

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.08.004

纤维素降解真菌的分离筛选^①

陈 静¹, 匡成兵²

1. 四川省农产品质量安全中心, 成都 610041; 2. 成都市农林科学院, 四川 温江 611130

摘要: 采用涂布平板法和刚果红平板透明圈法, 从常年堆积腐烂落叶下的腐殖土壤中分离获得 11 株有一定纤维素降解活性的真菌菌株. 采用滤纸失重法和 3,5-二硝基水杨酸比色法, 进一步测定了 11 株真菌对纤维素的降解能力, 结果表明: 编号为 LY4-2, LY4-4, LY4-5 和 LY5-1 的 4 株菌株对纤维素表现出不同程度的降解活性, 其中 LY4-5 菌株表现出较好的降解活性, 滤纸失重率为 44.96%, 羧甲基纤维素钠酶活为 41.25 IU, 滤纸酶活为 27.63 IU.

关键词: 纤维素降解; 真菌; 分离筛选; 失重率; 酶活

中图分类号: X712

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)08-0022-05

微生物发酵分解纤维素主要是依靠其产生的胞外酶完成, 自然界能产生分解纤维素酶的微生物很多, 包括细菌、真菌和放线菌. 据报道, 真菌分解纤维素的能力比细菌和放线菌强, 真菌在降解纤维素底物时, 菌丝穿过细胞壁进入细胞, 由内而外降解纤维素, 使其分解成可被利用的单糖或二糖^[1-2]. 目前国内外的研究表明, 用于纤维素酶生产的多为木霉属、青霉属、曲霉属和枝顶孢霉属的真菌, 其中木霉属是迄今所知形成和分泌纤维素酶系成分较全面的一个属, 国内外许多研究人员对此做了很多报道^[3].

20 世纪 50 年代初, 美国的 Reese 博士和他的合作者从腐烂的纤维材料上分离了大量真菌, 并经过一系列研究后发现绿色木霉分泌胞外纤维素酶的能力最强, 由该菌产生的纤维素复合酶具有分解天然纤维素所需的 3 种组分, 即内切葡萄糖苷酶、外切葡萄糖苷酶和 β -1,4-糖苷酶^[4]; 由荒开基夫等^[5]筛选出的荆孢曲霉 No. F-50 能产生较好的纤维素酶系, 其粗酶液对纸浆有很强的协同分解能力. 此外, 我国科学工作者对纤维素分解菌的筛选也做了大量工作, 洪洞等^[6]分离出 1 株对纤维素降解能力较好的黑曲霉突变菌株 2281-C, 并对其产生的纤维素酶进行了研究; 兰时乐等^[7]从腐木上分离到 1 株纤维素酶活较高的野生纤维素酶产生菌 TP01, 最后鉴定为绿色木霉, 并以该菌为出发菌株, 经 LiCl, 硫酸二乙酯和紫外线等化学物理诱变处理, 最后获得 1 株高产纤维素酶突变菌 TP1202, 该菌株对纤维素具有较高的降解活性.

利用微生物降解法分解纤维素, 是目前利用纤维素的最佳途径. 张琴等^[8]报道, 从重庆缙云山松树林下采集土样, 筛选获得 2 株降解棉秆纤维素活性较好的菌株, 并对产酶条件进行了研究. 西安建筑科技大学朱玉玺^[4]报道, 从常年堆积秸秆下、牛胃牛肠、温热的牛粪和造纸废液下的泥土中采样, 筛选获得了 3 株高效降解纤维素的菌株, 分别是青霉属、绿色木霉和假单胞菌属.

大量研究成果表明, 选育高效纤维素降解菌, 利用纤维素废弃物, 对其进行生产转化是完全可行的, 但就目前国内外研究而言, 筛选出的纤维素降解菌酶活力不高是限制纤维素资源应用的主要因素之一. 因

① 收稿日期: 2015-04-20

基金项目: 国家大学蔬菜产业技术体系建设项目(CARS-25).

作者简介: 陈 静(1976-), 女, 四川井研人, 高级农艺师, 主要从事农产品产地环境保护及农产品质量安全的研究.

此,进一步寻找和开发高产纤维素酶菌株,是纤维素资源能否高效利用的关键。

本试验主要从常年堆积腐烂落叶下的腐殖土中大量取样,分离筛选能产生高活性纤维素酶的秸秆降解真菌,为秸秆纤维素的有效利用提供优良菌株,以提高天然纤维素的可利用性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 土壤样品的采集

土壤样品:在温江区惠民社区旁树林内,于常年堆积腐烂落叶下的腐殖土中取样.选择肥沃、润湿的土壤,除去土表杂物,铲去表层土 3 cm 左右,取 1 kg 左右的土壤,置于阴凉处风干,放入冰箱内保存备用。

1.1.2 培养基

羧甲基纤维素钠(CMC-Na)培养基^[9]: CMC-Na 15 g, NH_4NO_3 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KH_2PO_4 1 g, 酵母膏 1 g, 琼脂 15 g, H_2O 1 000 mL, 10 mg/mL 链霉素溶液 3.3 mL(临用前加入)。

纤维素刚果红培养基^[10]: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CMC-Na 2 g, NaCl 0.1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g, K_2PO_4 1.0 g, 刚果红 0.4 g, 琼脂 15 g, pH 值为 7.0, H_2O 1 000 mL。

滤纸液体培养基: 滤纸 1 g, NH_4NO_3 0.4 g, 酵母膏 0.4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, KH_2PO_4 0.4 g, H_2O 100 mL。

CMC-Na 液体产酶鉴定培养基^[11]: CMC-Na 10 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KH_2PO_4 2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g, 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 5 g, H_2O 1 000 mL。

PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 蔗糖 20 g, 琼脂 15~18 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.2 方 法

1.2.1 真菌的分离及纯化

称取土样 10 g, 用研钵研细, 放入装有 90 mL 无菌水的三角瓶中, 置于摇床振荡 30 min 后取出, 趁悬浮液沉降静止前吸 1 mL 加入盛有 9 mL 无菌水的试管中振荡摇匀, 并照此逐级稀释成 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 的 3 种浓度, 将 3 种浓度的稀释液分别涂布于羧甲基纤维素钠平板上, 重复 3 次, 于 28 °C 恒温培养 2~5 d. 待菌丝长出后, 再接种于新的羧甲基纤维素钠培养基上纯化, 直至获得纯菌株为止。

1.2.2 菌株对纤维素降解活性的初筛

将纯化的菌株打成直径 5 mm 的菌饼, 分别接种于纤维素刚果红平板上, 重复 3 次, 于 28 °C 恒温培养 7 d, 测量菌落直径及透明圈直径, 并计算透明圈直径与菌落直径的比值。

1.2.3 菌株对纤维素降解活性的复筛

制备菌悬液^[4]: 将初筛获得的菌株按 10% 的接种量分别接种于 PDA 培养基中, 在摇床(30 °C, 150 r/min)培养 3 d, 取出, 离心(4 °C, 4 000 r/min)20 min, 取上清液即为菌悬液. 取 2 mL 菌悬液接种到 100 mL 滤纸液体培养基中, 重复 3 次, 同时设空白对照, 在摇床培养 5 d, 取出过滤、洗涤、烘干后称质量, 测定滤纸失重率, 根据下式计算滤纸失重率^[4]。

$$\text{滤纸失重率} / \% = \text{降解烘干后滤纸质量} / \text{未接种的空白培养基滤纸质量} \times 100$$

1.2.4 菌株降解酶活性测定

采用 3, 5 -二硝基水杨酸比色法(DNS 法)^[12-16]测定滤纸酶(FPAase)活性和羧甲基纤维素酶(CMCase)活性。

1.2.4.1 液体产酶发酵

将筛选获得的活性真菌按 5% 的接种量分别接种到 CMC-Na 液体产酶培养基中, 摇床培养 5 d.

1.2.4.2 绘制葡萄糖标准曲线

称取 0.500 0 g 葡萄糖, 制成 1.0 mg/mL 葡萄糖标准溶液, 分别取上述标准溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6,

0.8, 1.0 mL 置于 10 mL 试管中, 分别稀释至 1 mL, 再加入缓冲溶液(pH 值为 4.8, 0.2 mol/L, HAc-NaAC 缓冲液)2 mL 和 2 mL DNS 试剂, 混匀后于沸水浴中反应 5 min, 冷却后测吸光度值 A , 绘制葡萄糖标准曲线。

1.2.4.3 制备粗酶液

取培养 5 d 的发酵液 10 mL, 离心 15 min 后, 取上清液即为粗酶液。

1.2.4.4 滤纸酶活(FPAase)测定^[15]

粗酶液适当稀释后取 1 mL, 加入去淀粉滤纸(1 cm×6 cm), 再加入 HAc-NaAC(pH 值为 4.8, 0.2 mol/L)缓冲溶液 2 mL, 50 °C 反应 60 min, 迅速加入 2 mL DNS 试剂, 在沸水浴中反应 5 min. 冷却后测吸光度值 A , 根据葡萄糖标准曲线得反应产生的还原糖质量分数, 再根据还原糖质量分数计算酶活。

FPA 酶活的定义: 在 pH 值为 4.8, 50 °C 下, 每 1 mL 酶液在 1 min 内催化滤纸酶解生成 1 μg 还原糖的酶活性称为 1 个 FPA 酶活单位(IU)。

1.2.4.5 羧甲基纤维素酶活(CMCase)测定

羧甲基纤维素酶活(CMCase)测定^[15]: 粗酶液适当稀释后取 1 mL, 再加入缓冲液 2 mL, 50 °C 反应 30 min, 迅速加入 2 mL DNS 试剂, 然后在沸水浴中反应 5 min. 冷却后测吸光度值 A , 根据葡萄糖标准曲线得反应产生的还原糖质量分数, 再根据还原糖质量分数计算酶活。

CMC 酶活的定义: 在 pH 值为 4.8, 50 °C 下, 每 1 mL 酶液在 1 min 内催化 CMC-Na 酶解生成 1 μg 还原糖的酶活性称为 1 个 CMC 酶活单位(IU)。

1.2.4.6 酶活力计算^[16]

$$\text{酶活力} = A * B / V * T$$

其中: A 为样品中还原糖质量分数(μg); B 为酶液稀释倍数; V 为吸取的酶液体积(mL); T 为酶解时间(min)。

2 结果与分析

2.1 菌株对纤维素降解活性初筛

采用稀释培养法共分离得到 11 株真菌, 采用刚果红纤维素平板透明圈法对 11 株真菌进行纤维素降解活性初筛, 结果见表 1。

表 1 纤维素降解真菌透明圈直径(D)与菌落直径(d)的比值大小

菌株编号	透明圈直径/ cm	菌落直径/ cm	D/d	菌株编号	透明圈直径/ cm	菌落直径/ cm	D/d
LY4-1	1.90	1.40	1.357	LY5-2	2.55	2.25	1.133
LY4-2	0.65	0.50	1.300	LY5-3	1.50	1.35	1.111
LY4-3	2.30	1.85	1.243	LY6-1	1.65	1.50	1.100
LY4-4	1.05	0.85	1.235	LY6-2	2.80	2.60	1.077
LY4-5	1.15	0.96	1.198	LY6-3	2.15	2.05	1.049
LY5-1	2.20	1.90	1.158				

由表 1 可知, LY4-1, LY4-2, LY4-3 和 LY4-4 透明圈直径与菌落直径比值较大, 比值分别为 1.357, 1.300, 1.243 和 1.235。

2.2 菌株对纤维素降解能力的复筛

将上述 11 株菌分别接种到滤纸液体培养基中, 以不接种任何菌株的滤纸液体培养基作为空白对照, 测定滤纸的降解情况, 结果见表 2。由表 2 中可见, 编号为 LY4-2, LY4-4, LY4-5 和 LY5-1 的 4 株真菌对滤纸的降解能力较强, 滤纸的失重率分别为 41.23%, 33.90%, 44.96% 和 31.34%。

表 2 菌株降解后的滤纸平均质量和失重率

菌株编号	降解烘干后滤纸		菌株编号	降解烘干后滤纸	
	平均质量/g	滤纸失重率/ %		平均质量/g	滤纸失重率/ %
LY4-1	0.869 1	9.83eD	LY5-2	0.806 1	16.36cdCD
LY4-2	0.566 4	41.23bB	LY5-3	0.824 9	14.41edeCD
LY4-3	0.837 7	13.08deCD	LY6-1	0.825 3	14.37cdeCD
LY4-4	0.637 1	33.90bB	LY6-2	0.774 7	19.62cC
LY4-5	0.530 5	44.96aA	LY6-3	0.821 9	14.72cdeCD
LY5-1	0.661 7	31.34bB	CK	0.963 8	—

注:小写字母不同表示差异有统计学意义($p < 0.05$);大写字母不同表示差异有统计学意义($p < 0.01$).

2.3 菌株降解酶活性测定

2.3.1 葡萄糖标准曲线方程

葡萄糖标准曲线方程为 $Y = 1.4124X - 0.0064$, 线性相关系数 $R^2 = 0.9964$. 线性好, 可用于酶活力的计算.

2.3.2 酶活力测定

分别对各菌株进行滤纸酶活和羧甲基纤维素酶活测定, 所得结果见表 3.

表 3 11 株真菌的 FPA 酶活和 CMC 酶活大小的测定

菌株编号	FPA 酶活/IU	CMC 酶活/IU	菌株编号	FPA 酶活/IU	CMC 酶活/IU
LY4-1	1.44kK	1.97hH	LY5-2	2.02iI	2.25hH
LY4-2	21.05bB	31.81dD	LY5-3	3.43gG	4.75fF
LY4-3	1.73jJ	2.20hH	LY6-1	2.52hH	4.45fFG
LY4-4	18.04dD	34.42bB	LY6-2	4.60eE	6.05eE
LY4-5	27.63aA	41.25aA	LY6-3	3.73fF	4.09gG
LY5-1	19.81cC	33.03cC			

注:小写字母不同表示差异有统计学意义($p < 0.05$);大写字母不同表示差异有统计学意义($p < 0.01$).

由表 3 可知, LY4-2, LY4-4, LY4-5 和 LY5-1 这 4 株菌对 FPA 酶和 CMC 酶均表现出较好的活性, 其 FPA 酶活性分别为 21.05 IU, 18.04 IU, 27.63 IU 和 19.81 IU, CMC 酶活性分别为 31.81 IU, 34.42 IU, 41.25 IU 和 33.03 IU. 根据复筛和酶活性测定结果, LY4-5 菌株具有明显的纤维素降解活性, 具有一定的应用潜力.

3 讨论

本研究以四川省成都市温江区惠民社区旁树林的腐烂落叶及周边土壤为分离材料, 分离获得 11 株对纤维素具有一定降解活性的真菌. 试验再次证明, 腐烂秸秆和腐烂落叶下的腐殖土等地方富含丰富的纤维素降解菌群.

本研究明确了 4 株真菌对纤维素降解能力较高, 其中编号为 LY4-5 的菌株降解活性最强, 其滤纸失重率为 44.96%, 羧甲基纤维素钠酶活为 41.25 IU, 滤纸酶活为 27.63 IU, 具有潜在的应用价值. 但总体而言, 其对纤维素降解酶活性不高, 与实际开发应用还有较大差距. 因此在今后的工作中, 如何进一步改造菌株, 有效提高它的降解活性将是其研究的重点方向.

分解纤维素的酶是由多种组分组成的酶系, 自然条件下, 纤维素的彻底降解是由多种微生物长期相互作用的结果, 仅靠一种微生物是很难完全实现的. 因此, 在进行纤维素大分子的降解研究时要考虑微生物产酶体系之间的协同效应, 细菌和真菌之间有较强的相互作用^[22]. 本文仅研究了具有降解作用的真菌, 对其它种类微生物的降解作用测定及不同微生物种类之间的协同作用研究还有待于进一步探索.

参考文献:

- [1] 李日强, 辛小芸, 刘继青. 天然秸秆纤维素分解菌的分离选育 [J]. 上海环境科学, 2002, 21(1): 8—11, 63.
- [2] 曾青兰. 降解秸秆纤维素丝状真菌的分离鉴定 [J]. 湖北农业科学, 2008, 47(6): 652—655.
- [3] 刘 颖, 林亲录. 纤维素酶制取与应用研究进展 [J]. 中国食物与营养, 2006(4): 33—35.
- [4] 朱玉玺. 纤维素优良降解菌的筛选分离及其特性研究 [D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2005.
- [5] 荒开基夫, 郭维烈. 纤维素酶研究动向 [J]. 应用微生物, 1989(5): 19—22.
- [6] 洪 洞, 黄秀梨. 黑曲霉变种 2281-C 纤维素酶的纯化和性质 [J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 1998, 34(3): 403—408.
- [7] 兰时乐, 陈 娴, 李 慧, 等. 产纤维素酶菌种 TP1202 的选育及产酶条件研究 [J]. 生物技术, 2003, 13(2): 12—13.
- [8] 张 琴, 李艳宾, 岳耀峰, 等. 降解棉秆纤维素分解菌的筛选及其降解特性研究 [J]. 塔里木大学学报, 2009, 21(2): 61—64.
- [9] 刘海波, 王义强, 陈介南, 等. 一株高产纤维素酶菌的筛选与鉴定 [J]. 生物学杂志, 2008, 25(3): 16—20.
- [10] 林远声, 列璞怡. 降解纤维素的真菌分离、筛选及其酶活测定 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2004, 43(增刊): 82—85.
- [11] 朱利泉. 基础生物化学实验原理与方法 [M]. 成都: 成都科技大学出版社, 2002.
- [12] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1982.
- [13] 王 玮. 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖 [M] // 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000: 197—199.
- [14] 王希国, 杨 谦, 燕 红. 高效降解纤维素菌株的筛选与鉴定 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007(8): 70—71.
- [15] 张瑞萍. 纤维素酶的滤纸酶活和 CMC 酶活的测定 [J]. 印染助剂, 2002, 19(5): 51—53.
- [16] 张 超. 纤维素降解菌筛选及降解柑桔果渣研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2006.

Isolation and Screening of Cellulose-degradation Fungus

CHEN Jing¹, KUANG Cheng-bing²

1. Sichuan Agriculture Products Quality Security Center, Chengdu 610041, China;

2. Chengdu Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Wenjiang Chengdu 611130, China

Abstract: Eleven fungi strains with a certain activity of cellulose-degradation were isolated from the humus soil under pile-up rotting leaves all the year round by using spread plate method and transparent circle of Congo red plate method. By the filter paper weight-loss method and 3,5-Dinitrosalicylic acid colorimetric method, cellulose-degradation activity of the 11 fungi strains was studied. The result showed that four strains numbered LY4-2, LY4-4, LY4-5 and LY5-1 had different cellulose-degradation activity. LY4-5 stain had the best activity, the filter paper weight-loss rate was 44.96%, CMCase activity was 41.25 IU, FPAase activity was 27.63 IU.

Key words: Cellulose-degradation; Fungi; Isolation; Weight-loss rate; Enzyme activity

责任编辑 周仁惠

