

产木聚糖酶菌株 JF8 的鉴定及固态发酵条件研究

袁宏伟, 黄俊生

(中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737)

摘要:从采集的土壤中分离得到一株高产木聚糖酶的菌株 JF8, 对该菌株的菌落形态、分生孢子梗及瓶梗着生方式和分生孢子大小等形态学特征进行观察。结果发现, 该菌株与棘胞木霉(*Trichoderma asperellum*)的形态特征极为相似, 初步鉴定该菌株为棘胞木霉。进一步对该菌株的 rDNA-ITS 序列进行克隆并测序, 利用 DNASTar 软件中的 Clustal V 法建立与该菌株 ITS 序列同源性较高的木霉属不同种间的系统发育树, 发现该菌株的 ITS 序列与 Genebank 中已报道的棘胞木霉的 ITS 序列的同源性高达 99.6%, 结合形态特征观察结果, 证实该菌株为棘胞木霉。以蔗渣和麸皮为基质, 先对影响该菌株产木聚糖酶的单个因素进行研究, 而后采用 $L_9(3^4)$ 正交实验对各因素对产酶影响大小进行分析。结果表明, 4 种因素对产酶影响从大到小依次是温度、湿度、初始 pH 和麸皮添加比例, 最佳发酵产酶组合为: 培养温度 28 ℃, 水分添加量 12.5 mL, 初始 pH 值 3, 麸皮添加比例 30%。在此优化条件下静止培养 72 h, 菌株产酶活力可达 $5\,021.1\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 干曲。

关键词:棘胞木霉; ITS; 固态发酵; 木聚糖酶

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672–2043(2008)05–2086–05

Identification and Solid Fermentation Conditions of High Xylanase-Producing Strain JF8

YUAN Hong-wei, HUANG Jun-sheng

(Environmental and Plant Protection Institute of Chinese Academy of Tropical Agriculture Science, Zhanzhou 571737, China)

Abstract: Xylanase is a kind of glucosidase with the ability to hydrolyze β -1, 4 bond of xylanases in an endo-manner, whose hydrolysate are mostly dimer and oligomer of xylose, as well as some xylose and arabinose. More attention has been paid in the last decades to the application of xylanase in saccharification of lignocellulosics, pulp and paper industry, feed industry, xylooligosaccharide preparation and brewing industry. A xylanase-producing strain named JF8 was isolated from the soil sampled from the Jiangfeng Mountain. The strain was cultured on the PDA medium and its mycelium was white at first, and then became green after 48 hours of culture. This strain was found to be similar to *Trichoderma asperellum* based on its morphologic characteristics such as colony, conidiophores, phialides and conidia. The Internal Transcribed Spacer(ITS) sequence of the rDNA of the strain JF8 was amplified, and compared with that of *T. asperellum*. The results showed that these two strains exhibited 99.6% similarity in ITS sequence of rDNA. The strain JF8 was hence identified as *T. asperellum*. Bagasse and wheat bran were used as mediums to study the optimum solid fermentation conditions for the strain JF8. Experiments revealed that the strain JF8 grew best on a culture medium consisting of 3.5 g bagasse, 1.5 g wheat bran and 15 mL H_2O . Under the optimum conditions, the strain JF8 had a high xylanase activity of upto $5\,021.1\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ dry medium when cultured at 28 ℃ for 3 days. All studies showed that this xylanase has a good prospect for its application in industry.

Keywords: *Trichoderma asperellum*; Internal Transcribed Spacer(ITS); solid fermentation; xylanase

木聚糖酶可以将饲料中的非淀粉多糖(NSPS)分解成较小聚合度的低聚木糖, 从而改善饲料性能, 消

除或降低非淀粉多糖在动物肠胃中因粘度较大而引起的抗营养作用^[1]; 同时它可以破坏植物细胞壁的结构, 提高内源性消化酶的活性, 使饲料养分的利用率提高^[2]。另外, 木聚糖酶在造纸、食品和纺织等行业中的应用也较为广泛^[3,4]。因而木聚糖酶的发酵成为国内外学者研究的热点。目前, 利用固态发酵生产木聚糖酶的微生物多为霉菌。国内对黑曲霉、海枣曲霉

收稿日期: 2007–10–11

基金项目: 科技部“国家科技基础条件平台建设资助项目”(2005DKA21201–18); 科技部社会公益研究专项(2005DIB4J043)

作者简介: 袁宏伟(1982—), 男, 硕士, 主要从事应用微生物方面的研究。E-mail: yuananbang@163.com

通讯作者: 黄俊生 E-mail: H888111@126.com

及顶青霉等霉菌产木聚糖酶特性的研究较多。棘胞木霉是我国新记录的木霉种^[5],目前国内尚未见对该菌种开发利用的报道。笔者分离到一株高产木聚糖酶的棘胞木霉菌株,命名为 JF8,并重点对其固态发酵产木聚糖酶的条件进行了研究,为木聚糖酶的工业化生产及其应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

产木聚糖酶菌株 JF8 由本实验室从海南尖峰岭自然保护区野生森林的土壤中分离得到。

1.2 菌株鉴定

1.2.1 形态观察

在 PDA 平板上连续培养 72 h,进行菌落形态观察。同时取少量菌丝和孢子在 NIKON 光学显微镜下观察其个体形态特征。

1.2.2 分子鉴定

真菌基因组 DNA 提取:DNA 提取参考木霉 DNA 提取的方法^[6]。

ITS 序列扩增及分析:采用真菌核糖体 rDNA 区通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增 ITS1 和 ITS2 及 5.8S rDNA 全序列。扩增产物经上海华舜生物工程有限公司 DNA 回收试剂盒回收小片段,回收的 PCR 产物与克隆载体 pMD18-T 连接并送 TaKaRa 公司测序。测序结果与 Genbank 中已知真菌的 ITS 序列进行比对。

1.3 固态发酵产酶条件研究

斜面培养基(PDA):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,

琼脂 20 g,水 1 000 mL。121 ℃灭菌 20 min。用于菌种保存和传代培养。

种子制备:麸皮 10 g,(NH₄)₂SO₄ 1%,水 50 mL,pH 自然,121 ℃灭菌 20 min,冷却后接入孢子,28 ℃振荡培养 48 h。

固体发酵培养条件:称 4 g 蔗渣和 1 g 麸皮装入 250 mL 三角瓶中,按固液质量比 1:3 的比例添加营养液,121 ℃灭菌 30 min,冷却后接入液体种子,28 ℃静止培养 72 h。除特殊培养条件外均按照以上条件培养,每个处理做 3 个平行。营养液配方:(NH₄)₂SO₄ 1%,KH₂PO₄ 0.5%,MgSO₄·7H₂O 0.1%。

1.4 木聚糖酶活力测定

1.4.1 粗酶液制备

每克鲜曲中加 pH 值为 4.5 的柠檬酸缓冲液 100 mL,28 ℃,200 r·min⁻¹ 浸提 1 h,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后,用无菌滤纸过滤,滤液即为粗酶液。

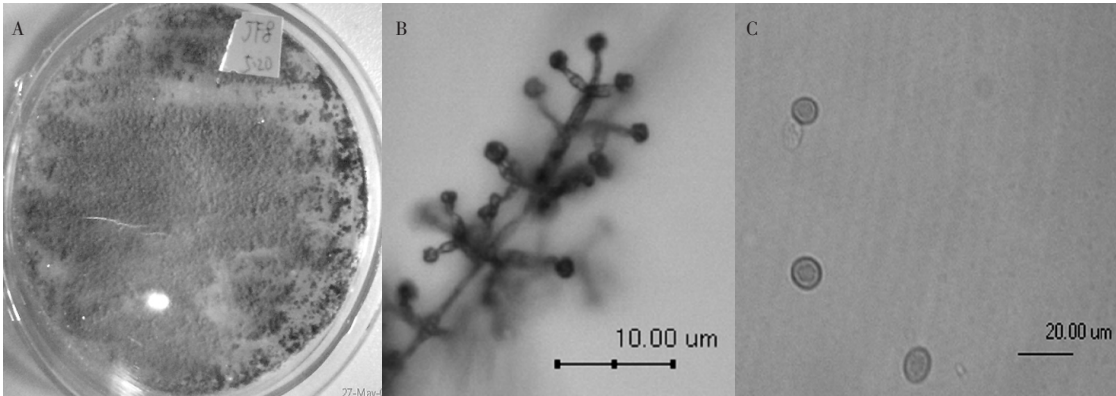
1.4.2 酶活力测定

参照 DNS 法对酶活力进行测定^[7]。
酶活力单位定义:每 min 产生 1 μmol 木糖的酶量为一个酶活单位 U,以 U·g⁻¹ 干曲表示。

2 结果与分析

2.1 JF8 的形态特征

菌丝体在 PDA 培养基上初为纯白色,培养 48 h 后开始变浅绿色,最后变成暗绿色,无气味,无黄色色素渗出到琼脂培养基上,菌落背面不变色,在 10~35 ℃温度范围内均可生长(见图 1-A)。分生孢子梗无延伸丝,成垫状丛束,细长、弯曲,次级分枝对生,顶端有两个以上瓶梗。瓶梗安甌形,常在一级,次级及三级分



A:菌落形态; B:分生孢子梗和瓶梗; C:分生孢子
A.Colony on PDA medium,B. Conidiophores and phialides,C.Conidia

图 1 JF8 的形态特征
Figure 1 Morphologic characteristics of strain JF8

枝上产生,长 6~8 μm ,两个或更多个一组轮生(见图 1-B)。分生孢子球形或近球形,光滑,淡绿色,直径 3~6 μm ,壁上偶见有微细刺状突起(见图 1-C)。与棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)的形态描述极为相似^[8],初步鉴定为棘孢木霉。

2.2 ITS 序列分析

测序结果表明,菌株 JF8 的 ITS 序列长度为 516bp,GC 含量为 55.42%,与章初龙等报道的 6 株 *Trichoderma asperellum* 的 ITS 序列碱基特征基本一致^[9]。将该序列在 GenBank 中登录(登录号为 EU019909)并进行 BLAST 同源性比较,发现与 GenBank 报道的两株棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* (登录号: AY857244 和 AJ849895)的 ITS 序列表现出极高的同源性,与登录号为 AY857244 的菌株的同源性为 99.6%,与登录号为 AJ849895 同源性为 98.6%。分析其碱基序列差异,发现除头部和尾部序列读取碱基的起点和终点位置不同外,三者的序列几乎无差异。结合 JF14 的形态学特征和 rDNA-ITS 序列分析,借助 DNASTar 软件中的 Clustal V 法建立与该菌株 ITS 序列同源性较高的木霉属不同种的系统发育树,结果表明,菌株 JF8 的 ITS 序列与 GenBank 中的 *Trichoderma asperellum* (登录号: AY857244)的遗传距离最近,位于系统发育树的同一分支(见图 2),并与木霉属的其他种有所区别。

2.3 产酶条件研究

2.3.1 发酵时间对产酶的影响

培养基接种后,每隔 24 h 取鲜曲测定酶活。结果如图 3 所示。在接种后的最初 24 h,为菌株生长适应期,产酶活力较低。随后菌株进入对数生长期,酶活力迅速升高。发酵进行至 72 h 时,酶活达到最大值。因

而,后续实验均以 72 h 为最佳产酶时刻。

2.3.2 麸皮添加比例对产酶的影响

麸皮添加比例对产酶的影响见图 4。从图 4 可以看出麸皮添加量为 30%时对产酶最有利。适当添加麸皮能提高木聚糖酶的产量。但添加麸皮过多会使培养基的黏度增大,不利于培养基透气和散热,因而酶活力降低。

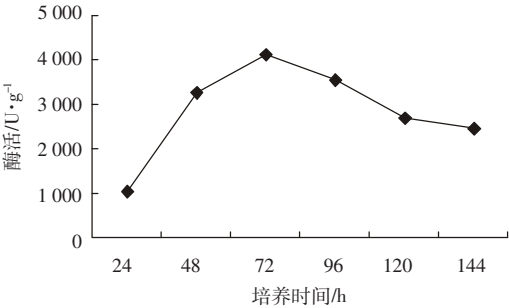


图 3 发酵时间对产酶的影响

Figure 3 Effect of time on xlanase production

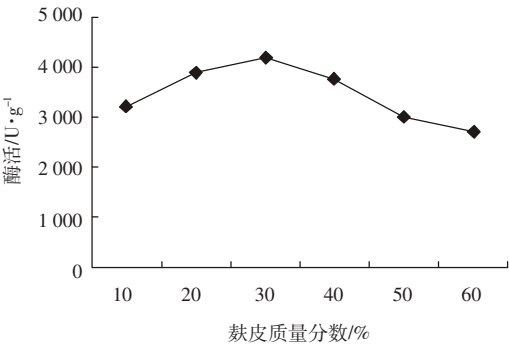


图 4 麸皮添加比例对产酶的影响

Figure 4 Effect of wheat bran on xlanase production

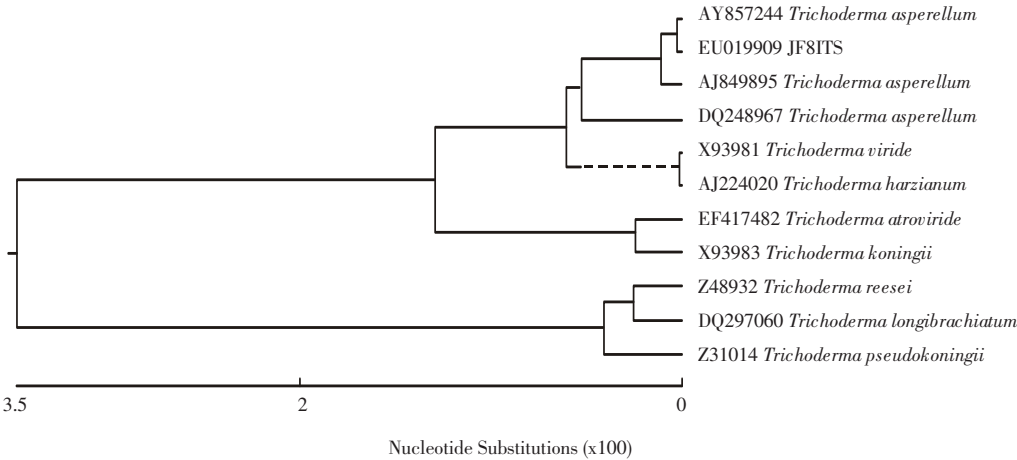


图 2 基于 ITS 序列木霉属种间的系统进化树

Figure 2 Phylogenetic trees based on ITS sequence data from *Trichoderma* SP.

2.3.3 培养温度对产酶的影响

发酵培养基接种后分别放置在不同温度下培养，结果如图 5 所示。从图 5 中可以看出,28 ℃时菌株产木聚糖酶活力最高。当温度高于 30 ℃时,酶活力急剧下降,这与吴克等报道的结果相一致^[10]。

2.3.4 水分添加量对产酶的影响

5 g 干基中分别添加 10~20 mL 水,水分添加量对产酶影响见图 6。可以看出添加 12.5 mL 水对产酶最有利。一定的水分可以促进孢子萌发和菌丝体生长。但水分过多会影响培养基的透气性。

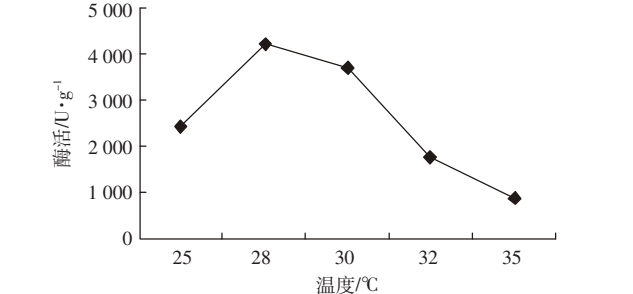


图 5 温度对产酶的影响

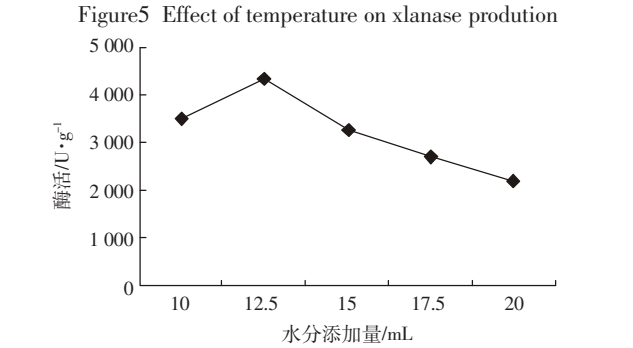


图 6 水分添加量对产酶影响

2.3.5 初始 pH 对产酶的影响

调节营养液的 pH,pH 对产酶影响见图 7。随着 pH 变化,酶活力呈现不规则的变化,pH 值为 5 时,酶活力最高。

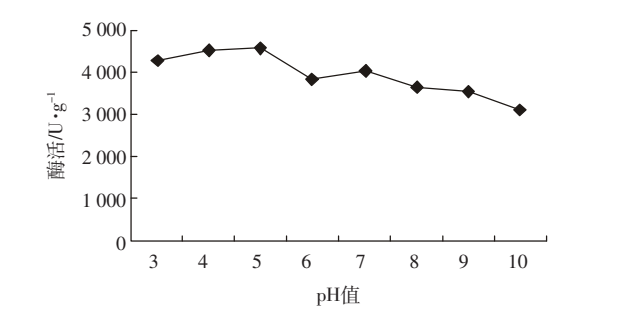


图 7 初始 pH 对产酶的影响

2.3.6 产酶条件优化

根据产酶单因子试验的结果,对影响产酶的主要因素:A 麸皮添比例(%),B 温度(℃),C 水分添加量(mL),D 初始 pH 作正交试验(见表 1),采用 4 因素 3 水平的 L₉(3⁴)正交表,对实验结果的极差进行直观分析,可以看出各因素对产酶影响从大到小依次为:温度、含水量、初始 pH 和麸皮添加量。其最佳组合为:麸皮添加比例 30%、温度 28 ℃、水分添加量 12.5 mL 和初始 pH 为 3。在此优化条件下,最高酶活力可达 5 021.12 U·g⁻¹。

3 讨论

本研究从森林腐土中分离得到一株高产木聚糖酶的棘胞木霉菌株 JF8,并利用固态发酵方法对该菌

表 1 L₉(3⁴)正交实验结果

Table 1 Result of solid fermentation based on 4 factors and 3 level						
实验号	因素				组合	酶活/U·g ⁻¹
	A麸皮/%	B温度/℃	C水分/mL	D/pH		
1	1(20)	1(25)	3(15)	2(4)	A1B1C3D2	2 669.3
2	2(30)	1(25)	1(10)	1(3)	A2B1C1D1	2 563.1
3	3(40)	1(25)	2(12.5)	3(5)	A3B1C2D3	3 073.2
4	1(20)	2(28)	1(10)	3(5)	A1B2C1D3	4 312.6
5	2(30)	2(28)	2(12.5)	1(3)	A2B2C2D1	5 021.1
6	3(40)	2(28)	3(15)	2(4)	A3B2C3D2	4 128.6
7	1(20)	3(30)	2(12.5)	3(5)	A1B3C2D3	4 616.4
8	2(30)	3(30)	1(10)	2(4)	A2B3C1D2	3 769.5
9	3(40)	3(30)	3(15)	1(3)	A3B3C3D1	3 123.0
K1	11 598.3	8 305.6	11 353.7	10 707.3	最佳组合: A2B2C2D1	
K2	11 353.7	13 462.3	12 710.7	10 567.4		
K3	10 324.8	11 508.9	9 920.9	12 002.2		
R	1 273.5	5 156.7	2 789.8	1 434.8		

株产木聚糖酶条件进行研究,结果表明温度和水分是影响菌株产酶的主要因素,水分影响着培养基的透气性和目的产物的合成。温度高低影响到菌丝的生长速度和代谢,同时也对水分的含量产生影响。在优化条件下 JF8 产酶活性可达 $5\,021.1\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,与黑曲霉等其他霉菌菌株相比^[10-12],棘胞木霉产酶活性更高。

本实验采用蔗渣和麸皮作为固态发酵培养基来生产饲料用酶,如能大量应用于工业化生产则能产生巨大的经济效益。在蔗渣培养基上,该菌株除高产木聚糖酶外,还产 CMC 酶、 β -葡萄糖苷酶等纤维素酶组分(未列出),其产酶性质有待进一步研究。

参考文献:

[1] Bedford M R, Classen H L. Reductum of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is affected through changes in carbohydrate composition of intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and feed conversion efficiency of broiler chicks[J]. *Journal Nutrition*,1992, 122:560-569.

[2] Steinfeldt S, Mullertz A, Jensen J F. Enzyme supplementation of wheat-based diets for broilers and effect on growth performance and intestinal viscosity[J]. *Animal Feed Science Technology*, 1998,75:27-43.

[3] 阴春梅,刘 忠.木聚糖酶的性质及其在纸浆漂白中的应用[J].天津造纸,2007,2:19-22.

YIN Chun-mei, LIU Zhong. The character of xylanase and its application on paper bleaching [J]. *Tianjin Paper Making*, 2007,2: 19-22.

[4] 卢 敏,潘 瑞.利用玉米麸皮制取膳食纤维的方法研究[J].粮食与饲料工业,1996, 11:39-40.

LU Min, PAN Rui. Research on making esculent fibre with corn and-bean[J]. *Cereal and Feed Industry*, 1996, 11:39-40.

[5] 章初龙,徐 同.我国河北、浙江、云南及西藏木霉种记述[J].菌物学报,2005,24(2):184-192.

ZHANG Chu-long, XU Tong. Records of *Trichoderma* species from Hebei, Zhejiang,Yunnan and Tibet of China [J]. *Mycosystema*, 2005,24

(2):184-192.

[6] 陈士华,刘昌雄,吴兴泉.绿色木霉 PCR 模板的制备方法研究[J].纤维素科学与技术,2006,14(1):27-30.

CHEN Shi-hua, LIU Chang-xiong, WU Xing-quan. Study on the extraction method of PCR template for *Trichoderma viride* [J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2006,14(1):27-30.

[7] Turunen O, Etuaho K, Fenel F, et al. Combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide-bridge in the α -helix region of *Trichoderma reesei* Endo-1,4- β -xylanase II increases the thermal stability through synergism[J]. *Biotechnol*, 2001,88: 37-46.

[8] Lieckfeldt E, Samuels G J, Nirenberg H I, et al. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*:Is it one or two species[J]. *Appl Env Microbiol*, 1999,65: 2418-2428.

[9] 章初龙,徐 同.*Trichoderma harzianum* 及其近缘种的分子系统学研究[J].生物多样性, 2003,11(1):10-19.

ZHANG Chu-long, XU Tong. Molecular Phylogenetic analysis of *Trichoderma harzianum* and its related species [J]. *Chinese Biodiversity*, 2003,11(1):10-19.

[10] 吴 克,蔡敬民,刘 斌,等.木霉菌株 T6 木聚糖酶固态发酵条件和酶学性质研究[J]. 菌物系统,2001,20(2):161-195.

WU Ke, CAI Jing-min, LIU Bin, et al. *Trichoderma* sp. T6 xylanase production condition in solid state fermentation and the enzyme properties[J]. *Mycosystema*, 2001,20(2):161-195.

[11] 刘月英,郑忠辉,任海霞,等.棒曲霉 UA-2 木聚糖酶的蔗渣固态发酵[J].厦门大学学报(自然科学版),1997,36(2):299-304.

LIU Yue-ying, ZHENG Zhong-hui, REN Hai-xia, et al. Xylanase production on bagasse with solid state fermentation by *Aspergillus clavatus* UA2 [J]. *Journal of Xiamen University (Nature Science)*, 1997,36(2): 299-304.

[12] 高 洁,李军训,肖 军,等.黑曲霉 ASP-12 固态发酵木聚糖酶培养条件研究[J]. 饲料工业,2006,27(6):16-18.

GAO Jie, LI Jun-xun, XIAO Jun, et al. Study on xylanase production by *Aspergillus niger* ASP-12 with solid fermentation[J]. *Feed Industry*, 2006,27(6):16-18.