



纤维素降解菌 *Aspergillus* sp. YN1 的产酶 条件及酶学特性

赵方圆 范宁杰 陈一楠 李顺鹏 黄星*

(南京农业大学生命科学学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 江苏 南京 210095)

摘要: 从牛羊粪堆肥中筛选出一株纤维素降解菌 *Aspergillus* sp. YN1, 主要研究了液体发酵培养基中碳源、氮源、培养温度、起始 pH、通气量以及接种菌龄对菌株 YN1 的羧甲基纤维素酶活(CMC 酶活)及滤纸酶活的影响。研究表明, 在优化条件下, 该菌的 CMC 酶活、滤纸酶活在培养第 3 天分别达到 0.53 U/mL 和 0.15 U/mL。在酶学特性研究中, 菌株 YN1 的 CMC 酶的最适反应温度为 70°C, 最适反应 pH 4.0 (酶促反应为 30 min)。用不同温度处理 1 h 或不同 pH 处理 2 h, YN1 的 CMC 酶在 30°C-50°C 或 pH 3.0-4.0 之间仍可保持 80% 以上的酶活性, 对热及酸表现出较高的稳定性。

关键词: *Aspergillus* sp., 纤维素酶活, 发酵条件优化, 酶学特性

The Enzyme-producing Conditions and Characteristics of Cellulases of a Cellulose-decomposing Strain YN1

ZHAO Fang-Yuan FAN Ning-Jie CHEN Yi-Nan LI Shun-Peng HUANG Xing*

(College of Life Science, Key Laboratory of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: *Aspergillus* sp. YN1, with cellulase activity, was screened from sheep and cattles feces compost. Different conditions for liquid fermentation which including carbon source, nitrogen source, temperature, pH, capacity of oxygen and inoculum age for the production of cellulases had been studied. The CMCase activity was 0.53 U/mL and the Filter-Paper activity was 0.15 U/mL when YN1 was cultured in the optimized condition for 3 d. In the study of characteristics of cellulases, the optimal reaction temperature was at 70°C and the optimal reaction pH was at 4.0 (in a 30-min reaction period). The cellulase activity retained above 80% when the cellulases were treated under the conditions that the temperature was from 30°C to 50°C for 1 h or the pH from 3.0 to 4.0 for 2 h, which showed the cellulases produced by YN1 have resistance to heat and acid.

Keywords: *Aspergillus* sp., Cellulase activity, Fermentation condition optimization, Characteristics of cellulases

我国是一个农业大国, 农作物秸秆年产量达 7 亿吨^[1]。由于农作物秸秆主要由纤维素、半纤维素和木质素三大部分组成, 自然状态下难以分解, 造成了纤维素资源的极大浪费。微生物可产生纤维素酶将纤维素降解为低分子量的己糖或戊糖并被进一步利用^[2]。因此纤维素酶产生菌的筛选、酶学特性、催化机理和纤维素酶的生产及应用研究已成为近年来的研究热点^[3]。由于真菌所产的纤维素酶多为胞外酶, 便于分离和提取且产酶效率较高, 利于纤维素酶的工业化制备及其应用, 因此研究和生产中采用的菌种大多是木霉^[4]、曲霉^[5-6]和青霉^[7-8]等真菌。不同来源纤维素复合酶的酶成分不同, 其酶活和分解能力也不相同, 且微生物的培养条件和酶活测定条件对所测的酶活影响较大^[9]。本实验室从堆肥中筛选到一株纤维素降解菌 *Aspergillus* sp. YN1, 本研究对该菌的液体发酵条件进行了优化, 并对其酶学特性进行了研究, 以期为该菌的进一步应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株与培养基

供试菌株 *Aspergillus* sp. YN1 (其 ITS 序列的 GenBank 登录号为 GU290041^[10]) 为本实验室从牛羊粪堆肥中筛选出的纤维素降解菌。

PDA 培养基(g): 去皮马铃薯 200, 葡萄糖 20, H₂O 1000 mL, pH 自然。液体发酵培养基(g)^[11]: 蛋白胨 3.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, 酵母粉 0.5, KH₂PO₄ 4, MgSO₄·7H₂O 0.3, CaCl₂·7H₂O 0.3, 吐温-80 0.2, 羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 10, H₂O 1000 mL, pH 6.0。发酵条件: 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 培养基, 用打孔器取直径为 8 mm 的 YN1 菌饼(取自在 PDA 培养基上生长良好的菌落)接种, 30°C、160 r/min 摇瓶培养 5 d。

1.2 酶活力的测定方法

1.2.1 羧甲基纤维素酶活(CMC 酶活)的测定: 取液体发酵液经过滤或离心后, 上清液即为粗酶液。取经适量稀释的粗酶液 0.5 mL, 加入含 1% (W/V) CMC-Na 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 5.0) 1.5 mL, 经 50°C 恒温水浴 30 min 后, 立即按 DNS 法测定还原糖生成量, 计算 CMC 酶活。

1.2.2 滤纸酶活的测定: 经过滤和离心后, 取经适量稀释的粗酶液 0.5 mL, 加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓

冲液 1.5 mL, 然后加入 50 mg 滤纸, 经 50°C 恒温水浴 1 h 后, 立即用 DNS 法测定还原糖生成量, 计算滤纸酶活^[12]。

1.3 酶活定义

酶活单位按照国际单位规定定义为, 以每分钟催化纤维素水解产生 1 μmol 葡萄糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.4 菌体生长速度的测定

将 YN1 接种于 PDA 培养基中心位置, 放置于待测条件下生长 3-4 d, 以菌落直径与生长天数的比值来表示菌体的生长速度。

1.5 菌株 YN1 液体发酵条件的优化

1.5.1 碳源种类对菌株产酶能力的影响: 在以 1% (W/V) 麸皮、CMC-Na、微晶纤维素(Avicel)、秸秆、稻壳、滤纸、棉花、葡萄糖为碳源(诱导底物)的液体发酵培养基中, 分别接种菌株 YN1, 发酵培养 3 d, 测定 CMC 酶活及滤纸酶活。

1.5.2 氮源种类对菌株产酶能力的影响: 在液体发酵培养基中分别加入 0.2% (W/V) 的不同氮源(硫酸铵、氯化铵、硝酸钾、硝酸铵、尿素), 分别接种 YN1, 发酵培养 3 d, 测定 CMC 酶活及滤纸酶活。

1.5.3 培养温度对菌株产酶能力的影响: 液体发酵培养基中接种 YN1, 分别在 20°C、25°C、30°C、35°C、40°C 下摇瓶培养 3 d, 测定 CMC 酶活及滤纸酶活, 并结合菌株在不同温度下的生长速度(菌落直径/d)来分析 YN1 产酶的温度效应。

1.5.4 培养基 pH 对菌株产酶能力的影响: 将发酵培养基初始 pH 值分别调至 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 接种 YN1 液体发酵培养 3 d, 测定 CMC 酶活及滤纸酶活, 并结合菌株在不同 pH 下的生长速度(菌落直径/d)来分析 YN1 产酶的 pH 效应。

1.5.5 通气量对菌株产酶能力的影响: 将 YN1 分别接入装有 50、75、100、125、150 mL 液体发酵培养基的三角瓶(250 mL)中, 160 r/min 摇瓶培养 3 d, 测定 CMC 酶活及滤纸酶活。

1.5.6 接种菌龄对菌株产酶能力的影响: 用打孔器取在 PDA 培养基上生长不同时间(2、4、6、8、10 d)的 YN1 菌饼, 接种至液体发酵培养基发酵培养 3 d, 测定 CMC 酶活及滤纸酶活。

1.6 降解菌的纤维素酶(CMC 酶)的特性研究

1.6.1 温度对酶促反应的影响及酶的热稳定性: 将 CMC 酶活测定中的水浴反应温度分别设为 30°C、

35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C, 其他条件同1.2.1的方法分别测定酶活, 以最高值为100%, 获得纤维素酶在不同温度的酶促反应中的相对酶活力。将 YN1 粗酶液分别置于30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C 下处理1 h 后, 按本文1.2.1的方法测定剩余酶活力, 以未做特殊处理的粗酶液作为对照, 评价纤维素酶的热稳定性。

1.6.2 pH 对酶促反应的影响及酶的酸碱稳定性: 利用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液把 CMC 酶活测定中 CMC-Na 底物溶液的 pH 调为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 不同值, 其它条件同 1.2.1 的方法分别测定酶活, 以最高值为 100%, 获得纤维素酶在不同 pH 酶促反应中的相对酶活力。用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制 pH 值为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的缓冲液, 分别加入粗酶液, 在 4°C 下放置 2 h 后, 按本文 1.2.1 的方法测定剩余酶活力, 以没用缓冲液处理的粗酶液的酶活力为对照, 评价纤维素酶的酸碱稳定性^[13]。

2 结果

2.1 菌株 YN1 液体发酵条件的优化

2.1.1 碳源种类对菌株产酶能力的影响: 不同碳源对 YN1 产酶的影响见图 1。结果表明, YN1 在供试的所有碳源中均能良好地生长, 但不同处理间纤维素酶产量有很大差别。8 种碳源中, 菌株的 CMC 酶活及滤纸酶活均以 CMC-Na 为碳源(诱导底物)时最高, 其次依次为麸皮、微晶纤维素、秸秆、稻壳、滤纸, 以棉花和以葡萄糖为碳源时几乎不产纤维素酶。对于纤维素降解微生物来讲, 在一般情况下, 纤维素酶需要进行诱导才能产生(同时也有一定的本底表达), 而在有容易利用的糖(如葡萄糖)存在时, 纤维素酶的产生将被抑制^[14]。

2.1.2 氮源种类对菌株产酶能力的影响: 分别加入 5 种氮源培养 YN1, 结果见图 2。从图 2 可看出, 菌株的 CMC 酶活及滤纸酶活均在以硝酸铵为氮源的情况下达到最高, 在以尿素为氮源时产酶相对较少, 只有以硝酸铵为氮源时的 40.87% 和 34.18%, 说明相比其他几种氮源, 硝酸铵更有利于 YN1 产纤维素酶。

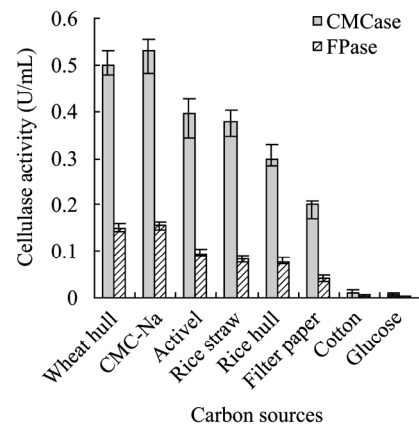


图 1 碳源对 YN1 产纤维素酶的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on cellulases production of YN1

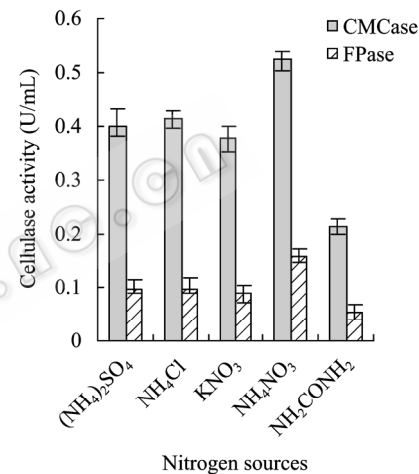


图 2 氮源对 YN1 产纤维素酶的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources on cellulases production of YN1

2.1.3 培养温度对菌株产酶能力的影响: 不同培养温度下, YN1 的 CMC 酶活及滤纸酶活表现出一定规律性。由图 3 可知, 随着培养温度的提高, YN1 菌的两种酶产量均有所提高, 30°C 时所测酶活达到最高峰。但随着温度的继续升高, 产酶量下降。通过测定 YN1 在不同温度下的生长速度得出 30°C 时菌体生长速度最快, 为 4.5 mm/d, 且菌体生长速度与产酶量有很好的相关性, 由此确定 YN1 的优化产酶温度为 30°C。

2.1.4 起始 pH 值对菌株产酶能力的影响: 调整液体发酵培养基的初始 pH 值进行试验, 图 4 为在不同 pH 下两种纤维素酶活的变化情况。CMC 酶活及滤纸酶活在 pH 6 条件下可以达到最大。在偏酸性条件 (pH 5-6) 下, 两种酶的产量基本维持在一个较高水

平, 同时 YN1 生长速度较快, 在 pH 为 6 时生长速度最快, 为 5.25 mm/d。在中性或碱性条件下生长速度减慢, 产酶量也降低。

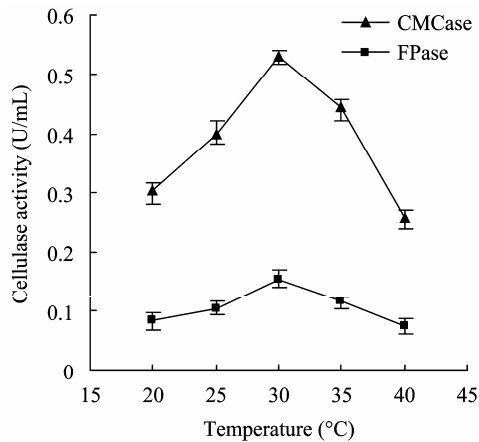


图3 培养温度对 YN1 产纤维素酶的影响
Fig. 3 Effect of incubation temperature on cellulases production of YN1

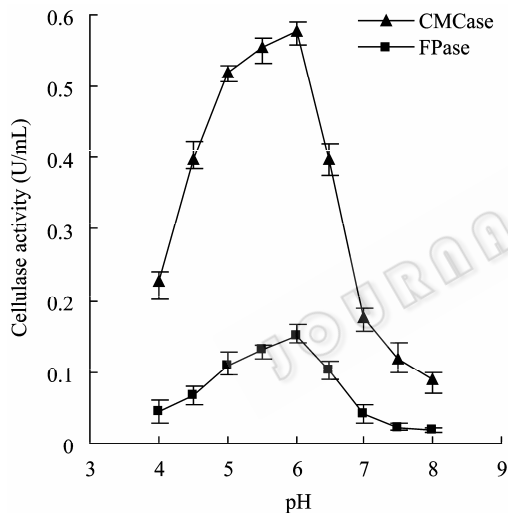


图4 起始 pH 对 YN1 产纤维素酶的影响
Fig. 4 Effect of initial pH value on cellulases production of YN1

2.1.5 通气量对菌株产酶能力的影响: 一般来说, 纤维素降解菌产酶能力的大小与培养基的通气量密切相关。在 160 r/min 摇瓶培养下 YN1 的产酶能力与通气量的关系如图 5 所示, 当装液量在 50–100 mL 之间时, CMC 酶和滤纸酶产量随装液量增加而增大。100 mL 时所测两种酶的活性达到最大, 超过 100 mL 后, 产酶量开始下降。

2.1.6 接种菌龄对菌株产酶能力的影响: 从图 6 可看出, 接种菌的菌龄对于 YN1 产纤维素酶的影响比较显著, 取 YN1 在 PDA 培养基上培养 4 d 时的菌饼

进行液体发酵, 测得 CMC 酶活及滤纸酶活最高, 早于或晚于这段时间, 两种酶的产量会有一定程度的降低。分析其原因, YN1 生长至第 4 天时已经产生大量孢子, 此时接种发酵有利于 YN1 快速繁殖成为优势菌, 并抑制其他杂菌的生长。而过早孢子未形成, 过晚菌株已衰老, 都将影响 YN1 的快速增殖, 继而影响其产纤维素酶。

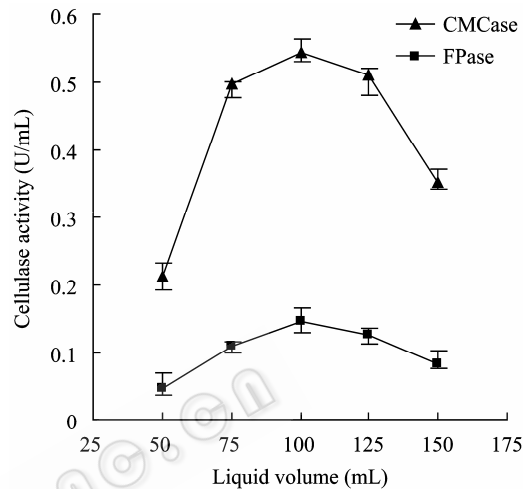


图5 通气量对产纤维素酶的影响
Fig. 5 Effect of capacity of oxygen on cellulases production of YN1

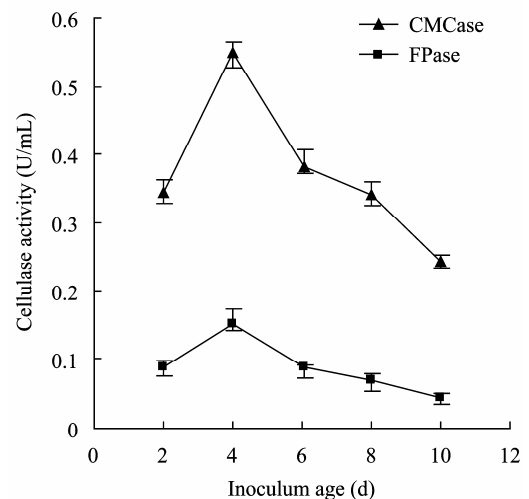


图6 接种菌龄对 YN1 产纤维素酶的影响
Fig. 6 Effect of inoculum age on cellulases production of YN1

2.2 优化条件下的产酶进程分析

根据以上优化条件[即取 PDA 培养基上生长 4 d 的 YN1 菌饼接种于以 CMC-Na 为碳源, NH_4NO_3 为氮源, pH 6.0 的液体发酵培养基中, 装液量为 100 mL (250 mL 三角瓶), 培养温度为 30°C]发酵培

养菌株 YN1, 并测定两种纤维素酶活, 结果如图 7 所示。优化后 CMC 酶活及滤纸酶活于第 3 天达到最大值 0.53 U/mL 和 0.15 U/mL, 分别提高到未优化前的 1.29 倍和 1.36 倍。由图 7 还可看出, 培养基优化后, YN1 对培养基的适应性增强, 从培养的第 1 天起即可进入快速产酶期。

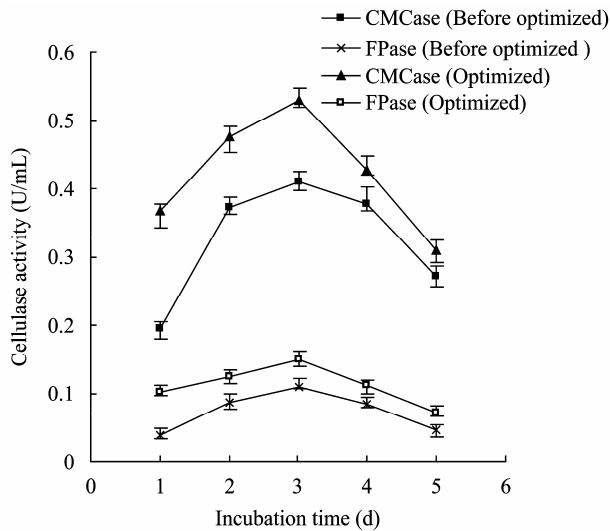


图 7 优化前后 YN1 产纤维素酶的比较

Fig. 7 Comparison of cellulases production of YN1 before optimized and optimized

2.3 降解菌的纤维素酶(CMC 酶)的特性研究

2.3.1 温度对酶促反应的影响及酶的热稳定性: 温度对 YN1 酶促反应的影响如图 8 所示, YN1 纤维素酶在 50°C–70°C 之间都有较高酶活, 且随着温度的升高酶活增大, 在 70°C 达到最高峰, 高于一般真菌最适反应温度。反应温度超过 70°C, 受高温使酶变性的影响, 酶活迅速降低。在测定酶的热稳定性实验中, 在酶促反应前用不同温度条件处理的 YN1 纤维素酶, 在 30°C–50°C 之间酶活性仍可保持 80% 以上(如图 8 所示), 但温度超过 50°C, 酶活性开始迅速下降, 到 70°C 以后则完全丧失活性。可见 YN1 纤维素酶虽然在高温时(50°C–70°C)具有较高酶活性, 但在反应前不可将此酶在高温下放置过久, 否则纤维素酶容易变性失活。

2.3.2 pH 对酶促反应的影响及酶的酸碱稳定性: pH 对 YN1 酶促反应的影响如图 9 所示, YN1 纤维素酶在 pH 4.0–5.0 之间均有较高活性, 在 pH 4.0 时纤维素酶活性出现最高峰, 与目前报道的大多数真菌的纤维素酶最适 pH 值一般集中在 4.4–4.6^[15] 相比略低。表明 YN1 纤维素酶在偏酸性环境中能更好

的发挥降解纤维素的作用。此外, YN1 的纤维素酶对于酸有一定的耐受性。如图 9 所示, 用不同 pH 条件处理 YN1 纤维素酶 2 h, 在 pH 3.0–4.0 之间 YN1 的纤维素酶活性可保持 85% 以上, 在此 pH 范围内表现出较高的稳定性, pH 大于 4 时酶稳定性下降。

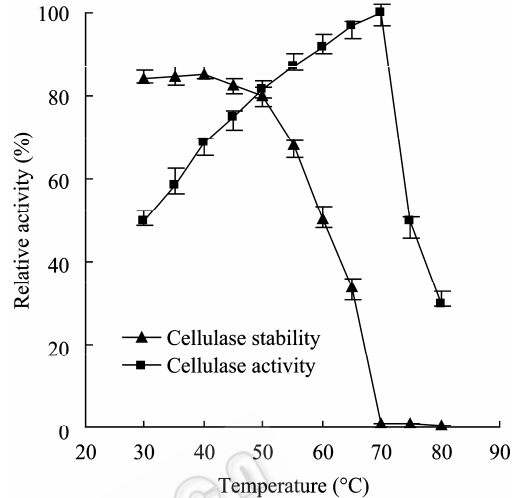


图 8 酶促反应温度对酶活的影响及热处理对纤维素酶稳定性的影响

Fig. 8 Effect of cellulase activity and stability under different temperature treatment

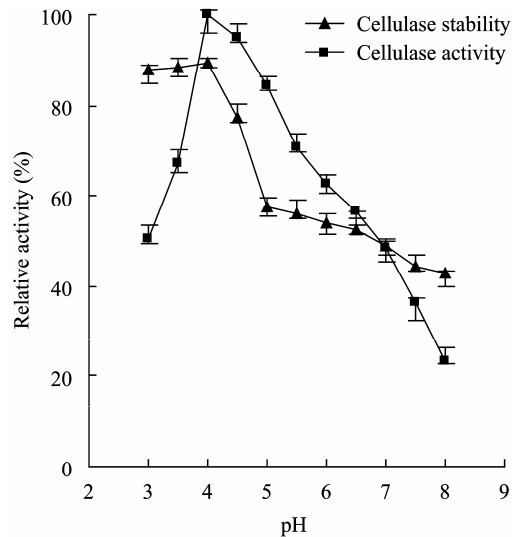


图 9 酶促反应 pH 对酶活的影响及 pH 处理对纤维素酶稳定性的影响

Fig. 9 Effect of cellulase activity and stability under different pH treatment

3 讨论

本实验室从牛羊粪堆肥中筛选出一株纤维素降解菌 YN1, 通过对其液体发酵培养基及发酵条件的优化, 获得 YN1 液体发酵优化条件为: 碳源

CMC-Na, 氮源 NH_4NO_3 , 培养温度 30°C , pH 6.0, 装液量 100 mL (250 mL 三角瓶), 接种 PDA 培养基上生长 4 d 的 YN1 菌株。在此条件下, 该菌的 CMC 酶活为 0.53 U/mL, 滤纸酶活为 0.15 U/mL, 分别提高到未优化前的 1.29 倍和 1.36 倍。YN1 液体发酵培养基及条件的优化为今后进行大规模发酵提供了经验。

前人报道的各种纤维素降解菌在氮源的利用上差异较大, 但在碳源的利用基本是以纤维素性碳源为较好的诱导底物, 本实验证明以可溶性 CMC-Na 为 YN1 的碳源时, 其诱导产生的纤维素酶活力最大, 但可能存在的问题是自然界中的纤维素酶一般都具有纤维素结合域^[16], 纤维素结合域可以使纤维素酶非常强烈地结合在不溶性纤维素底物上。因此, 以麸皮、秸秆等不溶性纤维素为底物进行发酵时, 通过过滤或离心发酵液的方法并未获得全部纤维素酶。针对这一问题, 在下一步的研究中将对 YN1 的纤维素酶的提取方法作进一步改进。

此外, 在一般的纤维素酶的生产中, 麸皮也是一些丝状真菌及细菌产纤维素酶的很好的诱导型碳源, 郑亚平^[17]及陈世成^[18]等报道的文献证明麸皮能够较大幅度地促进产酶, YN1 以麸皮为碳源其产酶能力仅次于 CMC-Na。而王晓芳^[19]等研究的绿色木霉及 B-6 以微晶纤维素为碳源时酶活性最高。此外, 玉米秸秆, 麦秆等含纤维素较高的农业废弃物也经常用作工业上发酵生产纤维素酶的廉价碳源。

在酶学特性实验中, 该菌的内切酶最适反应温度为 70°C , 最适反应 pH 4.0 (酶促反应为 30 min), 且在 50°C – 70°C 或 pH 4.0–5.0 条件下反应时都具有较高酶活。该酶在温度 30°C – 50°C 处理 1 h 或 pH 3.0–4.0 处理 2 h 后仍可保持 80% 以上的酶活性, 对热及酸具有较高的稳定性及耐受性。YN1 产生的纤维素酶在高温下仍保持较高酶活的特性表明 YN1 可有效应用于自然环境中的秸秆腐熟, 并且该菌在比较廉价的培养基上有较好的产酶能力, 为工业生产提供了低成本的前提, 具有较好的应用前景。

参 考 文 献

[1] 赵军, 王述洋. 我国生物质能资源与利用. 太阳能学报, 2008, **29**(1): 90–94.
[2] 燕红, 杨谦, 王希国. 两株芽孢杆菌产纤维素酶的研究. 林产化学与工业, 2006, **26**(2): 53–86.
[3] Lynd LR, Paul JW, Vanzyl WH, *et al.* Microbial cellulose

utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Biology Reviews*, 2002, **66**(3): 506–577.

- [4] 林志伟, 孙冬梅, 张红梅, 等. 黄绿木霉菌产纤维素酶条件优化. 微生物学通报, 2008, **35**(1): 59–62.
[5] Parenicova L, Skouboe P, Frisvad J, *et al.* Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(2): 521–527.
[6] Atif HA, Yasmeen MI. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 2004, **94**(3): 311–319.
[7] Adsul MG, Bastawde KB, Varma AJ, *et al.* Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. *Bioresource Technology*, 2007, **98**(7): 1467–1473.
[8] 刘韞滔, 褙淑霞, 龙传南, 等. 纤维素降解菌 L-06 的筛选、鉴定及其产酶条件的分析. 生物工程学报, 2008, **24**(6): 1112–1116.
[9] 崔宗均, 朴哲, 王伟东, 等. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的产酶条件. 农业环境科学学报, 2004, **23**(2): 296–299.
[10] 赵方圆, 范宁杰, 朱建春, 等. 纤维素高效降解菌 YN1 的筛选及其降解特性. 微生物学通报, 2010, **37**(4): 496–502.
[11] 王晓芳, 徐旭士, 吴敏, 等. 一株纤维素分解菌的分离与筛选. 生物技术, 2001, **11**(2): 27–30.
[12] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem*, 1987, **59**(2): 257–268.
[13] 朴哲, 崔宗均, 苏宝琳, 等. 高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的酶活特性. 中国农业大学学报, 2003, **8**(1): 59–61.
[14] 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.
[15] 孙英华, 梁静思, 胡新文. 大型腐生真菌 *Pleurotus sajor caju* 与木霉菌 *Trichoderma viride* 的纤维素酶活力比较研究. 热带作物学报, 1995, **16**(1): 99–103.
[16] 欧阳嘉, 李鑫, 王向明, 等. 纤维素结合域的研究进展. 生物加工过程, 2008, **6**(2): 10–16.
[17] 郑亚萍, 余晓斌. 碳源对绿色木霉 ZC 产中性纤维素酶的影响. 无锡轻工业大学学报, 2003, **22**(2): 30–33.
[18] 陈士成, 曲音波, 张岩, 等. 产中性纤维素酶芽孢杆菌 Y106 产酶条件优化. 应用与环境生物学报, 2000, **6**(5): 457–461.
[19] 王晓芳, 徐旭士, 吴敏, 等. 不同碳源对两株真菌纤维素酶合成的诱导和调控. 应用与环境生物学报, 2002, **8**(6): 653–657.