

产纤维素酶真菌 RX-3 的筛选鉴定及产酶条件优化

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2024.04.010

李 瑄 冉 松
万子艳 刘 洁
吴若彤 曾晓希

湖南工业大学
生命科学与化学学院
湖南 株洲 412007

摘 要: 筛选获得一株高产纤维素酶的真菌并进行产酶优化及酶学性质探究, 可为纤维素酶在废纸造纸中的应用提供参考。利用刚果红鉴定法筛选若干株产纤维素酶的菌株, 以 DNS 显色法测定菌株 CMCase 酶活。选取产酶能力最强即酶活最高的菌株对其进行产酶条件优化。最后, 收集菌株产生的粗酶液探究其酶学特性。实验结果表明: 真菌 RX-3 的产酶能力最强, 经鉴定为曲霉属中的黑曲霉; 真菌 RX-3 的最佳产酶条件是, 麦麸和蛋白胨分别为 RX-3 的碳源和氮源、接种量为 2%、最适 pH 环境为 4。真菌 RX-3 所产纤维素酶的酶学特性是, 最适反应时间为 25 min, 最适反应温度为 50 °C, 底物与酶液最适比为 3:1, Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 对酶活性起促进作用, Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Cu^{2+} 对酶活性起抑制作用。

关键词: 纤维素酶; 真菌; 产酶优化; 酶学性质; 废纸造纸

中图分类号: Q936

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2024)04-0072-09

引文格式: 李 瑄, 冉 松, 万子艳, 等. 产纤维素酶真菌 RX-3 的筛选鉴定及产酶条件优化 [J]. 包装学报, 2024, 16(4): 72-80.

1 研究背景

《中国造纸工业 2023 年度报告》报道^[1], 全年制浆造纸及纸制品全行业生产纸浆、纸、纸板和纸制品合计 29 139 万吨, 同比增长 2.63%。其中生产纸浆 8823 万吨, 较 2022 年增长 2.75%。因固废零进口政策的实施, 我国对进口纸浆和纸制品进行了限制, 这意味着本土固体废物在造纸行业中的需求量上升。用于造纸的本土固体废物主要是旧报纸、旧瓦楞纸、旧杂志、办公废纸为代表的废纸资源。然而, 相较于

麦草^[2]、桔杆^[3]、木材类^[4]等原生纤维资源, 废纸资源因其成分复杂^[5]、废纸纤维性能衰退^[6]、油墨附着^[7]等原因, 往往会出现产品质量过脆、纸张亮度过低、甚至无法成纸的问题。

利用废纸进行造纸的流程包括打浆、添料、除杂、脱墨、筛浆、漂白、过滤、脱水、干燥等过程, 而生物酶在打浆、除杂、脱墨、漂白环节中发挥重要作用。刘晶等^[8]研究发现, 纤维素酶在打浆环节中可促使纤维细胞壁分层脱落, 产生细小纤维, 有利于进行后续的除杂、脱墨和漂白环节。C. A. Mooney 等^[9]研究发现,

收稿日期: 2024-01-04

基金项目: 湖南省重点研发计划基金资助项目 (2023NK2026); 湖南省自然科学基金资助项目 (2022JJ50070, 2023JJ50168); 2023 年国家级大学生创新创业训练计划项目 (S202311535015); 湖南省教育厅科学研究基金资助重点项目 (22A0402)

作者简介: 李 瑄 (1999-), 女, 江西宜春人, 湖南工业大学硕士生, 主要研究方向为环境微生物,

E-mail: lx1214883864@163.com

通信作者: 曾晓希 (1972-), 女, 湖南娄底人, 湖南工业大学教授, 博士, 主要从事微生物选育和环境污染生物修复研究,

E-mail: zengxiaoxi2003@163.com

纤维的长短和粗细对酶的吸附能力具有显著影响。在制浆环节中, 利用纤维素酶将废纸的粗纤维预先处理成细小纤维, 不仅能够提升酶对废纸的降解效率, 还能够提升纸张的抗张强度和光学性能。罗清^[10]利用纤维素酶对马尾松原料纤维进行预处理, 显著提升了纸张强度, 降低了磨浆能耗。同时, 作为一类可针对性降解纤维素链之间糖苷键的综合酶系, 纤维素酶可破坏油墨与纤维表面的连接键, 便于使用洗涤的方式除去废纸上的油墨分子^[11-12]。M. Cicekler 等^[13]利用纤维素酶脱墨, 既提高了脱墨的效率, 又减少了脱墨过程中化学药品的使用, 有利于减少环境污染。

在利用废纸造纸的工艺中, 生物酶的使用不仅能降低生产成本、减少废水中的化学物质, 还可以充分降解纸张纤维, 从而提升纸张的强度、韧性、亮度等性能。因此, 高性能的生物酶有助于提升利用废纸资源造纸的效能, 促进造纸工业的发展并降低环境污染。而生物酶的性能与其生产菌的培养条件密切相关, 此外生物酶的酶学特性对生物酶的活性具有显著影响。刘晓丽等^[14]研究发现, 纤维素酶用于办公废纸脱墨的最佳条件为: 反应温度 55 ℃, 反应时间 60 min, pH 为 8.5, 废纸纸浆的质量分数为 6%, 酶用量为 2 U/g。

本研究通过刚果红鉴定培养基从水稻田腐烂秸秆和周边含有秸秆碎屑的土壤中筛选出一株高产纤维素酶的真菌, 利用 3, 5-二硝基水杨酸 (3, 5-dinitrosalicylic acid, DNS) 法测定其产酶的能力, 并对其产酶条件进行优化, 收集粗酶液探究其酶学特性, 以期纤维素酶在降解造纸材料方面的应用提供参考。

2 实验

2.1 材料

样品来源: 湖南省株洲市郊区水稻田腐烂秸秆和含有秸秆碎屑的周边土壤。

发酵培养基: 麦麸 20 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g、KH₂PO₄ 1 g、NaCl 0.1 g、CaCl₂ 0.1 g、FeCl₃ 0.01 g、去离子水 1000 mL, pH 自然, 121 ℃灭菌 20 min。

马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 马铃薯浸粉 5 g、葡萄糖 20 g、氯霉素 0.1 g、琼脂粉 15 g、去离子水 1000 mL, pH 为 5.8~6.2, 121 ℃灭菌 20 min。

马铃薯葡萄糖肉汤 (potato dextrose broth, PDB) 培养基: 马铃薯浸粉 5 g、葡萄糖 20 g、氯霉素 0.1 g、去离子水 1000 mL, pH 为 5.8~6.2, 121 ℃灭菌 20 min。

刚果红鉴定培养基: KH₂PO₄ 0.5 g、MgSO₄ 0.25 g、羧甲基纤维素钠 (carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na) 2 g、明胶 2 g、刚果红 0.2 g、酵母浸粉 5 g、琼脂 15~20 g、去离子水 1000 mL, pH 自然, 121 ℃灭菌 20 min。

2.2 方法

2.2.1 产纤维素菌株的筛选

富集: 取适量秸秆和含有秸秆碎屑的土壤样品加入以水稻秸秆为唯一碳源的富集培养基中, 于 28 ℃、180 r/min 条件下培养 24~72 h, 获得能水解纤维素的菌株。

初筛: 取富集菌液点接于刚果红鉴定培养基上, 28 ℃培养。能够在刚果红培养基上产生透明圈的菌株, 可初步鉴定为产纤维素酶菌株, 再对筛选出的菌株进行编号并接种于 PDB 培养基中培养, 用于后续实验。

复筛: 对筛选出的菌株测定羧甲基纤维素酶 (carboxymethylcellulase, CMCase) 酶活, 并将随时间变化的酶活数值整理成酶活曲线, 选出酶活最高的菌株作为目的菌株用于后续实验。CMCase 酶活定义如下: 在特定的条件下 1 min 内释放 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酶活单位 (U)。测定方法参照文献 [15]: 取 0.5 mL 的酶液与 1.5 mL 质量分数为 1% 的 CMC-Na 溶液混合, 于 55 ℃下反应 30 min; 再加入 3 mL DNS 溶液并沸水浴 10 min 终止反应; 自然冷却后定容至 10 mL, 震荡均匀后测定其在 540 nm 处的吸光度 (optical density, OD₅₄₀)。将菌株接种至 PDB 培养基, 每 12 h 测定一次 CMCase 酶活。

2.2.2 菌株的鉴定

形态学鉴定: 将筛选所得菌株接种于 PDA 培养基上, 观察菌株的颜色变化、菌丝形态、有无褶皱。

分子学鉴定: 将筛选出的菌株送至上海生工有限公司进行测序, 测序结果在 NCBI 网站上用 BLAST 程序进行分析。用 MEGA7.0.26 构建菌株内部转录间隔区核糖体 RNA (internal transcribed spacer ribosomal RNA, ITS rRNA) 系统发育树进行鉴定。

2.2.3 菌株的产酶条件优化

1) 碳源优化

为了研究菌株发酵产酶的最佳碳源, 分别以麦麸、微晶纤维素、浮小麦、CMC-Na 为唯一碳源, 配制 100 mL 发酵培养基, 接种两颗真菌孢子球 (质量分数为 2%), 在 28 ℃、180 r/min 条件下培养最佳时间, 测定 CMCase 酶活, 酶活数值最高的实验组为最佳碳源。

2) 氮源优化

为了研究菌株发酵产酶的最佳氮源, 分别以蛋白胨、干酪素、酵母浸粉、硝酸铵为唯一氮源, 配制 100 mL 发酵培养基, 接种两颗真菌孢子球 (质量分数为 2%), 在 28 ℃、180 r/min 条件下培养最佳时间, 测定 CMCase 酶活, 酶活数值最高的实验组为最佳氮源。

3) 接种量优化

为了研究菌株发酵产酶的最佳真菌接种量, 以最佳碳源和氮源配制 100 mL 发酵培养基, 分别按质量分数 1%、2%、3%、4% 接种真菌孢子球, 在 28 ℃、180 r/min 条件下培养最佳时间, 测定 CMCase 酶活, 酶活数值最高的实验组为最佳接种量。

4) pH 优化

为了研究菌株发酵产酶的最佳 pH, 以最佳碳源和氮源配制 100 mL 发酵培养基, 以最佳接种量接种真菌孢子球, 设培养基 pH 环境分别为 3、4、5、6、7, 在 28 ℃、180 r/min 条件下培养最佳时间, 测定 CMCase 酶活, 酶活数值最高的实验组为最佳 pH。

2.2.4 RX-3 所产纤维素酶的酶学特性

将发酵培养至酶活最高的菌株培养液 10 000 r/min 下离心 10 min, 收集上清液于锥形瓶中, 保存于 4 ℃冰箱。收集的上清液即为粗酶液。

1) 反应时间

在 1.5 mL 底物中加入 0.5 mL 粗酶液, 保持温度和 pH 不改变的条件下, 设置不同梯度反应时间 (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 min) 为实验组进行反应; 反应结束后, 使用紫外分光光度计测定 CMCase 酶活, 测得酶活数值最高的实验组为最适反应时间。

2) 反应温度

在 1.5 mL 底物中加入 0.5 mL 粗酶液, 不改变 pH, 在最适反应时间下, 设置不同反应温度 (40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 ℃) 为实验组进行反应; 反应结束后, 使用紫外分光光度计测定 CMCase 酶活, 测得酶活数值最高的实验组为最适反应温度。

3) 底物与粗酶液体积比

保持 pH 不改变、在最适反应时间和反应温度条件下, 设置底物与粗酶液不同体积比 (1:1、2:1、3:1、4:1、5:1) 为实验组进行反应; 使用紫外分光光度计测定 CMCase 酶活, 测得酶活数值最高的实验组为最适底物与粗酶液体积比。

4) 重金属离子对 CMCase 酶活的影响

保持 pH 不改变, 在最适的反应时间、反应温度、底物与粗酶液体积比, 向试管中分别加入 1 mol/L 的 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 金属溶液各 1 mL 进行反应。使用紫外分光光度计测定 CMCase 酶活, 探究不同重金属离子对酶活性的影响。

3 结果与分析

3.1 产纤维素酶真菌的筛选与鉴定

3.1.1 真菌筛选

1) 初筛

为了获得能够产纤维素酶的真菌, 利用刚果红鉴定培养基, 初步筛选出 3 株具有明显透明圈的真菌, 将其分别命名为 RX-2、RX-3、RX-6, 其在生长前期和后期的鉴定结果如图 1 所示。

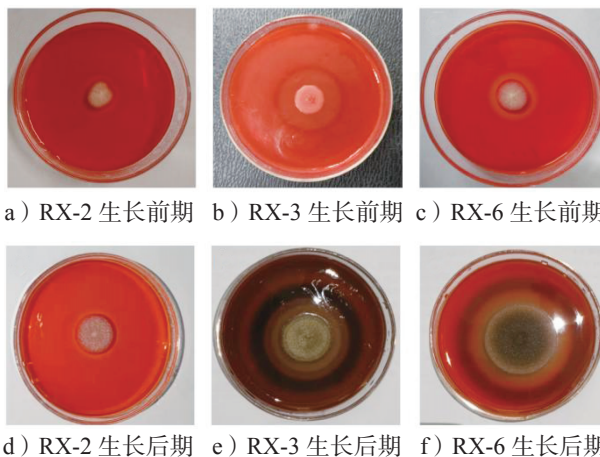


图 1 真菌的刚果红鉴定结果

Fig. 1 Congo red identification results of fungi

由图 1a~c 可知, 在生长前期, 3 株真菌的透明圈圈径和清晰程度均有明显差异。由图 1d~f 可知, 在生长后期, RX-3 和 RX-6 的透明圈均有所扩大, 且不同程度地被真菌产生的色素侵染, 透明度大大降低; 而 RX-2 的透明圈圈径和清晰程度较前期无明显变化。

测量得到的真菌内圈径、外圈径和透明圈径如表

1 所示。为了减小误差保证结果的准确性, 应尽量选择生长圆润的菌体测量圈径。从表 1 可知, 透明圈径由大到小依次是: RX-3、RX-6、RX-2。真菌 RX-3 产生的透明圈径较大。

表 1 真菌的圈径

Table 1 Circle diameter of fungi cm

菌株编号	内圈径	外圈径	透明圈径
RX-2	0.72	1.04	0.32
RX-3	0.77	1.49	0.72
RX-6	0.83	1.34	0.51

2) 复筛

(1) 葡萄糖标准曲线

样品的吸光度 OD_{540} 与其葡萄糖含量之间的关系如图 2 所示。由数据拟合分析可得标准曲线为

$$y=1.743\ 55x-0.185\ 40, R^2=0.998\ 58。$$

根据此标准曲线, 采用紫外分光光度计测得的吸光度 OD_{540} (即 y), 可求出样品中所含葡萄糖的量 G (即 x), 再根据式 (1) 计算得出 CMCase 酶活 (单位为 U/mL)。

$$\text{CMCase 酶活} = G \times N \times 5.56 \div t, \quad (1)$$

式中: G 为吸光度对应的葡萄糖含量, mg;

N 为稀释倍数; t 为反应时间, h;

5.56 为常数, 即 1 mg 葡萄糖的物质的量, μmol 。

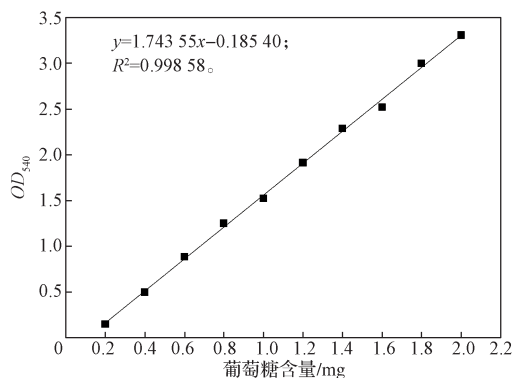


图 2 葡萄糖标准曲线

Fig. 2 Glucose standard curve

(2) CMCase 酶活曲线

为了研究真菌 RX-2、RX-3、RX-6 的产酶能力, 将 3 株真菌的 CMCase 酶活按时间顺序整理成曲线, 结果如图 3 所示。由图可知, 3 株真菌的酶活曲线都呈先上升至最高点再下降的趋势。其中 RX-2 和 RX-3 的最高 CMCase 酶活出现在接种后的第 6 天, 分别为 7.1 U/mL 和 7.9 U/mL; RX-6 的最高

CMCase 酶活出现在接种后的第 7 天, 为 3.7 U/mL。在 CMCase 酶活变化的过程中, RX-3 的 CMCase 酶活一直高于其它两株真菌。由此可知, 3 株菌的 CMCase 酶活由大到小依次是: RX-3、RX-2、RX-6, 真菌 RX-3 的 CMCase 酶活最高。

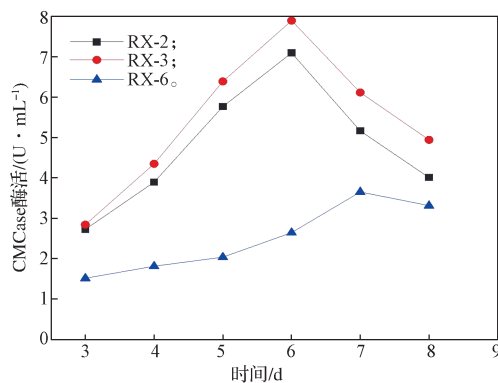


图 3 CMCase 酶活曲线

Fig. 3 CMCase enzyme activity curve

根据以上刚果红鉴定法和 CMCase 酶活测定的结果综合考虑, 真菌 RX-3 所产生的透明圈径最大, 纤维素酶酶活最高, 为 7.9 U/mL。这与李碧婵等^[16]在武夷山森林腐烂枯叶及附近土壤筛选得到的纤维素酶高产菌的酶活 (7.91 U/mL) 相近, 而韦张其等^[17]自白蚁菌圃中筛选得到的 4 株菌中, CMCase 酶活最高为 0.875 U/mL。由此可知, RX-3 的产酶能力较高, 因此选择真菌 RX-3 为后续实验所需的纤维素酶高产菌。

3.1.2 真菌形态学鉴定

为了研究真菌 RX-3 的形态学特征, 将其接种于 PDA 培养基, 结果如图 4 所示。真菌 RX-3 的菌体为乳白色, 背面长有放射状褶皱。在生长前期, 真菌 RX-3 表面长有白色匍匐菌丝, 呈一种放射状的纹路。纹路自菌体边缘向中央排列, 在靠近中心点的位置有一小块平整的区域上长有淡黄色的小颗粒。在生长中期, 菌丝的颜色会逐渐变黑, 菌体表面中心的小颗粒变为黑色。在生长后期, 菌体的形态并无太大改变。



a) 正面

b) 背面

图 4 真菌 RX-3 的形态学结果

Fig. 4 Morphological results of fungus RX-3

3.1.3 真菌分子学鉴定

为了研究真菌 RX-3 的亲源性, 提取真菌的 ITS RNA 进行测序并构建系统发育树, 结果如图 5 所示。通过比较真菌 RX-3 与曲霉属中的黑曲霉、塔宾曲霉、

百岁兰曲霉的同源性, 可知真菌 RX-3 与 *Aspergillus* sp. 的相似率达到 99.82%, 与 *Aspergillus niger* 的相似率为 99.64%, 所以真菌 RX-3 属于曲霉属中的黑曲霉。

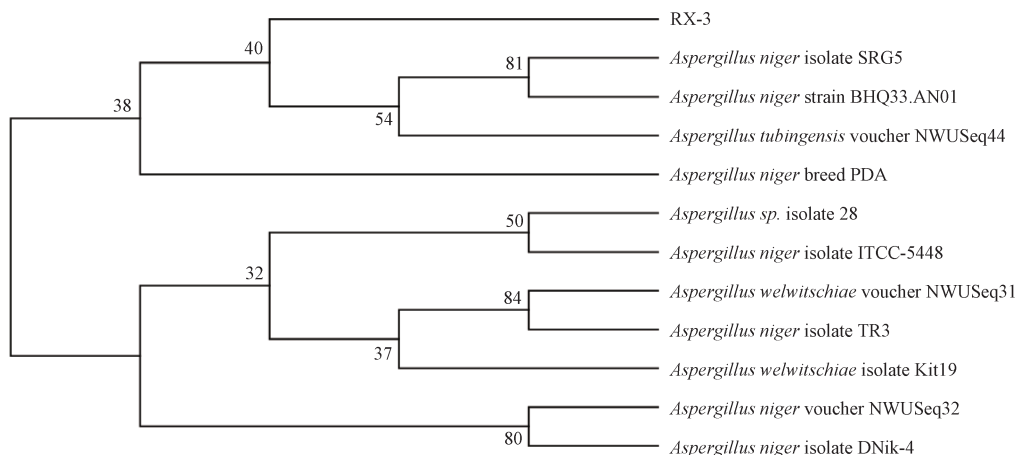


图 5 真菌 RX-3 的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of fungus RX-3

3.2 真菌 RX-3 的产酶条件优化

3.2.1 碳源优化

为了研究不同碳源对真菌 RX-3 产酶的影响, 分别以麦麸、微晶纤维素、CMC-Na、浮小麦为唯一碳源设置实验组, 测得真菌 RX-3 的 CMCase 酶活依次为 7.5, 1.4, 2.4, 4.4 U/mL。显然, 4 种碳源中以麦麸为唯一碳源时, 真菌 RX-3 的 CMCase 酶活最高。因此, 真菌 RX-3 的最佳碳源为麦麸。

本研究中, 最佳碳源下真菌 RX-3 的 CMCase 酶活, 约为文献 [18] 中最佳碳源下 CMCase 酶活 (1.2 U/mL) 的 6.3 倍。

3.2.2 氮源优化

为了研究不同氮源对真菌 RX-3 产酶的影响, 分别以蛋白胨、酵母浸粉、干酪素、硝酸铵为唯一氮源设置实验组, 测得真菌 RX-3 的 CMCase 酶活依次为 6.1, 3.9, 1.6, 3.8 U/mL。显然, 4 种氮源中以蛋白胨为唯一碳源时, 真菌 RX-3 的 CMCase 酶活最高。因此, 真菌 RX-3 的最佳氮源为蛋白胨。

本研究中, 最佳氮源下真菌 RX-3 的 CMCase 酶活, 约为文献 [19] 中最佳氮源下 CMCase 酶活 (1.8 U/mL) 的 3.4 倍。

3.2.3 接种量优化

为了研究不同接种量对真菌 RX-3 产酶的影响, 分别以质量分数 1%, 2%, 3%, 4% 为接种量时进行实

验, 测得真菌 RX-3 的 CMCase 酶活分别为 4.1, 5.2, 4.4, 3.2 U/mL。显然, 接种量为 2% 时真菌 RX-3 的产酶能力最强, 即 2% 为最佳接种量。因为真菌的生长周期较长, 接种量为 1% 时, 真菌的生长缓慢, 产酶能力较弱; 加大接种量可缩短真菌的生长周期, 并在一定程度上促进真菌的产酶; 但接种量过大、生长速度过快, 会导致真菌的生存空间过度挤压, 从而抑制真菌的产酶。因此, 真菌 RX-3 产酶的最适接种量为 2%。

本研究中, 最佳接种量下真菌 RX-3 的 CMCase 酶活, 约为文献 [20] 中最佳接种量下酶活 (2.74 U/mL) 的 1.9 倍。

3.2.4 pH 优化

为了研究不同 pH 对真菌 RX-3 产酶的影响, 以培养基培养环境 pH 分别为 3, 4, 5, 6, 7 时进行实验, 测得真菌 RX-3 的 CMCase 酶活分别为 4.7, 5.7, 4.7, 5.2, 3.1 U/mL。结果表明, 当 $\text{pH} < 7$ 时, CMCase 酶活普遍处于较高的水平, 证明真菌 RX-3 是一种嗜酸性真菌, 酸性环境有利于真菌 RX-3 产酶并稳定酶的活性。环境 $\text{pH}=4$ 时真菌 RX-3 的 CMCase 酶活最高为 5.7 U/mL, 即 $\text{pH}=4$ 为最佳培养环境。

本研究中, 最佳 pH 培养环境下真菌 RX-3 的 CMCase 酶活, 约为文献 [21] 中最佳 pH 培养环境下枯草芽孢杆菌 CMCase 酶活 (1.12 U/mL) 的 5.1 倍。

3.3 RX-3 所产纤维素酶的酶学特性

3.3.1 反应时间

为了研究反应时间对真菌 RX-3 所产纤维素酶酶活的影响, 在反应 20~65 min 时间段内, 每隔 5 min 测定一次 CMCase 酶活, 实验结果如图 6 所示。由图可知: 在 20~30 min 内, 真菌 RX-3 产生的纤维素酶的酶活处于较高的水平。在 20~25 min 内, 酶活呈上升趋势; 自 25 min 之后, 酶活整体呈降低趋势; 在 50~55 min 内, 酶活出现了一波轻微的上涨后持续下降。因此, 25 min 是真菌 RX-3 所产纤维素酶的最佳反应时间, 此时 CMCase 酶活最高, 为 6.82 U/mL。

文献 [22] 中, 在 30 min 最佳反应时间下的酶活为 6.13 U/mL, 略低于本研究的 6.82 U/mL。

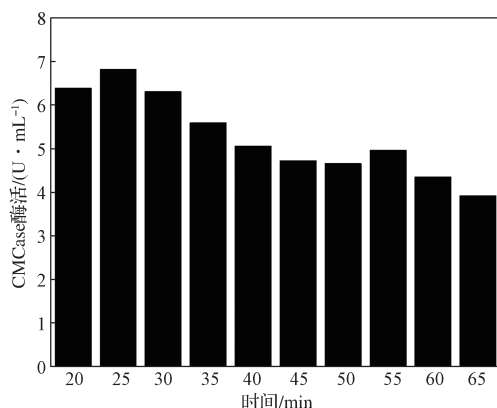


图 6 反应时间对酶活的影响

Fig. 6 Effects of reaction time on enzyme activity

3.3.2 反应温度

为了研究不同的反应温度对真菌 RX-3 所产纤维素酶酶活的影响, 温度在 40~80 °C 范围内, 每隔 5 °C 测定一次 CMCase 酶活, 实验结果如图 7 所示。由图可知: 在温度达到 50 °C 之前, CMCase 酶活随着温度的上升而上升, 反应温度为 50 °C 时, CMCase 酶活最高, 为 7.7 U/mL; 在 50~55 °C 范围内, CMCase 酶活仍保持较高水平; 在 50~65 °C 范围内, CMCase 酶活随着温度的升高而缓慢下降; 虽然在 65~70 °C 范围内, CMCase 酶活略有上升, 但是整体保持下降趋势。因此, 50 °C 是真菌 RX-3 所产纤维素酶的最佳反应温度。不过, 在 55~75 °C 范围内, CMCase 酶活依旧保持在较高水平上, 说明真菌 RX-3 产纤维素酶的热稳定性较强。

文献 [23] 中, 在最佳反应温度 60 °C 下, 测得 CMCase 酶活为 3.11 U/mL, 在 70~80 °C 反应 0.5 h 后, 剩余 CMCase 酶活只有 30%, 说明其 CMCase 酶活

以及其热稳定性不如真菌 RX-3 所产纤维素酶。

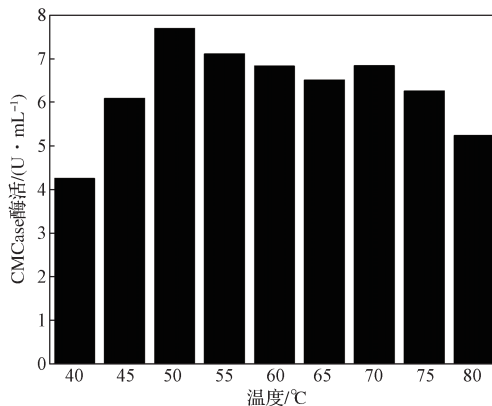


图 7 反应温度对酶活的影响

Fig. 7 Effects of reaction temperature on enzyme activity

3.3.3 底物与粗酶液体积比

为了研究底物与粗酶液的不同体积比对真菌 RX-3 产纤维素酶活的影响, 设定底物与粗酶液不同体积比进行实验, 测定 CMCase 酶活, 结果如图 8 所示。由图可知: 当底物与粗酶液的体积比为 3:1 时, 粗酶液的 CMCase 酶活最高, 为 6.4 U/mL; 随体积比的进一步增大, CMCase 酶活略有下降; 当体积比为 4:1 和 5:1 时, CMCase 酶活基本持平, 说明当底物的体积为粗酶液体积的 4 倍之后, 底物对粗酶液的影响达到饱和。因此, 3:1 是粗酶液反应时的最佳底物与粗酶液体积之比。

文献 [24] 中在最佳底物浓度下, 测得 CMCase 酶活为 2.5 U/mL, 说明其筛选所得产酶菌的产酶性能低于真菌 RX-3 的。

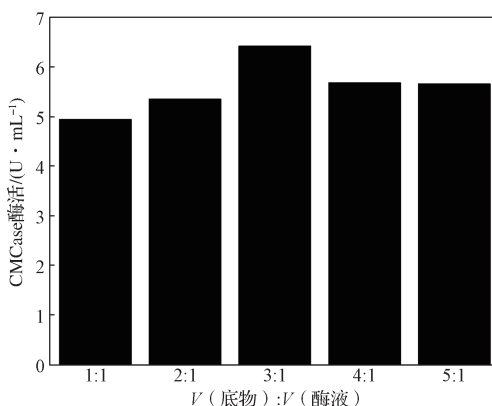


图 8 底物与酶液体积比对酶活的影响

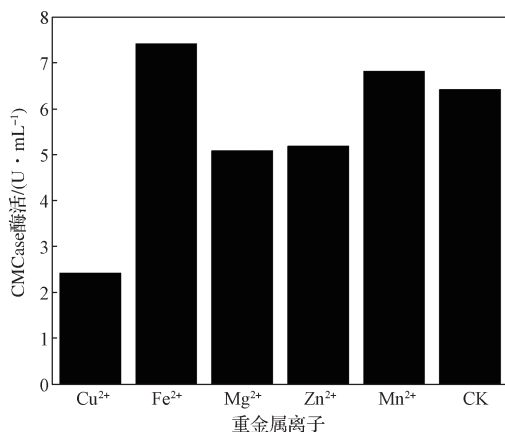
Fig. 8 Effects of substrate to enzyme volume ratio on enzyme activity

3.3.4 重金属离子对 CMCase 酶活的影响

为了研究不同重金属离子对真菌 RX-3 所产纤维

素酶酶活的影响,在测定CMCase酶活时,向不同实验组试管中分别加入1 mol/mL的不同种重金属离子溶液各1 mL,结果如图9所示。由图可知,加入 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 后CMCase酶活比CK组的大,而加入 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 后CMCase酶活比CK组的小。因此, Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 对RX-3所产纤维素酶的活性起促进作用,而 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 起抑制作用。

李明华等^[25]研究发现, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 可提高细菌SP18所产纤维素酶的活性, Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 对纤维素酶活性起抑制作用。结合本研究的结果,说明不同种类金属离子对不同微生物所产的纤维素酶活性的影响不同。



注:CK组为不加重金属离子的对照组。

图9 重金属离子对酶活的影响

Fig. 9 Effects of heavy metal ions on enzyme activity

4 结论

综上所述,可得如下结论:

1) 本文筛选获得的一株高产纤维素酶真菌RX-3,经鉴定得知该菌为曲霉属中的黑曲霉。

2) 对真菌的产酶条件进行优化,可知真菌RX-3的最佳碳源和氮源分别为麦麸和蛋白胨,最佳接种量为2%,最佳pH环境为4。

3) 对真菌RX-3所产纤维素酶的酶学特性进行探究,发现当底物与粗酶液以3:1的体积比,在50℃反应25 min时,菌株所产的纤维素酶的CMCase酶活最高。

4) Fe^{3+} 和 Mn^{2+} 促进真菌RX-3所产纤维素酶的活性,而 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Cu^{2+} 抑制真菌RX-3所产纤维素酶的活性。

本研究筛选分离得到的真菌RX-3具有较强的产

纤维素酶能力,在造纸材料预处理及造纸废料降解等方面具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] 中国造纸协会. 中国造纸工业2023年度报告[R]. 北京: 中国造纸协会, 2023: 1-38.
China Paper Association. 2023 Annual Report of China's Paper Industry[R]. Beijing: China Paper Association, 2023: 1-38.
- [2] 李雪. 麦草氧碱制浆机理的研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2016.
LI Xue. Study on Oxygen-Alkali Pulping Mechanism of Wheat Straw[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2016.
- [3] 卫珊. 小麦秸秆生物机械制浆酶催化机制研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2021: 6-8.
WEI Shan. Study on Enzyme Catalytic Mechanism of Wheat Straw Bio-Mechanical Pulping[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2021.
- [4] 吉玉岱, 程垒垒. 浅谈造纸纤维[J]. 黑龙江造纸, 2020, 48(4): 21-22.
JI Yudai, CHENG Leilei. Discussion on Papermaking Fiber[J]. Heilongjiang Pulp & Paper, 2020, 48(4): 21-22.
- [5] BOUCHARD J, DOUEK M. The Effect of Recycling on the Chemical Properties of Pulps[J]. Journal of Pulp & Paper Science, 1994, 20(5): 131-136.
- [6] NAZHAD M M. Fundamentals of Strength Loss in Recycled Paper[J]. Tappi Journal, 1994, 77: 171-179.
- [7] 陈嘉翔. 油墨粒子的不可逆再沉积对再生浆白度的影响[J]. 中国造纸, 2000, 19(5): 52-58.
CHEN Jiaxiang. Effect of Irreversible Ink Redeposition During Pulping on the Brightness of Recycled Pulp[J]. China Pulp & Paper, 2000, 19(5): 52-58.
- [8] 刘晶, 李晨曦, 刘洪斌. 纤维素酶在造纸过程中的应用[J]. 中国造纸, 2018, 37(2): 48-53.
LIU Jing, LI Chenxi, LIU Hongbin. The Application of Cellulase in Papermaking Process[J]. China Pulp & Paper, 2018, 37(2): 48-53.
- [9] MOONEY C A, MANSFIELD S D, BEATSON R P, et al. The Effect of Fiber Characteristics on Hydrolysis and Cellulase Accessibility to Softwood Substrates[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 25(8/9): 644-650.
- [10] 罗清. 酶预处理对马尾松TMP性能和磨浆能耗的影响及机理研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2013: 24-

35.
LUO Qing. Study on Effects and Mechanism of Enzymatic Pretreatment on the Properties and Refining Energy of Masson Pine TMP[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2013: 24-35.
- [11] IBARRA D, CONCEPCIÓN MONTE M, BLANCO A, et al. Enzymatic Deinking of Secondary Fibers: Cellulases/Hemicellulases Versus Laccase-Mediator System[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(1): 1-9.
- [12] 温志英, 安郁琴, 王双飞. 静电复印纸废纸酶辅助膨化脱墨工艺研究 [J]. 中国造纸, 2009, 28(9): 27-31.
WEN Zhiying, AN Yuqin, WANG Shuangfei. Enzymatic Explosion Deinking of Printed Xerox Paper[J]. China Pulp & Paper, 2009, 28(9): 27-31.
- [13] CICEKLER M, TUTUS A. Effects of Cellulase Enzyme in Deinking of Solvent-Based Inks from Mixed Office Wastes[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2021, 39(2): 152-160.
- [14] 刘晓丽, 邱丙中, 聂爱玲, 等. 混合办公废纸纤维素酶法脱墨工艺研究 [J]. 包装工程, 2018, 39(13): 47-51.
LIU Xiaoli, QIU Bingzhong, NIE Ailing, et al. Deinking Process of Cellulase in Mixed Office Waste Paper[J]. Packaging Engineering, 2018, 39(13): 47-51.
- [15] 孙以新. 产纤维素酶菌株的筛选及其降解秸秆的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
SUN Yixin. Screening of Cellulose-Producing Microorganisms and Degrading of Straw[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.
- [16] 李碧婵, 陈金燕, 苏雅娜, 等. 纤维素酶高产细菌的筛选、鉴定及酶学特性分析 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(17): 4572-4576.
LI Bichan, CHEN Jinyan, SU Yana, et al. Screening and Identification of a Cellulase Producing Bacterium and Its Cellulase Characterization[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(17): 4572-4576.
- [17] 韦张其, 王洁慧, 刘国庆, 等. 白蚁菌圃中产纤维素酶菌株的鉴定与酶活研究 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49(6): 1-4, 9.
WEI Zhangqi, WANG Jiehui, LIU Guoqing, et al. Identification of Strain with Cellulase Activity in Termite Combsare and Study on Enzymatic Activity[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2021, 49(6): 1-4, 9.
- [18] 罗奉奉, 付 跃, 黄秀艳, 等. 一株纤维素酶真菌的筛选鉴定及产酶条件优化 [J]. 中国酿造, 2021, 40(2): 133-139.
LUO Fengfeng, FU Yue, HUANG Xiuyan, et al. Screening and Identification of a Cellulase-Producing Strain and Optimization of Cellulase-Producing Condition[J]. China Brewing, 2021, 40(2): 133-139.
- [19] 崔登雪. 产纤维素酶芽胞杆菌的筛选鉴定及产酶条件优化 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
CUI Dengxue. Screening and Optimization of Fermentation Conditions for Cellulase Production by Bacillus[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017.
- [20] 张华姣, 王永宏, 韩立荣, 等. 枝状枝孢菌 F4-1 液体发酵产纤维素酶及部分酶学性质研究 [J]. 西北农业学报, 2012, 21(9): 149-153.
ZHANG Huajiao, WANG Yonghong, HAN Lirong, et al. Studies on Liquid-State Fermentation and Cellulase Properties of Cladosporium Cladosporioide F4-1[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2012, 21(9): 149-153.
- [21] 郭玲玲, 江志阳, 陶姝宇, 等. 一株耐高温产纤维素酶芽胞杆菌的筛选鉴定及其液体发酵条件优化 [J]. 微生物学杂志, 2022, 42(2): 43-49.
GUO Lingling, JIANG Zhiyang, TAO Shuyu, et al. Screening Characterization and Liquid Fermentation Conditions Optimization of a High Temperature Tolerant Cellulase-Producing Bacillus Strain[J]. Journal of Microbiology, 2022, 42(2): 43-49.
- [22] 周新萍. 产纤维素酶菌株的鉴定、诱变育种、发酵产酶条件及酶学性质研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
ZHOU Xinping. Identification, Mutation Breeding, Fermentation Conditions and Enzymatic Properties of Cellulase-Producing Strains[D]. Nanchang: Nanchang University, 2007.
- [23] 曹平华, 李晓霞, 李 旺, 等. 1 株烟曲霉产耐热纤维素酶发酵条件优化及酶学性质研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(11): 4414-4423.
CAO Pinghua, LI Xiaoxia, LI Wang, et al. Optimization of Fermentation Conditions and Enzymatic Characteristics of the Thermophilic Cellulase from *Aspergillus Fumigatus*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(11): 4414-4423.
- [24] 胡 爽. 青贮饲料中产纤维素酶细菌的筛选、发酵和产酶条件优化及酶学性质初探 [D]. 石河子: 石河子大学, 2008.
HU Shuang. The Preliminary Study on the Isolation and Identification of Cellulose-Producing Bacteria from Silage, Optimization of Cultural Conditions and Enzyme-Producing Conditions and Enzyme Property[D]. Shihezi: Shihezi University, 2008.

[25] 李明华, 孟秀梅, 王成龙. 纤维素酶高产菌筛选鉴定及酶学性质初步研究 [J]. 中国酿造, 2021, 40(8): 134-138.

LI Minghua, MENG Xiumei, WANG Chenglong.
Screening and Identification of High-Producing Cellulose

Strain and Enzymatic Property[J]. China Brewing, 2021, 40(8): 134-138.

(责任编辑: 邓光辉)

Screening, Identification and Optimization of Enzyme Production Conditions of Cellulase-Producing Fungus RX-3

LI Xuan, RAN Song, WAN Ziyang, LIU Jie, WU Ruotong, ZENG Xiaoxi

(College of Life Science and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: A fungus with high yield of cellulase was screened for enzyme production optimization and enzymatic property exploration to provide a reference for the application of cellulase in regenerated papermaking. Several strains producing cellulase were screened by Congo red identification method, and the CMCase activity of the strains was determined by DNS colorimetric method. The strain with the strongest enzyme production ability and the highest enzyme activity was selected to optimize the enzyme production conditions. Finally, the crude enzyme produced by the strain was collected to explore its enzymatic properties. The results showed that the enzyme production ability of fungus RX-3 was the strongest, and it was identified as *Aspergillus sp.*. The optimum enzyme production conditions of fungus RX-3 were as follows: wheat bran and peptone were the carbon source and nitrogen source of RX-3, respectively, the inoculation amount was 2%, and the optimum pH environment was 4. The enzymatic properties of cellulase produced by fungus RX-3 were as follows: the optimum reaction time was 25 min, the optimum reaction temperature was 50 °C, the optimum ratio of substrate to enzyme solution was 3:1, Fe^{2+} and Mn^{2+} promoted the enzyme activity, and Zn^{2+} , Mg^{2+} and Cu^{2+} inhibited the enzyme activity.

Keywords: cellulase; fungus; enzyme production optimization; enzymatic property; regenerated papermaking