



生物技术通报
Biotechnology Bulletin
ISSN 1002-5464, CN 11-2396/Q

《生物技术通报》网络首发论文

题目：烟曲霉 A-16 产纤维素酶工艺优化及酶学特性研究
作者：张开平，刘燕丽，涂绵亮，李继伟，吴文标
DOI：10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-1507
收稿日期：2021-11-28
网络首发日期：2022-05-07
引用格式：张开平，刘燕丽，涂绵亮，李继伟，吴文标. 烟曲霉 A-16 产纤维素酶工艺优化及酶学特性研究[J/OL]. 生物技术通报.
<https://doi.org/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-1507>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

烟曲霉 A-16 产纤维素酶工艺优化及酶学特性研究

张开平¹ 刘燕丽¹ 涂绵亮¹ 李继伟¹ 吴文标²

(1. 百色学院, 百色 533000; 2. 西南大学食品科学学院, 重庆 400716)

摘要： 分离筛选高效降解稻草的菌株，研究菌株产纤维素酶工艺条件及酶学性质。采用刚果红染色法从腐败木质下的土壤中分离筛选到一株产纤维素酶菌株，结合菌株的形态特征和 18S rDNA 序列同源性比较进行鉴定；通过单因素试验和响应面分析法确定菌株最适产酶条件，并对纤维素酶的稳定性进行研究。分离纯化得到的菌株命名为烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus* A-16)；响应面实验结果表明，最优产纤维素酶工艺参数为：稻草粉添加量 7 g/100 mL，pH 6.0，温度 65℃，发酵时间 5 d；在此最优条件下，该菌产生的羧甲基纤维素酶 (CMCase) 和滤纸酶 (FPA) 活力分别为 2 954.76 U/mL 和 1 086.37 U/mL；其总活力较优化前提高了 26.4%。该纤维素酶的适宜反应温度为 70℃，适宜 pH 6.0。在 80℃ 热处理 90 min 条件下酶活力可保持在 80% 以上，说明该酶热稳定性较好。同时，在 pH 5.0–7.0 范围内比较稳定，放置 1 d 后可保持 70% 以上的酶活力。该研究可为利用富含纤维素的生物质原料开发洁净能源及食品级葡萄糖资源提供了基础支撑。

关键词： 烟曲霉；纤维素酶；产酶条件；酶学特性

DOI : 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-1507

Optimization of Producing Cellulase by *Aspergillus fumigatus* A-16 and Its Enzymatic Properties

ZHANG Kai-ping¹ LIU Yan-li¹ TU Mian-liang¹ LI Ji-wei¹ WU Wen-biao²

(1. Baise University, Baise 533000; 2. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716)

Abstract: The aim of this work was to screen efficient straw degradable strains and study their process of cellulase and characteristics. A cellulase-producing strain was isolated from soil under decayed wood using the Congo red staining test, and then was identified through morphological characteristics and 18S rDNA sequence comparisons. The condition of enzyme production was determined by single factor experiment and response surface experiments, and the stability of cellulase was investigated. As results, the isolated strain was named *Aspergillus fumigatus* (*Aspergillus fumigatus* A-16). The response surface test showed that the optimal process parameters of producing cellulase were as follows: straw powder 7 g/100 mL, pH 6.0, fermentation temperature 65℃, and fermentation time 5 d. Under this optimal fermentation conditions, the carboxymethyl cellulase (CACase) and filter paper activities (FPA) was 2954.76 U/mL and 1 086.37 U/mL, and the total enzyme activity was 26.4% higher than that before optimization. The suitable reaction temperature was 70℃ and pH 6.0 of CMCase and FPA. The relative enzyme activity of the enzyme retained at over 80% after being heated for 90 min at 80℃, indicating that it had a good thermal stability. Meanwhile, the relative enzyme activity of the enzyme was stable in the pH 5.0–7.0 and could be remained > 70% after 1 d. This study may provide basic support for exploiting clean energy and food-grade glucose resource by using cellulose-rich biomass as a raw material.

Key words: *Aspergillus fumigatus*; cellulase; condition of producing enzyme; enzymatic properties

收稿日期：2021-11-28

基金项目：广西自然科学基金项目 (2020GXNSFAA297263)

作者简介：张开平，男，硕士，高级实验师，研究方向：发酵工程；E-mail：1453571341@qq.com

通讯作者：吴文标，男，博士，教授，研究方向：食品科学与工程；E-mail：wbwu2006@sina.com

尽管经济在快速发展和社会在不断进步,但是全球仍然面临着能源危机、粮食短缺和环境恶化等严峻挑战,采用适当的生物催化剂将绿色、可持续、可再生且尚未利用的生物质转化为高附加值产品已成为当前国内外关注的焦点^[1]。纤维素是由 β -1,4葡萄糖苷键连接而成的线性多聚糖^[2],是自然界中分布最广^[3]、含量最多、最清洁的可再生资源^[4],具有很高的利用价值^[5]。复杂的结构特征^[6]使纤维素分子的生物降解效率低^[7];目前其大多用于燃烧或直接废弃,这造成了极大的资源浪费和环境污染。如果能通过纤维素酶将纤维素进行高效降解得到可进一步开发利用的产品,则对缓解全球面临的能源与粮食危机、环境污染等问题具有重要的意义。

相对于具有成本昂贵、设备要求严格、产物提取困难和二次污染严重等缺陷^[8]的化学降解法而言,纤维素酶降解法具有反应条件温和、操作简单、糖化率高、成本低、副产物少且无污染等优点^[9-10]。虽然纤维素酶来源广泛(例如细菌、放线菌和丝状真菌均可分泌纤维素酶^[11-13]),但是目前国内外研究最多的是丝状真菌,如木霉属、根霉属、曲霉属等^[14-15]。然而在生产技术上仍然面临纤维素酶活力低、热稳定性差、最适pH范围较窄的难题,这严重限制了其在工业化生产中的应用^[16-18]。

本研究采用刚果红染色法从土壤中筛选出一株性能优良、高产纤维素酶的真菌烟曲霉,对该菌发酵稻草秸秆生产纤维素酶的工艺参数进行了优化,并对所产纤维素酶的特性进行了研究,旨在为纤维素类农业废弃物的开发利用提供有效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 从百色市大王岭自然保护区常年堆积的腐败木质下的土壤中采集土样,保存在4℃冰箱备用。

1.1.2 培养基 参照文献^[19-20],作综合调整。

(1) 富集培养基(g/L): CMC-Na 20.00、 KH_2PO_4 1.00、 Na_2CO_3 0.50、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20、 FeSO_4 0.05、 MnSO_4 0.05、蛋白胨 10.00、牛肉膏 10.00, pH 自然。

(2) 筛选培养基(g/L): CMC-Na 20.00、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20、 KH_2PO_4 1.00、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.00、 FeSO_4 0.05、 MnSO_4 0.05、琼脂 15.00, pH 自然。

(3) 种子培养基(g/L): CMC-Na 20.00、 MnSO_4 0.05、蛋白胨 10.00、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20、 KH_2PO_4 1.00、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.50, pH 自然。

(4) 复筛液体培养基(g/L): CMC-Na 20.00、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20、 KH_2PO_4 1.00、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.00、 FeSO_4 0.05、 MnSO_4 0.05, pH 自然。

(5) 摇瓶发酵培养基(g/L): 稻草粉 5.00、蔗糖 5.00、蛋白胨 10.00、酵母膏 3.00、吐温-80 2.00 mL、 KH_2PO_4 1.00、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20、 MnSO_4 0.05、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.50、 CaCl_2 0.40、 FeSO_4 0.05, pH 自然。

(6) 斜面保藏培养基: PDA 培养基。

1.1.3 主要试剂与仪器 刚果红、3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠等均为国产分析纯,稻草粉(经清洗、干燥、粉碎、过120目筛,待用); ThermoTaq DNA Polymerase (#EP0402) 和 dNTP Mix (R0192) 购至 Thermo 公司, SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (SK8131) 和 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (B518259) 购至上海生工。

DNA 电泳槽 (H6-1), 上海精益有机玻璃制品仪器厂; 稳压电泳仪 (DYY-8), 上海琪特分析仪器有限公司; 电子分析天平 (BS110S), 上海一恒科学仪器有限公司; 显微镜 (YS 100), 日本 Nikon; 紫外可见分光光度计 (UV-2700), 日本岛津; 电热恒温水浴锅 (DK-8D), 上海森信实验仪器有限公司; 凝胶成像仪 (SC850), 上海山富科学仪器有限公司; PCR 仪 (2720 thermal cycler), 美国 Applied Biosystems 公司; 可控恒温摇床 (HZQ-F160), 上海跃进医疗器械厂; 生化培养箱 (SPX-300B), 上海博泰实验设备有限公司; 高速离心机 (YXJ-2), 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 测序仪 (3730XL), 美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 纤维素酶产生菌的筛选 富集培养: 取 5.0 g 土样置于 45 mL 生理盐水中, 加入无菌玻璃珠充分振荡混匀, 用滤纸过滤除去固体杂质得样品液。取每种样品液 1.0 mL 加入盛有 30 mL 富集培养基的 250 mL 锥形瓶中, 置于 45℃、150 r/min 的恒温摇床

中培养 5 d, 得到第一代菌群。取 1.0 mL 一代菌液转入 30 mL 新鲜富集培养基中, 在 45℃、150 r/min 条件下培养 5 d, 得到第二代菌群; 相同条件下重复富集培养 8 轮, 得到热稳定性纤维素酶产生菌群。

初筛培养: 梯度稀释富集后的培养液 10^{-5} – 10^{-7} 倍, 分别取 0.1 mL 涂布于平板筛选培养基, 45℃ 培养 4–5 d 后, 用刚果红染色法^[20] 判断纤维素酶产量, 挑取透明圈较大且生长迅速的菌落划线分离, 直到获得纯培养, 编号, 保存备用。

复筛培养: 将初筛获得的单菌落转接到种子培养基中, 在 45℃、150 r/min 条件下培养 3 d, 制得一级种子液, 然后按 1% 的接种量接入复筛培养基中, 于 45℃、150 r/min 下摇床培养 5 d。

1.2.2 纤维素酶活的测定 粗酶液的制备: 发酵结束后, 发酵液于 12 000 r/min、4℃ 条件下离心 15 min, 收集上清液得粗酶液。葡萄糖含量的测定: 采用 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定。羧甲基纤维素酶 (carboxymethyl cellulase, CMCase) 及滤纸酶 (filter paper activities, FPA) 活性的测定分别参照文献^[3, 21]。酶活力单位的定义: 在 45℃ 条件下, 每分钟催化底物水解释放 1 μ mol 葡萄糖所需要的酶量, 即为 1 个酶活力单位 (U), 以 U/mL 表示。

1.2.3 菌种鉴定 (1) 菌株形态观察: 将目标菌株点种至筛选培养基平板上, 于 45℃ 条件培养 3 d 后, 观察其菌落形态, 结合《真菌鉴定手册》和《中国真菌志》等进行分类鉴定。

(2) 分子鉴定: 从菌株的形态学特征, 初步判断该菌株为真菌。① DNA 提取: 用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取 A-16 菌株基因组 DNA, 置 -20℃ 冰箱保存。② PCR 扩增: 以提取的 DNA 为模板, 选用真菌 18S rDNA 通用引物 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 和 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', PCR 扩增体系和反应条件参照 ThermoTaq DNA Polymerase (#EP0402) 试剂说明书进行, 扩增结束后将 PCR 产物于 4℃ 冰箱保存。③ PCR 产物的检测: 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对扩增的 PCR 产物进行检测。④ PCR 产物纯化: 用上海生工的 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (SK8131) 进行纯化回收。⑤ 测序: 纯化的目的片段与 pMD18-T 载体连接, 然后转化到大肠杆菌 DH5 α

感受态细胞中, 筛选并获得阳性克隆子^[21]。扩增产物交由上海生工生物股份有限公司, 用 BigDyeTr v3.1 Cycle Seq Kit (4336921) 对纯化后的 PCR 产物进行测序。⑥ 构建系统发育进化树: 将测得的 18S rDNA 序列提交 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 选取相似性高的微生物序列, 用 Clustal W 2.0 软件进行多重序列比对, 用 MEGA 7.0 软件中的 N-J 邻接法构建系统进化树。

1.2.4 烟曲霉发酵稻草粉生产纤维素酶条件优化 以 CMCase 和 FPA 酶活力为指标, 依次研究不同产酶条件 [稻草粉添加量 (2、4、6、8、10、12 g/100 mL)、产酶培养基初始 pH (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)、发酵温度 (25℃、35℃、45℃、55℃、65℃、75℃) 和发酵时间 (2、3、4、5、6、7、8 d)] 对纤维素酶活力的影响。在单因素试验基础上, 以稻草粉添加量、初始 pH、发酵温度和发酵时间为变量, 以 CMCase 酶活力为响应值, 设计了 4 因素 3 水平共 29 个试验点的响应面优化试验。

1.2.5 数据分析 每个试验点重复 3 次, 实验数据用 PASW Statistics 18 软件进行单因素方差分析, 多重比较用 LSD 法, 结果以平均值 \pm 标准偏差表示。响应面试验数据用 Design - Expert 10.0 Trial 软件通过 Box-Behnken 组合法进一步优化产酶工艺参数。

1.2.6 纤维素酶酶学特性初步测定 酶反应最适温度及热稳定性: 分别在 30℃–90℃ 条件下测定 CMCase 和 FPA 酶活力, 确定最适反应温度; 其中以酶活力最高时所对应的温度为参照, 设定该温度下的酶活力为相对酶活 100%。然后将酶液分别置于不同温度 (30℃–90℃) 的恒温水浴锅中保温 90 min, 保温结束后快速冷却, 在最适反应温度条件下测定 CMCase 和 FPA 酶的残余酶活; 以未经处理的酶液作对照。

酶反应的最适 pH 和 pH 稳定性: 以不同 pH 的缓冲液 [柠檬酸–柠檬酸钠缓冲液 (pH 3.0–6.0)、磷酸二氢钠–柠檬酸缓冲液 (pH 7.0–8.0)、甘氨酸–NaOH 缓冲液 (pH 9.0–11.0)] 配制 1% CMC-Na 溶液或滤纸条溶液作为反应底物, 在最适反应温度下测定 CMCase 和 FPA 的酶活力, 确定 CMCase 和 FPA 酶的最佳作用 pH, 其中以酶活最高时所加的缓冲液 pH 为标准, 设定该 pH 条件下酶活力为 100%。

然后将酶液与不同 pH (3.0–11.0) 缓冲液等体积混合, 4℃冰箱保存 24 h, 于 45℃保温 2 h, 再将酶液调回到最适 pH 值; 在最适反应温度下测定 CMCase 和 FPA 酶的残余酶活力, 用未经处理的酶液作对照。

2 结果

2.1 产纤维素酶菌株的筛选

对从土壤中初筛得到 20 余菌株进行纯培养, 复选出 D/d 值最大的 8 菌株, 其 CMCase 和 FPA 酶活力见表 1。由表 1 可知, 菌株 A-16 产的 CMCase 和 FPA 酶活力分别为 2516.24 U/mL 和 686.48 U/mL, 总活力均高于其它菌株, 基本可以确定 A-16 菌株产的纤维素酶能力是最强的。因此, 后续试验选择 A-16 菌株作为出发菌株, 开展其发酵稻草粉生产纤维素酶工艺条件研究及对所产纤维素酶的酶学特性进行测定。

表 1 产纤维素酶菌株酶活性

Table 1 Enzymatic activity of the cellulase-producing strains

菌株编号	D/d 值	羧甲基纤维素酶活力	滤纸酶活力
Number of strain	D/d value	CMCase / (U·mL ⁻¹)	FPA / (U·mL ⁻¹)
A-02	5.83 ± 0.66	926.09 ± 65.43	289.41 ± 23.28
A-07	5.65 ± 0.71	757.26 ± 17.55	116.52 ± 16.65
A-10	7.12 ± 0.48	1487.39 ± 85.23	418.14 ± 43.12
A-11	6.64 ± 0.50	1004.58 ± 36.52	396.41 ± 40.33
A-16	9.87 ± 0.42	2516.24 ± 117.41	686.48 ± 43.20
A-19	8.15 ± 0.17	1986.61 ± 123.28	768.87 ± 27.40
A-22	8.41 ± 0.24	2387.40 ± 67.20	718.41 ± 33.11
A-26	7.57 ± 0.30	2060.24 ± 25.64	671.92 ± 40.29

2.2 菌株鉴定

将菌株 A-16 接种到筛选培养基上培养 3 d, 菌落呈绿色, 菌丝体产生大量分生孢子梗, 顶端膨大为近似球形的顶囊, 表面长满单层或双层的小梗; 随着培养时间延长, 菌落变为墨绿色 (图 1); 根据菌落形态及显微镜观察, 再结合《真菌鉴定手册》和《中国真菌志》的对比, 初步判断该菌株是曲霉属真菌。为了进一步确定该菌的类别, 采用通用引物 ITS1、ITS4 对菌株 A-16 基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析, PCR 产物只得到一条在 500–600 bp 之间有明亮的条带, 将 PCR

回收纯化后产物送到上海生工进行测序, 结果得到扩增的 A-16 菌株 ITS 序列片段大小为 569 bp。将测得的 18S rDNA 序列提交 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对 (登录号: MH846230), 挑选其中 5 株模式菌株的 ITS 序列进行同源性分析, 用 MEGA7.0 软件构建系统进化树, 结果见图 2。A-16 菌株的 18S rDNA 序列与 GenBank 数据库中烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) MT529449 在同一个分支上, 亲缘关系最近, 相似性达 99% 以上, 再结合形态特征可以初步鉴定该菌为烟曲霉, 命名为 *Aspergillus fumigatus* A-16。

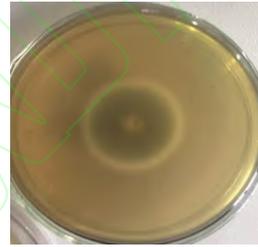


图 1 菌株 A-16 菌落形态

Fig.1 Colony morphology of the strain A-16

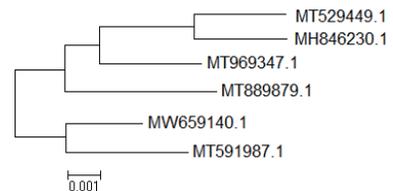
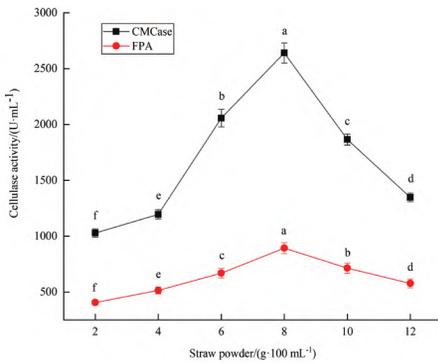


图 2 菌株 A-16 基于 18S rDNA 的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of the strain A-16 based on 18S rDNA

2.3 烟曲霉发酵稻草粉生产纤维素酶单因素试验

2.3.1 稻草粉添加量对纤维素酶活性的影响 由图 3 可知, 随着稻草粉添加量的增加, CMCase 和 FPA 酶活力先上升后下降, 不同稻草粉添加量对纤维素酶活性的影响显著 ($P < 0.05$)。当稻草粉添加量为 8 g/100 mL 时, 纤维素酶活性最强。继续增加稻草粉浓度, 反而降低了介质的孔隙率, 溶氧不足, 菌体生长受限, 使得纤维素酶的活性降低。由多重比较得出, 稻草粉添加量为 8 g/100 mL 时产酶能力 (以所产纤维素酶的活性计) 与其它稻草粉添加量时的相比差异显著 ($P < 0.05$)。因此, 稻草粉添加量为 8



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$); 下同

Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$); The same below

图3 稻草粉添加量对 *A. fumigatus* A-16 菌株纤维素酶活力的影响

Fig.3 Effects of straw powder on the cellulase activity of strain *A. fumigatus* A-16

g/100 mL 时最佳。

2.3.2 pH 对产纤维素酶活性的影响 由图 4 可知, 产酶培养基初始 pH 对 A-16 菌株产纤维素酶活性影响显著 ($P<0.05$)。随着 pH 升高, CMCCase 和 FPA 酶活力变化趋势基本一致, 均呈现先增大后减小。由 LSD 法多重比较可知, 初始 pH 6.0 时, CMCCase 和 FPA 酶活力最高, 且明显高于其它初始 pH 时菌株所产的纤维素酶活力 ($P<0.05$), 说明 *A. fumigatus* A-16 菌株在中性偏酸性条件下能分泌较高的纤维素酶量, 在碱性条件下不利于产酶。因此, 选择最佳培养基初始 pH 为 6.0。

2.3.3 温度对产纤维素酶活性的影响 在其它条件恒定的情况下, 不同发酵温度对产酶的影响见图 5, 菌株 A-16 生长温度较宽且具有较强的耐高温耐受性, 随着温度升高, CMCCase 和 FPA 的酶活力呈现先上升后下降的趋势。当温度过高时, 加快菌体老化, 不利于纤维素酶的代谢积累, 并且酶的稳定性显著下降。当温度为 65℃ 时, CMCCase 活力达到最大值, 为 2714.6 U/mL, 显著高于其它培养温度下的菌株产纤维素酶活力 ($P<0.05$), 是 25℃ 培养条件下酶活力的 1.95 倍。然而, 当温度为 55℃ 时, FPA 的酶活力达到最高, 为 902.8 U/mL, 由 LSD 法多重比较可知, 55℃ 培养条件下产的 FPA 活力较其它培养温度的显著增大 ($P<0.05$)。因此, *A.s fumigatus* A-16 产纤维

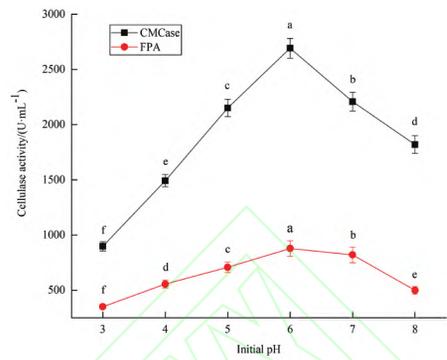


图4 初始 pH 对 *A. fumigatus* A-16 菌株纤维素酶活力的影响

Fig.4 Effects of initial pH on the cellulase activity of strain *A. fumigatus* A-16

素酶的适宜培养温度范围为 55℃-65℃。

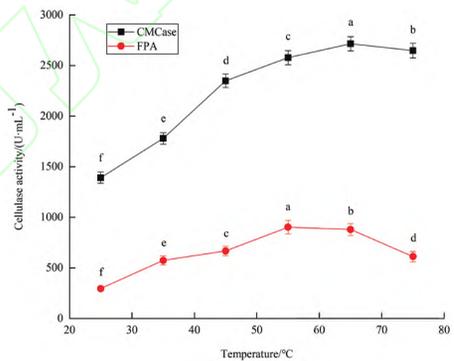


图5 温度对 *A. fumigatus* A-16 菌株纤维素酶活力的影响

Fig.5 Effects of temperature on the cellulase activity of strain *A. fumigatus* A-16

2.3.4 发酵时间对纤维素酶活性的影响 由图 6 可知, 不同发酵时间对 CMCCase 和 FPA 的酶活力有显著影响 ($P<0.05$)。发酵 5 d 时, CMCCase 和 FPA 的酶活力均达到最高, 继续延长培养时间, 营养供应不足, 菌体开始老化, 纤维素酶活缓慢下降。由 LSD 法多重比较可知, 发酵到第 5 天时 FPA 酶活力虽然和第 6-8 天酶活力差异不显著 ($P>0.05$), 但综合考虑时间成本、低耗能等因素, 选择最佳产酶时间为 5 d。

2.4 响应面法优化实验

响应面设计及试验结果见表 2, 方差分析见表 3, 根据回归方程作出不同因子的响应曲面图见图 7。对表 2 实验数据进行二次回归拟合后, 得到回归方

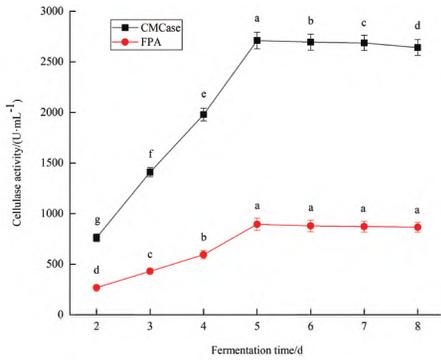


图 6 发酵时间对 *A. fumigatus* A-16 菌株纤维素酶活力的影响

Fig.6 Effects of fermentation time on the cellulase activity of strain *A. fumigatus* A-16

程为： $Y=2916.68-215.88A-40.00B+29.83C-17.42D-9.15AB+50.10AC-56.46AD+154.38BC-59.47BD-35.82CD-301.240A^2-301.57B^2-334.09C^2-254.14D^2$

由表 3 可知，模型极显著 ($P<0.0001$)，模型失拟项不显著 ($P>0.05$)，说明模型选择合适，因此可用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析和预测。模型的可决系数 R^2 为 $0.9058>0.9$ ，说明 90.58% 的 CMCCase 活力的变化可以用该模型来解释。离散系数 (CV) 为 5.30%，其值较低，表明整个试验具有较好的精确性和可靠性，从而也说明该模型拟合度较好。

同时，模型中自变量一次项 A 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对 CMCCase 活力的影响极显著 ($P<0.01$)，BC 对 CMCCase 活力的影响显著 ($P<0.05$)，其它因素交互作用均不显著 ($P>0.05$)。根据 F 值大小可知，各因素对 CMCCase 活力的影响大小为：稻草粉添加量 $>$ pH $>$ 发酵温度 $>$ 发酵时间。对回归方程进行优化，得到最佳发酵条件为：稻草粉添加量 7.28 g/100 mL，pH 5.94，发酵温度 65.03℃，发酵时间 5.01 d。在此条件下预测最大 CMCCase 活力为 2 956.52 U/mL。为了方便实际操作，将最佳发酵工艺参数修正为：稻草粉添加量 7 g/100 mL，pH 6.0，发酵温度 65℃，发酵时间 5 d。为了验证预测值与实际情况是否吻合，进行 3 次重复试验。结果表明 CMCCase 活力平均值为 $2\ 954.76 \pm 2.33$ U/mL，与模型预测值接近，说明该模型具有较高的可信度。

表 2 响应面设计及试验结果

Table 2 Response surface design and test results

试验号 Test No.	稻草粉添加量 Straw powder/ (g·100 mL ⁻¹)	pH	发酵温度/ Fermentation temperature/°C	发酵时间 Fermentation time/d	羧甲基纤维素 酶活力 CMCase / (U·mL ⁻¹)
1	10	6.0	75	5	2063.71 ± 3.15
2	6	5.0	65	5	2531.72 ± 4.86
3	6	6.0	65	6	2657.27 ± 5.22
4	6	7.0	65	5	2513.37 ± 1.82
5	8	7.0	65	6	2086.14 ± 5.44
6	8	5.0	65	6	2447.22 ± 2.18
7	10	5.0	65	5	2073.50 ± 2.97
8	8	7.0	65	4	2413.23 ± 4.92
9	8	6.0	65	5	2888.50 ± 2.83
10	6	6.0	65	4	2481.15 ± 2.24
11	8	6.0	55	6	2370.83 ± 3.01
12	8	6.0	65	5	2954.07 ± 2.16
13	10	7.0	65	5	2018.95 ± 3.68
14	8	7.0	55	5	2004.27 ± 6.20
15	8	5.0	55	5	2274.48 ± 4.97
16	10	6.0	65	6	2168.28 ± 2.94
17	10	6.0	55	5	2075.56 ± 4.99
18	8	7.0	75	5	2635.90 ± 3.13
19	8	6.0	65	5	2951.56 ± 3.51
20	10	6.0	65	4	2217.78 ± 4.23
21	6	6.0	75	5	2406.44 ± 7.46
22	8	6.0	65	5	2898.67 ± 4.35
23	8	5.0	65	4	2536.43 ± 3.79
24	6	6.0	55	5	2618.73 ± 4.34
25	8	6.0	75	6	2267.33 ± 5.75
26	8	5.0	75	5	2288.70 ± 5.14
27	8	6.0	75	4	2298.64 ± 2.95
28	8	6.0	65	5	2820.48 ± 3.77
29	8	6.0	55	4	2258.87 ± 3.49

2.5 菌株A-16产纤维素酶的特性

2.5.1 酶反应最适温度及热稳定性 粗酶液在不同温度条件下测定 CMCCase 和 FPA 酶活力，结果 (图 8-A) 表明，CMCase 和 FPA 酶的适宜反应温度均为 70℃，且在 40℃-80℃ 范围内均有较强的酶活性，仍然保持在 80% 以上，说明所得纤维素酶属于高温酶。将酶液在不同温度条件下分别保温 90 min，然后在 70℃ 下测定 CMCCase 和 FPA 酶的残余酶活力，结果 (图 8-B) 表明，CMCase 和 FPA 酶活

表3 响应面模型及回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance of the response surface model and the regression equations

方差来源 Source	总偏差平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性 Significance
Model	2.224E+006	14	1.589E+005	9.61	<0.0001	**
<i>A</i>	5.593E+005	1	5.593E+005	33.84	<0.0001	**
<i>B</i>	19200.00	1	19200.00	1.16	0.2994	
<i>C</i>	10680.33	1	10680.33	0.65	0.4349	
<i>D</i>	3640.08	1	3640.08	0.22	0.6461	
<i>AB</i>	334.89	1	3640.08	0.02	0.8888	
<i>AC</i>	10040.04	1	10040.04	0.61	0.4487	
<i>AD</i>	12746.41	1	12746.41	0.77	0.3947	
<i>BC</i>	95326.56	1	95326.56	5.77	0.0308	*
<i>BD</i>	14149.10	1	14149.10	0.31	0.5861	
<i>CD</i>	5133.72	1	5133.72	0.86	0.3705	
<i>A</i> ²	5.886E+005	1	5.886E+005	35.61	<0.0001	**
<i>B</i> ²	5.899E+005	1	5.899E+005	35.69	<0.0001	**
<i>C</i> ²	7.240E+005	1	7.240E+005	43.80	<0.0001	**
<i>D</i> ²	4.190E+005	1	4.190E+005	25.35	0.0002	**
残差	2.314E+005	14	16529.14			
失拟项	2.108E+005	10	21083.15	4.10	0.0932	
纯误差	20576.45	4	5144.11			
所有项	2.455E+006	28				

注: $P < 0.05$ 表明模型或考察因素影响显著; $P < 0.01$ 表明影响极显著

Note: $P < 0.05$: Significant influence of the model or examined factors. $P < 0.01$: Extremely significant

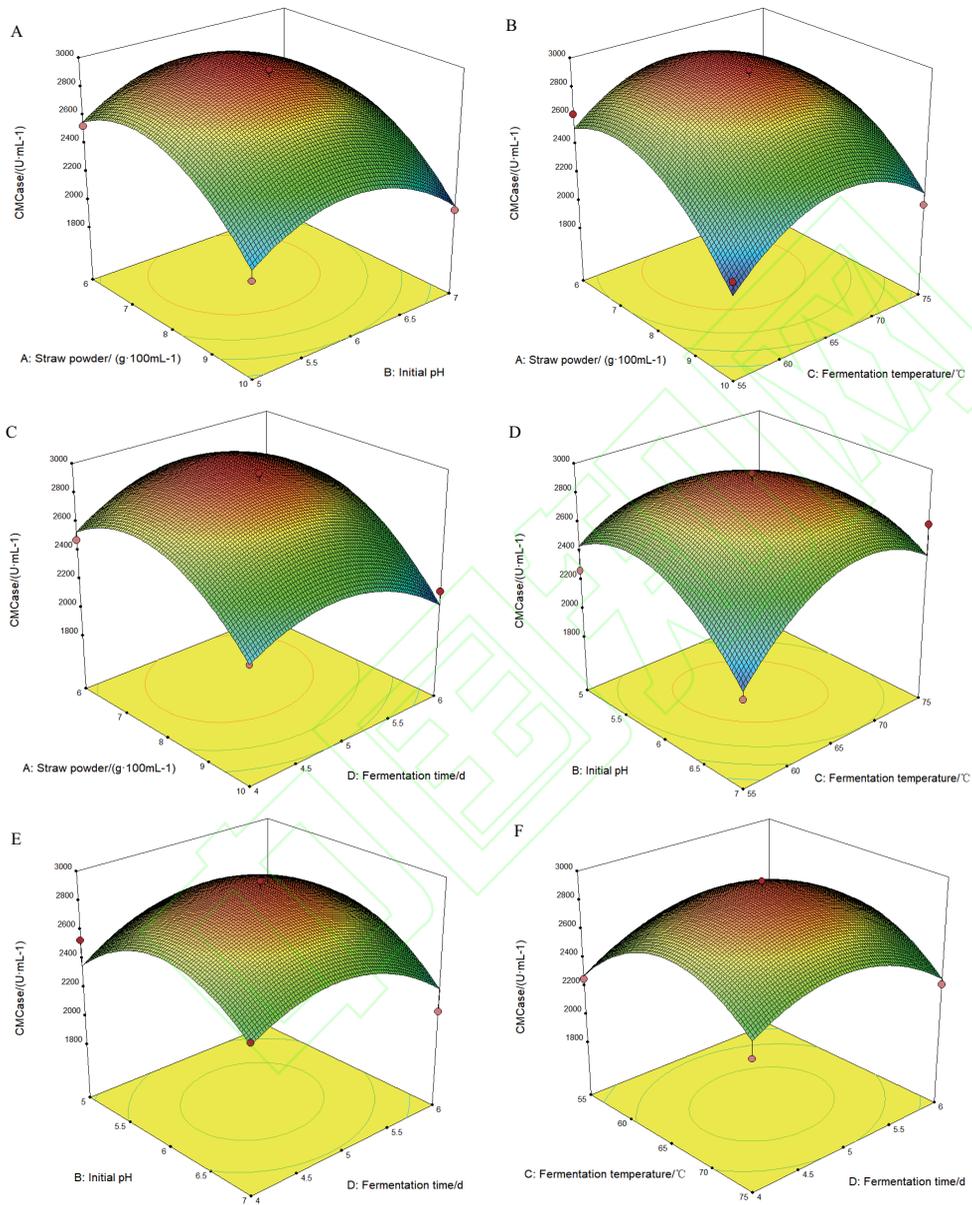
力在 80℃ 之内稳定性较好, 处理 90 min 酶活力还保持在 80% 以上, 继续升高温度至 90℃ 保温 90 min, CMCCase 和 FPA 酶的相对酶活力均保持在 70% 以上。相比较 CMCCase, FPA 的热稳定性更好一些, 90℃ 温度范围内随温度升高酶活力下降比较缓慢, 90℃ 处理 90 min 后, 仍然保持 76.3% 的酶活力, 说明菌株 A-16 所产的纤维素酶具有良好的热稳定性, 具有良好的开发价值。

2.5.2 酶反应的最适 pH 和 pH 稳定性 粗酶液于不同 pH 条件下测定 CMCCase 和 FPA 酶活力, 结果 (图 9-A) 表明, CMCCase 和 FPA 酶的最适反应 pH 均为 6.0, 且在 pH 5.0–8.0 范围内催化分解羧甲基纤维素和滤纸的效率高, 可见菌株 A-16 所产纤维素酶的最佳反应条件为中性偏酸性。pH 稳定性实验结果 (图 9-B) 表明, CMCCase 和 FPA 酶活力在 pH 5.0–7.0 范围内比较稳定, 放置 1 d 后可保持 70% 以上的酶活力, 尤其在 pH 6.0 时, CMCCase 活力可保持 84.6%, FPA

酶活力可保持 86.9%; 若反应体系 pH 低于 5.0 或高于 7.0 时, CMCCase 和 FPA 酶活力快速丧失, 说明该酶是一种中性偏酸性酶, 对 pH 变化比较敏感。

3 讨论

理想的产纤维素酶效率是微生物发酵法具有实际应用价值的关键因素之一^[13, 22]。单因素和响应面优化建立的培养纯化 *A. fumigatus* A-16 的条件组合具备高效生产纤维素酶的能力。本研究所得的优化条件使 *A. fumigatus* A-16 发酵产品的总纤维素酶活力较优化前提高了 26.4%, 优化效果十分明显。以所获产品的纤维素酶活力为考察指标进行比较, *A. fumigatus* A-16 菌株及其培养条件优于已报道的 *A. fumigatus* B-2-3 菌株及其培养条件^[23]。在优化条件下, 与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* DX4)^[24] 和放线菌 (*Streptomyces azureus* T23-B)^[25] 相比, *A. fumigatus* A-16 能得到更高总纤维素酶活力的发酵产品, 菌株产酶活力高了 34.35% 以上。



A : 稻草粉添加量和 pH 交互作用 ; B : 稻草粉添加量和发酵温度交互作用 ; C : 稻草粉添加量和发酵时间交互作用 ; D : pH 和发酵温度交互作用 ; E : pH 和发酵时间交互作用 ; F : 发酵温度和发酵时间交互作用

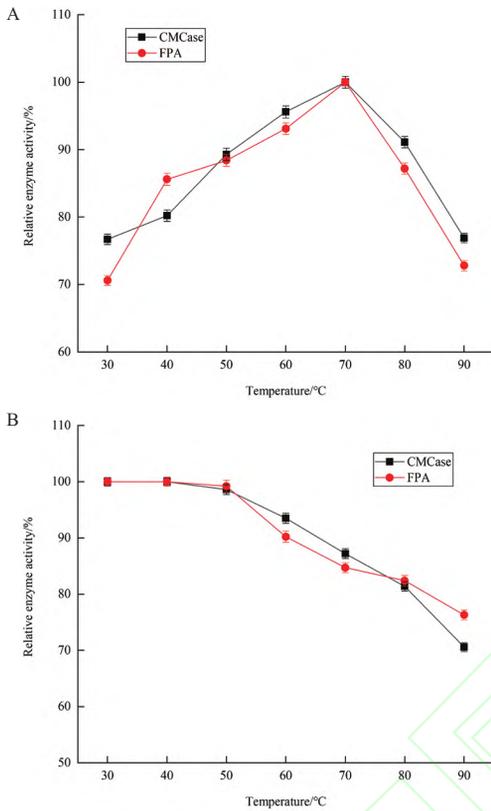
A : Interaction of straw powder and initial pH. B : Interaction of straw powder and fermentation temperature. C : Interaction of straw powder and fermentation time. D : Interaction of pH and fermentation temperature. E : Interaction of pH and fermentation time. F : Interaction of fermentation temperature and fermentation time

图 7 响应曲面图

Fig.7 Response surface diagram

与其它报道的产纤维素酶菌株相比,本研究分离纯化出来的烟曲霉 A-16 所产纤维素酶的活力更高、耐热和耐酸特性更优异,具有潜在的开发价值。在工业生产中,耐高温纤维素酶有助于提高纤维素降解率。目前,已有文献报道了耐高温纤维素酶生

产菌,巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)^[26],嗜热烟曲霉 (*A. fumigatus* JCM 10253)^[20] 芽孢杆菌 (*Bacillus* sp. BSC6-1)^[18],但这些耐高温菌产纤维素酶的最适反应温度为 45℃–60℃,热稳定性在 50℃–70℃,而本研究筛选得到的 *A. fumigatus* A-16 菌株所

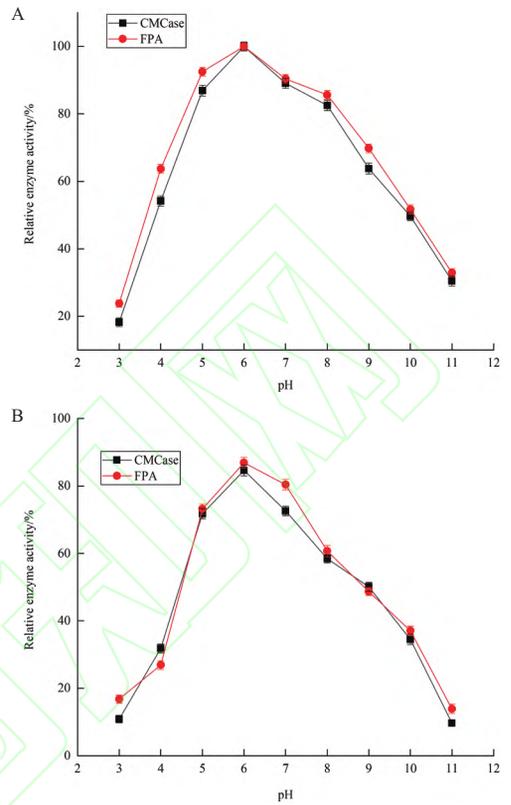


A : CMCase 和 FPA 酶作用最适反应温度 ; B : CMCase 和 FPA 酶的热稳定性
A : Optimal temperature for CMCase and FPA enzymatic activity. B : Thermostabilities of the CMCase and FPA

图 8 菌株 A-16 产纤维素酶作用的最适温度及其热稳定性
Fig.8 Optimal temperature of cellulase activity of strain A-16 and its thermo-stabilities

产 CMCase 和 FPA 酶的适宜反应温度条件为 70℃, 在 80℃ 热处理 90 min, 酶活力还保持在 80% 以上, 其中 FPA 酶在 90℃ 保温 90 min 仍然保持 76.3% 的酶活力。较其它已报道的菌株具有明显优势, 是一株性能优良的耐高温纤维素酶生产菌株。本研究筛选得到的烟曲霉 A-16 与蒋芳等^[27]、金伟等^[28] 筛选出来的耐高温真菌在最适反应温度 (均为 70℃) 上相似, 但其它条件均不相同。同时, *A. fumigatus* A-16 菌株所产 CMCase 和 FPA 酶在 pH 5.0-7.0 范围内稳定性较高, 放置 1 d 后可保持 70% 以上的酶活力。这一温和的 pH 范围有利于生产应用。

本研究建立的培养纯化 *A. fumigatus* A-16 的优化条件组合中, 使用稻草粉为基础培养基。我国有大量的这种原料, 价格低廉, 因此, 生产成本低。



A : CMCase 和 FPA 酶作用最适反应 pH ; B : CMCase 和 FPA 酶的 pH 稳定性

A : Optimal pH for CMCase and FPA enzymatic activity. B : pH stabilities of the CMCase and FPA

图 9 菌株 A-16 产纤维素酶作用的最适 pH 及其 pH 稳定性

Fig. 9 Optimal pH of cellulase activity of strain A-16 and its pH stabilities

同时, 实现废弃物资源化利用目标; 减少资源浪费和环境污染。烟曲霉 A-16 是一株原始野生型菌, 后续研究工作将通过诱变、菌种改良或蛋白质工程技术等现代生物技术手段来构建高效纤维素酶基因工程菌, 优化生产工艺提高纤维素酶产量和增强酶热稳定性, 旨在为耐高温酸性纤维素酶的规模化生产及工业化应用提供优良菌株。

4 结论

本研究从土壤中筛选到一株性能稳定、高产纤维素酶的 *A. fumigatus* A-16。通过响应面分析法优化获得最佳产酶条件: 稻草粉添加量 7 g/100 mL, pH 6.0, 发酵温度 65℃, 发酵时间 5 d, 在最优发酵条件下, CMCase 活力达到 2 954.76 U/mL, FPA 酶活

为 1 086.37 U/mL, 较优化前提高了 26.4%。该菌产纤维素酶的最适反应条件为 70℃, pH 6.0, 具有较强的耐热能力和较好的 pH 稳定性, 可作为耐高温酸性纤维素酶生产的资源菌, 具有纤维素酶制剂规模化生产和纤维素资源开发应用的潜力。

参考文献

- [1] Souii A, Guesmi A, Ouertani R, et al. Carboxymethyl cellulase production by extremotolerant bacteria in low-cost media and application in enzymatic saccharification of *Stevia* biomass [J] . Waste Biomass Valorization, 2020, 11 (5) : 2111-2122.
- [2] Mehboob N, Asad MJ, Asgher M, et al. Exploring thermophilic cellulolytic enzyme production potential of *Aspergillus fumigatus* by the solid-state fermentation of wheat straw [J] . Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172 (7) : 3646-3655.
- [3] Sohail M, Ahmad A, Khan SA. Production of cellulase from *Aspergillus terreus* MS105 on crude and commercially purified substrates [J] . 3 Biotech, 2016, 6 (1) : 103.
- [4] Mahmood RT, Asad MJ, Mehboob N, et al. Production, purification, and characterization of exoglucanase by *Aspergillus fumigatus* [J] . Appl Biochem Biotechnol, 2013, 170 (4) : 895-908.
- [5] Sharma HK, Xu CC, Qin WS. Co-culturing of novel *Bacillus* species isolated from municipal sludge and gut of red wiggler worm for improving CMCase activity [J] . Waste Biomass Valorization, 2020, 11 (5) : 2047-2058.
- [6] Zanirun Z, Bahrin EK, Lai-Yee P, et al. Effect of physical and chemical properties of oil palm empty fruit bunch, decanter cake and sago pith residue on cellulases production by *Trichoderma asperellum* UPM1 and *Aspergillus fumigatus* UPM2 [J] . Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172 (1) : 423-435.
- [7] Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose [J] . Biotechnol Biofuels, 2012, 5 (1) : 45.
- [8] Zhang K, Pei ZJ, Wang DH. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals : a review [J] . Bioresour Technol, 2016, 199 : 21-33.
- [9] Wang D, Sun J, Yu HL, et al. Maximum saccharification of cellulose complex by an enzyme cocktail supplemented with cellulase from newly isolated *Aspergillus fumigatus* ECU0811 [J] . Appl Biochem Biotechnol, 2012, 166 (1) : 176-186.
- [10] 李乐, 李明星, 汤国雄, 等. 一株纤维素酶产生菌的筛选与产酶特性研究 [J] . 环境科技, 2019, 32 (1) : 24-29.
- Li L, Li MX, Tang GX, et al. Optimization of enzyme production conditions for a cellulase-producing strain [J] . Environ Sci Technol, 2019, 32 (1) : 24-29.
- [11] Miao JX, Wang MM, Ma L, et al. Effects of amino acids on the lignocellulose degradation by *Aspergillus fumigatus* Z5 : insights into performance, transcriptional, and proteomic profiles [J] . Biotechnol Biofuels, 2019, 12 : 4.
- [12] Srivastava N, Rawat R, Sharma R, et al. Effect of nickel-cobaltite nanoparticles on production and thermostability of cellulases from newly isolated thermotolerant *Aspergillus fumigatus* NS (class : Eurotiomycetes) [J] . Appl Biochem Biotechnol, 2014, 174 (3) : 1092-1103.
- [13] Islam F, Roy N. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses [J] . BMC Res Notes, 2018, 11 (1) : 445.
- [14] El-Ghonemy DH, Ali TH, El-Bondkly AM, et al. Improvement of *Aspergillus oryzae* NRRL 3484 by mutagenesis and optimization of culture conditions in solid-state fermentation for the hyperproduction of extracellular cellulase [J] . Antonie Van Leeuwenhoek, 2014, 106 (5) : 853-864.
- [15] Grigorevski-Lima AL, da Vinha FNM, Souza DT, et al. *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases [J] . Appl Biochem Biotechnol, 2009, 155 (1/2/3) : 321-329.
- [16] Das A, Paul T, Ghosh P, et al. Kinetic study of a glucose tolerant β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* ABK9 entrapped into alginate beads [J] . Waste Biomass Valorization, 2015, 6 (1) : 53-61.
- [17] Sharma M, Soni R, Nazir A, et al. Evaluation of glycosyl hydrolases in the secretome of *Aspergillus fumigatus* and saccharification of alkali-treated rice straw [J] . Appl Biochem Biotechnol, 2011, 163 (5) : 577-591.
- [18] 于岚, 程芳, 邵文琦, 等. 一株嗜热纤维素酶生产菌的分离、鉴定及酶学研究 [J] . 安徽农业科学, 2013, 41 (17) : 7413-7417.
- Yu L, Cheng F, Shao WQ, et al. Study on isolation, identification and characterization of a thermophilic cellulase-producing strain [J] . J Anhui Agric Sci, 2013, 41 (17) : 7413-7417.
- [19] Lin CY, Shen ZC, Qin WS. Characterization of xylanase and

- cellulase produced by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* N2 and its efficient saccharification of barley straw [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2017, 182 (2): 559-569.
- [20] Saroj P, Manasa P, Narasimhulu K. Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation [J]. *Bioresour Bioprocess*, 2018, 5: 31.
- [21] 谢洁, 商必志, 任慧爽, 等. 一株纤维素酶产生菌 *B. cereus* JYMB2 菌株的筛选鉴定 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2016, 38 (5): 45-51.
- Xie J, Shang BZ, Ren HS, et al. Screening and identification of a cellulase-producing strain of *Bacillus cereus*-JYMB2 [J]. *J Southwest Univ Nat Sci Ed*, 2016, 38 (5): 45-51.
- [22] 马振刚, 熊亮, 张真, 等. 高产碱性纤维素酶细菌的筛选鉴定及其酶学特性与发酵条件研究 [J]. *南方农业学报*, 2021, 52 (3): 722-731.
- Ma ZG, Xiong L, Zhang Z, et al. Screening and identification of a strain with high yield of alkaline cellulase and its enzyme characterizations and fermentation conditions [J]. *J South Agric*, 2021, 52 (3): 722-731.
- [23] 魏姣, 万学瑞, 吴润, 等. 产纤维素酶真菌菌株的分离筛选及产酶条件优化 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2016, 51 (2): 8-15.
- Wei J, Wan XR, Wu R, et al. Isolation and screening of fungi strains producing cellulase and optimization of conditions for enzyme production [J]. *J Gansu Agric Univ*, 2016, 51 (2): 8-15.
- [24] 何楠, 令利军, 冯蕾, 等. 1 株产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及生长特性 [J]. *微生物学杂志*, 2017, 37 (1): 43-49.
- He N, Ling LJ, Feng L, et al. Isolation, identification and growth characteristics of a cellulase-producing bacterium [J]. *J Microbiol*, 2017, 37 (1): 43-49.
- [25] 李婷, 王玥, 刘中珊, 等. 一株降解纤维素的低温放线菌 *Streptomyces azureus* 及产酶条件优化 [J]. *中国农学通报*, 2021, 37 (32): 25-33.
- Li T, Wang Y, Liu ZS, et al. A novel low temperature cellulose-degrading strain *Streptomyces azureus* and its enzymatic production condition optimization [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2021, 37 (32): 25-33.
- [26] 赵龙妹, 陈林, 杜东晓, 等. 产纤维素酶细菌的筛选鉴定与特性分析 [J]. *中国农学通报*, 2021, 37 (30): 83-88.
- Zhao LM, Chen L, Du DX, et al. Screening, identification and characteristic analysis of cellulase-producing bacteria [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2021, 37 (30): 83-88.
- [27] 蒋芳, 刘松青, 甄阳光, 等. 一株产高温纤维素酶菌株的分离筛选 [J]. *纤维素科学与技术*, 2015, 23 (2): 50-54.
- Jiang F, Liu SQ, Zhen YG, et al. Isolation and screening of a thermophilic cellulase bacterial strain [J]. *J Cellul Sci Technol*, 2015, 23 (2): 50-54.
- [28] 金伟, 陈文静, 缪礼鸿, 等. 1 株耐热纤维素酶产生菌的筛选及其酶学特性 [J]. *江苏农业科学*, 2017, 45 (20): 272-274.
- Jin W, Chen WJ, Miao LH, et al. Screening of a heat-resistant cellulase-producing strain and enzymatic specificity [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2017, 45 (20): 272-274.

(责任编辑 张婷婷)