

一种产生纤维素酶菌种的筛选方法——染色滤纸条法

西北水土保持生物土壤研究所微生物室发酵饲料组

目前选育产纤维素酶菌种，一般初筛用滤纸渍烂法选取生长旺、使滤纸渍烂显著的菌株，作为初筛结果。复筛时制曲、萃取、过滤、离心及活性测定等步骤，工作量大，效率低，影响菌种选育工作的进展。我们在选育纤维素酶菌种中，对国外新近介绍的染色滤纸条法稍作改进，对数百株真菌作了初筛和初步复筛，证明用染色滤纸条法，可减少工作量，并能以数百株菌同时投入初筛，提高了筛选效率，加速了菌种的选育过程。现将方法介绍如下。

一、方 法

(一)染色滤纸条的制备

1.染料和试剂的配制

染料雷马唑亮蓝 R(Remazol Brilliant Blue R) 4.5 克，溶于 750 毫升蒸馏水中。

硫酸钠 90 克，溶于 300 毫升蒸馏水中。

磷酸三钠 4.5 克，溶于 45 毫升蒸馏水中。

甲醇约 800 毫升。

56 × 36 厘米华特曼 1 号滤纸（或新华 1 号滤纸）一张。

2.滤纸染色方法 将 60 × 40 × 5.5 厘米瓷盘置同样大的蒸汽浴上预热后，向盘内注入沸蒸馏水 750 毫升，放入滤纸一张，用橡皮油印滚筒压除气泡，预热几分钟后将沸染料溶液均匀注入，倾摇瓷盘，使染料布匀，接着将沸硫酸钠溶液分五次，每次 60 毫升，每隔 2 分钟加入盘内，再将沸磷酸三钠溶液，于 3 分钟内均匀滴入（加上述二液时要不断倾摇瓷盘），加盖，放置 10 分钟（其间倾摇瓷盘 1—2 次），把瓷盘取出，倾去溶液，

用自来水浸洗多次,待水变清后,再用约5升蒸馏水浸洗8—10次,最后用甲醇洗3次,小心将染好的滤纸取出,风干,裁成1×6厘米(50毫克)的纸条。

3.制备染色滤纸条要注意以下问题

(1)染色时滤纸上液层厚度应有2—3毫米以上,否则染色不匀,可依此要求视所用瓷盘大小按比例增减蒸馏水和各溶液的用量。

(2)湿滤纸强度很低,在染色及冲洗时均应仔细保持滤纸平展,避免损坏。

(3)浸洗时,滤纸上颜色条纹显得很重,当水渗透后即呈均匀的蓝色,风干后滤纸贴瓷盘一面的颜色较正面略淡,是正常现象,如偶然有杂色斑点,在裁滤纸条时,应除去。

(二)无机盐液

按所筛选菌的要求配制,我们培养木霉的无机盐液成分如下:

KH₂PO₄ 2.0克, (NH₄)₂SO₄ 1.4克, 尿素 0.3克, MgSO₄ · 7H₂O 0.3克, CaCl₂ 0.3克, FeSO₄ · 7H₂O 5.0毫克, MnSO₄ · H₂O 1.56毫克, ZnSO₄ · 7H₂O 1.4毫克, CoCl₂ 2.0毫克, 蒸馏水 1000毫升, pH 5.0。

我们进行别的真菌筛选时,也用此培养液,另加0.1%蛋白胨,结果尚好。

(三)筛选方法

于内径13—16毫米试管中加入无机盐培养液5毫升及染色滤纸条一张(滤纸条直立于管内,部分露出液面),加棉塞,15磅灭菌30分钟,冷却后将平板上长好的菌落,接种在管内露出液面的染色滤纸条上及溶液中,保温静止培养。

因为染色滤纸条上的染料分子与纤维素分子呈化学结合,不溶于水,培养时微生物产生的纤维素酶将纤维素降解成可溶性糖,染料随之进入培养液,使培养液呈蓝色。微生物产生的纤维素酶对纤维素分解力愈强,蓝色就愈深,所以在培养适当时间后,将蓝色深的试管选出,先将管内滤纸条上的菌接入纤维素粉(2%)矿质盐琼脂斜面,培养保存备用。然后用蒸馏水将选出的试管定容至5毫升,连同滤纸激烈振荡,离心除去滤纸纤维及菌丝、孢子,于595nm比色,再取光密度读数较高的菌株,进行正常的复筛。

(四)固体培养法

固体曲用青草粉硫酸铵(2%)培养基加二倍水,29℃培养3—4天,提取酶液。

滤纸酶活力测定:取1毫升适当稀释的酶液,1毫升0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(对木霉用pH 4.0,其他菌类pH为4.8),1×6厘米滤纸一条(华特曼一号,49—51毫克),50℃酶解1小时,DNS显色,

550nm比色,测释放之还原糖(以葡萄糖计)。用灭活酶液在相同条件下作空白测定,以校正酶活数字。酶液浓度应调节在上述条件下,产糖0.5毫克左右。活力以毫克(葡萄糖)/克曲表示。

二、结 果

我们用染色滤纸条法筛选500多株真菌,28—30℃培养三个星期,目测选出61株,比色测定光密度(见表1),经比色后选出22株(占总株数4%)投入复筛,大大减轻了工作量。

表1 用染色滤纸条法对真菌作初筛的光密度分布

| 光密度读数范围 | 株 数 | 占总株数之% |
|-----------|-----|--------|
| >0.6 | 3 | 4.0 |
| 0.599—0.5 | 5 | |
| 0.499—0.4 | 14 | |
| 0.399—0.3 | 22 | 7.9 |
| 0.299—0.2 | 14 | |
| 0.199—0.1 | 2 | |
| <0.1 | 1 | 13.7 |
| 色 淡 未 比 色 | 75 | |
| 无 色 | 413 | 74.4 |
| 筛 选 总 株 数 | 549 | 100.0 |

在木霉的筛选中,对所选出的木霉和不同酶活水平的木霉,用染色滤纸条法(培养两个星期)与固体培养法比较酶活测定的结果(见表2)。

表2 染色滤纸条法和固体培养法对不同酶活水平木霉的酶活测定结果(毫克/克曲)

| 菌 号 | 固 体 培 养 法 (毫克/克曲) | 染色滤纸条法(595nm O. D.) |
|--------|----------------------|------------------------|
| 867* | 105.5 | 0.413 |
| 1323 | 98.7 | 0.380 |
| 1323-3 | 87.5 | 0.375 |
| 1323-4 | 76.4 | 0.294 |
| 191 | 30.5 | 0.137 |

* 系上海植物生理所赠与。

除在木霉的筛选时用染色滤纸条法外,对其他产纤维素酶的真菌也用此法作了筛选,对投入初步复筛的一个白色菌丝体类群和一个暗色菌丝体类群(均未分类)与固体培养法作了比较,结果用回归直线示于图1和2中。对于其他真菌如构曲霉、交链孢霉、青霉及

放线菌因复筛菌株少,未作计算与图示,仅将数据列于表 3,可以看出,仍有相似的趋势。

表 3 产纤维素酶真菌筛选时用染色滤纸条法和固体培养法的结果比较

| 菌类 | 方法 光密度 菌号 | 染色滤纸条法* | 固体培养法** |
|---------|-----------------|---------|---------|
| 交链孢霉 | 2646 | 0.280 | 0.178 |
| | 2654 | 0.242 | 0.172 |
| | 3009 | 0.220 | 0.195 |
| | 2407 | 0.135 | 0.133 |
| 构曲霉 | 1238 | 0.115 | 0.387 |
| | 1155 | 0.134 | 0.370 |
| | 2859 | 0.077 | 0.305 |
| 未定名曲霉类群 | 3839 | 0.430 | 0.500 |
| | 3972 | 0.377 | 0.495 |
| | 1170 | 0.230 | 0.455 |
| | 0428 | 0.100 | 0.348 |
| | 4067 | 0.043 | 0.113 |
| 青霉 | 008 | 0.564 | 0.417 |
| | 1428 | 0.115 | 0.320 |
| 放线菌 | 4124 | 0.517 | 0.145 |
| | 3565 | 0.410 | 0.045 |
| | 3030 | 0.275 | 0.020 |

* 染色滤纸条法培养液用木霉培养液加 0.1% 蛋白胨。
** 固体培养法的光密度 (O. D.) 是减去灭活酶液空白测得的 O. D. 之后的值。

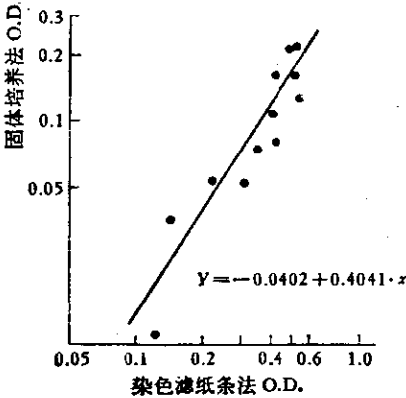


图 1 白色菌丝体类群的回归线

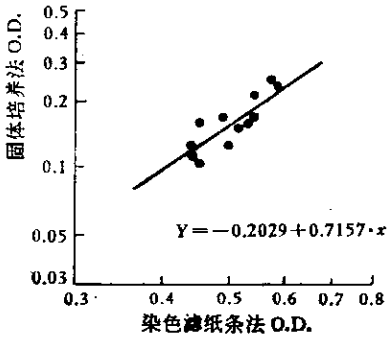


图 2 暗色菌丝体类群的回归线

三、讨 论

用染色滤纸条法和固体培养法测得的光密度用回归方程表示,并对白色菌丝体类群(I)和暗色菌丝体类群(II)回归关系的显著性作了检验,结果见表 4。查表得知理论值(I)在 $p=0.01, n_1=1, n_2=9$ 时, $F=10.56$, (II)在 $p=0.01, n_1=1, n_2=11$ 时, $F=9.65$, 而由表 4 所求出的 F 值(I)=20, (II)=10.93, 分别大于理论值 10.56 和 9.65, 因此可以认为这两个类群中两种测定方法的回归关系极为显著。同样,这两类群求得两种测定结果的相关系数 $r(I)=0.85, r(II)=0.88$ 。因此可以认为在这两个类群中,两种测定方法的相关性是比较显著的,所以看来用染色滤纸条法在定性测定的水平上可以在很大程度上代替测还原糖来表示纤维素酶活性的方法,而且也反映一定程度上量的关系。对于放线菌、交链孢霉等由于投入复筛的菌株较少,不能做出进一步的分析。对于所筛选出的木霉来说,两种方法测出的酶活也相当的一致。在培养过程中,867 菌株比 1323 菌株蓝色出现早 1 天,看来蓝色出现的迟早也是可以考虑的一个因素。

表 4 两种菌类两种方法回归关系的显著性检验

| 菌类 | 项目 | 变异来源 | 自由度 | 平方和 | 平均方和 | F 值 |
|---------|-------|------|-----|--------|--------|-------|
| 白色菌丝体类群 | 回归部分 | | 1 | 0.034 | 0.034 | 20 |
| | 离回归部分 | | 9 | 0.015 | 0.0017 | |
| | 总变异 | | 10 | 0.049 | | |
| 暗色菌丝体类群 | 回归部分 | | 1 | 0.0153 | 0.0153 | 10.93 |
| | 离回归部分 | | 11 | 0.0043 | 0.0014 | |
| | 总变异 | | 12 | 0.0196 | | |

为进一步检验染色滤纸条法的可靠性以及在滤纸染色过程中由于操作及条件控制不好对方法本身的影响,我们作了该方法在同一菌株上的重复试验,滤纸染

色深的 A 和滤纸染色较浅的 B 对结果的影响试验以及滤纸在洗涤过程中洗得较差在灭菌后已稍呈蓝色的 C 对结果影响的试验, 这三种补充试验结果见表 5。由表 5 数据作统计分析, 可以看出试验 A 对试验 B 的

表 5 染色滤纸法的重复性及滤纸染色质量和洗涤质量对比色结果的影响 (以 595 nm O. D. 表示)

| 重 复 处 理 | 染色深的滤纸条 A | 染色较浅的滤纸条 B | 洗得较差的滤纸条 C |
|---------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 0.350 | 0.370 | 0.371 |
| 2 | 0.455 | 0.365 | 0.381 |
| 3 | 0.364 | 0.385 | 0.441 |
| 4 | 0.405 | 0.384 | 0.325 |
| 5 | 0.336 | 0.350 | 0.468 |
| 6 | 0.345 | | |
| 7 | 0.395 | | |
| 8 | 0.390 | | |
| 平均值及标准差 | 0.380±0.039 | 0.371±0.015 | 0.397±0.057 |

S_D (平均差异的标准误差) = ± 0.042 , t 值 = 0.214, 而用柯克伦 (Cochran) 法求近似 t 值, 则 $t' = 2.41$, 这样求得的 t 值小于 $p=0.05$ 时的计算 t' 值 ($0.214 < 2.41$), 因此这两个试验之间的差异并不显著。同样, 试验 A 对试验 C 的 $S_D = \pm 0.046$, $t = -0.369$, 求得 $t' = 2.44$, 因此 t 值也小于 $p=0.05$ 时

的 t' 值 ($-0.369 < 2.44$), 所以这两个试验之间也没有显著的差异。这就是说由于操作过程温度掌握不好而使染色较浅 (不能太浅) 或因洗涤不彻底致使灭菌后稍呈蓝色时, 如果同一次筛选中所用的染色滤纸条均系同一张大滤纸上裁下来的话, 那末它们对筛选结果准确性的影响是不大的。

关于染料对菌类的毒性问题, 从我们工作来看, 似乎对所作过的真菌无明显的影响, 但确实的证明以及它对其他菌类是否有影响, 则尚须进一步研究。

四、结 论

1. 为适合我们的工作, 将原方法中振荡培养改为静止培养, 并为改进染色质量而加大了染色液用量, 在我们工作中证明是可行的。
2. 此方法适用于木霉产纤维素酶的菌种初筛。由于能够定量比较, 可以减少复筛菌株数, 看来也可能适用于对其他种类真菌的筛选。
3. 染色滤纸条法和固体培养法在某些类群的真菌上表现出显著的相关性, 所以是一个值得进一步研究和应用的方法, 此法特别适用于大量的菌种诱变工作。
4. 滤纸染色稍浅及洗涤质量稍差时, 对用同一批滤纸的试验来说, 它们对试验结果的影响并不显著。

参 考 资 料

Poincelot., R. P. et al., *Appl. Microbiol.*, **23** (5): 875—879, 1972。