

一株纤维素降解真菌的筛选、鉴定及酶学性质分析

甄静^{1,2} 王继雯^{1,2} 谢宝恩^{1,2*} 李冠杰^{1,2} 刘莹莹^{1,2} 周伏忠¹ 陈国参¹

(1. 河南省微生物工程重点实验室 河南 郑州 450008)

(2. 河南省科学院生物研究所有限责任公司 河南 郑州 450008)

摘要: 通过对富含枯枝败叶的土壤样品进行富集培养, 利用刚果红纤维素培养基初筛和酶活测定复筛得到产纤维素酶的一株真菌, 将其命名为 GC2-2, 并对该菌株进行鉴定及酶学性质研究。结果表明该菌株是一株耐高温、碱性纤维素酶的真菌 GC2-2。通过 18S rDNA 分子克隆测定, 该菌为球孢枝孢菌, 其滤纸酶的活力优于 CMC 酶的活力。该菌所产酶的最适反应条件为温度 35 °C, 最适 pH 值 7.5。

关键词: 真菌, 球孢枝孢菌, 碱性纤维素酶

Isolation, identification of a cellulase-producing strain and characterization of its cellulase-producing capability

ZHEN Jing^{1,2} WANG Ji-Wen^{1,2} XIE Bao-En^{1,2*} LI Guan-Jie^{1,2} LIU Ying-Ying^{1,2}
ZHOU Fu-Zhong¹ CHEN Guo-Can¹

(1. Key Laboratory of Microbial Engineering of Henan, Zhengzhou, Henan 450008, China)

(2. Henan Academy of Sciences Institute of Biology Co., Ltd, Zhengzhou, Henan 450008, China)

Abstract: A new fungus, designated GC2-2, which produced thermostable alkaline cellulase was isolated from deadwood soil. GC2-2 was identified as *Cladosporium* sp. by morphological characteristics as well as by analysis of the gene encoding the 18S rRNA. *Cladosporium* sp. GC2-2 produced cellulase enzyme. The enzyme activity on filter paper was higher than that on CMC. The optimal conditions for the enzymatic reaction were about 35 °C and at pH 7.5.

Keywords: Fungi, *Cladosporium* sp., Alkaline-cellulase

农作物秸秆是农作物生产中一种富含氮、磷、钾、钙、镁和有机质等有效成分的可再生生物资源

和潜在的非竞争资源。农作物光合作用的产物有一半以上存在于秸秆中, 我国是农业大国, 农作物秸

基金项目: 2009 年河南省重大公益科研招标项目(No. 091100910500)

* 通讯作者: Tel: 86-371-63382181; ✉ xbaoen@163.com

收稿日期: 2010-09-16; 接受日期: 2010-12-13

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

秆资源丰富,具有数量大、分布广、种类多等特点,但是,这些大量的农作物秸秆资源并没有被很好利用,联合国环境规划署(UNEP)统计,全球每年农作物秸秆产量近20亿吨,大部分都没有利用,在我国,农作物秸秆约有不足10%用做饲料,应用技术处理利用的秸秆不足3.0%,广大农民为了赶农时、抢播种、图省事,相当大的一部分被废弃、焚烧,造成严重的环境污染^[1-3]。

在农作物秸秆资源利用的诸多研究领域中,秸秆堆腐还田的技术占有重要的地位。秸秆堆腐的方法主要分为物理的、化学的和生物的3大类,其中以应用微生物学方法的腐解效果最好,也就是我们常说的秸秆微生物堆腐方法。这种方法是利用微生物分解作用,促使农作物秸秆发酵腐熟,使秸秆中所含的有机质及氮、磷、钾等元素成为植物生长所需的营养,并繁殖大量的有益菌微生物,成为优良的绿色堆腐有机肥。因此筛选出具有高活性纤维素酶活的秸秆降解微生物菌株是当前研究的一个热点。本研究从腐烂枯枝败叶的土壤中筛选到1株产碱性纤维素酶的菌株GC2-2,并对其酶活力进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:纤维素,刚果红,葡萄糖,醋酸,醋酸钠,羧甲基纤维素钠,酒石酸钾钠,DNS,苯酚,氢氧化钠,无水亚硫酸钠,试剂均为分析纯,购自上海国药公司。

1.1.2 培养基:富集培养基^[4](g/L):蛋白胨 10, CMC-Na 10, K_2HPO_4 1, Na_2CO_3 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.015, $MnSO_4$ 0.05, 酵母膏 10, 调节pH值为6。

高盐察氏培养基(g/L): $NaNO_3$ 2, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, KCl 0.5, $FeSO_4$ 0.01, NaCl 60, 蔗糖 30, 琼脂 20, pH 6.0。

纤维素刚果红培养基^[5](g/L): K_2HPO_4 0.50, $MgSO_4$ 0.25, 纤维素粉 1.88, 刚果红 0.20, 琼脂 14.00, 明胶 2.00, 土壤浸汁 100 mL, pH 7.0。

种子培养基^[4] (g/L): CMC-Na 10, 蛋白胨 3.0,

KH_2PO_4 4.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03, pH 6.0。

发酵产酶培养基^[5] (g/L): CMC-Na 10, $(NH_4)_2SO_4$ 4, KH_2PO_4 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, 蛋白胨 10, 牛肉膏 5, pH 自然。

1.2 方法

1.2.1 土样采集:材料:郑州郊区采集富含枯枝败叶的下层土壤。

1.2.2 样品富集:将采集的土壤样品分别置入无菌三角瓶中,加入适量无菌水,于30℃、180 r/min 摇床振荡打散均匀后,静置30 min。取5 mL 静置后的上清液加入盛有50 mL 富集培养基的三角瓶中,在30℃、180 r/min 摇床振荡培养3-5 d后,移取5 mL 培养液至另一盛有新鲜富集培养基的三角瓶中继续培养3 d。

1.2.3 纤维素分解菌株的筛选:初筛:取富集后的培养液用无菌水分别稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 倍,涂布到高盐察氏培养基平板上,于30℃培养箱培养,待长出菌落后,挑取培养基上的真菌于高盐察氏培养基上划线分离,得到单菌落。然后将真菌转接到纤维素刚果红培养基上培养1周左右,依据透明圈直径选择高产酶菌株。

复筛:将初筛得到的单菌落接种到种子培养基中,30℃、180 r/min 振荡培养,制成菌悬液,然后接种于液体发酵培养基中,30℃、180 r/min 振荡培养3 d,分别测定滤纸酶活和CMC酶活和木质素酶活,把酶活较高的菌株作为复筛的优良菌株。

1.2.4 粗酶液的制备:取250 mL 三角瓶,装入200 mL 发酵产酶培养基,从种子培养基中取4 mL 悬浮液接种到发酵产酶培养基上,30℃、180 r/min 摇床振荡培养3 d。培养液于4℃、6 000 r/min 离心15 min,上清液为粗酶液。

1.2.5 酶活力测定方法:(1) CMC 酶活力测定^[6]。25 mL 具塞试管中加入1.5 mL 以0.2 mol/L pH 5.0 HAc-NaAc 缓冲液配制的1% CMC-Na 溶液,置于50℃水浴中预热5 min。加0.5 mL 适当稀释的酶液,摇匀,50℃准确反应30 min,之后加入DNS 试剂1.5 mL,放入沸水浴显色5 min,取出后立即置于冰水中冷却至室温,定容至25 mL,摇匀。以相同条件下沸水浴灭活5 min 的酶液为空白,在波长

520 nm 条件下测定吸光值。

酶活单位的定义:上述反应条件下,每分钟催化纤维素水解生成 1 μmol 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位,用 IU/mL 表示。

(2) 滤纸酶活力测定^[7]。取 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 5.0) 1 mL,加入新华定量滤纸 1 条(1 cm×6 cm、50±1 mg),再加入粗酶液 0.5 mL,50 °C 恒温水浴保持 1 h,加入 DNS 试剂 1.5 mL,于沸水浴中放置 5 min,冷却,定容至 25 mL,于 520 nm 处测定其吸光度值,按 DNS 法测定还原糖含量。在上述条件下,每分钟催化水解底物生成 1 μmol 葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活单位,用 IU/mL 表示。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 菌株的形态特征观察:根据《中国真菌志》方法^[8],采用载片培养法培养真菌,光学显微镜下观察菌丝体大小、形状、表面特征及是否有横隔、孢子大小、形状、类型等,对照确定菌株的种属地位。

1.3.2 分子生物学鉴定:真菌总 DNA 的提取具体步骤为^[9]:将从培养皿上刮取的菌体或离心收获的菌体放入研钵中,加液氮后研磨成粉末。将该粉末转移到 10 mL 的离心管中,向离心管中加入一定量的 DNA 抽提液[0.1 g/2 mL,抽提液配方:Tris-HCl (pH 7.5) 0.2 mol/L, NaCl 0.5 mol/L, EDTA 0.01 mol/L, SDS 1%]和与抽提液等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, V/V/V),于涡旋器上剧烈涡旋 3–6 min,8 000 r/min、4 °C 离心 5 min。再将上清液转移到一个新的离心管,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1, V/V),混匀后 8 000 r/min、4 °C 离心 5 min。将上清液转移到一个新的离心管,向该离心管中加入 2.5 倍体积的无水乙醇,–20 °C 放置 30 min。取出离心管,10 000 r/min、4 °C 离心 10 min,弃上清液后空气干燥,加入适量的 TE 溶解沉淀即得到 DNA。

以提取的真菌 DNA 作为模板,用真菌通用引物扩增 18S rDNA 序列。NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')及 NS8(5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3')扩增供试菌的片段。PCR 体系为 50 μL 体系:基因组 DNA 2 μL ,上游引物 2 μL ,下游引物 2 μL ,

10×PCR buffer (Mg^{2+}) 5 μL , dNTPs 4.0 μL , *Taq* 酶 1.0 μL , ddH₂O 34 μL 。

PCR 反应条件:94 °C 5 min;94 °C 1 min,56 °C 1 min,72 °C 80 s,35 个循环;72 °C 10 min。PCR 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,检测后进行测序分析。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选结果

样品富集培养后涂到高盐察氏培养上,得到 6 株真菌,纯化后将其涂到纤维素刚果红培养基上,挑选具有透明圈的真菌菌株,然后测定有透明圈菌株的酶活。经过初筛和复筛后得到一株分解纤维素能力较强的菌株,命名为 GC2-2。

2.2 GC2-2 菌株形态特征观察

对菌株 GC2-2 进行平板培养及载片培养,平板培养观察其菌落形态,载片培养在光镜下进行形态观察,结果见图 1。该菌菌落平展,粉状,近圆形,边缘整齐,灰褐色,背面褐色,分生孢子梗端生或者侧生于菌丝,直,偶尔见分枝,枝孢椭圆形或近圆柱形,分生孢子近球形。

根据《中国真菌志》,菌株 GC2-2 依形态学特征初步鉴定为枝孢属(*Cladosporium*)。

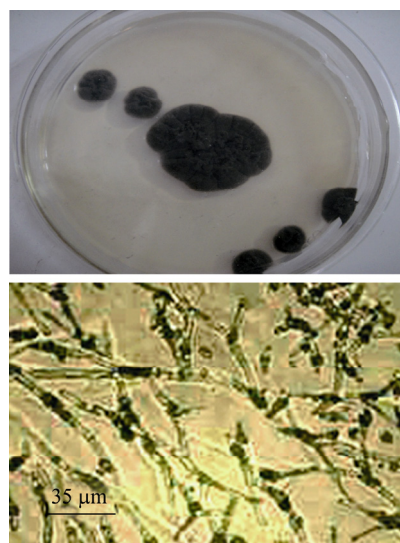


图 1 GC2-2 菌落形态特征

Fig. 1 Morphological characteristic of GC2-2 strain

2.3 分子生物学鉴定

为了进一步确定该菌的分类地位,在形态学的基础上又进行了分子生物学鉴定。用所设计的引物扩增并进行 18S RNA 序列分析,将测序结果与 NCBI 数据库 BLAST 比对,选取同源性较高的模式菌株进行系统发育分析,结果见图 2。由图 2 及其形态特征分析,菌株 GC2-2(*Cladosporium sphaerospermum*)属于与球孢枝孢菌,其同源性为 96%。其 18S rRNA GenBank 登录号为 HM347335。

2.4 GC2-2 粗酶液酶学性质的初步研究

2.4.1 温度对 CMC 酶活力的影响: 调节温度分别为 20 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C、75 °C、80 °C, pH 值为 6.5, 反应时间为 30 min, 测定不同温度下的酶活力。结果见图 3。

从图 3 中可以看出,此菌分泌的纤维素酶在 20 °C–85 °C 均有酶活力,并且在 85 °C 条件下相对酶活为 50%左右,说明此菌分泌的纤维素酶具有较强的高温耐受性。此菌分泌的纤维素酶最适反应温

度的是 35 °C。

2.4.2 pH 值对 CMC 酶活力的影响: 用 pH 值分别为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的缓冲溶液配置 1% 的 CMC 底物溶液,加入酶液反应,测定 CMC 酶活力。其结果见图 4。

从图 4 中可以看出,此菌分泌的纤维素酶在 pH 5.0–8.5 均有酶活力, pH 8.5 相对酶活在 60%, pH 6.0 相对酶活为 20%, 说明此菌分泌的纤维素酶 pH 范围广泛,无论是酸性还是碱性条件都具有一定酶活力,最适的 pH 范围是 7.5。

2.4.3 不同发酵时间对酶活力的影响: 从种子培养基中取 4 mL 悬浮液接种到发酵产酶培养基上, 30 °C、180 r/min 摇床振荡培养,然后分别在 2、3、4、5、6、7 d 取粗酶液测定酶活。其结果见图 5。

从图中可以看出,该菌滤纸酶活力高于其 CMC 酶活力, CMC 酶活在第 3 天达到最高值,而滤纸酶活在第 4 天达到最高峰,两种酶活在接近第 7 天时都几乎为零。

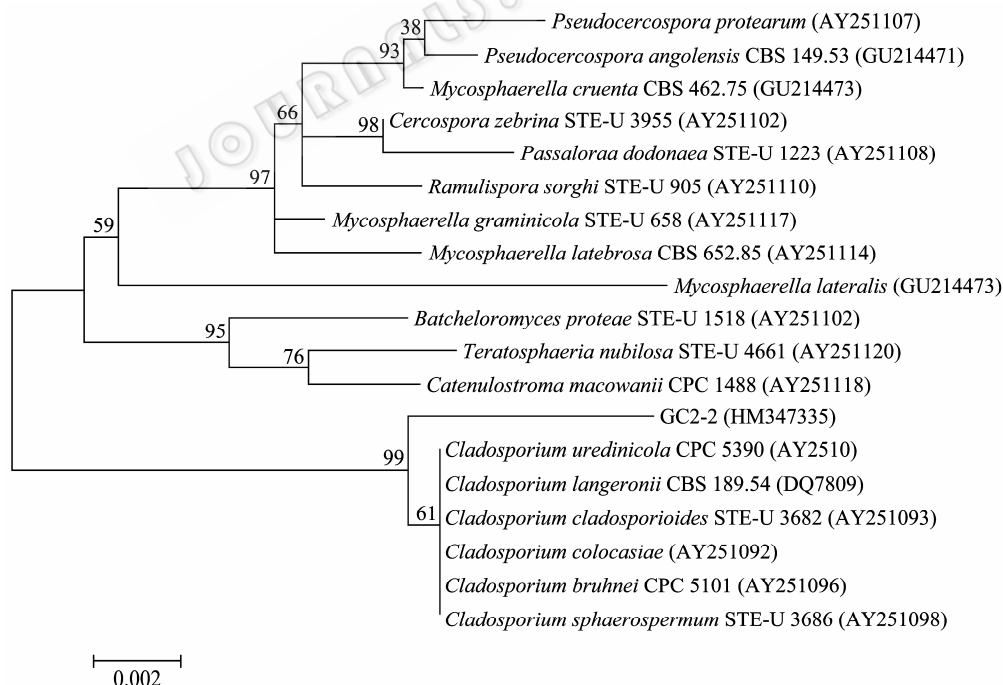


图 2 菌株 GC2-2 与相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of GC2-2 and related *Cladosporium* sp.

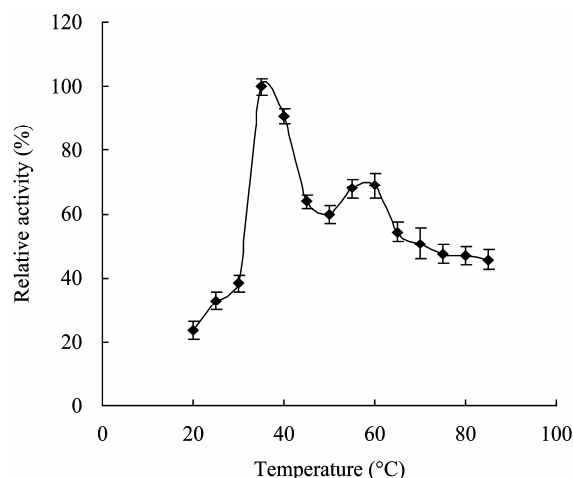


图3 不同温度对酶活力的影响

Fig. 3 Effects of temperature on the enzyme activity

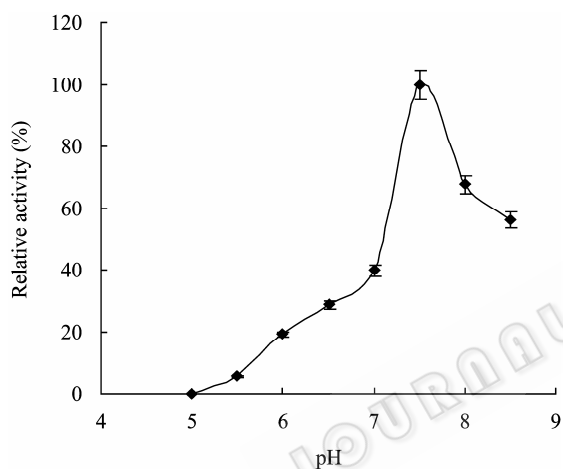


图4 pH值对酶活力的影响

Fig. 4 Effects of pH value on the enzyme activity

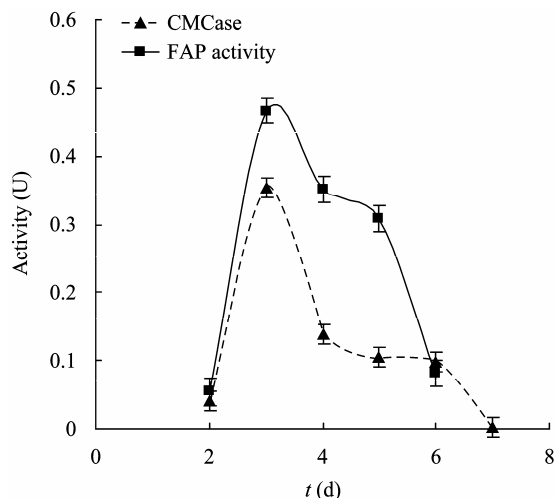


图5 不同发酵时间对酶活力的影响

Fig. 5 Effects of incubation time on enzyme activity

3 结论

目前,对产纤维素酶真菌的研究大多集中于曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)、青霉属(*Penicillium*)等,而很少有关于枝孢属产纤维素酶的研究报道^[10]。本实验从土壤样品中,利用刚果红培养基以及酶活性测定方法筛选分离得到一株产纤维素酶的真菌 GC2-2,通过形态特征观察以及分子生物学鉴定,该菌株属于枝孢属中的球孢枝孢菌 *Cladosporium sphaerospermum*。

酶学性质研究表明, *Cladosporium sphaerospermum* GC2-2 分泌的纤维素酶具有宽泛的反应温度和 pH 范围,其温度耐受范围在 30 °C–85 °C 之间,在 85 °C 下相对酶活为 50% 左右,具有极强的耐高温能力。国内目前报道产耐高温纤维素酶的真菌通常只能耐受 60 °C–70 °C 高温,其中耐高温能力最强的是曲霉所分泌的纤维素酶,在 80 °C 下残余酶活力为 45%^[11],与之相比, *Cladosporium sphaerospermum* GC2-2 分泌的纤维素酶的耐高温性,在 85 °C 下残余酶活力仍能为 50%,对于秸秆堆沤、腐熟,具有明显的优势,能够起到降低成本、缩短降解时间的作用。

Cladosporium sphaerospermum 分泌的纤维素酶 pH 耐受范围在 5.0–8.5,最适 pH 为 7.5–8.5。目前国内报道的镰刀霉菌(*Fusarium* sp.)所分泌的纤维素酶, pH 7.5–8.5 之间剩余酶活力在 80% 以上^[12]。与之相比,两者相对酶活基本接近,具备了用于秸秆腐熟发酵的基本条件。*Cladosporium sphaerospermum* GC2-2 分泌的纤维素酶滤纸酶活与 CMC 酶活性都较高,具有较好的降解作物秸秆所需要的酶系。测定表明,其滤纸酶活与 CMC 酶活随着时间的推移,都呈现出逐步降低的趋势,在接近第 7 天时二者都几乎为零,其原因是因为纤维素酶是一种诱导酶^[13],只有当酶的作用底物或其类似物存在时才能合成。因此,该菌株在发酵的初期产酶活较高,随着底物的减少酶活呈逐步下降趋势。综合 *Cladosporium sphaerospermum* GC2-2 所产纤维素酶的酶学特征及酶系组成,该菌具有极具秸秆生物降解的研究和应用价值。

参 考 文 献

- [1] 陈爱侠, 钟章成. 四川大头茶种子萌发特性的初步研究[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 1996, 24(1): 81-84.
- [2] 杨期和, 宋松泉, 叶万辉, 等. 种子感光的机理及影响种子感光性的因素[J]. 植物学通报, 2003, 20(2): 238-247.
- [3] 杨利平, 宋满珍, 张晶. 光照和温度对百合属 6 种植物种子萌发的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(4): 14-18.
- [4] 聂志强. 产纤维素酶真菌的筛选及其酶学性质的研究[J]. 中国酿造, 2009, 204(3): 81-83.
- [5] 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基[J]. 微生物学通报, 1997, 24(4): 251-252.
- [6] 王晓芳, 徐旭士, 吴敏, 等. 一株纤维素分解菌的分离与筛选[J]. 生物技术, 2001, 11(2): 27-30.
- [7] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 56-68.
- [8] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1979: 565-566.
- [9] 方卫国, 杨星勇, 裴炎, 等. 真菌核酸的一种快速提取方法[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(3): 305-307.
- [10] 韩立荣, 张双玺, 张兴, 等. 高效纤维素降解真菌的筛选和鉴定[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(9): 169-174.
- [11] 高建民, 席宇, 翁海波, 等. 一株嗜热嗜酸纤维素酶高产霉菌分离鉴定及其酶学性质研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 715-718.
- [12] 曾青兰. 产碱性纤维素酶真菌的筛选鉴定及酶学性质研究[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(8): 899-901.
- [13] 郭杰炎, 蔡武城. 微生物酶[M]. 北京: 科学出版社, 1986.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。