发酵培养 3 d 后测定各纤维素酶的活性。由图 4 可知, EG 和 CBH 在 30°C 的培养温度下达

到最高, 而 FPase 和 BGL 的最适温度为 35°C。除 BGL 外, 其余各酶对温度的改变表现出了较强的适应性。

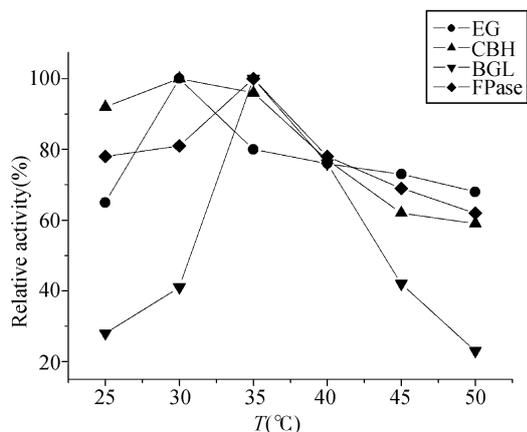


图 4 培养温度对纤维素酶活力的影响
Fig. 4 Effect of temperature on cellulase activity

2.3.5 起始 pH 值对菌株产酶能力的影响

菌株 L-06 在不同 pH 值(3-10)的液体发酵培养基中发酵培养, 图 5 为培养 3 d 后各种酶的活力变化。EG、CBH、BGL、FPase 分别在 pH9、pH5、pH8、pH6 条件下酶活力可以达到最高; 在 pH5~10 条件下, 各酶活力基本维持在一个较高水平。

2.3.6 接种量对菌株产酶能力的影响

分别接种不同的菌量(20 μL、40 μL、60 μL、80 μL、100 μL), 经发酵 3 d 后测酶活。

如图 6 所示, EG、CBH、BGL 和 FPase 的最适接种量分别为 40 μL、60 μL、100 μL 和 60 μL。

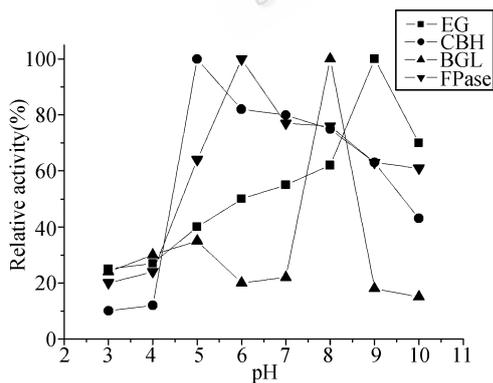


图 5 起始 pH 对纤维素酶活力的影响
Fig. 5 Effect of initial pH value on cellulase activity

2.4 最优培养条件的验证

根据以上各纤维素酶的最优条件分别配制液体发酵培养基, 发酵培养菌株 L-06, 并测定各纤维素酶活力, 结果如表 2 所示。优化后 CBH、BGL 于

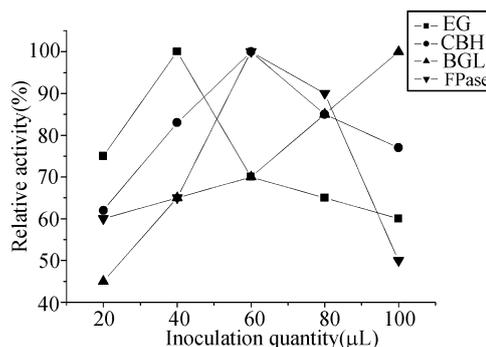


图 6 接种量对纤维素酶活力的影响
Fig. 6 Effect of inoculation quantity on cellulase activity

第 3 天分别达到最高值 2770 u/mL 和 831 u/mL; EG、FPase 于第 4 天分别达到最高值 9032 u/mL 和 4035 u/mL。相对于对照, BGL、CBH、EG、FPase 分别提高了 1.49 倍、1.36 倍、1.87 倍和 1.47 倍。其中各酶活力达到最峰值所需的时间都有不同程度的缩短。

表 2 优化前后纤维素酶活力的比较
Table 2 Comparison of cellulase activity between the unoptimized and the optimized

Cellulase	Incubation time/d				
	1	2	3	4	5
EG(u) [*]	1494	8548	12668	18064	4086
EG(u)	604	2616	8014	9650	890
CBH(u) [*]	22	1335	2770	2048	572
CBH(u)	6	932	1620	2037	307
BGL(u) [*]	806	924	1662	1290	898
BGL(u)	388	440	1102	1116	492
FPase(u) [*]	429	1416	3194	4035	383
FPase(u)	115	1044	2214	2737	53

Note: the enzyme with the “*”superscript was optimized

3 讨论

具有纤维素降解能力的丝状真菌中多具有较高的β-葡萄糖苷酶活力, 而在天然纤维素降解中起重要作用的 CBH 活力却较低^[5]。对比近期 Adsul(2007) 等报道的文献^[1,2,13,15], L-06 不但具有较高水平的 CBH 活性, 而且拥有较完整的纤维素酶系, 这不但使其具有抗纤维二糖等还原型纤维寡糖的阻遏效应, 更有利于各酶相互协同催化水解纤维素^[5,10]。这在以结晶型纤维素为主体的秸秆、麸皮、棉花等天然纤维素的降解与利用中具有重要意义。

L-06 在 pH10 的培养条件下, 菌株 L-06 产生的 CBH 和 EG 仍然分别保持了 43%和 70%的酶活性; 在 50°C培养条件下, CBH 和 EG 也仍保持了 59%和

68%的酶活性。因此,菌株 L-06 产生的 CBH、EG 表现出了一定耐热耐碱的特性,基本具备了作为洗涤剂添加成分的碱性纤维素酶的要求^[14]。此外,菌株 L-06 产生的 CBH 在有表面活性剂存在的条件下,也表现出了较好的适应性,这对该菌的工业应用提供了广阔的平台。尤其内切型纤维素酶在纺织及造纸工业方面具有重要的应用,建立大规模高效生产技术对发展我国纺织用纤维素酶具有深远的意义^[16]。

由于滤纸结构中包括结晶型纤维素和非结晶型纤维素,所以通常采用 FPase 来衡量纤维素酶系的综合降解能力^[6,8]。本文实验结果显示,菌株 L-06 具有较高的 FPase 活性(优化后达到 4035 u/mL),表明该菌具有较完整的酶系。在优化菌株 L-06 的发酵培养条件时,FPase 活性常表现出与 EG、CBH 活性的正相关性,尤其是与 EG 活性。当 EG 活性受到抑制时(如:表面活性剂),即使具有较高的 CBH 活力,FPase 活性也较低。这可能是因为滤纸的降解首先需要 EG 的膨胀作用才能提供更多的还原端和非还原端让 CBH 来作用;而当 EG 和 CBH 都有较高酶活性时,FPase 活性也相应提高。这体现出 CBH 和 EG 对滤纸降解的协同作用。

由于纤维素酶系的多型性,纤维素的酶解是一个复杂的过程;目前为止,对其真正的酶解机制仍不完全清楚,因此有待进一步深入探索。

REFERENCES

- [1] Adsul MG, Bastawde KB, Varma AJ, et al. Gokhale DV. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. *Bioresource Technology*, 2007, **98**(7): 1467–1473.
- [2] Yoon JJ, Kim YK. Degradation of crystalline cellulose by the *Brown-rot Basidiomycete fomitopsis palustris*. *The Journal of Microbiology*, 2005, **43**(6): 487–492.
- [3] Lawford HG, Rousseau JD. Cellulosic fuel ethanol-alternative fermentation process designs with wild type and recombinant *Zymomonas mobilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2003, **105**: 457–469.
- [4] Kansoh AL, Essam SA, Zeinat AN. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*. *Polymer degradation and stability*, 1999, **62**(2): 273–278.
- [5] Gao PJ, Xu P. Environmental resources of microbial technology. Beijing: Chemical Industry Press, 2004, 15–109. 高培基, 许平. 环境资源微生物技术. 北京: 化学工业出版社, 2004, 15–109.
- [6] Teather MR, Wood PJ. Use of congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from The bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, **38**: 148–158.
- [7] Ye JY. A new differential medium for cellulose decomposing microorganisms. *Microbiology*, 1997, **24**(4): 251–252. 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基. 微生物学通报, 1997, **24**(4): 251–252.
- [8] Li X, Gao P. Isolation and partial properties of cellulose-decomposing strain of *cytophaga sp* LX-7 from soil. *Journal of Applied Microbiology*, 1997, **82**: 73–80.
- [9] Wei JC. Fungus Identification Manual, Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1979, 495–499. 魏景超. 真菌鉴定手册, 上海: 上海科技出版社, 1979, 495–499.
- [10] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in PCR Protocols: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *A Guide to Methods and Amplification*. San Diego, Calif: Academic Press, 1990, **1**: 315–322.
- [11] Gokhale DV, Puntambekar US, Deobagkar DN, Peberdy JF. Production of cellulolytic enzymes by mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Enzyme and Microbial Technology*, 1988, **10**(7): 442–445.
- [12] Li RQ, Wang AY, Kong LD. Isolation and screening of a cellulose-decomposing fungus strain. *Journal of Shanxi University*, 2006, **29**(3): 317–320. 李日强, 王爱英, 孔令冬. 一株纤维素分解菌的分离选育. 山西大学学报(自然科学版), 2006, **29**(3): 317–320.
- [13] Poorna CA, Prema P. Production of cellulase-free endoxylanase from novel *Alkalophilic thermotolerant Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Bioresource Technology*, 2007, **98**: 485–490.
- [14] Song GJ. Alkaline cellulase and mechanisms of pollutant removal. *Biotechnology*, 1997, **24**(6): 364–367. 宋桂经. 碱性纤维素酶及其去污机理. 微生物学通报, 1997, **24**(6): 364–367.
- [15] Zhang YH, Lynd LR. Regulation of cellulose synthesis in batch and continuous cultures of *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology*, 2005, **187**(1): 99–106.
- [16] Ding SJ, Song MJ, Yang HJ, et al. Xing ZT, Zhou R, Cao J. High-level Production of neutral endoglucanase 1 in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22**(1): 71–76. 丁少军, 宋美静, 杨红军, 等. 中性内切型纤维素酶在毕赤酵母中高水平表达的研究. 生物工程学报, 2006, **22**(1): 71–76.