

一株产阿魏酸酯酶青霉菌株的筛选、 鉴定及生长特征

李夏兰¹ 胡雪松¹ 范韵敏¹ 方柏山^{1,2*}

(1. 华侨大学 福建省高校工业生物技术重点实验室 福建 厦门 361021)
(2. 厦门大学 化学化工学院化学工程与生物工程系 福建 厦门 361005)

摘要: 从腐烂的木质纤维中筛选了一株产阿魏酸酯酶的菌株 HDFE1, 根据其形态特征、rDNA ITS1-5.8S-ITS2 序列及系统发育分析, 鉴定菌株 HDFE1 为青霉属的橘青霉(*Penicillium citrinum* Thom)。菌株 HDFE1 最适生长温度为 30°C, 最适生长 pH 为 6.0。该菌株在 30°C、pH 6.0、200 r/min 培养 60 h 时, 阿魏酸酯酶活力为最高, 达 20.75 U/L。

关键词: rDNA ITS1-5.8S-ITS2 区, 阿魏酸酯酶, 鉴定, 生长特性

Isolation, Identification and Growth Characteristics of a Penicillium Strain Producing Feruloyl Esterases

LI Xia-Lan¹ HU Xue-Song¹ FAN Yun-Min¹ FANG Bai-Shan^{1,2*}

(1. Key Industry Biotechnology Laboratory of Fujian Province, HuaQiao University, Xiamen, Fujian 361021, China)
(2. Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: The strain HDFE1, producing feruloyl esterases, was isolated from rotten wood fiber. It was identified as *Penicillium citrinum* Thom by study of morphology and rDNA ITS1-5.8S-ITS2 sequence and phylogenetic analysis. The optimum conditions for its growth were pH 6.0 and 30°C. At 30°C, pH 6.0, and 200 r/min for 60 h, the strain could produce feruloyl esterases at a yield 25 of 20.75 U/L.

Keywords: Feruloyl esterases, rDNA ITS1-5.8S-ITS2, Identification, Growth characteristics

阿魏酸酯酶(FEA, EC 3.1.1.73)是羧酸酯水解酶的一个亚类, 属胞外酶, 其主要生物功能是水解多糖与阿魏酸(FA)连结的酯键。1987年 Mackenzie 等人首次从橄榄色链霉菌发现阿魏酸酯酶, 至今已分离纯化得到 30 多种阿魏酸酯酶。目前产酶的真菌主要有黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、嗜热侧孢霉(*Sporotrichum*

thermophile)、黄柄曲霉(*Aspergillus flavipes*)、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)、塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*)、青霉类(*Penicillium*)等; 细菌主要有荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvent*)、嗜酸乳酸杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、粪堆梭菌(*Clostridium stercorearium*)、热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*); 放线菌有链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)^[1-2]。各种微生物分泌的

阿魏酸酯酶在氨基酸序列、肽链结构、物化性质和催化特性上都有所不同^[3]。阿魏酸酯酶在木质纤维的降解中起着重要的作用^[3-4]。

国内已开展了阿魏酸酯酶的菌种筛选、发酵及应用等研究工作^[5-8]。本文报道了一株产阿魏酸酯酶的菌株筛选,对其进行了形态鉴定和 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 系统发育分析,并探讨了该菌株的生长特性。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

Fungi Identification PCR Kit, 日本 TaKaRa 公司; 反式阿魏酸标准品美国 Sigma 公司; 其他常规试剂均为国产或进口分析纯。麦糟, 福建泉州雪花啤酒厂提供。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基及培养条件: 固体培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基, 30°C 培养。液体培养基: PDA 培养基, 不加琼脂, 装液量为 150 mL 三角瓶 30 mL, pH 自然, 30°C、200 r/min 培养。初筛培养基(%): PDA 培养基, 麦糟 1.0, 不加琼脂, 装液量为 150 mL 三角瓶 30 mL, pH 自然, 30°C、200 r/min 培养。复筛培养基^[9](发酵培养基)(%): KH₂PO₄ 0.1, Na₂HPO₄·12H₂O 0.4, NaCl 0.02, MgSO₄·7H₂O 0.02, CaCl₂ 0.005, 酵母粉 0.6, 麦糟 6.0; 装液量为 250 mL 三角瓶 50 mL, 初始 pH 6.0, 接种量 5% (V/V), 30°C、200 r/min 培养。鉴定培养基^[10]: 查氏酵母膏琼脂(CYA)培养基, 查氏琼脂(CA)培养基。

1.2.2 菌种筛选: (1) 采样: 样品取自福建泉州周边含有腐烂木质纤维的土壤。(2) 富集培养: 将所取样品配制成 0.1 g/mL 溶液, 用玻璃珠振荡, 脱脂棉过滤, 吸取 5 mL 过滤后的样品溶液于 PDA 液体培养基中进行富集培养。(3) 初筛: 采用梯度稀释法分离。将稀释液涂布于 PDA 平板培养基上培养, 待长出菌落 1-2 d 后, 挑选单菌落划线再次转接到 PDA 平板培养基上, 培养 168 h。将分离的纯化菌株接种于初筛培养基中, 培养基中的菌体终浓度控制为 6×10^7 cells/mL 左右。每 24 h 分光光度法测定各菌株阿魏酸的释放量。(4) 复筛: 将初筛中释放阿魏酸量高的菌株, 接种于复筛培养基, 培养 168 h, 每 24 h HPLC 法测定阿魏酸酯酶酶活。筛选到的菌株接种到 PDA 固体斜面培养基, 保存于 4°C 冰箱中。

1.2.3 阿魏酸的测定: (1) 分光光度法^[11]: 取 1 mL 样品液, 加 4 mL 无水乙醇混匀, 4000 r/min 离心 20 min, 测定 318 nm 吸光度。空白对照为 1 mL 无菌培养基加 4 mL 无水乙醇离心后的上清液。(2) HPLC 法^[11]: 样品液于 8000 r/min 离心 20 min 后取上清液 500 μ L, 加入 1.0 mL 50% 的甲醇于 10000 r/min 离心 15 min。色谱条件: 检测波长 318 nm, 柱温为 30°C, 流动相为甲醇:水:冰乙酸 = 30:69.5:0.5 (V/V/V), 流速为 0.9 mL/min, 进样量为 20 μ L。

1.2.4 阿魏酸酯酶酶活测定: 取 250 μ L 酶液, 加入 250 μ L, pH 6.0 Na₂HPO₄-C₆H₈O₇ 缓冲溶液配制的阿魏酸甲酯溶液, 在 50°C 反应 10 min 后加入 500 μ L 10% 冰乙酸(V/V), 4°C、10000 r/min 离心 20 min, HPLC 法测定阿魏酸含量^[12]。空白对照为煮沸失活的酶液。在 50°C、pH 6.0 条件下, 每分钟酯解阿魏酸甲酯, 生成 1 μ mol 阿魏酸所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.5 菌种形态观察: 将纯化的菌株在鉴定培养基上培养, 观察菌落外观形态, 菌丝生长情况, 显微镜或扫描电镜观察菌丝体、分生孢子等。

1.2.6 菌株的分子鉴定: 菌种 HDFE1 斜面孢子接种于 PDA 液体培养基中, 培养 72 h, 收集菌丝体, 按照文献[13]的液氮研磨法提取基因组 DNA, 用 Fungi Identification PCR Kit 进行 PCR 扩增菌株 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 区。采用 ITS 通用引物: ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 扩增程序: 94°C 5 min; 95°C 0.5 min, 55°C 0.5 min, 72°C 1.5 min, 35 个循环; 72°C 5 min。送北京英茂盛业生物科技有限公司纯化后测序。

用 DNASTar 软件分析测序结果, 并将序列与 GenBank 中的 15 株其他真菌的 ITS 序列进行比对, 系统发育树用 MEGA 3.0 软件构建。

1.2.7 菌株生长曲线的测定: 将纯化的菌株斜面孢子接种于 PDA 液体培养基中, 培养 108 h, 每隔 12 h 取 20 mL 发酵液, 过滤收集菌丝, 洗涤, 100°C 烘干至恒重, 测菌丝重量。以培养时间为横坐标, 菌丝干重为纵坐标, 绘制菌株的生长曲线。

1.2.8 菌株的生长特征: 将纯化的菌株斜面孢子接种于 PDA 液体培养基中, 培养 72 h, 分别做初始 pH 值、温度对菌株生长的影响单因子实验。测定发酵液中的干重, 判断菌体的生长情况。

1.2.9 菌株发酵过程阿魏酸、阿魏酸酯酶的变化: 将纯化的菌株斜面孢子接种于 PDA 液体培养基中, 培养 60 h, 取一定体积的菌悬液(约 5.4×10^5 cells/mL) 接种到发酵培养基中振荡培养 168 h, 每隔 12 h 或 24 h 取样, 测定发酵过程中阿魏酸及阿魏酸酯酶变化情况。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

2.1.1 菌株的筛选及分离: 实验共初筛了 87 株菌株, 先后分离到 13 株菌株, 这 13 株菌株释放阿魏酸量见表 1, 其在 PDA 平板培养基上培养 168 h 的菌落形态见表 2。

Strain number	FA concentration (mg/L)	Strain number	FA concentration (mg/L)
HDFE1	3.12	HDFE8	1.90
HDFE2	2.74	HDFE9	1.90
HDFE3	2.56	HDFE10	1.87
HDFE4	2.30	HDFE11	1.82
HDFE5	2.11	HDFE12	1.50
HDFE6	2.01	HDFE13	1.21
HDFE7	1.95		

从表 1 可看出, 菌株 HDFE1、HDFE2、HDFE3、HDFE4 与其他菌株相比阿魏酸的释放量较高, 可推测阿魏酸酯酶的酶活力相对也较高。

Strain number	Size	Shape	Dry or moist	Height	Transparency	Color and Etc
HDFE1	大	圆	干燥	隆起	不透明	白色毛绒针尖状, 中心暗灰绿色, 背面呈黄色, 直径 7 mm-8 mm
HDFE2	大	圆	干燥	隆起	不透明	白色毛绒针尖状, 内缘 6 mm 处有一圈墨绿色圆弧, 背面呈黄色, 直径 8 mm-9 mm
HDFE3	小	圆	干燥	隆起	不透明	纯白色棉絮状, 产紫红色色素, 直径 2 mm-3 mm
HDFE4	较小	圆	干燥	隆起	不透明	毛绒针尖状, 边缘白色, 中心墨绿色, 背面呈墨绿色, 直径 4 mm-5 mm
HDFE5	大	圆	干燥	隆起	不透明	纯白色针尖状, 无色素, 直径 6 mm-7 mm
HDFE6	小	圆	干燥	隆起	不透明	浅黄色棉絮状, 产黄色色素, 直径 2 mm-3 mm
HDFE7	小	圆	干燥	平	不透明	青色棉絮状, 产黄色色素, 直径 3 mm-4 mm
HDFE8	小	圆	干燥	平	不透明	灰白色棉絮状, 产棕褐色色素, 直径 3 mm-4 mm
HDFE9	小	圆	湿润	隆起	不透明	灰色毛绒状, 产黄褐色色素, 直径 2 mm-3 mm
HDFE10	小	圆	干燥	隆起	不透明	青色棉絮状, 产褐色色素, 直径 2 mm-3 mm
HDFE11	小	圆	干燥	隆起	不透明	粉红色针尖状, 产红褐色色素, 直径 3 mm-4 mm
HDFE12	小	不规则	湿润	隆起	不透明	粉红色针尖状, 无色素, 直径 2 mm-3 mm
HDFE13	大	圆	干燥	隆起	不透明	褐色针尖状, 产褐色色素, 直径 7 mm-8 mm

虽然木质纤维降解产生的酚酸除阿魏酸外, 还有异阿魏酸、对-羟基苯甲酸、咖啡酸、丁香酸等, 但与 HPLC 法相比, 分光光度法测量的相对误差在 7% 左右^[9]。因此采用简便快速的分光光度法测定阿魏酸, 有利于相对快速准确的筛选产阿魏酸酯酶的目标菌株。

2.1.2 菌株的复筛: 将 HDFE1、HDFE2、HDFE3、HDFE4 4 株菌株的 PDA 液体培养基接种到复筛培养基中进行复筛, 其中 HDFE1 菌株产阿魏酸酯酶的能力较强, 为 18.56 U/L。

2.2 菌株 HDFE1 的鉴定

2.2.1 菌株形态结构观察: 菌株 HDFE1 在 CA 培

培养基 25°C 培养 12 d 后, 直径 20 mm-30 mm, 具有少量放射性皱纹, 并有几道同心环纹, 质地绒状且中心带絮状。分生孢子大量产生, 分生孢子面呈典型的蓝绿色, 菌丝体白色至淡黄色(图 1A), 无渗出现液, 反面呈橙黄色(图 1B)。

菌株 HDFE1 在 CYA 培养基 5°C 培养 7 d, 不生长。在 25°C 条件下培养 7 d, 菌落直径 25 mm-5 mm, 菌落平坦, 分生孢子结构大量产生, 分生孢子面蓝灰绿色, 近于橄榄灰色, 菌丝体白色, 几乎无渗出现液(图 2A), 反面黄色(图 2B)。

镜检特征见图 3, 菌丝有隔膜; 分生孢梗茎 (50-65) $\mu\text{m} \times$ (2.2-2.6) μm 自基质生出, 壁平滑, 孢

子梗顶端膨大, 帚状枝双轮生, 偶有发现单轮生, 梗基每轮大多为 3 个, 分生孢子大量产生, 分生孢子串呈不分枝的链状。单个分生孢子 $2.2\ \mu\text{m}$ – $2.6\ \mu\text{m}$, 大多为球形(图 4), 根据文献[6], 初步判断该菌株为青霉属、叉状亚属、叉状组、橘青霉系。

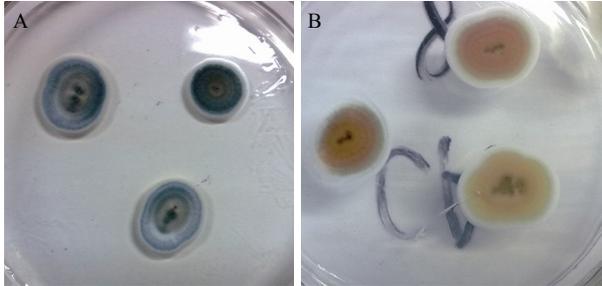


图 1 HDFE1 菌株在 CA 培养基上的菌落形态
Fig. 1 Colony shape of HDFE1 strain on CA medium
Note: A: Colony obverse; B: Colony inverse.

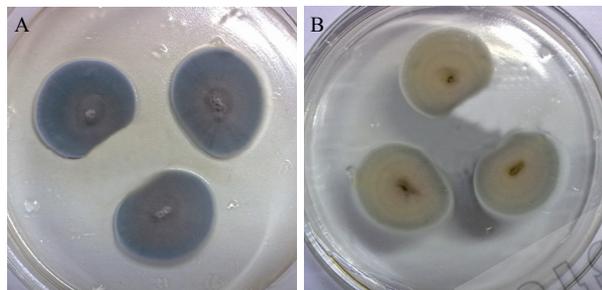


图 2 HDFE1 菌株在 CYA 培养基上的菌落形态
Fig. 2 Colony shape of HDFE1 strain on CYA medium
Note: A: Colony obverse; B: Colony inverse.

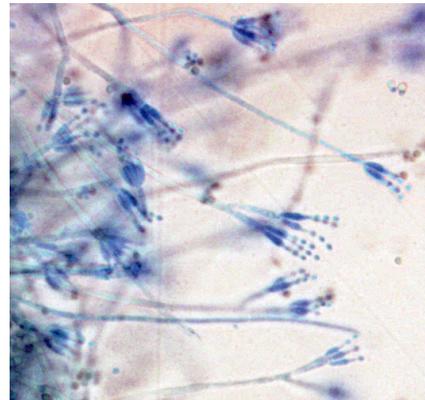


图 3 菌株 HDFE1 孢子梗形态图($\times 320$)
Fig. 3 The conidia conidiophore morphology of HDFE1 strain under optics microscopic ($\times 320$)



图 4 菌株 HDFE1 孢子形态图($\times 13000$)
Fig. 4 The conidia morphology of HDFE1 strain under scanning electron microscopy ($\times 13000$)

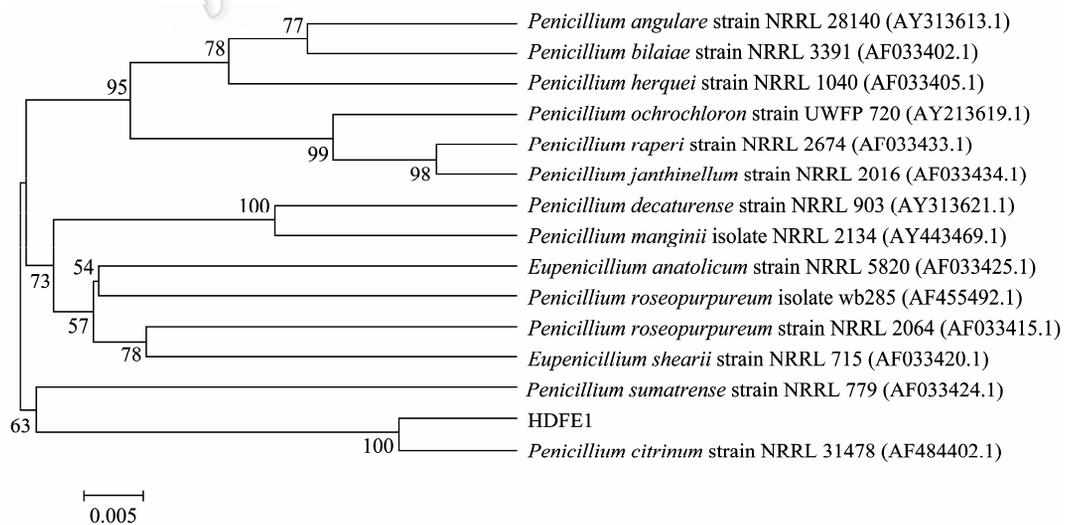


图 5 菌株 HDFE1 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 序列的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on rDNA ITS1-5.8S-ITS2 sequences of strain HDFE1

Note: The numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap. Numbers in parentheses are the rDNA ITS1-5.8S-ITS2 sequences accession number. Bar, 0.5% sequence divergence.

2.2.2 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 扩增: 提取菌株 HDFE1 总 DNA 作为模板, PCR 扩增 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 区, 经测序目的基因序列长度为 525 bp, GenBank 序列号: HM486421。菌株 HDFE1 的 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 序列与 14 株菌株的同一性(Identity)均在 90.0%以上, 且与其中的 *Penicillium citrinum* 同一性达到 100%, 构建的分子进化树见图 5, 菌株 HDFE1 与 *Penicillium citrinum* 在构建的进化树的同一分枝上, 结合菌株的形态鉴定及 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 序列分析结果, 判定菌株 HDFE1 为青霉属的橘青霉系的橘青霉(*Penicillium citrinum*)。

2.3 HDFE1 的生长曲线

HDFE1 的生长曲线结果见图 6。实验结果表明, 0-12 h 为生长延迟期, 12-60 h 为快速生长期, 60 h 以后为衰亡期。

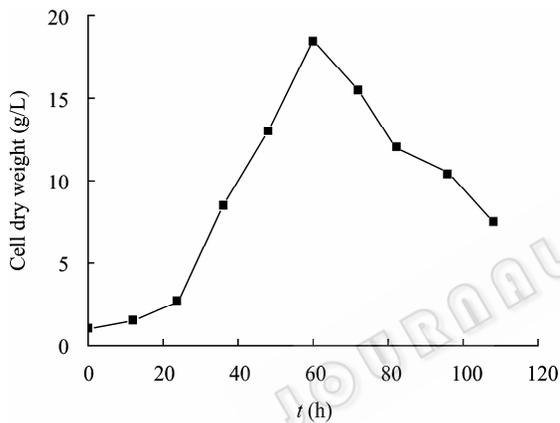


图 6 HDFE1 菌种的生长曲线
Fig. 6 The growth curve of strain HDFE1

2.4 菌株的培养特征

温度对菌株 HDFE1 生长速率的影响见图 7。当温度从 20°C 上升至 30°C 时, 菌株 HDFE1 的生长速率逐渐提高; 但是当温度继续升高时, 生长速率不断下降。pH 值对菌株 HDFE1 生长速率的影响见图 8。当 pH 值从 3 增大至 6 时, 菌株 HDFE1 的生长速率逐渐提高; 但是当 pH 值继续升高时, 生长速率不断下降。

2.5 发酵过程中阿魏酸、阿魏酸酯酶活力的变化情况

发酵过程中阿魏酸、阿魏酸酯酶活力的变化情况, 见图 9。

由图 9 可知, 发酵液中阿魏酸酯酶在发酵 24 h 后酶活力开始逐渐上升, 在 60 h 达到最高值。阿魏

酸释放量与阿魏酸酯酶的变化趋势一致。阿魏酸的随着发酵时间的延长而释放量降低主要是因为阿魏酸易氧化和见光易分解特性所造成。

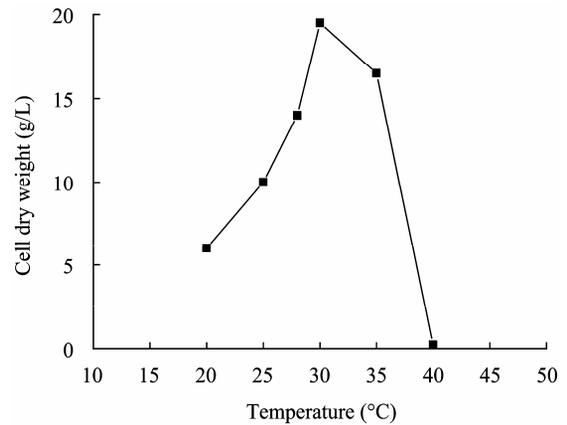


图 7 温度对菌株 HDFE1 生长的影响
Fig. 7 Effect of temperature on the growth of strain HDFE1

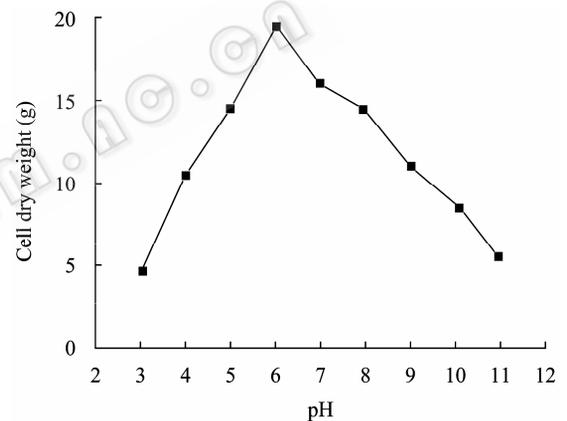


图 8 pH 对菌株 HDFE1 生长的影响
Fig. 8 Effect of pH on the growth of strain HDFE1

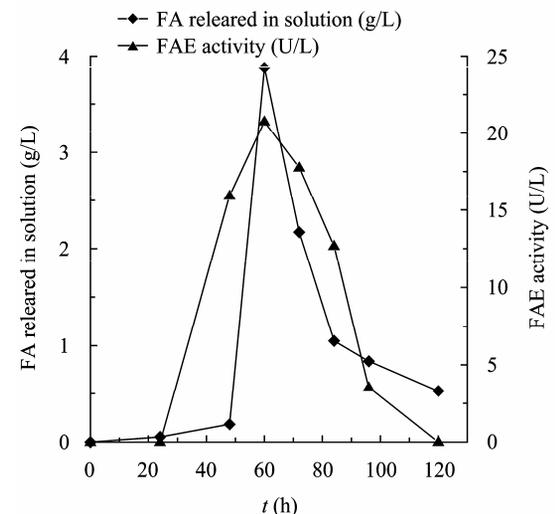


图 9 发酵产 FA 和低聚糖的时间曲线
Fig. 9 Time curve of ferulic acid and feruloyl esterases

3 结论

从腐烂的木质纤维中筛选得到产阿魏酸酯酶的菌株 HDFE1, 综合形态特征及 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 系统发育分析, 将菌株 HDFE1 鉴定为青霉属的橘青霉(*Penicillium citrinum*)。目前产阿魏酸酯酶的青霉属有扩张青霉(*Penicillium expansum*)、短密青霉(*Penicillium brevicompactum*)和绳状青霉(*Penicillium funiculosum*)^[3]。国内外还未见有关橘青霉产阿魏酸酯酶的报道。所筛的橘青霉菌株产阿魏酸酯酶的分纯化另文报道。

参考文献

- [1] Crepin VF, Faulds CB, Connerton IF, *et al.* Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **63**(6): 647-652.
- [2] Topakas E, Vafiadi C, Christakopoulos P, *et al.* Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochemistry*, 2007, **42**(4): 497-509.
- [3] Benoit I, Danchin EGJ, Bleichrodt RJ, *et al.* Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnol Lett*, 2008, **30**(3): 387-396.
- [4] Mathew S, Abraham TE. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2004, **24**(2): 59-83.
- [5] 曾薇, 陈洪章. 阿魏酸酯酶和纤维素酶在水解汽爆稻草中的协同作用. *生物工程学报*, 2009, **25**(1): 49-54.
- [6] 张帅兵, 裴小琼, 吴中柳, 等. 黑曲霉阿魏酸酯酶 A 的克隆、表达及快速酶活检测体系的建立. *应用与环境生物学报*, 2009, **15**(2): 276-279.
- [7] 王洪川, 陈洪章. 高产阿魏酸酯酶菌株的筛选及其固态发酵的研究. *食品科学*, 2007, **33**(4): 25-29.
- [8] 欧仕益, 张璟, 汪勇, 等. 采用黑曲霉发酵制备阿拉伯木聚糖酶和阿魏酸酯酶的研究. *食品科技*, 2004(4): 90-92.
- [9] Crawford DL. Lignocellulose decomposition by selected streptomyces strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978(6): 1041-1045.
- [10] 孔华忠. 中国真菌志. 第35卷. 北京: 科学出版社, 2007: 22-23, 121-122.
- [11] 黄艳凤, 周庆礼, 李士炼, 等. 从黑麦麦麸中提取的阿魏酸的检测. *药物生物技术*, 2004, **11**(1): 49-51.
- [12] Shin HD, Chen RR. Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum* NRRL 26517. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **38**(3): 478-485.
- [13] 袁洪水, 李术娜, 张爱莲, 等. 石英砂研磨法快速提取顶头孢霉染色体 DNA. *河北农业大学学报*, 2007, **30**(5): 8-11.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名变更

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名, 造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱, 这大大影响了本刊在国际上的传播, 也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论, 以及主办单位批准, 本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”, 请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。

《微生物学通报》编辑部

2009-12-25