

土壤中纤维素降解真菌的筛选及其纤维素酶活性的研究

陈晶晶^{1,2}, 王伏伟¹, 刘曼¹, 朱林^{1*}, 叶爱华^{2*}, 王晓波¹, 车威¹

(1. 安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

摘要: 通过对小麦/玉米秸秆还田土壤样品进行富集培养, 利用刚果红纤维素培养基筛选得到产纤维素酶的真菌 XJ-25, 并对该菌株进行形态学观察和 18S-ITS-5.8S 区序列系统发育分析, 初步鉴定为格孢腔菌属 (*Phaeosphaeria*), 定名为 *Phaeosphaeria* sp.XJ-25。在研究液体发酵培养基中碳源、氮源、培养时间、起始 pH、培养温度、接种量以及通气量对菌株 XJ-25 的羧甲基纤维素酶(CMC)的酶活及滤纸酶 (FPA) 的酶活影响的基础上, 利用响应面法对发酵条件进行优化。结果显示, CMC 酶活达到最大的条件为玉米秸秆粉 1.34 g·L⁻¹ (麸皮 0.16 g·L⁻¹)、尿素 10.06 g·L⁻¹、培养基初始 pH 3.25、接种量 4.13%, CMC 酶活达到 23.871 U·mL⁻¹。FPA 酶活最大的发酵最佳条件为玉米秸秆粉 1.34 g·L⁻¹ (麸皮 0.16 g·L⁻¹)、尿素 10.12 g·L⁻¹、培养基初始 pH 3.41、接种量 4.22%, FPA 酶活为 8.653 U·mL⁻¹。粗酶液的最适反应温度为 50℃, 酶液的热稳定较差, 当温度超过 40℃, 该酶活力显著下降。最适反应 pH 为 5, 在 pH 4~6 的范围内酶活性较稳定。

关键词: 纤维素降解真菌; 筛选; 响应面法; 纤维素酶活性

中图分类号: S154

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)04-0654-08

Isolation of cellulose-decomposing fungi from the soil and analyzing its cellulase activity

CHEN Jingjing^{1,2}, WANG Fuwei¹, LIU Man¹, ZHU Lin¹, YE Aihua², WANG Xiaobo¹, CHE Wei¹

(1. School of Resources and Environmental Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: A highly active cellulose-decomposing strain XJ-25 was isolated from the soil in the wheat and maize straw returned fields using enrichment culture and Congo red staining test. The isolated strain was identified as *Phaeosphaeria* sp. XJ-25 by its morphological characteristics as well as by phylogenetic relationships based on 18S-ITS-5.8S ribosomal gene sequences. Conditions for liquid fermentation, a process that produces cellulase were optimized by the response surface methodology (RSM). The results showed that the conditions for CMCase activity reaching the maximum were: the corn stalk powder, 1.34 g·L⁻¹ (bran was 0.16 g·L⁻¹); urea, 10.06 g·L⁻¹; initial pH of culture medium, 3.25; inoculation quantity, 4.13%; and CMCase activity reached 23.871 U·mL⁻¹. The conditions of FPase activity reaching the maximum were: the corn stalk powder, 1.34 g·L⁻¹ (bran was of 0.16 g·L⁻¹); urea, 10.12 g·L⁻¹; initial pH of culture medium, 3.41; inoculation quantity, was 4.22%; and FPase activity reached 8.653 U·mL⁻¹. The optimal reaction temperature of the crude enzyme solution was 50°C. When the temperature was over 40°C, the thermal stability of enzyme solution was poor, and the enzyme activity significantly decreased. The optimum reaction pH was 5. In the range of pH 4-6, the enzyme activity was more stable.

Key words: cellulose-decomposing fungi; isolation; response surface methodology (RSM); cellulase activity

纤维素是自然界中储量最大、分布最广泛的可再生天然碳水化合物^[1], 其主要存在于秸秆、木材等高等植物的细胞壁中。我国是农业大国, 也是秸秆资源最丰富的国家之一, 每年农作物秸秆产量

在 7 亿 t 以上^[2]。秸秆直接还田是农作物收获后将秸秆粉碎或整株返还到田里的一种秸秆利用方法, 此法简单、方便、易于普及^[3]。秸秆还田为微生物的活动提供了丰富的碳源和氮源, 促进微生物的生

收稿日期: 2013-12-11

基金项目: 安徽省自然科学基金(1408085MD75)和安徽省高校自然科学基金重点项目(KJ2013A113)共同资助。

作者简介: 陈晶晶, 硕士研究生。E-mail: cjj0622@163.com

* 通信作者: 朱林, 博士, 教授。E-mail: zhulin@ahau.edu.cn 叶爱华, 副教授。E-mail: yahhay1@163.com

长繁殖。这样的土壤与其他土壤相比更富集纤维素分解菌以产生纤维素酶来分解纤维素。

采用微生物技术处理秸秆是当前研究最多的一种秸秆处理方法。其中木霉属中的里氏木霉(*Trichoderma reesei*)和绿色木霉(*Trichoderma viride*)由于产生纤维素酶系较全、活性高且具有降解木材的能力, 已经被深入研究成为最典型的纤维素酶生产菌株^[4-5]。真菌所产的纤维素酶组成全面, 酶活力较高并且能分泌到胞外, 更易收集和纯化, 所以工业生产中常用木霉、青霉作为纤维素酶的产生菌。如今, 纤维素酶已广泛应用在食品加工、饲料工业、纺织工业、造纸工业和发酵酒精等方面。

本研究从秸秆还田后的土壤中分离筛选能降解纤维素的真菌, 通过固体培养初筛、复筛、测定菌株的羧甲基纤维素酶(CMCase)和滤纸酶(FPase)的酶活力, 从中获得 1 株酶活较大的纤维素降解菌株。并通过形态观察和 18S-ITS-5.8S 区基因序列测定来确定种属, 对该菌的液体发酵条件进行了优化, 并对其纤维素酶学性质进行了研究, 为有效地利用农作物秸秆奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品 纤维素降解菌分离材料采自安徽蒙城内农业示范科技园秸秆还田后的砂姜黑土^[6]。

1.1.2 试剂及药品 化学试剂均为分析纯, 购自上海生工生物工程有限公司; 引物合成, 测序由上海生工生物工程有限公司完成; 分子生物学试剂购自大连 TaKaRa 公司。

1.1.3 培养基 种子培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 去皮马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 10 g, 秸秆 2 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然。

天然秸秆液体培养基: $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 蛋白胨 10 g, KH_2PO_4 1 g, 秸秆 30 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然。

菌种保藏培养基(PDA 培养基): 去皮马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 加蒸馏水至 1000 mL。

富集培养基^[7], 羧甲基纤维素培养基^[8], 纤维素刚果红培养基^[9]。所有培养基 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 备用。

1.2 菌种的分离与纯化

无菌操作称取土样 0.5 g, 加入大约 100 mL 富集培养基中, 28°C 、 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 4 d, 取菌悬液 1 mL 梯度稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 涂布于羧甲基纤维素培养基上 28°C 培养 3~7 d。

陆续挑取平板上单个菌落继续划线于羧甲基纤维素培养基上, 28°C 再培养 3 d。重复于固体平板分离 3 次。最终从固体平板中挑选出水解圈直径/菌落直径比值最大的单菌落, 保存与 PDA 斜面上。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 形态学特征 在 PDA 平板上 28°C 培养 7 d 后进行形态观察。

1.3.2 基因组提取及 18S-ITS-5.8 S 区基因扩增 对纯化后培养的菌株使用改进的石英砂研磨法^[10]提取 DNA, 然后扩增真菌的 18S-ITS-5.8S 基因。扩增体系 25 μL , 组成为无菌水 18.2 μL 、 $10\times\text{PCR}$ Buffer 2.5 μL 、dNTPs 2 μL 、引物 ITS1 (5'-TCCGTA GGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3') 各 0.5 μL ($10\text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、*rTaq* DNA 聚合酶 0.3 μL 、菌株的基因组 DNA 1 μL (稀释 10 倍)。扩增程序为 95°C 5 min, 95°C 50 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。

1.3.3 18S-ITS-5.8 S 基因测序及分析 PCR 产物先切胶回收, 经 pMD[®]19-T Simple Vector 载体连接后转入大肠杆菌 *DH5 α* 感受态细胞, 经蓝白筛选后挑阳性克隆子送上海生工生物工程有限公司测序。将所获得的菌株 18S-ITS-5.8S 区基因序列提交 GenBank 核酸序列数据库并与数据库中已知的相关序列进行比对, 采用 MEGA4.0 构建系统发育树。

1.4 纤维素酶活的测定

将菌种接种于以秸秆为唯一碳源的液体培养基中 28°C 液体摇瓶培养 4 d, 所得培养液于 4°C 、 $5000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min。上清液即为粗酶液。

1.4.1 CMC 酶活力的测定 取 0.2 mL 上清液于 25 mL 干燥刻度试管中, 加入 1.8 mL 1% CMCNa 溶液 (pH 值 4.8, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制) 50°C 水浴 30 min 后加入 DNS 试剂 3.0 mL。沸水浴 5 min, 终止反应并显色。冷却定容至 25 mL, 摇匀。用 520 nm 波长下测定吸光度。空白对照中稀释酶液在沸水浴中水浴 15 min 使其失活, 其他条件不变。然后, 以空白对照为空白液调零, 比色测定吸光度, 再根据标准曲线, 测定葡萄糖 (这里把所有具有还原性的糖都当作葡萄糖) 含量。

1.4.2 FPA 酶活力的测定^[11] CMC 酶活力 $X = (1000\times G\times 25) / (0.2\times 30\times 180)$

FPA 酶活力 $X = (1000\times G\times 25) / (0.2\times 60\times 180)$ 式中: X 为样品的酶活力 ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$); 1000=换算倍数; G 为标准曲线上光吸收值所对应的葡萄糖毫克数; 25 为定容体积 (mL); 0.2 为加酶量 (mL); 30、60 为作用时间 (min); 180 为葡萄糖的摩尔质量

(g·mol⁻¹)。在上述条件下,酶活力按照国际单位规定定义为:每分钟催化纤维素水解生成 1 μmol 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位 U。

1.5 响应面法优化液体发酵

采用响应面法^[12]的 Box-Behnken 进行试验设

计。在单因素试验的基础上,根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理,以碳源、氮源、培养基初始 pH 值和接种量 4 个因素为自变量,以纤维素酶活为响应值,设计了优化发酵条件的四因素三水平实验,其因素水平选取见表 1。

表 1 影响发酵条件的因素与水平
Table 1 Factors and levels of fermentation conditions

因素 Factor	编码 Code	水平 Level		
		-1	0	1
玉米秸秆粉/g·L ⁻¹ Corn stalk powder	A	1.2	1.35	1.5
尿素/g·L ⁻¹ Urea	B	9	10	11
培养基初始 pH 值 Initial pH value of medium	C	2	3	4
接种量/% Inoculum size	D	3	4	5

1.6 纤维素酶酶学性质研究

1.6.1 粗酶液的最适温度 采用 1.4 所获得的粗酶液(下同)置于 30~80℃的水浴条件下,其他条件不变,测其纤维素酶活力。

1.6.2 粗酶液的热稳定性 粗酶液分别在 30~80℃水浴保温 1 h,迅速冷却后,在 50℃条件下,测粗酶液酶活,未处理的粗酶液酶活为 100%,3 次重复。

1.6.3 最适 pH 值 分别用 pH 3~8 缓冲液配制 10 g·L⁻¹(W/V)的羧甲基纤维素钠溶液作为底物,然后在最适反应温度 50℃条件下,测定粗酶液的酶活,3 次重复。

1.6.4 pH 稳定性 将发酵过的粗酶液分别置于 pH 3~8 的缓冲液条件下室温(25℃)放置 1 h,测其残余纤维素酶活力,未处理的粗酶液酶活为 100%,3 次重复。

1.7 数据处理

采用 Microsoft Excel 2003 软件对数据进行处理和绘图,采用 Design Expert 7.0 响应面设计软件进行实验设计和数据方差分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 XJ-25 的分离

将筛选到的在刚果红固体培养基上水解圈直径/菌落直径比值最大的编号为 XJ-25 的真菌菌株进行液体产酶发酵试验,测定其粗酶液的 CMC 酶活性。结果显示该菌株于天然秸秆液体培养基中培养 4 d (50 mL 装量,28℃,200 r·min⁻¹,pH 自然),其粗酶液的 CMC 酶活高达 16.07 U·mL⁻¹,FPA 酶活达到 7.47 U·mL⁻¹。

2.2 菌株 XJ-25 的形态观察鉴定

对菌株 XJ-25 进行平板培养及载片培养,平板

培养观察其菌落形态,载片培养在显微镜下进行形态观察。菌株 XJ-25 在 PDA 平板培养基上生长较快,28℃条件下培养 3 d 菌落直径达 25~30 mm,菌落呈圆形,有放射状沟纹,形成同心环纹,边缘灰色,中间褐绿色,菌丝茂盛,菌落背面呈黄色。培养 7~8 d 时有大量孢子产生,孢子产量随培养时间延长而增多,子囊孢子近圆形,孢子颜色为褐色。

2.3 18S-ITS-5.8S 区序列分析

对菌株 XJ-25 的 18S-ITS-5.8S 区基因序列(GeneBank 登录号为 KF143800)进行同源性比较,结果显示其序列与格孢腔菌属的很多菌株相似度高达 99%,部分达到 97%。以 18S-ITS-5.8S 区基因序列同源性为基础构建系统发育树(图 1),菌株 XJ-25 与格孢腔菌属聚为一支。根据菌株的形态特征,结合其分子鉴定结果,初步判断菌株 XJ-25 属于格孢腔菌属的一个种,暂命名为 *Phaeosphaeria* sp.XJ-25。

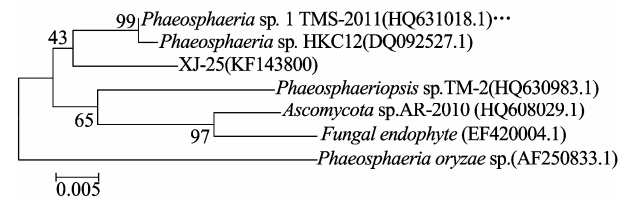


图 1 菌株 XJ-25 的 18S-ITS-5.8S 区基因序列系统发育树
Figure 1 Phylogenetic tree derived from 18S-ITS-5.8S gene sequence of strain XJ-25

2.4 响应面法优化液体发酵

2.4.1 优化液体发酵条件 如表 2 所示,在单因素试验基础上,对碳源、氮源、培养时间、培养基初始 pH 值、培养温度、接种量和装液量进行优化,确定了产纤维素酶的最佳条件是碳源是玉麸比 9:1、

氮源为尿素、培养时间为 4 d、培养基初始 pH 值 3、培养温度为 28℃、接种量为 4%、装液量为 50 mL。

2.4.2 优化发酵条件对 CMC 酶活的影响 应用 Design Expert 7.0 软件对表 2 中的有关 CMC 酶活的数据进行二次多项回归拟合, 可获得玉米秸秆粉 (A)、尿素 (B)、培养基初始 pH 值 (C)、接种量 (D) 和 CMC 酶活(X1)之间的二次多项式回归方程为:

$$X_1 = -512.94954 + 374.82889A + 46.15942B + 19.3325C + 10.84875D - 0.14667AB - 2.95833AC - 1.00667AD + 0.03525BC + 1.30775BD + 0.3415CD - 134.2A^2 - 2.55912B^2 - 2.63638C^2 - 2.87875D^2$$

由表 3 可知, 模型 $P < 0.0001$, 说明该模型高度显著, 模型具有合理性; 失拟项 ($P = 0.1114$) > 0.05 , 失拟项不显著, 说明残差均由随机误差引起; 复相

关系数 $R^2 = 0.9439$, $R_{adj}^2 = 0.8878$, 说明该模型对实验的拟合情况良好, 实验误差小。当“ $Prob > F$ ”即 P 值小于 0.05 时, 即表示该项指标显著^[13]。综上得出, 应用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析和预测具有可行性。为进一步研究相关变量间的交互作用, 采用 Design Expert 7.0 软件绘制等高线和 3D 图, 来直观反映各因素对响应值的影响。等高线的形状可以反映出交互效应的强弱大小, 圆形表示两交互作用不显著, 椭圆形表示两交互作用显著, 说明越趋向椭圆表明交互作用越强, 越趋向圆形则相反, 表明交互作用越弱。图 2 反映玉米秸秆粉为 $1.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和培养基初始 pH 为 3 时尿素 (B) 和接种量 (D) 对 CMC 酶活 (Y1) 的交互作用, 当尿素量为 $9.5 \sim 10.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 且接种量为 $3.5\% \sim 4.5\%$ 时 CMC 酶活可达实验的最大值。

表 2 响应面优化试验设计及试验结果

Table 2 Experimental design and results of response surface methodology

实验号 No.	设计的因子水平 Designed factor level				CMC 酶活/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ CMC enzyme activity	FPA 酶活/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ FPA enzyme activity
	A	B	C	D		
1	1	-1	0	0	18.934	7.035
2	1	0	0	1	18.496	6.853
3	0	0	1	1	20.334	7.764
4	-1	-1	0	0	19.014	7.121
5	0	1	0	1	21.756	8.365
6	-1	0	1	0	18.633	6.903
7	0	0	0	0	24.136	8.631
8	0	0	0	0	23.127	8.956
9	0	0	0	0	23.543	7.963
10	0	0	-1	1	17.034	5.345
11	1	0	0	-1	17.103	5.542
12	0	-1	0	1	17.186	5.974
13	0	1	-1	0	17.347	6.138
14	0	1	0	-1	17.697	6.457
15	1	0	1	0	20.986	8.034
16	0	-1	0	-1	18.358	6.762
17	0	0	0	0	23.893	9.156
18	0	0	-1	-1	16.881	5.147
19	-1	0	0	-1	17.143	5.683
20	0	-1	-1	0	17.135	4.869
21	-1	0	0	1	17.932	6.632
22	0	-1	1	0	19.325	7.362
23	-1	0	-1	0	16.964	5.271
24	1	1	0	0	17.435	6.315
25	1	0	-1	0	17.542	6.376
26	-1	1	0	0	17.427	6.248
27	0	1	1	0	19.678	7.531
28	0	0	0	0	22.226	8.789
29	0	0	1	-1	18.815	6.973

表 3 CMC 酶活回归方程系数及回归模型方差分析

Table 3 Regression coefficient of regression equation and ANOVA of items of regression equation of the CMCase activity

方差来源 Source of variation	系数估计 Estimate of coefficient	标准差 SD	平方和 SS	均方 MS	F	P
模型 Model			159.92	11.42	16.83	<0.0001
Intercept	23.85	0.37				
A	-0.28	0.24	0.95	0.95	1.4	0.2556
B	0.12	0.24	0.16	0.16	0.24	0.6343
C	1.24	0.24	18.42	18.42	27.14	0.0001
D	0.56	0.24	3.79	3.79	5.58	0.0332
AB	-0.022	0.41	1.936E-003	1.936E-003	2.852E-003	0.9582
AC	-0.44	0.41	0.79	0.79	1.16	0.2996
AD	-0.15	0.41	0.091	0.091	0.13	0.7194
BC	0.035	0.41	4.970E-003	4.970E-003	7.322E-003	0.9330
BD	1.31	0.41	6.84	6.84	10.08	0.0068
CD	0.34	0.41	0.47	0.47	0.69	0.4210
A2	-3.02	0.32	59.14	59.14	87.12	<0.0001
B2	-2.56	0.32	42.48	42.48	62.58	<0.0001
C2	-2.64	0.32	45.08	45.08	66.41	<0.0001
D2	-2.88	0.32	53.15	53.15	79.19	<0.0001
残差 Residual			9.50	0.68		
失拟项 Lack of fit			9.23	0.92	13.55	0.1114
误差 Error			0.27	0.068		
总离差 Total deviation			169.43			

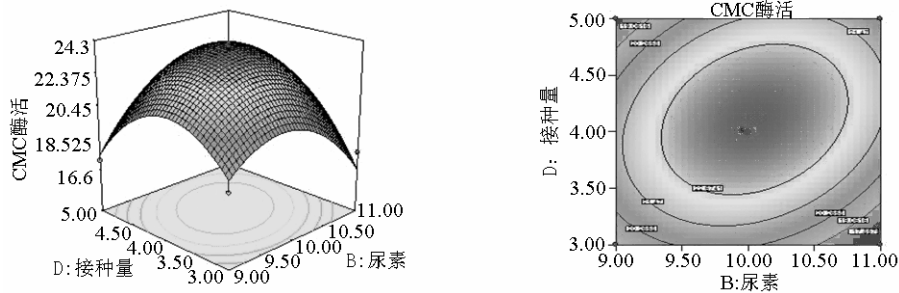


图 2 尿素与接种量对 CMC 酶活的响应面分析图和等高线图

Figure 2 Response surface and contour plots of the effects of nitrogen and inoculum on the CMCase activity

2.4.3 优化发酵条件对 FPA 酶活的影响 应用 Design Expert 7.0 软件对表 2 中的有关 FPA 酶活的数据进行二次多项回归拟合, 可获得玉米秸秆粉 (A)、尿素 (B)、培养基初始 pH 值 (C)、接种量 (D) 和 FPA 酶活(X2)之间二次多项式回归方程为:

$$X_2 = -188.37608 + 139.06222A + 15.765B + 10.1545C + 3.52617D - 0.255AB - 0.043333AC - 0.60333AD - 0.275BC + 0.674BD + 0.14825CD - 50.09074A^2 - 0.85654B^2 - 1.16454C^2 - 1.19154D^2$$

由表 4 可知, 模型 $P=0.0003<0.05$, 说明该模型显著, 模型具有合理性; 失拟项 ($P=0.2846$) >0.05 , 失拟项不显著, 说明残差均由随机误差引起; 复相

关系数 $R^2=0.8826$, $Radj^2=0.7651$, 说明该模型对实验的拟合情况良好, 实验误差小。当“ $Prob > F$ ”即 P 值小于 0.05 时, 即表示该项指标显著。综上所述, 应用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析和预测具有可行性。

为进一步研究相关变量间的交互作用, 采用 Design Expert 7.0 软件绘制等高线和 3D 图, 来直观反映各因素对响应值的影响。图 3 反映玉米秸秆粉为 $1.35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和培养基初始 pH 为 3 时尿素 (B) 和接种量 (D) 对 FPA 酶活 (Y2) 的交互作用, 当尿素量为 $9.5\sim 10.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 且接种量为 $3.5\%\sim 4.5\%$ 时 CMC 酶活可达实验的最大值。

表 4 FPA 酶活回归方程系数及回归模型方差分析

Table 4 Regression coefficient of regression equation and ANOVA of regression model of the FPase activity

方差来源 Source of variation	系数估计 Estimate of coefficient	标准差 SD	平方和 SS	均方 MS	F	P
模型 Model			35.51	2.54	7.52	0.0003
Intercept	8.70	0.26				
A	-0.19	0.17	0.44	0.44	1.30	0.2729
B	0.16	0.17	0.31	0.31	0.92	0.3536
C	1.95	0.17	10.87	10.87	32.20	<0.0001
D	0.36	0.17	1.59	1.59	4.71	0.0476
AB	-0.038	0.29	5.852E-003	5.852E-003	0.017	1.8971
AC	-6.500E-003	0.29	1.690E-004	1.690E-004	5.007E-004	0.9825
AD	-0.091	0.29	0.033	0.033	0.097	0.7600
BC	-0.28	0.29	0.30	0.30	0.90	0.3599
BD	0.67	0.29	1.82	1.82	5.38	0.0359
CD	0.15	0.29	0.088	0.088	0.26	0.6178
A2	-1.13	0.23	8.24	8.24	24.41	0.0002
B2	-0.86	0.23	4.76	4.76	14.10	0.0021
C2	-1.16	0.23	8.80	8.80	26.06	0.0002
D2	-1.19	0.23	9.21	9.21	27.28	0.0001
残差 Residual			4.73	0.34		
失拟项 Lack of fit			3.9	0.39	1.88	0.2846
误差 Error			0.83	0.21		
总离差 Total deviation			40.24			

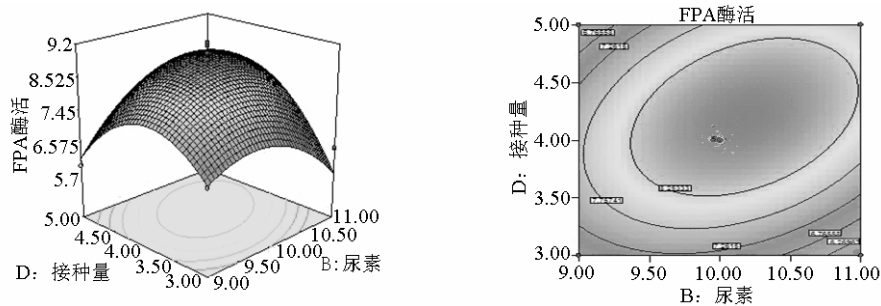


图 3 尿素与接种量对 FPA 酶活的响应面分析图和等高线图

Figure 3 Response surface and contour plots of the effects of nitrogen and inoculum on the FPase activity

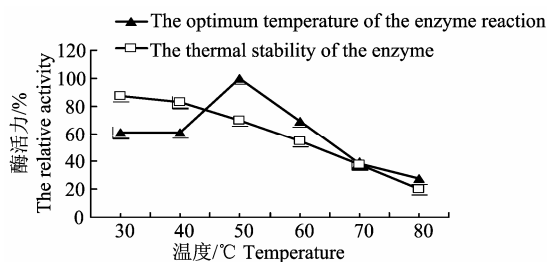


图 4 温度对酶活力的影响

Figure 4 The effect of temperature on the FPase activity

2.4.4 模型的实验验证 通过软件分析, 得出 CMC 酶活最大的发酵最佳条件为玉米秸秆 1.34 g (麸皮 0.16 g)、尿素 10.06 g、培养基初始 pH 3.25、接种

量 4.13%, 在此条件下, CMC 酶活的理论值为 24.0481 U·mL⁻¹。FPA 酶活最大的发酵最佳条件为玉米秸秆 1.34 g (麸皮 0.16 g)、尿素 10.12 g、培养基初始 pH 3.41、接种量 4.22%, 在此条件下, FPA 酶活的理论值为 8.951 U·mL⁻¹。

为检验响应面分析方法可靠性, 根据所得出最佳条件进行发酵实验, 设定 3 个重复, 取平均值, CMC 酶活为 23.871 U·mL⁻¹, 与理论值相比, 误差为 0.74%。FPA 酶活为 8.653 U·mL⁻¹, 与理论值相比, 误差为 3.3%。因此, 利用响应面分析方法得到的纤维素酶活发酵条件参数可靠, 具有实用价值。

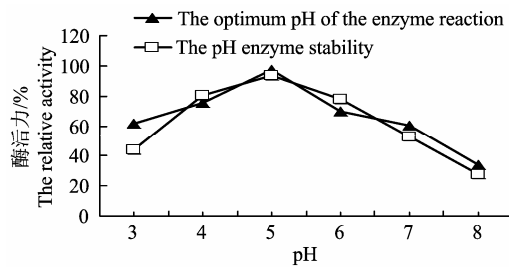


图 5 pH 对纤维素酶活力的影响

Figure 5 The effect of pH on the FPAse activity

2.5 酶学性质研究

2.5.1 酶的最适温度值及纤维素酶热稳定性 由图 4 可知, 在反应温度为 50℃ 时 XJ-25 菌株的纤维素酶活力最高, 随着温度的提高, 纤维素酶活力迅速下降, 酶活只是在一个很窄的温度范围内表现很高。纤维素酶在 30~40℃ 条件下相对稳定, 酶活力基本没有多少损失, 温度过高时, 其活力迅速下降, 说明该酶热稳定性较差, 在储存过程中注意低温保藏。

2.5.2 酶的最适 pH 值及 pH 稳定性 由图 5 可看出在 pH 为 5 时, 纤维素酶活力表现最高, 在偏酸条件下, 纤维素酶活力明显下降, 因此该菌产生的纤维素酶催化反应的最适反应 pH 为 5 左右。该菌所产生的纤维素酶, 在 pH 值为 4~6 范围内剩余酶活力保持 80% 以上, 可见菌株 XJ-25 在中性偏酸环境下具较强的稳定性。

3 讨论

纤维素分解菌的分离筛选方法很多, 例如 CMC-天青法、凉乙醇沉淀法、台盼兰法、刚果红法等。而其中较公认最为常用的分离方法是刚果红法。本文通过刚果红法筛选秸秆还田后土壤中降解纤维素的真菌, 并对其初步研究。经形态学鉴定及 18S-ITS-5.8S 区序列同源性比对, 将菌株初步鉴定为格孢腔菌属, 命名为 *Phaeosphaeria* sp. XJ-25。

响应面分析方法是利用合理的试验设计, 采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数, 解决多变量问题。该法具有试验次数少、周期短和回归方程精度高的特点, 能研究几种因素间的交互作用, 在一定程度上弥补了正交试验设计的不足。随着统计学的发展和应用, 响应面法的应用领域不再局限于化学工业, 在生物学、医学以及生物制药领域都得到了广泛应用^[14]。本研究通过响应面分析法对发酵产酶条件进行优化, 得出了其 CMC 酶活和 FPA 酶活最大的最适条件。其 CMC 酶活达到

23.871 U·mL⁻¹, CMC 酶活最大的发酵最佳条件为玉米秸秆 1.34 g·L⁻¹ (麸皮 0.16 g·L⁻¹)、尿素 10.06 g·L⁻¹、培养基初始 pH 3.25、接种量 4.13%。FPA 酶活为 8.653 U·mL⁻¹, FPA 酶活最大的发酵最佳条件为玉米秸秆 1.34 g·L⁻¹ (麸皮 0.16 g·L⁻¹)、尿素 10.12 g·L⁻¹、培养基初始 pH 3.41、接种量 4.22%。粗酶液的最适反应温度为 50℃, 酶液的热稳定较差, 当温度超过 40℃, 该酶活力显著下降。最适反应 pH 为 5, 在 pH4~6 的范围内酶活性较稳定。

在自然界中, 许多细菌、真菌、放线菌、原生动动物等都能产纤维素酶。但细菌、放线菌和原生动动物所产纤维素酶量较少、纤维素酶系不完全且多数属于胞内酶, 故国内外关于产纤维素酶菌种的研究主要集中在真菌方面。赵方圆等^[15]从牛羊粪堆肥中筛选出一株纤维素降解菌, 该菌的 CMC 酶活、滤纸酶活分别达到 0.53 和 0.15 U·mL⁻¹。Ahamed 等^[16]研究表明工业生产中常用的纤维素酶生产菌株产生的 FPA 酶活力为 5.02 U·mL⁻¹, CMC 酶活力为 4.2 U·mL⁻¹。张明珠等^[17]获得的包括白腐真菌、绿色木霉在内的 7 种具有降解纤维材料能力的菌株, 纤维素酶的活力在 0.28~12.54 U·mL⁻¹。马旭光等^[18]通过航空诱变获得的纤维素降解菌 ZM-8 的纤维素酶活力在 1.84~20.14 U·mL⁻¹。刘清锋等^[19]从稻田腐烂秸秆中分离到纤维素分解菌株, 该菌株的 CMC 酶活和滤纸酶活最高分别达到 45.01 和 6.89 U·mL⁻¹。武秀琴等^[20]以黑曲霉为出发菌株, 经紫外线(15 W, 照射距离 30 cm 左右, 照射时间 8 min)和亚硝酸(0.1 mol·L⁻¹ 的 NaNO₃ 处理 5 min)的复合诱变, 得到的突变菌株纤维素酶活力提高了 61.10%, 滤纸酶活力提高了 64.01%, 此研究启发我们可以通过采取诱变的手段来提高酶活, 有一定参考价值和借鉴意义。

参考文献:

- [1] Lynd L R, Wyman C E, Gemgross T U. Biocommodity engineering [J]. *Biotechnology Progress*, 1999, 15(5): 777-793.
- [2] 赵军, 王述洋. 我国生物质能资源与利用[J]. *太阳能学报*, 2008, 29(1): 90-94.
- [3] 刘培军, 张曰林. 作物秸秆综合利用技术[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2010.
- [4] Baldrian P, Valášková V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(3): 501-521.
- [5] Štursová M, Žifčáková L, Leigh M B, et al. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 80(3): 735-746.
- [6] 王磊, 陶少强, 夏强, 等. 秸秆还田对土壤氮素养分及

- 微生物量氮动态变化的影响[J]. 土壤通报, 2013, 44(4): 956-963.
- [7] Nakajima-Kambe T, Okada N, Takeda M, et al. Screening of novel cellulose-degrading bacterium and its application to denitrification of groundwater[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 99(4): 429-433.
- [8] 余晓斌, 郝学财. 纤维素酶液体发酵最佳培养基的确定[J]. 工业微生物, 2005, 35(3): 1-5.
- [9] 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基[J]. 微生物学通报, 1997, 24(4): 251-252.
- [10] 何叶喧, 王世英, 李兵, 等. 一种快速提取丝状真菌产黄青霉 DNA 的方法[J]. 中国抗生素杂志, 2005(8): 503-504.
- [11] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 56-68.
- [12] Thompson D. Response surface experimentation[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 1982, 6(3): 155-188.
- [13] 费荣昌. 实验设计与数据处理[M]. 无锡: 无锡轻工大学出版社, 2001: 59-63.
- [14] Liu W, Yu Y, Yang R, et al. Optimization of total flavonoid compound extraction from *Gynura medica* leaf using response surface methodology and chemical composition analysis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(11): 4750-4763.
- [15] 赵方圆, 范宁杰, 陈一楠, 等. 纤维素降解菌 *Aspergillus* sp. YN1 的产酶条件及酶学特性[J]. 微生物学通报, 2010, 37(8): 1194-1199.
- [16] Ahamed A, Vermette P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions [J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 40(3): 399-407.
- [17] 张明珠, 张力, 韩大勇. 新型秸秆分解菌的筛选和酶活性研究[J]. 中兽医医药杂志, 2008(3): 15-17.
- [18] 马旭光, 张宗舟, 蔺海明, 等. 黑曲霉产高酶活纤维素酶突变株 ZM-8 的筛选[J]. 饲料工业, 2006, 27(24): 11-13.
- [19] 刘清锋, 支晓鹏, 徐惠娟, 等. 纤维素降解菌青霉 T24-2 的分离及产酶特性[J]. 工业微生物, 2007, 37(3): 15-19.
- [20] 武秀琴, 王敏. 纤维素酶高产菌株的诱变选育[J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (23): 9817-9818.