

# 高产纤维素酶青霉菌的筛选和及产酶条件的研究

胡丹, 刘霞, 雷颀

(南昌理工学院生物与环境工程系, 江西 南昌 330013)

**摘要:** 本文从稻田土壤中分离到一株产纤维素酶活力高的X-5菌株, 经形态特征及生理生化特征初步鉴定为半知菌亚门, 丝孢纲, 丝孢目, 丛梗孢科, 青霉属(*Penicillium*)。对青霉菌X-5菌株进行发酵培养条件的研究结果表明, 以5.0%稻草粉为碳源, 3.0%豆粕粉为氮源, 装液量为60ml, 接种量为5.0%, 培养温度为26~28℃, 初始pH 4.5~6.0, 培养120 h, 产酶活力最高, CMC酶活为75.72 IU/ml, FP酶活为6.68 IU/ml。

**关键词:** 纤维素酶; 青霉属; 液体发酵

中图分类号: Q93-331; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)03-0014-04

## Research on Screening of a High Cellulose-producing *Penicillium* Strain and Cellulose Production

HU Dan, LIU Xia, LEI Ji

(Biology and Environmental engineering, Nanchang Institute of Technology, NanChang 330013, China)

**Abstract:** Strain X-5 which with high cellulose-producing activity was obtained and identified to be *Fungi Imperfecti, Moniliales, Moniliaceae, Aspergillales, Penicillium*. Production of cellulase was carried out by submerged fermentation with strain X-5. The results showed that the best carbon source, nitrogen source, medium volume, inoculum size, temperature, the initial pH value and culturing time were 5.0% rice straw powder, 3.0% bean cake meal, 60mL, 5.0%, 26~28℃, 4.5~6.0, and 120 h, respectively. Under the above conditions, the highest activities of CMCase and FPase in the fermented broth were 75.72 IU/ml and 6.68 IU/mL, respectively.

**Key words:** cellulase; *Penicillium*; submerged fermentation

纤维素是生物圈最丰富的有机物质, 占植物界碳素的50%以上, 同是也是自然界分布最广的有机化合物。

纤维素酶(Cellulase)是降解纤维素生成葡萄糖的一组酶的总称, 它不是单种酶, 而是起协同作用的多种酶系<sup>[1,2]</sup>, 要使纤维素得以充分降解和利用, 一方面要提高酶的活力, 另一方面要改善纤维素酶系各组分相对含量。纤维素酶的工业化生产有固体发酵法和液体深层发酵法2种, 由于液体深层发酵法的培养条件容易控制, 不易污染杂菌, 生产效率高, 已成为国外重要的研究和生产工艺<sup>[3]</sup>。

本课题对从稻田土壤中分离到的产纤维素酶菌株, 采用液体发酵生产纤维素酶, 通过发酵条件的优化, 筛选得到一株高产纤维素酶青霉菌, 尤其是滤纸酶活较高, 具有广泛的应用前景。

### 1 材料、培养基与方法

收稿日期: 2006-10-30

作者简介: 胡丹(1980-), 女, 助教, 研究方向为工业微生物

1.1 样品: 稻田土壤

1.2 培养基

1.2.1 增殖培养基

2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.4 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.3 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 g  $\text{CaCl}_2$ , 5 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.6 mg  $\text{MnSO}_4$ , 1.7 mg  $\text{ZnCl}_2$ , 1.7 mg  $\text{CoCl}_2$ , 20 g CMC-Na, 1000 mL 蒸馏水, pH 5.5。

1.2.2 分离筛选培养基<sup>[4]</sup>:

①刚果红纤维素琼脂: 2.0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25 g  $\text{MgSO}_4$ , 14.0 g 琼脂, 2.0 g 明胶, 1.88 g 纤维素粉, 0.20 g 刚果红, 1000 mL 水, pH 7.0。培养基中的琼脂均需预处理以除去可能存在的碳源。

②滤纸条培养基: 直径 1.5 cm、长 1.5 cm 试管中加入上述刚果红纤维素琼脂 5 mL, 加 1 条瓦特曼滤纸(6 cm×1 cm)垂直于试管中, 一部分露出斜面, 加棉塞 121℃, 30 min 下灭菌。

1.2.3 鉴定培养基

土豆 200 g 洗净, 去皮切成小块, 煮沸 15 min 后纱布过滤, 定容至 1000 mL 加 1% 葡萄糖、0.05% 胆酸

钠和 1.5%琼脂, pH 8.0。

#### 1.2.4 发酵培养基

2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 30 g 豆饼粉, 0.3 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 g  $\text{CaCl}_2$ , 5 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.6 mg  $\text{MnSO}_4$ , 1.7 mg  $\text{ZnCl}_2$ , 1.7 mg  $\text{CoCl}_2$ , 50 g 稻草粉, 1000 mL 蒸馏水, pH 5.5。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 纤维素酶生产菌的筛选<sup>[5]</sup>

##### 1.3.1.1 初筛方法

将少许样品放入含 50 mL 增殖培养基的 300 mL 的三角瓶中, 30 °C、200 r/min 下培养 3~5 d, 然后分别稀释涂布于分离筛选培养基上, 观察菌落特征和透明圈大小, 同时将单个纯菌落分别接入滤纸条培养基中, 于 30 °C 静置培养, 定期目测滤纸条溃烂情况, 选取透明圈/菌落直径比值较大菌落及滤纸溃烂显著的菌株进行产酶发酵试验。

##### 1.3.1.2 复筛方法

将初筛得到的几株菌制成孢子悬液( $10^8$  个/mL)。在 500mL 三角瓶中装入液体发酵培养基 50 mL, 于旋转摇床上 250 r/min, 30 °C 培养 4 d, 将发酵液于 4000 r/min 离心 30 min, 取上清液测其 CMC 和 FP 酶活力, 比较各菌株在稻草上的产酶能力, 得到酶活较高的菌株。

#### 1.3.2 纤维素酶活力测定<sup>[6]</sup>

①羧甲基纤维素酶 (CMCase) 活力: 取适当稀释的上清液 0.5 mL, 以 CMC-Na 为底物, 加入 pH 为 4.8 的醋酸缓冲液 0.5 mL, 以不加底物为对照, 50 °C 反应 30 min, 取出, 加 2 mL DNS 溶液, 沸水浴中保持 5 min, 流水冷却, 定容至 25 mL, 混匀, 在 550 nm 处比色。

②滤纸酶 (FPA) 活力: 取适当稀释的上清液 0.5 mL, 以 50 mg(1 cm×6 cm)新华滤纸条为底物, 加入 pH 4.8 醋酸缓冲液 0.5 mL, 以不加底物为对照, 50 °C 反应 60 min, 取出, 加入 2 mL DNS 溶液, 沸水浴中保持 5 min, 流水冷却, 定容至 25 mL, 混匀, 在 550 nm 处比色。

酶活定义: 以 1 mL 酶液在 1 min 内分解底物生成 1  $\mu\text{mol}$  葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活单位(IU)。

#### 1.3.3 菌株鉴定方法<sup>[7,8]</sup>

菌落观察和显微电镜观察。

## 2 结果

### 2.1 菌种筛选

#### 2.1.1 初筛结果

通过刚果红平板分离筛选, 得到透明圈/菌落直径比值较大的 6 个菌落如表 1, 同时将这 6 个菌落分别接入滤纸条培养基中, 于 30 °C 静置培养, 目测滤纸条溃烂情况得表 2。

表 1 刚果红平板分离筛选结果

筛选菌株	X-1	X-2	X-3	X-4	X-5	X-6
滤纸崩溃时间 T/h	5.0	2.5	4.0	9.0	1.5	7.0

表 2 滤纸崩溃结果

筛选菌株	菌落直径 D/mm	透明圈直径 d/mm	d/D
X-1	3.5	15.8	4.5
X-2	3.1	18.9	6.1
X-3	1.4	7.0	5.0
X-4	2.5	5.3	2.1
X-5	3.2	20.8	6.5
X-6	2.7	11.6	4.3

#### 2.1.2 复筛结果

取上清液测其 CMCase 和 FPA 酶活力如表 3, 比较各菌株在稻草上的产酶能力, 得到酶活较高的 X-5 菌株。

表 3 各菌株在粗酶液中的酶活 单位: IU/mL

菌株	X-1	X-2	X-3	X-4	X-5	X-6
CMCase 酶活	32.81	60.08	45.29	22.61	75.67	36.83
FPA 酶活	2.44	5.23	3.33	1.29	6.64	2.86

### 2.2 菌种鉴定

X-5 菌株的菌落特征: 菌落颜色为绿色, 同心圆花纹, 孢子呈现绿色。

显微镜观察结果如图 1, 子实体为帚状, 其帚状枝有单束的小梗, 分生孢子小梗不分枝, 产生单轮帚状枝。无足细胞, 菌丝有横隔。孢子成串或链状, 单个孢子为球状或圆形, 非常光滑, 常常带有青绿色。单个孢子通过缢裂产生, 是典型的分生孢子。

依据文献资料<sup>[7,8]</sup>, 初步鉴定为半知菌亚门, 丝孢纲, 丝孢目, 丛梗孢科, 青霉属 (*Penicillium*)

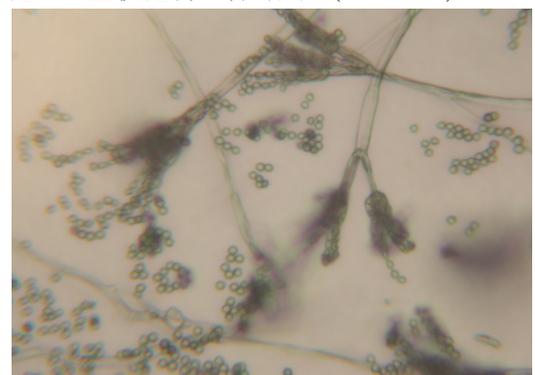


图 1 NC-7 菌株的菌丝照片

## 2.3 发酵条件对产酶的影响

## 2.3.1 不同碳源对产酶的影响

分别用 4 种不同碳源进行产酶试验, 酶活测定结果见表 4。由表 4 可知, 以稻草粉为碳源时羧甲基纤维素酶和滤纸酶活力分别高达 74.37 IU/mL 和 6.68 IU/mL, 以玉米秆、麸皮和米糠为碳源时酶活稍低。因此选用稻草粉为碳源进行产酶试验。

表 4 不同碳源对产酶的影响 单位: IU/mL

碳源	玉米秆	麸皮	稻草粉	米糠
CMCase 酶活	54.21	55.64	74.37	49.37
FPA 酶活	4.34	4.01	6.68	3.69

## 2.3.2 碳源添加量对产酶的影响

在培养基中分别加入不等量碳源, 其他发酵条件不变, 结果见表 5。由表 5 可知, 碳源不足不能满足菌体生长, 过多添加碳源并不能提高该菌产酶能力, 考虑经济效益, X-5 菌株发酵所需最佳碳源量为 5%。

表 5 不同碳源添加量对产酶的影响 单位: IU/mL

碳源含量/%	1	2	3	4	5	6	7
CMCase 酶活	17.93	33.62	50.53	67.83	75.28	74.89	76.01
FPA 酶活	0.96	2.97	4.11	5.78	6.15	6.33	6.25

## 2.3.3 不同氮源对产酶的影响

分别用 6 种不同氮源进行产酶试验, 酶活测定结果见表 6。由表 6 可知, 以豆饼粉为氮源时酶活最高, 因此选用豆饼粉为氮源进行产酶试验。

表 6 不同氮源对产酶活力的影响 单位: IU/mL

氮源	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	尿素	豆饼粉	酵母膏
CMCase 酶活	39.83	45.38	62.15	11.07	76.03	24.37
FPA 酶活	3.06	3.69	5.09	0.71	6.44	1.38

## 2.3.4 氮源添加量对产酶的影响

在培养基中分别加入不等量氮源, 其他发酵条件不变, 结果见表 7。测得 X-5 菌株发酵所需最佳氮源量为 3%。

表 7 不同氮源添加量对产酶的影响 单位: IU/mL

氮源含量/%	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5
CMCase 酶活	8.57	23.96	29.49	44.81	67.84	74.27	75.48
FPA 酶活	0.49	1.40	2.16	3.35	5.71	6.43	6.37

## 2.3.5 接种量对产酶的影响

设定不同接种量, 其他发酵条件不变, 结果见表 8。测得 5% 为最佳接种量, 接种量不足或过大都会影响纤维素酶的发酵产量。

表 8 不同接种量对产酶的影响 单位: IU/mL

接种量/%	2.5	5.0	7.5	10.0
CMCase 酶活	56.43	76.01	64.90	51.09
FPA 酶活	4.11	6.47	5.33	3.98

## 2.3.6 培养基起始 pH 对产酶的影响

将培养基 pH 调至不同的值, 其他发酵条件不变, 结果见表 9。产酶最适 pH 为 4.5~6.0。

表 9 不同培养基起始 pH 值对产酶的影响 单位: IU/mL

pH	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.6	7.0
CMCase 酶活	62.17	75.02	75.38	74.88	74.92	68.36	61.19
FPA 酶活	5.03	6.46	6.53	6.37	6.49	5.59	5.06

## 2.3.7 培养温度对产酶的影响

于不同温度下进行产酶试验, 结果见表 10。产酶最适培养温度为 26~28 °C。

表 10 不同温度对产酶的影响 单位: IU/mL

温度/°C	24	26	28	30	32
CMCase 酶活	51.95	73.94	74.42	65.19	50.22
FPA 酶活	4.03	6.55	6.49	5.37	3.98

## 2.3.8 培养时间对产酶的影响

于不同培养时间取样, 测定酶活, 结果见表 11。培养 120 h 产酶达到高峰。

表 11 不同培养时间对产酶的影响 单位: IU/mL

时间/h	24	48	72	96	120	144	168
CMCase 酶活	17.44	31.47	49.85	67.01	75.18	70.23	63.29
FPA 酶活	0.97	2.16	4.04	5.58	6.52	6.17	5.32

## 2.3.9 通气量对产酶的影响

于 250 mL 三角瓶装不同量培养基, 进行产酶试验, 结果见表 12。测得 250 mL 三角瓶装 60 mL 培养基能获得最佳产酶效果。

表 12 不同装液量对产酶的影响单位: IU/mL

装液量/ml	20	40	60	80	100
CMCase 酶活	45.75	66.13	75.72	62.96	42.09
FPA 酶活	3.64	5.11	6.68	5.29	3.31

## 3 结论

从稻田土壤中分离到一株产纤维素酶活力高的 X-5 菌株, 经形态特征及生理生化特征初步鉴定为半知菌亚门, 丝孢纲, 丝孢目, 丛梗孢科, 青霉属(*Penicillium*)。对青霉菌 X-5 菌株进行发酵培养条件的研究结果表明, 以 5.0% 稻草粉为碳源, 3.0% 豆饼粉为氮源, 在 250 mL 三角瓶中装 60 mL 培养基, 接种量为 5.0%, 培养温度为 26~28 °C, 初始 pH 4.5~6.0, 培养 120 h, 产酶活力最高, CMCase 酶活为 75.72 IU/mL, FPA 酶活为 6.68 IU/mL。

## 参考文献

- [1] King KW, Vessal ML. The production of cellulases[J]. Advanchem.ser, 1969,(9):7-15. (下转第 13 页)