

一株嗜热嗜酸纤维素酶高产霉菌分离鉴定及其酶学性质研究

高建民 翁海波* 席宇 袁明雪 韩绍印

(郑州大学生物工程系 郑州 450001)

摘要 从含有大量纤维素物质的堆肥里分离到一株土曲霉,其最适生长温度为 45℃,最适生长酸碱度为 pH 2.0,在最适条件下培养该菌的最高 CMCase 活性可达 3.680IU/mL,此酶最适反应温度和酸碱度为 60℃ 和 pH2.0,并且具有较高的热稳定性。

关键词 土曲霉 鉴定 CMCase 活性

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0715-04

Isolation and Identification on a Thermoacidophilic Fungus of High-producing Cellulase and the Characteristics of its Enzyme

GAO Jian-Min WENG Hai-Bo* XI Yu YUAN Ming-Xue HAN Shao-Yin

(Department of Biology Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 45001)

Abstract A novel *Aspergillus terreus* strain M11 was isolated from the compost containing cellulose and identified. The isolate grow best at 45℃ and pH2.0. It was found that the activity of the CMCase was up to 3.680IU/mL with high heat stability and the optimal reaction conditions of the CMCase were at 60℃ and pH2.0.

Key words *Aspergillus terreus*, Identification, CMCase activity

纤维素是自然界中最丰富的可再生资源,约占植物组织平均干重的 20% ~ 45%^[1]。据估计全世界每年通过光合作用产生的纤维素高达 1.55×10^9 吨,其中 89% 尚未被人类利用^[2]。纤维素酶可把纤维素转化为可溶性糖,进而作为酒精发酵和其它工业生产所需原料,纤维素作为一种可替代燃油的再生能源已成为目前研究的一个热点^[3]。工业生产中用酶反应温度大多在 50℃ 左右,且在酸环境中更有利于纤维素的分解。因此筛选高产耐高温、耐酸纤维素酶的菌株具有重要意义。国内外有关分离纤维素降解菌的报道很多,但有关分离降解纤维素土曲霉的报道还很少^[4,5]。本文报道了一株嗜热嗜酸的纤维素酶高产菌株土曲霉的筛选过程及其产酶条件和酶学性质的初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

长期堆放富含纤维素物质的垃圾堆肥。

1.2 培养基

筛选培养基成分:CMC-Na(羧甲基纤维素钠) 5g, MgSO₄ 0.5g, KH₂PO₄ 2g, 酵母粉 2g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000mL。液体发酵培养基参照文献[8], 实验用培养基均在 1×10^5 Pa 下灭菌 20min。

1.3 菌株分离方法

采集样品用 0.9% 的无菌生理盐水梯度稀释,涂布筛选培养基平板上,30℃ 培养 2d,原位复制法复制到另一平板中培养,原平板用 0.5% 的刚果红染色 30min,然后用 1% 的 NaCl 溶液洗涤 15min,观察菌落周围是否有透明圈,有透明圈的菌落进一步划线纯化,获取初筛纯培养菌株。

1.4 摇瓶复筛试验

将初筛菌株接到 30mL 液体培养基中(250mL 三角瓶),30℃ 和 180r/min 条件下培养 24h 制成种子液。1% 的接种量将种子液分别接种到含 30mL 液体培养基的 250mL 三角瓶中,同条件下培养 72h 后

* 通讯作者 Tel: 0371-65038081, E-mail: hbweng@163.com

收稿日期:2006-11-28, 修回日期:2007-03-20

采用 DNS 法测定发酵液中的粗酶活力进行复筛^[6]。

1.5 菌株的鉴定

菌株的鉴定采用观察形态和 rDNA ITS 基因序列分析相结合的方法^[7]。以分离菌株的 DNA 为模板,PCR 扩增其 ITS 序列,扩增引物为 ITS1(5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),反应程序为:95℃ 2min,95℃ 1min,50℃ 1min,72℃ 1min,35 个循环;72℃ 10min。扩增产物纯化后测序。

1.6 纤维素酶活力测定

1%的 CMC-Na 溶液作为底物,加入经适当稀释的酶液,在 60℃反应 30min,用 DNS 法于 540nm 测定还原糖,扣除空白试验值。将上述条件下每分钟由底物产生 1μmol/L 葡萄糖所需酶量定义为一个酶活力单位,用 IU/mL 表示^[8]。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

通过初筛共得到 18 株纤维素分解能力较强的菌株。对初筛的 18 株菌进行液体发酵,72h 后分别测定其 CMCase(内切-β-1,4-葡聚糖酶)活力,菌株 M11 的活力最大,可达 1.054 IU/mL,具体结果见表 1。

表 1 所筛菌株的透明圈直径和液体培养后的 CMCase 酶活力

菌株	透明圈直径	CMCase 活力	菌株	透明圈直径	CMCase 活力
M1	12	0.021	M10	16	0.010
M2	11	0.019	M11	40	1.054
M3	16	0.018	M12	32	0.953
M4	13	0.013	M13	14	0.286
M5	9	0.003	M14	10	0.085
M6	20	0.021	M15	26	0.186
M7	23	0.023	M16	19	0.192
M8	6	0.005	M17	23	0.197
M9	25	0.028	M18	29	0.329

透明圈直径单位为 mm;CMCase 活力单位为 IU/mL

2.2 菌株的鉴定

M11 菌落在 PDA 平板培养基上培养 2d 后以白色絮状向四周扩散,培养 4d 后变为沙褐色。镜检表明菌丝无隔膜,分生孢子球形,分生孢子梗微弯曲,光滑无色,顶囊球形,无菌核。ITS 基因序列在 GenBank 中进行 Blastn 后,用 Clustal W 进行序列比

对后,用 MEGA3.1 构建系统发育树(图 1)。结果表明:M11 与土曲霉的同源性为 100%。初步把该菌株鉴定为一株土曲霉,命名为 *Aspergillus terreus* M11。

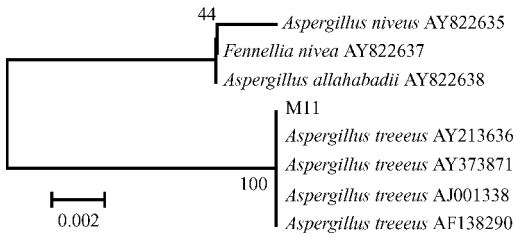


图 1 基于菌株 M11 的 ITS 序列的系统发育树

2.3 不同因素对菌株产酶的影响

2.3.1 培养时间对菌株产酶的影响:将 1mL 孢子悬浮液接种于 30mL 液体培养基中(250mL 三角瓶),30℃、180r/min 培养。每隔 24h 测 CMCase 的活力,结果见图 2,可以看出,当培养到第 192h,CMCase 活力达到最大。因此培养时间以 7d~9d 为宜。

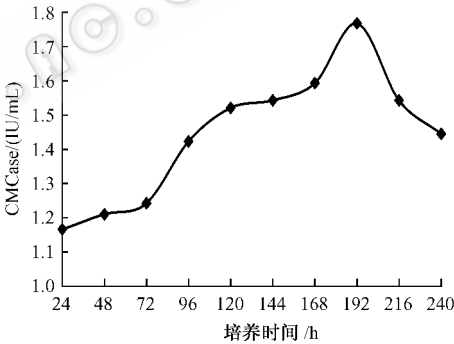


图 2 培养时间对 M11 产酶的影响

2.3.2 接种量对菌株产酶的影响:取培养 24h 的种子培养液分别按 1%、2%、3%、4%、5%、6% 和 7% 的接种量接种于液体发酵培养基中,培养 72h 后测酶活力。结果如图 3,接种量为 1%~4% 时,酶活随接种量的增加而增加,接种量在 4%~6% 之间时酶活变化很小,接种量超过 5% 以后酶活开始下降。

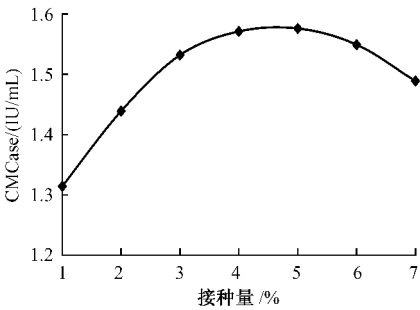


图 3 接种量对 M11 产酶的影响

结果表明最适接种量应为 3% ~ 6%。

2.3.3 培养温度对菌株产酶影响 种子液接种于液体发酵培养基中,分别于不同温度下培养 72h 后分别测其酶活力。结果如图 4 所示,在 45℃ 时菌株的产酶量最高,50℃ 时菌株的产酶量急剧下降,50℃ 以上和 20℃ 以下菌株几乎不生长,这与嗜热真菌的生长温度特征相吻合^[9]。

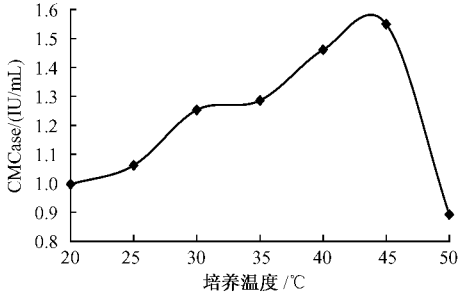


图 4 培养温度对 M11 产酶的影响

2.3.4 初始 pH 对菌株产酶影响 种子液接种到初始 pH 值不同的液体培养基中,培养 72h 后分别测其酶活力。结果见图 5,当 pH 为 2.0 时菌株生长的最好,酶活力最大,在 pH 为 2.0 ~ 7.0 之间菌株都能较好的生长,具有较高的产酶量。由此可以表明菌株 *A. terreus* M11 有很高的耐酸性和较广的 pH 适应性。

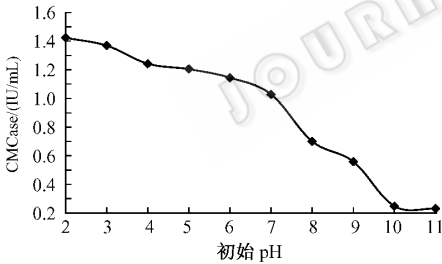


图 5 初始 pH 对 M11 产酶的影响

2.3.5 不同碳源对菌株产酶的影响 :分别选用报纸、麸皮、CMC-Na、微晶纤维素为碳源研究不同碳源对菌株产酶的影响。结果如图 6 所示,以麸皮为唯一碳源时产酶量最高。

2.3.6 不同氮源对菌株产酶的影响 :以牛肉膏、尿素、硫酸铵、硝酸钠、酵母粉、硝酸铵、氯化铵、和蛋白胨为氮源,研究不同的氮源对产酶的影响,结果见图 7,以有机氮做氮源时,产酶量普遍提高,其中以牛肉膏做氮源时的产酶量最高。在以上所述的各条件都是最适的情况下培养菌株 *A. terreus* M11,测得其最高产 CMCase 活力为 3.680IU/mL。

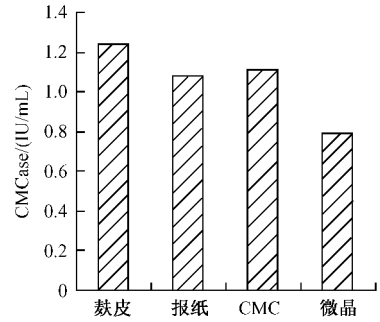


图 6 不同碳源对 M11 产酶的影响

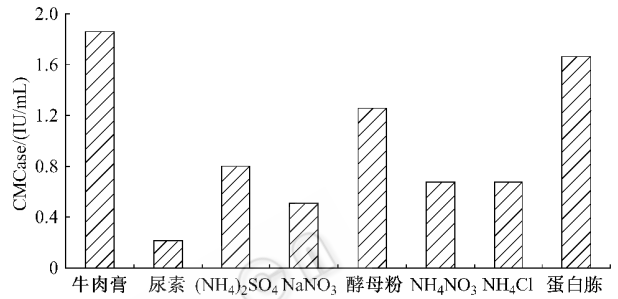


图 7 不同氮源对 M11 产酶的影响

2.4 CMC 粗酶性质初步研究

2.4.1 酶反应最适温度 :取 *A. terreus* M11 粗酶经适当稀释后和 1% CMC 底物在不同的温度下反应 30min 测定酶的最适反应温度,结果见图 8,可以看出酶反应的最适温度在 60℃ 左右,与嗜热真菌所产酶的最适反应温度(55℃ ~ 80℃)相一致^[9]。

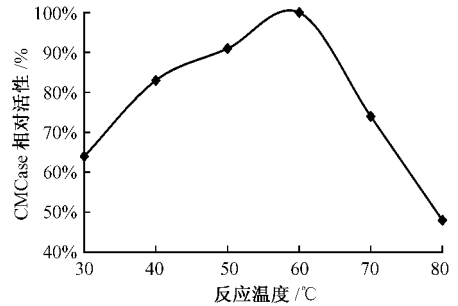


图 8 不同反应温度下酶的活性

2.4.2 酶的热稳定性 :取粗酶液在不同温度下温浴 30min 后,测定其活性并与 4℃ 保存酶液的活力相比,结果如图 9,酶液在 50℃ 温育 30min 酶活可保持 68%,在 100℃ 温育 30min 酶活仍保持 30% 左右,表明此酶有较高的热稳定性。

2.4.3 酶反应最适 pH :用不同 pH 值的缓冲液配制 1% 的底物,测定在不同 pH 值下粗酶液的催化活性。所用缓冲液为甘氨酸-盐酸缓冲液(pH2.0),磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液(pH3.0 ~ 6.0),磷酸缓冲液

(pH7.0),Tris-HCl 缓冲液(pH8.0),甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH9.0~10.0)。结果见图 10,该酶液在 pH 为 2.0 时催化活性最高,表明该酶是一种耐强酸性酶。

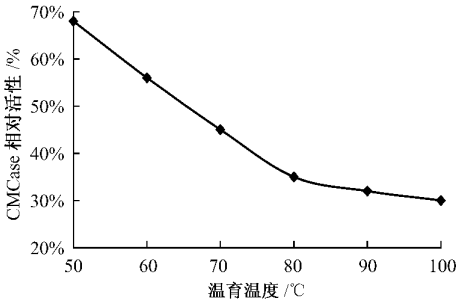


图 9 不同温度下温育 30min 后酶的活性

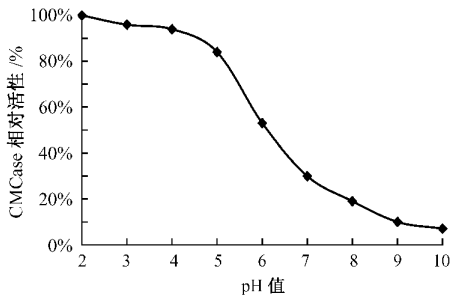


图 10 不同 pH 值下酶的活性

2.4.4 酶的 pH 稳定性:将酶液分别置于不同的 pH 的环境下,50℃温育 1h 后测定酶活力,结果如图 11 所示,在 pH 为 2.0~4.0 之间时酶液活性较稳定。表明该菌产生的 CMCase 在酸性条件下具有较强的稳定性。

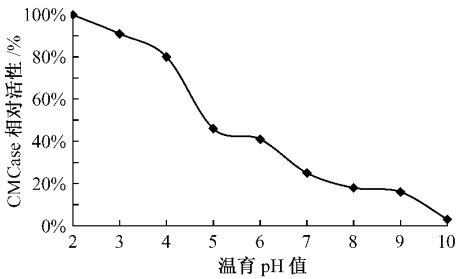


图 11 不同 pH 值下温育 1h 后酶的活性

2.4.5 金属离子对酶活的影响:在酶反应体系中加入不同的金属离子(0.01mol/L),测定含不同金属离子的酶反应体系下的酶活力,结果如表 2 所示。由表 2 可知, Sr^{2+} 、 Mn^{2+} 与 Zn^{2+} 对该酶活性有促进作

用, K^{+} 和 Mg^{2+} 对该酶活性有抑制作用而 Ca^{2+} 和 Na^{+} 对该酶的活性没有影响。

表 2 金属离子对酶活性的影响

金属离子	对照	Ca^{2+}	Na^{+}	Sr^{2+}	K^{+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Mg^{2+}
相对酶活力(%)	100	100	100	109	87	113	114	93

3 讨论

Singh S 等人于 1996 年分离一株产纤维素的土曲霉,最佳生长条件为 pH4.0,温度 28℃^[4]。Bastawde K B 于 1992 年报道了一株嗜热土曲霉所产的 CMCase 的最适反应温度为 60℃,最适 pH 为 3.8^[5]。我们分离到的这株土曲霉 *A. terreus* M11,分泌的纤维素酶活性强,具有较广的生长温度(20℃~50℃)和酸碱度 pH(2.0~7.0),最佳生长条件为 45℃和 pH2.0。它所产生的 CMCase 热稳定性和 pH 稳定性较高,最适反应温度为 60℃,最适 pH 为 2.0。*A. terreus* M11 因具有嗜热嗜酸和高产纤维素酶的特性,在城市垃圾尤其是酸性环境下的垃圾处理中应具有很大的应用价值。

参考文献

[1] Stephens G R, Heichel G H. Biotechnol Bioengr Symposium, 1975, 5: 27~42.

[2] Tomme P, Warren R A, Gilkes N R. Adv Microb Physiol, 95, 37: 1~81.

[3] Li Y H, Ding M, Wang J, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 70(4): 430~436.

[4] Singh S, Brar J K, Sandhu D K, et al. J Basic Microbiol, 1996, 36(4): 289~296.

[5] Bastawde K B. World J Microbiol Biotechnol, 1992, 8(1): 45~49.

[6] 刘森林,邢苗,刘刚,等.微生物学通报,2005,32(4): 91~94.

[7] Hamelin R C, Bérubé P, Gignac M, et al. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(11): 4026~4031.

[8] Miller G L. Anal Chem, 1959, 31: 249~259.

[9] Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat M K. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(3): 461~488.