

# 毛壳霉 CQ31 的鉴定及固体发酵产木聚糖酶条件的优化

丛倩千 江正强\* 吕顺意

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

**摘要:** 从土壤中筛选出一株产木聚糖酶的真菌 CQ31, 经鉴定后命名为毛壳霉 CQ31。该菌能够利用几种农业废弃物固体发酵高产木聚糖酶, 玉米杆为最佳碳源。单因素优化试验表明: 以玉米杆为碳源, 胰蛋白胨为氮源, 初始水分含量 80%, 初始 pH 值 9.0 为最佳产酶条件。在优化后的条件下培养 7 d 产木聚糖酶水平高达 4897 U/g 干基碳源, 此时甘露聚糖酶酶活达 803 U/g 干基碳源。因此, 毛壳霉 CQ31 固体发酵产木聚糖酶和甘露聚糖酶具有一定的工业化应用前景。

**关键词:** 毛壳霉, 木聚糖酶, 甘露聚糖酶, 固体发酵, 玉米杆

## Identification of *Chaetomium* sp. CQ31 and Optimization of Xylanase Production in Solid State Fermentation

CONG Qian-Qian JIANG Zheng-Qiang\* LV Shun-Yi

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** A fungus CQ31 isolated from soil samples was identified as *Chaetomium* sp.. This strain produced effectively xylanases utilizing several liguocellulosic materials in the solid-state fermentation (SSF), and corn straw was the best carbon source. The results of single-factor-experiment showed that the corn straw as the carbon source, tryptone as the nitrogen source, initial moisture content of 80% and initial pH 9.0 were the optimal conditions for xylanase production. Under the optimized conditions, it produced xylanase which was 4897 U/g dry substrate while mannanase was 803 U/g dry substrate after 7 days of cultivation. Therefore, xylanase and mannanase production by *Chaetomium* sp. CQ31 in SSF possess potential for commercial applications.

**Keywords:** *Chaetomium* sp., Xylanase, Mannanase, Solid state fermentation, Corn straw

木聚糖是自然界中一种丰富的再生资源, 是最具代表性的半纤维素, 约占半纤维素的 1/3~1/2, 是自然界中仅次于纤维素的最丰富的多糖<sup>[1]</sup>。木聚糖酶(Xylanase, EC 3.2.1.8)是木聚糖水解酶系中最关

键的水解酶, 通过水解木糖分子间的  $\beta$ -1,4-糖苷键, 将木聚糖水解成低聚木糖及少量木糖和阿拉伯糖。木聚糖酶的工业化应用始于上世纪 80 年代, 最初应用于饲料, 而后扩展到食品、纺织和造纸工业。近

年来,木聚糖酶在制浆造纸、食品、饲料等行业都有广泛的应用,特别是制浆造纸工业是应用木聚糖酶最多的行业。

木聚糖酶属于诱导酶,主要由微生物发酵生产,发酵方法主要有液体发酵和固体发酵。液体发酵一般需要在培养基中加入昂贵的木聚糖才能高效产酶。在木聚糖酶的生产过程中,碳源的成本是影响生产成本的重要因素。固体发酵能利用廉价的农业废弃物如秸秆、玉米芯、蔗渣、麸皮等作为碳源生产木聚糖酶。另外,固体发酵的操作成本要比液体发酵低的多,因此,固体发酵产木聚糖酶越来越受到关注<sup>[2]</sup>。近年来国内外对固体发酵产木聚糖酶的研究报道逐渐增加,固体发酵产木聚糖酶的水平也越来越高。国内曾报道过利用黑曲霉<sup>[3]</sup>、青霉菌<sup>[4]</sup>、绿色木霉<sup>[5]</sup>等真菌进行固体发酵产木聚糖酶,其中以黑曲霉发酵产木聚糖酶活力最高,达到 5147 U/g 干基。而利用真菌固体发酵产木聚糖酶活性最高为嗜热棉毛菌(*Thermomyces lanuginosus*)D<sub>2</sub>W<sub>3</sub> 以高粱秆为碳源进行的固体发酵,经过发酵条件的优化木聚糖酶的产量高达 48000 U/g 干基<sup>[6]</sup>。

毛壳菌属为常见的霉腐菌,大多数具有较强的纤维素分解能力,其中较为突出的为球毛壳菌所产的木聚糖酶<sup>[7]</sup>。国内对利用毛壳属真菌生产木聚糖酶的研究较少,而利用毛壳属真菌进行固体发酵产木聚糖酶,目前未见相关研究的报道。本研究分离筛选到的一株中等嗜热菌 CQ31,从形态、18S rDNA 及 ITS 对其进行鉴定,并进一步研究了其固体发酵产木聚糖酶条件的优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

桦木木聚糖为美国 Sigma 公司产品;胰蛋白胨、酵母提取物为英国 Oxiod 公司产品;大豆蛋白胨、牛肉蛋白胨等购自北京双旋培养基制造厂;玉米芯、玉米苞皮、蔗皮、小麦秸秆等农业废弃物均购自北京郊区。破碎筛选处理后取 40 目上备用;其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 菌株

CQ31 由本实验室从土样中筛选并保存。斜面培养基(同生长培养基)(每 L):槐豆胶(LBG)10 g,酵母提取物 6 g,牛肉蛋白胨 4 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g,琼脂 15 g。1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。

将 CQ31 接种到生长培养基的平板上,37°C 培养 5 d 待其长出菌丝体后用 5 mL 灭菌的 20%甘油将菌丝体洗下,混匀后冷冻保存备用。

### 1.3 真菌 CQ31 的菌株鉴定

将 CQ31 接种于 PDA 培养基上,置于 37°C 培养箱中培养 7 d 后观察其菌落形态及显微结构。采用常规 PCR 方法,以通用引物 SR1R (TACCTGGT TGATCCTGCCAGT)和 SR6 (CCTTGTTACGACTT TTA CTT)及 ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)和 ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC)分别对其 18S rDNA 及 ITS 进行扩增后,将测序获得的基因序列经 NCBI 上的 Blast 对比,依据相似度高低并结合菌株形态对菌株进行初步鉴定。

### 1.4 固体发酵产木聚糖酶

**1.4.1 发酵培养方法和粗酶液的提取:**取 5 g 碳源于 250 mL 三角瓶中,加入含 2%酵母提取物的 10 mL 水溶液。用玻璃棒搅拌均匀后于 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min,冷却后接种 1 mL 菌悬液,混匀后置于 37°C 培养箱中静置培养 5 d。取 0.3 g 固体发酵物,加入 5 mL 0.05 mol/L pH 6.0 的柠檬酸缓冲液,37°C 180 r/min 振荡 2 h,10000 r/min 冷冻离心 10 min,上清液即为木聚糖酶粗酶液。

**1.4.2 固体发酵产酶条件的优化:**在上述发酵培养条件下,选取不同的碳源(包括玉米芯、玉米秆、稻草秆、甘蔗渣、高粱秆、麸皮、蔗皮、玉米苞)考察对该菌株产酶的影响。在优化的碳源基础上通过改变水分含量、氮源种类和培养基初始 pH,确定最佳水分含量、氮源种类和培养基初始 pH。在最佳培养基组成和培养条件下,每天取样后测木聚糖酶活性和蛋白含量了解产酶历程。

### 1.5 酶活力及蛋白含量的测定

酶活力的测定参照 Bailey 等<sup>[8]</sup>的方法:木聚糖酶活力的测定为,0.1 mL 适当稀释的酶液,加入到 0.9 mL(用 0.05 mol/L pH 6.0 柠檬酸缓冲液配制)1% 桦木木聚糖底物中,60°C 反应 10 min,采用 DNS 法<sup>[9]</sup>测定所产生的还原糖量,以木糖作为标准。木聚糖酶的活力单位定义为:在上述反应条件下,每分钟生成 1 μmol 木糖所需要的酶量。甘露聚糖酶活力测定同上,底物改为 0.5%的槐豆胶(Sigma),以甘露糖为标准。甘露聚糖酶活力单位定义为:在上述条件下,每分钟生成 1 μmol 甘露糖所需的酶量。蛋白含量的测定参照 Lowry 等的方法<sup>[10]</sup>,以牛血清白蛋白

白作为标准蛋白。

### 1.6 SDS-PAGE 电泳及酶谱

SDS-PAGE 按照 Laemmli 的方法<sup>[11]</sup>。考马斯亮蓝 R-250 染色。木聚糖酶酶谱分析为正常的 SDS-PAGE 后(电泳胶中含有 0.2%的桦木木聚糖), 将电泳胶取出用 25%的异丙醇溶液浸泡 3 次(20 min/次)使蛋白复性, 然后用缓冲液浸泡 3 次(10 min/次)洗去异丙醇溶液, 最后将电泳胶置于 37°C 条件下保温 20 min, 加入 0.5 g/L 的刚果红溶液染色 30 min, 用 1 mol/L NaCl 溶液脱色直至显现透明带。甘露聚糖酶酶谱同上, 只是将电泳胶中的桦木木聚糖改为

槐豆胶。

## 2 结果与讨论

### 2.1 真菌 CQ31 的鉴定

CQ31 在 PDA 培养基上的菌落形态如图 1A 所示。气生菌丝为白色, 菌落表面呈绒毛状, 后转为絮状, 颜色不变; 无渗出液。反面呈微黄色; 缺乏可溶性色素。菌丝形态见图 1B 所示, 菌丝交织, 并存在较多的球状不成熟的闭囊壳, 后经不同方式培养均未获得子囊孢子, 根据其典型的闭囊壳初步判断其与毛壳属菌株相近。



图 1 在 37°C 下培养 7 d 的单菌株形态(A)和显微镜下的菌丝形态(B) (10×40)

Fig. 1 Cultural characteristics of CQ31 at 37°C for 7 d (A) and images of CQ31 under optical microscope(B) (10×40)

CQ31 的 18S rDNA 的扩增结果显示, 片段长度为 1683 bp, 此序列经由 NCBI 上 Blast 比对结果显示其同毛壳属(*Chaetomium* sp.)相似度高达 99%。在此基础上进一步对 CQ31 的 ITS 片段进行扩增, 结果显示片段长度为 556 bp, 此序列经由 NCBI 上 Blast 比对结果显示其同球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)相似度为 92%, 表明 CQ31 同已报道的毛壳属的其它种之间存在一定的差异, 并可能具有一定的新颖性。由于 CQ31 经不同培养均不产生孢子, 不能进一步对其所属种进行明确鉴定, 故根据菌落形态分析、18S rDNA 及 ITS 比对结果初步判定真菌 CQ31 为 *Chaetomium* sp.。毛壳霉是腐生子囊菌中数量最多和意义较大的类群之一, 是一类重要的真菌资源, 呈世界性分布<sup>[12]</sup>。同时, 毛壳菌的大多数种类都具有较强的降解纤维素的能力。胡晓瑜<sup>[1]</sup>等曾对毛壳菌产木聚糖酶条件进行了研究, 结果显示球毛壳菌利用玉米芯木聚糖进行液体发酵时产酶能力最强,

而毛壳属菌种利用农业废弃物为碳源进行固体发酵产木聚糖酶, 目前国内尚无相关研究的报道。

### 2.2 不同碳源对产木聚糖酶的影响

碳源是微生物生长过程中为微生物提供碳素来源的物质, 微生物利用碳素物质具有选择性。由于木聚糖酶属于诱导酶, 故本实验中选用玉米芯、玉米秆、稻草秆、甘蔗渣、高粱秆、麸皮、蔗皮、玉米苞和花生壳等含有半纤维素的物质作为单一碳源进行固体发酵试验, 不同碳源对产木聚糖酶的影响结果如图 2 所示。玉米秆为碳源菌株发酵产酶水平最高(248 U/g), 高粱秆次之(206 U/g), 其它几种碳源如麸皮、蔗皮、玉米苞和花生壳作为碳源时, 其所产酶活力均低于 50 U/g。因此, 确定玉米秆为最佳碳源。

### 2.3 初始水分含量对产酶的影响

固体发酵过程中, 培养基初始水分含量是关键性因素之一。不同水分含量对产木聚糖酶活性的影

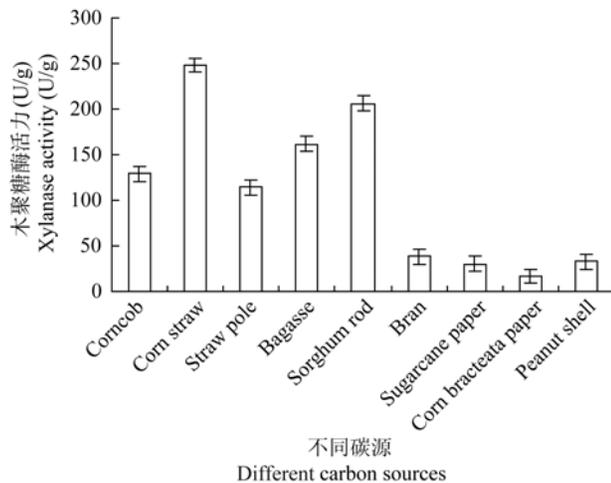


图2 不同种类碳源对毛壳霉 CQ31 产酶的影响  
Fig. 2 Effect of carbon sources on xylanase production by *Chaetomium sp.* CQ31

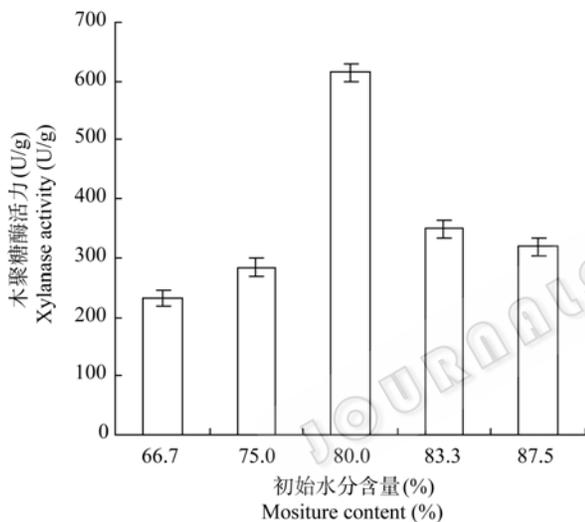


图3 初始水分含量对毛壳霉 CQ31 产木聚糖酶的影响  
Fig. 3 Effect of moisture content on xylanase production by *Chaetomium sp.* CQ31

响如图3所示。当培养基的初始水分含量为80%时,木聚糖酶的产量最高(615 U/g)。许多研究表明固体发酵条件下,初始水分含量高适合大多数真菌生长和产木聚糖酶<sup>[13]</sup>。

#### 2.4 不同氮源对产酶的影响

木聚糖酶的合成受到酶诱导物及酶蛋白质前体的调控,而酶蛋白质的前体主要来自氮源。因此氮源的类型及性质都会影响酶的合成和分泌。从不同的氮源对产酶的影响结果(如表1)可见胰蛋白胨为氮源时,产木聚糖酶活最高为1204 U/g。且有机氮产酶效果明显优于无机氮源,无机氮源中硫酸铵的

表1 不同种类氮源对毛壳霉 CQ31 产木聚糖酶的影响

Table 1 Effect of nitrogen source on xylanase production by *Chaetomium sp.* CQ31

氮源 Nitrogen source	酶活 Xylanase activity (U/g)
Yeast extract	650±34
Tryptone	1204±65
Beef peptone	643±32
Soybean peptone	482±24
CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	502±25
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	157±11
(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>	157±8

产酶量最高,但仅为胰蛋白胨的19%。

#### 2.5 初始 pH 值对产酶的影响

CQ31 在较高的 pH 环境下利于木聚糖酶的合成(图4)。当初始 pH 为 9.0 时, CQ31 固体发酵产木聚糖酶的量达到最大(2815 U/g),即偏碱性的培养条件下更利于木聚糖酶合成。这与蔡敬民<sup>[3]</sup>等报道的黑曲霉 A3 菌株固体发酵产木聚糖酶的情况相反。

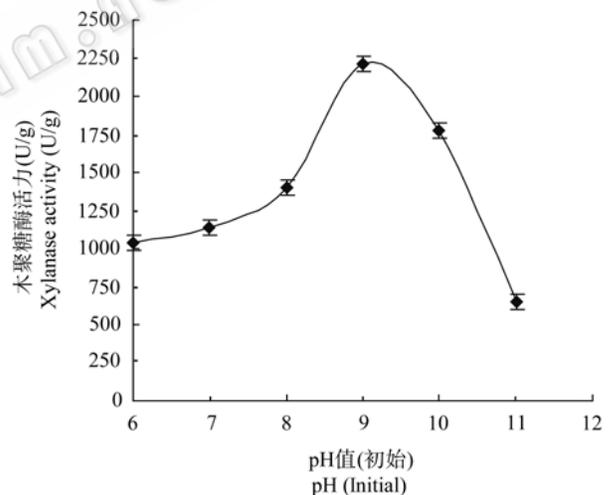


图4 初始 pH 值对毛壳霉 CQ31 固体发酵产木聚糖酶的影响

Fig. 4 Effect of initial pH on xylanase production by *Chaetomium sp.* CQ31

#### 2.6 固体发酵产木聚糖酶的历程

毛壳霉 CQ31 固体发酵的产酶历程如表2所示,第7天的产酶最高达4897 U/g干基碳源。发酵第1天~第3天,菌株分泌出的木聚糖酶很少,从第4天开始分泌的酶量急剧增加,到第5天时,酶活力达到2885 U/g,达到最高产酶量50%以上,6 d、7 d是其产酶的高峰期,第8天酶活力开始下降。同时,在发

酵过程中所产胞外蛋白含量的变化趋势和酶活力的变化趋势相近, 第7天时达到最大 72 mg/g 干基碳源(表 2)。所产胞外蛋白的电泳图及相应的酶谱图(图 5)表明 CQ31 所产的胞外蛋白有 4 条木聚糖酶带, 分子量主要分布在 25.0 kD~37.0 kD 之间, 且随着培养天数的递增蛋白带及对应的酶谱带随之加粗。在真菌产木聚糖酶的研究中, 大多数真菌产多种木聚糖

酶。嗜热真菌 *Melanocarpus albomyces*, *Humicola insolens*, *Myceliophthora* sp. 等产生 2 种或 2 种以上木聚糖酶<sup>[2]</sup>。Paloheimo 等<sup>[14]</sup>在研究中发现嗜热毛壳霉菌可产生 3 种木聚糖酶, 分子量分别为 22 kD、23 kD 和 27 kD, 而本研究中的毛壳霉菌所产木聚糖酶在数量及分子量上均同其存在一定的差异性, 说明 CQ31 所产的木聚糖酶具有一定的新颖性。

表 2 毛壳霉 CQ31 固体发酵产酶历程

Table 2 Effect of incubation time on xylanase and mannanase production by *Chaetomium* sp. CQ31

培养天数 Time(d)	木聚糖酶活 Xylanase activity (U/g)	甘露聚糖酶活 Mannanase activity (U/g)	蛋白含量 Protein content (mg/g)
2	376±19	79±4	17±0.8
3	787±39	176±9	22±1
4	2058±103	352±18	38±2
5	2885±144	542±27	48±2
6	3742±187	676±34	58±3
7	4897±244	803±40	72±4
8	4041±202	650±32	68±3

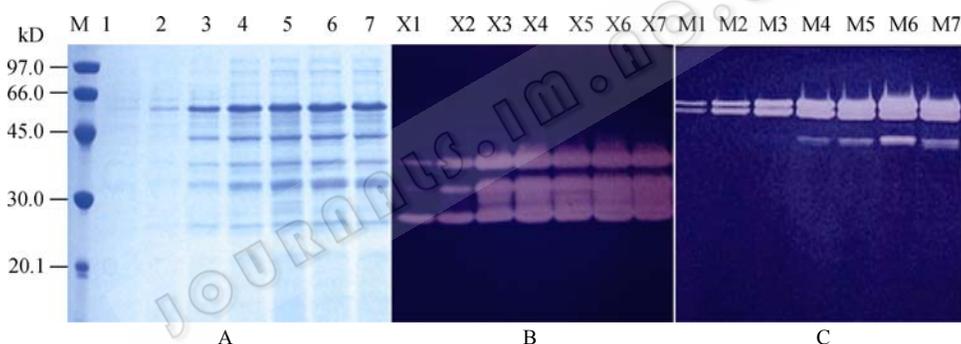


图 5 固体发酵产酶粗酶液的 SDS-PAGE 和木聚糖酶及甘露聚糖酶谱分析

Fig. 5 SDS-PAGE (A) and zymogram (B, C) of the crude enzyme produced by *Chaetomium* sp. CQ31

注: M: 低分子量标准蛋白; 1~7: 第 2 天~8 天的粗酶液; X1~X7: 1~7 对应的木聚糖酶谱分析; M1~M7: 对应的甘露聚糖酶谱分析。

Note: M: Low molecular weight calibration kit; 1~7: 2~8 days, respectively; X1~X7: Xylanase zymogram of the crude culture supernatants after 2-8 days of fermentation; M1~M7: Mannanase zymogram of the crude culture supernatants after 2-8 days of fermentation.

毛壳霉 CQ31 发酵粗酶液的 SDS-PAGE 电泳图中(如图 5-A)在 60 kD 存在主要蛋白带, 故对其不同发酵时间所获的粗酶液测定其它酶活发现该主要蛋白带为甘露聚糖酶。由表 2 可以看出, 随着产酶时间的增加甘露聚糖酶酶活随之增加, 当发酵时间达到 7 d 时甘露聚糖酶酶活达到最高值为 803 U/g 干基碳源, 而其所产胞外蛋白对应的甘露聚糖酶酶谱图(图 5-C 所示)表明 CQ31 固体发酵可以产生 3 条甘露聚糖酶带, 分子量分布在 45 kD~60 kD 之间。由此可见毛壳霉 CQ31 固体发酵所产的胞外蛋白主要为木聚糖酶及甘露聚糖酶, 毛壳霉液体发酵产木聚糖酶已有相关报道, 而已报道的产甘露聚糖酶的真菌主要为曲霉、木霉、酵母、青霉、梭孢菌、多孔菌

及核盘菌<sup>[15]</sup>, 利用毛壳霉发酵产甘露聚糖酶的相关报道目前尚未见到, 且 CQ31 发酵可同时产生两种半纤维素酶对工业化生产具有很强的应用价值。

### 3 结论

从土壤中筛选出的一株中等嗜热真菌 CQ31, 经菌落形态、18S rDNA 及 ITS 鉴定为毛壳霉 CQ31。该菌株能利用农业废弃物固体发酵高产木聚糖酶。固体发酵产木聚糖酶的最适碳源为玉米杆, 通过发酵条件的优化, 产木聚糖酶酶水平最高达 4897 U/g 干基碳源, 同时发现产甘露聚糖酶最高水平也可达 803 U/g 干基碳源, 具有很大的工业化应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] 胡晓瑜, 周文美, 田永峰, 等. 毛壳菌产木聚糖酶条件的研究. 贵州工业大学学报, 自然科学版, 2007, 36(5): 44-48.
- [2] 杨绍青, 闫巧娟, 江正强, 等. 嗜热拟青酶固体发酵产木聚糖酶条件优化. 微生物学通报, 2006, 33(3): 1-6.
- [3] 蔡敬民, 吴克. 黑曲霉 A3 木聚糖酶固体发酵研究. 工业微生物, 1997, 27(2): 1-4.
- [4] 王洪媛, 杨翔华. 青霉菌 FSWY3 固体发酵研究. 抚顺石油学院学报, 2003, 23(1): 19-22.
- [5] 苏移山, 张晓元, 朱希强, 等. 绿色木霉复合木聚糖酶的固体发酵条件优化. 食品与药品, 2007, 9(03A): 5-7.
- [6] Sonia KG, Chadha BS, Saini HS. Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid-state fermentation. *Bioresouce Technology*, 2005, 96(14): 1561-1569.
- [7] 胡学智. 寡糖研究进展. 工业微生物, 1997, 27(1): 30-39.
- [8] Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 1992, 23(3): 257-270.
- [9] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 1959, 31: 426-428.
- [10] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biological Chemistry*, 1951, 193: 265-275.
- [11] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [12] 郭云忠, 孙广宇, 高保卫. 毛壳属真菌的分类研究. 西北林学院报, 2005, 20(1): 132-135.
- [13] Halttich D, Nidetzky B, Kulbe KD, et al. Cellulolytic and hemicellulolytic enzymes of *Sclerotium rolfsii*: Optimization of the culture medium and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. *Bioresouce Technology*, 1994, 58(1): 43-50.
- [14] Paloheimo M, Hakola S. Production in *Trichoderma reesei* of three xylanases from *Chaetomium thermophilum*: a recombinant thermoxylanase for biobleaching of kraft pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76: 377-386.
- [15] 吴襟, 何秉旺. 微生物  $\beta$ -甘露聚糖酶. 微生物通报, 1999, 26(2): 134-136.

## 2009 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
10	全国酶工程会议	中国微生物学会酶工程专业委员会	待定	待定	待定	金城 010-64807425
11	2009年生物过程模型化与控制学术会议	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	9月	100	上海	袁景淇 021-34204055
12	重要人兽共患病研究新进展学术研讨会	中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会	10月 14-18日	200	湖南 衡阳	万康林 010-61739466
13	第七届全国微生物毒素学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	10月	180	重庆	梁华平 023-68757404
14	第三届全国资源生物技术与糖工程学术研讨会	中国微生物学会基础微生物专业委员会	10月	150	山东 济南	李越中 0531-88564288
15	首届全国生物固氮学术研讨会	中国微生物学会农业微生物专业委员会	10月	100	湖北 武汉	李友国, 张志明 027-87281685, 027-87281687
16	2009年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	11月	400	待定	王旭 010-64807200
17	第十二次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物专业委员会	11月	250	湖北 武汉	蒋建东 025-84396348
18	植物线虫的微生物防治研讨会	中国微生物学会农业微生物专业委员会	12月	60	昆明	张克勤 0871-5033790