

一株纤维素分解菌的分离、鉴定及产酶条件优化

吴 丹, 邓泽元*, 范亚苇, 刘文群, 余 玮

(食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学高等研究院, 江西 南昌 330047)

摘 要: 从江西传统发酵食品中分离到一株产纤维素酶活力较高的菌株, 通过形态学与分子生物学方法鉴定得知, 该菌与粗壮脉纹孢菌最高同源性可达 99%。还对该菌产纤维素酶的条件进行了优化, 通过单因素试验, 得出该菌最佳产酶条件为: 培养温度为 30℃、初始 pH 值为 4.8、发酵周期为 6d。

关键词: 纤维素酶; 鉴定; 产酶条件

Study on Screening and Identification of Cellulolytic Strain MC and Its Cellulase-producing Conditions

WU Dan, DENG Ze-yuan*, FAN Ya-wei, LIU Wen-qun, YU Wei

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Institute of Advanced Study, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: In this study, a cellulolytic strain named as MC was screened from traditional fermentation soybean residue, and was identified by the methods of morphology and molecular biology. The results showed that the strain has the highest homology of 99% with *Neurospora crassa*. Besides, the optimization of fermentation conditions was conducted. The results showed that the optimal conditions are as follows: cultivation temperature 30 °C, initial pH 4.8, and fermentation cycle 6 days.

Key words: cellulase; identification; fermentation conditions

中图分类号: TQ920.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0218-04

构成绿色植物细胞壁的主要成分纤维素, 被认为是世界上最丰富的可再生资源^[1]。如何充分地利用对缓解全球能源危机、食品和饲料资源紧张以及环境污染有着重大意义。自然界当中能分解纤维素的生物主要为真菌类及部分细菌, 以木霉、曲霉、青霉的能力最突出^[2-3]。国内外已有不少文献对纤维素酶进行了报道, 探明纤维素的降解是由一系列酶的协同作用来完成, 构成这一酶系的酶主要有: C1 酶、Cx 酶及 β -葡萄糖苷酶^[4-5]。对纤维素酶的应用已在食品、饲料、医药、纺织、造纸等各个领域取得一定进展^[6-7], 但霉菌纤维素酶活力较低, 一直是阻碍其大规模生产应用的瓶颈问题^[8]。

目前, 人们研究的纤维素酶主要来自细菌和丝状真菌等微生物, 而对真菌研究较多的菌属主要有木霉属(*Trichoderma*)、青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、漆斑霉属(*Myrthecium*)、孢霉属(*Fusarium*)。

本实验从江西传统发酵食品中分离得到一株产纤维

素酶菌, 该菌为可食用霉菌, 安全无毒, 产纤维素酶活较高。对该菌进行分离鉴定, 并对其液体发酵产酶条件进行优化为进一步应用开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源

从江西传统发酵食品中分离, 菌株命名为 MC。

1.1.2 培养基

分离与鉴定培养基: PDA 培养基; 发酵培养基: 稻草粉 40g、蔗渣 10g、蛋白胨 10g、 KH_2PO_4 2g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8g, 用蒸馏水溶解并定容到 1000ml。

1.1.3 试剂

三羟甲基氨基甲烷-盐酸、氯化钠、乙二醇四磺酸钠、十六烷基三甲基溴化胺、 β -巯基乙醇、氯仿、异戊醇。

收稿日期: 2007-01-26

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT0540); 江西省科技厅科研项目(200726)

作者简介: 吴丹(1983-), 女, 硕士, 研究方向为功能食品。E-mail: wudan442@126.com

* 通讯作者: 邓泽元(1963-), 男, 教授, 博士, 研究方向为营养、保健与功能食品。E-mail: dengzy28@yahoo.com.cn

1.1.4 仪器与设备

TH-CB-403 超净工作台、DHP-9162 恒温培养箱、XSJ-2 落射荧光显微镜、YXQ.WY21-600 灭菌锅、PCR 仪、电泳仪、UVI 凝胶图像分析系统、DU640 紫外光栅分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离

用接种环将待分离样品分别划线接种于 PDA 培养基上, 将划线平板倒置于 32℃ 恒温培养 3d; 挑取典型孢子进行纯培养, 纯化后的菌株接种于沙氏斜面保存。

1.2.2 菌种形态特征鉴定

将接种针经火焰灭菌并冷却后, 从斜面上蘸取极少量孢子, 点植于平板上的中间位置, 将平板置于 28℃ 恒温培养 3d, 观察菌落特征。

1.2.3 显微镜下形态特征观察

用解剖针从培养皿的菌落上, 挑取少量菌体, 置载玻片的水滴中, 加盖盖玻片。于显微镜下观察其形态特征。

1.2.4 18SrDNA 的 PCR 扩增

霉菌 DNA 提取按参考文献[9]进行。以抽提的霉菌 DNA 作为 PCR 扩增的模板。PCR 反应体系(50 μ l)在表 1 中列出。反应条件: 94℃ 预热变性 5min; 94℃ 1min, 56℃ 1min, 72℃ 2min, 进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 7min。取 PCR 产物 5 μ l 与 1 μ l loading buffer 混合, 点样, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。PCR 产物经 PCR Product Purification kit 进行纯化。

1.2.5 PCR 产物序列测定及序列分析

将已纯化的 PCR 产物用 Megabase 1000 自动测序仪进行测序。所得序列用 NCBI 的 BALST 程序进行同源序列比对。

1.2.6 MC 菌株产酶条件优化

1.2.6.1 粗酶液的制备

将 MC 接种到 80ml 发酵培养基, 经一定条件的培养, 取液体培养物于 4℃、8000r/min 离心 15min, 上清液即为粗酶液。

1.2.6.2 纤维素酶活力测定

参考文献[10]和[11]。一个酶活力单位定义为 1ml 酶液 1min 内水解底物生成 1 μ mol 还原糖所需酶量。

1.2.6.3 培养温度对产酶的影响

将接种后的发酵培养基(初始 pH 值为 4.8)于 25、28、30、32、34℃, 分别振荡(160r/min)培养 6d, 分别取样测羧甲基纤维素钠酶活力(Cx 酶活力)、微晶纤维素酶活力(C1 酶活力)、 β 葡萄糖苷酶(β G 酶活力)、滤纸酶活(FP 酶活), 试验重复三次, 结果取平均值。

1.2.6.4 初始 pH 值对产酶的影响

用缓冲液将培养基分别配制成 pH 值为 4.0、4.4、4.8、5.0、5.5、6.0, 分别接种于 30℃ 恒温振荡(160r/min)培养 6d, 分别取样测以上酶活, 试验重复三次, 结果取平均值。

1.2.6.5 培养时间对产酶的影响

将接种后的发酵培养基(初始 pH 值为 4.8)于 30℃ 恒温振荡(160r/min)培养 3、4、5、6、7d, 分别取样测以上酶活, 试验重复三次, 结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 纤维素分解菌 MC 的形态观察结果

菌株 MC 在平板上生长迅速, 2~3d 可长满 9cm 的培养皿, 菌丝体疏松, 呈棉絮状, 菌丝起初为白色, 后为淡黄色, 孢子呈橙色。氧气充足时生长迅速(图 1)。在显微镜下观察菌株 MC, 可见菌丝体有分支和

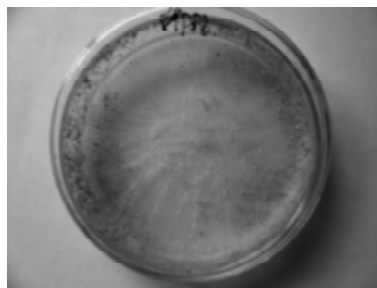


图1 菌株 MC 的平板菌落特征

Fig.1 Characteristics of MC strain colony on plate

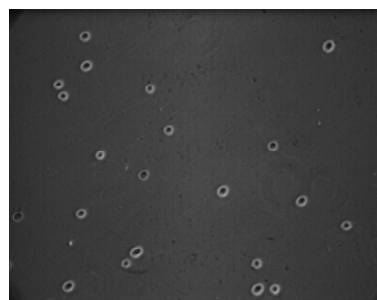


图2 显微镜下菌株 MC 的菌丝与孢子

Fig.2 Hyphae and spore of MC strain under microscope

分隔,分生孢子梗为双叉状分枝。子囊圆筒形,内有8个子囊孢子,分生孢子卵形,椭圆形。分生孢子直径 $6\sim 8\mu\text{m}$ (图2)。根据形态特征观察结果,查《真菌鉴定手册》可知,该真菌与*Neurospora crassa*(粗壮脉纹孢菌)相符合^[12],初步判断为粗壮脉纹孢菌。

2.2 纤维素分解菌 MC18S rDNA PCR 扩增和序列分析

为进一步鉴定菌种的种类,对提取的DNA进行PCR扩增和序列分析(序列检测结果略)。将得到的碱基序列通过因特网在GenBank等国际核酸序列数据库内进行同源序列搜索,找出该菌株与数据库中同源性最高的模式菌株或保藏于ATCC或DSM等国际菌种保藏中心的菌株。根据比对结果,该菌种的DNA序列与*Neurospora crassa*(粗壮脉纹孢菌)有高同源性,同源性达99%。最终判定该菌株为*Neurospora crassa*(粗壮脉纹孢菌)。

2.3 MC 产酶条件优化

2.3.1 培养温度对产酶的影响

图3为MC各酶活随培养温度的变化曲线。由图3可以看出,在 30°C 时,各酶活力最高,此时,Cx酶活力、Cl酶活力、 βG 酶活力、FP酶活分别达9.6、2.72、1.02、0.98U/ml。温度可能从以下两方面影响纤维素酶的生产:一方面是影响各种催化酶反应的速率和蛋白质的性质;另一方面是影响发酵液的物理性质,如发酵液的黏度、基质和氧在发酵中的溶解度和传递速率、某些基质的分解和吸收速率等。

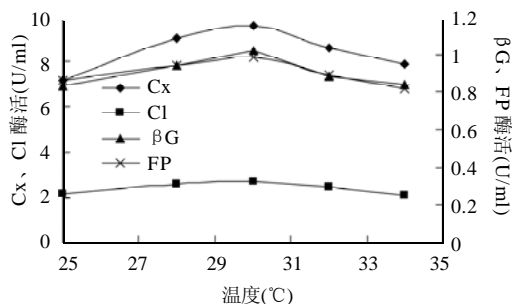


图3 培养温度对产酶的影响

Fig.3 Effects of temperature on cellulase activity

2.3.2 培养基初始 pH 值对产酶的影响

图4为MC各酶活随初始pH值的变化曲线。由图4看出,各酶活力在pH值4.8达最高,Cx酶活力、Cl酶活力、 βG 酶活力、FP酶活分别为9.61、2.72、0.92、0.95U/ml。pH值可能从下列几个方面影响产酶情况:(1)细胞内的 H^+ 或 OH^- 离子能够影响酶蛋白的解离度和电荷情况,改变酶的结构和功能,引起酶活性的改变;(2)pH值影响细胞对基质的利用速度和细胞的结构,影响菌体的生长和产物的合成;(3)pH影响细胞膜的电荷状况,引起膜通透性发生改变,影响细胞对营

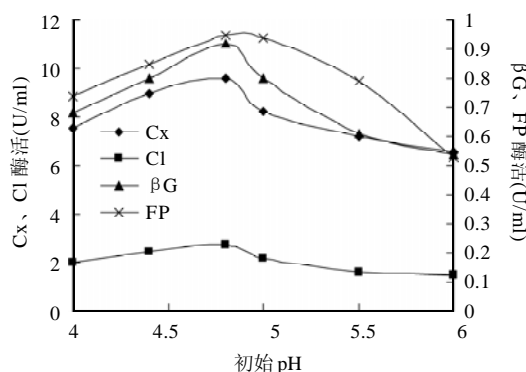


图4 初始 pH 对产酶的影响

Fig.4 Effects of initial pH on cellulase activity

养物质的吸收和代谢产物的形成。

2.3.3 培养时间对产酶的影响

图5为MC各酶活随时间的变化曲线。由图5可以看出,各酶的活力在第6d达到最高,Cx酶活力、Cl酶活力、 βG 酶活力、FP酶活分别达9.88、2.59、0.89、0.67U/ml。实验中发现,菌体生长在第6d达到高峰,由此推测产酶与菌体生长可能是同步的,具体情况有待进一步研究。

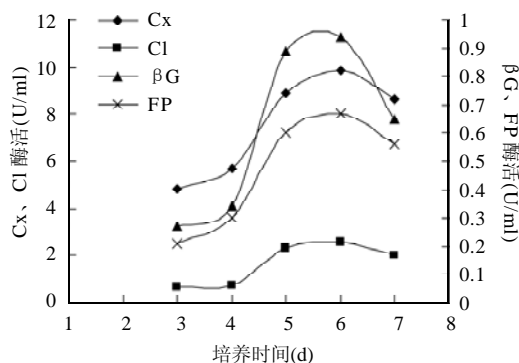


图5 培养时间对产酶的影响

Fig.5 Effects of time on cellulase activity

3 结论

3.1 通过对该菌株的分离、纯化和鉴定,表明该菌为*Neurospora crassa*(粗壮脉纹孢菌)。

3.2 对产酶的影响因素研究结果表明,最佳液体发酵产酶培养条件为:培养温度 30°C 、初始pH值4.8、发酵周期6d。

研究结果表明该菌是一株优良的纤维素酶生产菌株。已有文献表明,该类菌可以直接转化纤维原料生产酒精^[13]。因此有必要进一步研究该菌的产酶规律和机理,并通过育种提高产酶活力,为最终实现该菌工业化提供科学依据。

参考文献:

- [1] 张加春, 易琴, 黄遵锡. 纤维素酶曲的潜盘生产研究[J]. 云南师范大学学报: 自然科学版, 2002(2): 50-52.
- [2] WEN Z Y, LIAO W, CHEN S L. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure [J]. Bioresour Technol, 2005, 96(4): 491-499.
- [3] PANAGIOTOU G, KEKOS D, MACRIS B J, et al. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation [J]. Ind Crops and Products, 2003, 18(1): 37-45.
- [4] 阎伯旭, 高培基. 纤维素酶分子结构与功能研究进展[J]. 生命科学, 1995, 7(5): 22-25.
- [5] WOOD T M. Properties and mode of action of cellulases[C]// Biotechnology and bioengineering symposium. NY: Wiley, 1975: 111-137.
- [6] OHRNIYA K, SAKKA K, KARITA S, et al. Structure of cellulases and their applications [J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 1997, 14: 365-414.
- [7] COUGHLAN M P. Cellulases: production, properties and applications [J]. Biochem Society Transanc, 1985, 13: 405.
- [8] 王景林. 高活力纤维素酶菌株康氏木霉 B27 的选育与产酶条件的研究[J]. 生物技术, 1996, 6(6): 14-17.
- [9] 吴乃虎. 基因工程原理[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [10] 张树政. 酶制剂工业: 下册[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 489-490.
- [11] 洪洞, 黄秀梨. 黑曲霉变种 2281-C 纤维素酶的纯化和性质[J]. 北京师范大学学报: 自然科学版, 1998(4): 12-15.
- [12] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 197-198.
- [13] 王丹, 林建强, 张潇, 等. 直接生物转化纤维素类资源生产燃料乙醇的研究进展[J]. 山东农业大学学报, 2002(3): 525-529.