

一株耐冷玫红假裸囊菌 HD1031 的鉴定及其 所产纤维素酶的研究

韩龙^{1,2,3△} 石家骥^{2,3△*} 石磊^{1*} 王有智² 钞亚鹏^{2,3}
杨敬^{2,3} 张国青^{2,3} 钱世钧^{2,3}

(1. 曲阜师范大学 生命科学学院 山东 曲阜 273165)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

(3. 传感器国家重点实验室 北京 100101)

摘要:【目的】以纤维素为唯一碳源,从四川省阿坝自治州黄龙沟的高山低温环境中分离筛选产纤维素酶的耐冷菌,并研究菌株的产酶特征。【方法】根据菌株的 ITS 序列分析及形态特征,对菌株进行鉴定。利用 DNS 法测定纤维素酶活性。【结果】从四川省阿坝自治州黄龙沟的高山腐殖土中筛选出一株产纤维素酶的耐冷菌 HD1031,经鉴定该菌为玫红假裸囊菌(*Pseudogymnoascus roseus*)。该菌可在 4 °C–25 °C 生长,最适生长温度为 16 °C–17 °C。该菌在以微晶纤维素和玉米芯粉为碳源、硫酸铵和 Tryptone 为氮源的培养基中,17 °C、160 r/min 摇瓶发酵 8 d 后产生纤维素酶,其中内切葡聚糖酶酶活为 366.67 U/mL,滤纸酶酶活 87.6 U/mL,β-葡萄糖苷酶酶活 90.8 U/mL,酶最适反应 pH 为 6.0,最适反应温度为 50 °C。【结论】筛选获得一株产纤维素酶的耐冷菌 HD1031,此菌株所产纤维素酶在 20 °C–40 °C 下活性较高,对热敏感,具有低温纤维素酶的特点。

关键词: 玫红假裸囊菌,耐冷菌,低温纤维素酶

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA020204, 2012AA101807)

*通讯作者: 石家骥: shijj@sun.im.ac.cn; 石磊: slsql@163.com

△并列第一作者

收稿日期: 2012-07-18; 接受日期: 2012-11-08

Identification of a psychrotroph *Pseudogymnoascus roseus* HD1031 and the properties of its producing cellulase

HAN Long^{1,2,3△} SHI Jia-Ji^{2,3△*} SHI Lei^{1*} WANG You-Zhi² CHAO Ya-Peng^{2,3}
YANG Jing^{2,3} ZHANG Guo-Qing^{2,3} QIAN Shi-Jun^{2,3}

(1. College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu, Shandong 273165, China)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(3. State Key Laboratory of Sensor, Beijing 100101, China)

Abstract: [Objective] To screen a psychrotolerant cellulase-producing strain from the decayed soil of Huanglong Mountain, Sichuan, China, and determine the properties of the cellulase. **[Methods]** The strain was identified by the morphology and ITS sequence analysis. The DNS method was used to determine the activity of cellulases. **[Results]** A psychrotolerant cellulase-producing strain HD1031 was screened from the decayed soil of Huanglong Mountain. It was identified as *Pseudogymnoascus roseus* by the morphology and ITS sequence analysis. The strain could grow between 4 °C and 25 °C and its optimum growth temperature is 16 °C–17 °C. In the medium containing Avicel, corn cob powder, (NH₄)₂SO₄ and Tryptone, the strain HD1031 produced cellulases. After cultivating under the conditions of 17 °C and 160 r/min for 8 days, the cellulases activities in the fermentation broth were CMCase activity 366.67 U/mL, FPA 87.6 U/mL and the β-glucosidase activity 90.8 U/mL. The optimum pH value and temperature of the CMCase was pH 6.0 and 50 °C, respectively. **[Conclusion]** A psychrotolerant cellulase-producing strain HD1031 was screened and identified. The cellulase possessed the characters of cold-active cellulase.

Keywords: *Pseudogymnoascus roseus*, Psychrotroph, Cold-active cellulase

纤维素酶是一种能够将纤维素降解为葡萄糖的复合酶系, 主要由 3 个组分组成, 即: 内切葡聚糖酶(EC 3.2.1.4, CMC 酶); 外切葡聚糖酶(EC 3.2.1.91, 或称纤维二糖水解酶 CBH); 葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21, 水杨甙酶)。纤维素酶应用较为广泛, 在纺织行业中的作用较为突出, 主要用于牛仔布的水洗和石磨处理, 包括起花、减量处理和生物抛光。纤维素酶处理棉麻织物具有以下优点: (1) 能赋予织物独特花色和柔软手感且不会引起织物强度的过度损伤; (2) 减轻

磨石对设备的磨损, 增加设备的处理能力, 提高生产效率; (3) 酶可降解, 污水易处理, 利于环保^[1-2]。

工业生产上常用的产纤维素酶微生物多是常温和中温丝状真菌, 它们能够产生完整的纤维素酶系, 可以将结晶纤维素完全降解为葡萄糖, 如: 木霉(*Trichoderma* sp.)、青霉(*Penicillium* sp.)、腐质霉(*Humicola* sp.)^[3]等。上述菌株产生的纤维素酶大多需要在较高温度条件下才能发挥较好的效能, 在室温或较低温度下, 它们的酶活力都非

常低;而低温纤维素酶则在室温或低温下具有较高的酶活力。在实际应用中,较低的温度意味着较低的能耗,特别是用低温纤维素酶对牛仔布进行水洗处理,会产生较常温酶处理更好的质感与弹性^[2];同时,失活处理也较容易。因此,开发研究低温纤维素酶在工业上具有重要的意义。

低温酶往往是由低温菌产生的,根据 Moyer 与 Morita 的定义,将适冷菌分为耐冷菌(Psychrotrophs)与嗜冷菌(Psychrophiles)^[4]。目前发表过的产低温纤维素酶菌株有十几株,大多是来自极地、海洋或高山等自然低温环境中的微生物。这些菌株所产纤维素酶的最适反应温度在 20 °C–40 °C,对热敏感,pH 稳定性范围相对较窄,所产纤维素酶的酶活不高。产酶菌种有:交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)、青霉(*Penicillium* sp.)、木霉(*Trichoderma* sp.)、链霉菌(*Streptomyces* sp.)、缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas* sp.)和地丝霉(*Geomyces* sp.)等^[5–8]。

本实验室从四川黄龙高山上的腐殖土样中筛选到一株可以分解纤维素的真菌,其所产的纤维素酶酶活力较高,具有潜在的工业应用价值。

1 材料

1.1 土样

中国四川省黄龙沟高山腐殖土。

1.2 主要试剂

羧甲基纤维素钠(CMC, Fluka), 3,5-二硝基水杨酸(国药集团), Avicel PH-101 (Fluka), Tryptone (Oxoid), 水杨苷(Salicin, Sigma), 新华 1 号滤纸(杭州新华)。

1.3 培养基

斜面、平板培养基: PDA 培养基。

筛选培养基(g/L): 纤维素粉 15, 硫酸铵 5, 磷酸二氢钠 1.5, 去氧胆酸 1, 琼脂 15, pH 6.0, 使用前加入青霉素。

菌丝体培养基(g/L): 葡萄糖 10, 玉米浆 5, Tryptone 10, 磷酸二氢钾 1.5, pH 自然。

产酶培养基(g/L): 微晶纤维素 20, 麸皮 10, 玉米芯粉 10, Tryptone 10, 磷酸二氢钾 1.5, 自来水, pH 自然。1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

2 方法

2.1 菌株的筛选

取 1 g 土样于 40 mL 筛选培养基(不加琼脂粉)中,于 19 °C、140 r/min 振荡富集培养 10 d。取富集液以无菌水梯度稀释为 10⁻²–10⁻⁶ 浓度,每个梯度取 0.5 mL 涂布于固体筛选培养基上,17 °C–20 °C 培养。产纤维素酶的菌株将会水解纤维素产生透明圈,挑取相应菌落,在 PDA 固体培养基上进行划线纯化,得到纯培养物。

2.2 形态学鉴定

用打孔器取直径 5 mm 的菌丝块接种于 PDA 平板上,铝箔纸包裹,在 20 °C 暗处培养 50 d,记录菌落形态;另在 PDA 固体培养基上做插片培养,通过光学显微镜和扫描电子显微镜进行微观和超微观察,并测量孢子大小,进行形态学鉴定。

2.3 分子鉴定

接种 HD1031 在 17 °C、160 r/min 培养 7 d,利用天根基因组试剂盒从 HD1031 的菌丝体中提取基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板,采用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行菌株 ITS 序列的扩增,按照燕勇等^[9]报道的 PCR 反应体系及反应条件进行。扩增产物由北京擎科生物公司测序。将测定的序列提交 GenBank 数据库并进行 BLAST 比较分析,并用 MEGA 3.1 软件进行同源性分析,建立系统发育树。

2.4 生长温度曲线的测定

用打孔器取直径 5 mm 的菌丝块接种于 PDA 固体培养基上,分别置于 4 °C、10 °C、14 °C、

17 °C、20 °C、25 °C、28 °C 等不同温度条件下培养 10 d, 测量菌落直径。

2.5 纤维素酶活力的测定

菌株在产酶培养基中于 17 °C、160 r/min 发酵培养 10 d 后, 发酵液离心, 上清液即为粗酶液。按照卢敬华等^[10]所述方法测定 CMC 酶活力与滤纸酶活力。

β -葡萄糖苷酶活力的测定: 以 1.5% 的水杨苷为底物代替 CMC, 其他同 CMC 酶活测定。

酶活力单位的定义: 参照相关文献[7,11-12], 将本文中的纤维素酶活力定义为: 在上述条件下, 每分钟水解底物产生 1 μ g 还原糖的酶量为一个酶活力单位(U/mL)。

2.6 产酶条件的研究

2.6.1 碳源和氮源对产酶的影响: 在发酵培养基中分别加入 2% (W/V) 的不同碳源(稻草粉、玉米芯粉、Avicel PH101、Avicel 4 号、Avicel 2 号、Avicel PH101+玉米芯粉)进行发酵产酶实验; 分别加入 1% (W/V) 的不同氮源(酵母膏、牛肉膏、Tryptone、硝酸钾、硝酸铵、尿素、硫酸铵、硫酸铵+牛肉膏、硫酸铵+酵母膏、硫酸铵+Tryptone)进行发酵产酶实验; 测定发酵酶活, 确定最佳碳源和氮源。另在 HD1031 的培养基中, 分别以 1.0%、1.5%、2.0%、2.5% (W/V) 的碳源和 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 氮源浓度进行发酵产酶实验, 确定最佳碳、氮源浓度。

2.6.2 发酵温度和培养基初始 pH 的确定: 在温度为 10 °C、12 °C、15 °C、17 °C、20 °C 的条件下进行发酵产酶实验, 确定最佳发酵温度。在培养基的初始 pH 分别为 5.0、6.0、7.0、8.0 的条件下进行发酵产酶实验, 测定不同 pH 条件下的产酶情况, 确定初始 pH。

2.7 酶学性质的研究

2.7.1 最适反应温度: 分别测定粗酶液在 4 °C、12 °C、20 °C、30 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、

60 °C 以及 70 °C 下的酶活。

2.7.2 温度对酶稳定性的影响: 将粗酶液在 4 °C、20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C 以及 70 °C 条件下分别保温 1、2、3、4 和 5 h 后, 在 50 °C 下测定剩余酶活力。

2.7.3 最适 pH: 分别测定粗酶液在 pH 为 3.0、4.0、5.0、5.4、6.0、6.6、7.2、8.0 (其中 pH \geq 6.0 的缓冲液为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH $<$ 6.0 的缓冲液为 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液, 下同)条件下的酶活力。

2.7.4 pH 对酶稳定性的影响: 将粗酶液分别置于 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、6.6、7.2、8.0 的缓冲液中于 4 °C 保温 23 h 后测定酶活。

2.7.5 离子对酶的影响: 将酶分别与 10 mmol/L KNO₃、CaCl₂、FeCl₃、CoCl₂、MgSO₄、MnSO₄、ZnSO₄、BaCl₂、CuSO₄、FeSO₄、Li₂SO₄、NH₄Cl、NaCl、EDTA、HgCl₂ 混合后置于 4 °C 放置 30 min, 然后在最适温度和最适 pH 下测定酶活力。以未加金属离子的酶液为对照, 计算相对酶活。另外将酶分别与 10 mmol/L K₂CO₃、K₂Cr₂O₇、K₂SO₄、KH₂PO₄、KI、KCl、KNO₃ 混合后置于 4 °C 放置 30 min, 然后在最适温度和最适 pH 下测定酶活。以粗酶液为对照, 计算相对酶活。

2.8 与其他种类纤维素酶的比较

2.8.1 不同温度下的酶活特性: 将 HD1031 所产纤维素酶与特异腐质霉 H31-3 所产的中性纤维素酶以及木霉 T211 所产的酸性纤维素酶(本实验室制备)同时置于 4 °C、10 °C、20 °C、30 °C 以及各酶的最适反应温度下进行反应, 以最适温度下的酶活为 100%, 计算各温度下的剩余酶活力。

2.8.2 室温下的滤纸崩解实验: 将 HD1031 所产的纤维素酶与腐质霉所产的中性纤维素酶以及木霉所产的酸性纤维素酶(同上)调节至相同比活力 625 U/mg。取以上 3 种酶液 1 mL 分别与 5 mL 的缓冲液(HD1031 与腐质酶 H31-3 所产纤维素酶

在 pH 6.0 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 木霉 T211 所产纤维素酶在 pH 4.8 的 0.1 mol/L 醋酸缓冲液中)混合, 加入 50 mg 滤纸条(6 cm×1 cm), 并置于 25 °C、140 r/min 的摇床上反应, 记录各瓶中滤纸的崩解时间。

3 结果与分析

3.1 菌株筛选

图 1A 显示, 在筛选培养基中于 20 °C 培养 3 周后得到一株有明显透明水解圈的菌株, 经平板划线将该菌株纯化, 得到一株在低温培养下可以分泌胞外纤维素酶的菌株, 命名为 HD1031。

3.2 形态学鉴定

该菌在 PDA 固体培养基上于 20 °C 下避光培

养 50 d 后, 菌落直径为 58 mm; 菌落表面呈绒毛状, 中间有琥珀色分泌液, 边缘整齐, 不透明, 有放射状沟纹, 背面呈黄褐色(图 1B)。菌落颜色与培养温度有一定的相关性, 在 20 °C 和 4 °C 下菌落分别呈现粉红色和白色, 老熟后均为灰色。显微和超微观察, 菌丝无色透明, 多分枝, 分隔, 直径为 1.0 μm–2.0 μm, 偶尔可见节部膨大(图 1E)。分生孢子梗简单, 菌丝状, 或成束; 产生顶生或侧生的分生孢子。分生孢子(2.0–2.5) μm×(3.0–3.5) μm; 无色; 单个, 或成串; 表面粗糙; 梨形, 倒卵形, 柱形, 底端平截(图 1C–F)。该菌的形态特征, 与采自类似生境的 *Pseudogymnoascus* sp.一致^[13–15], 但该菌在多种培养条件下均未产生子囊果, 因此应是其无性型。

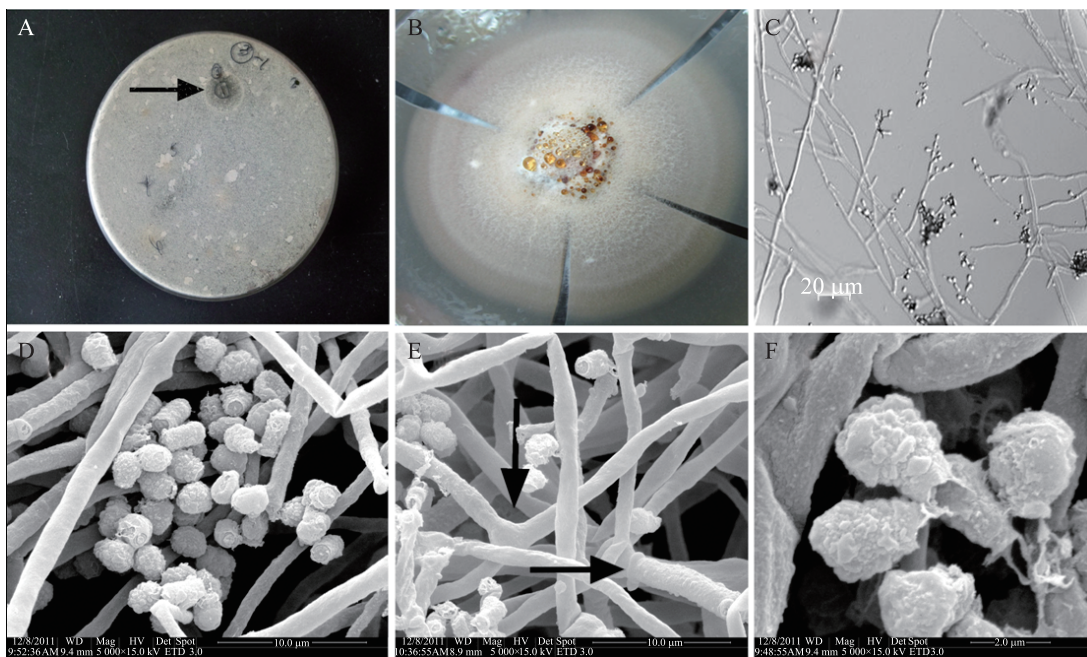


图 1 HD1031 的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of HD1031

注: A: HD1031 水解纤维素产生的透明圈; B: 菌落形态, 在 PDA 平板上 20 °C 避光培养 50 d; C: 插片培养, 光学显微镜形态, 菌丝无色, 多隔, 分枝; D–F: 扫描电镜形态, 分生孢子顶生或侧生, (2.0–2.5) μm×(3.0–3.5) μm。E: 箭头指示为膨大的节部; 标尺: C=20 μm, D–E=10 μm, F=2 μm。

Note: A: The cellulose hydrolysed zone of HD1031; B: The colony of HD1031 after cultivated for 50 d on PDA at 15 °C–20 °C in the dark; C: The morphology of Light micrographs. Hyphae hyaline, septate, ramose; D–F: The morphology of scanning electronic microscope. Conidia acrogenous and lateral, (2.0–2.5) μm×(3.0–3.5) μm。E: Arrow locate swollen internode; Scale: C=20 μm, D–E=10 μm, F=2 μm。

3.3 菌株分子生物学鉴定

以 HD1031 菌株基因组 DNA 为模板扩增该菌的 ITS 序列, 如图 2 所示, 测序大小为 627 bp, 将该序列提交 GenBank 数据库(登录号 JQ081229)进行 BLAST 比对分析, 利用 MEGA 3.1 软件构建系统进化树, 结果如图 3 所示。

HD1031 与玫红假裸囊菌 (*Pseudogymnoascus roseus*) 相似性达 99%, 结合该菌的形态特征确定该菌为一株玫红假裸囊菌 *Pseudogymnoascus roseus*。

3.4 生长温度曲线的测定

实验结果表明 HD1031 可在 4 °C–25 °C 生长, 17 °C–20 °C 时生长速度相对较快, 当温度为 28 °C 时该菌停止生长, 符合耐冷菌的定义(图 4)。

3.5 产酶条件的研究

3.5.1 碳源和氮源对产酶的影响: 分别采用 6 种

碳源和 10 种氮源进行产酶发酵实验。当采用 Avicel PH101 和玉米芯粉为碳源时, 所产酶活力为 342.8 U/mL, 明显较其他碳源所产酶活力高; 以硫酸铵+Tryptone 为氮源时, 所产纤维素酶酶活力比其他氮源时高, 结果见表 1。

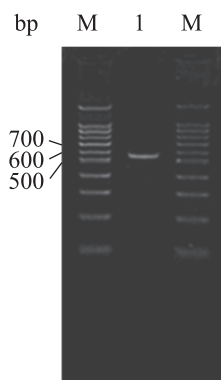


图 2 ITS 序列琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Result of agarose gel electrophoresis for ITS sequence

Note: M: Marker; 1: ITS sequence.

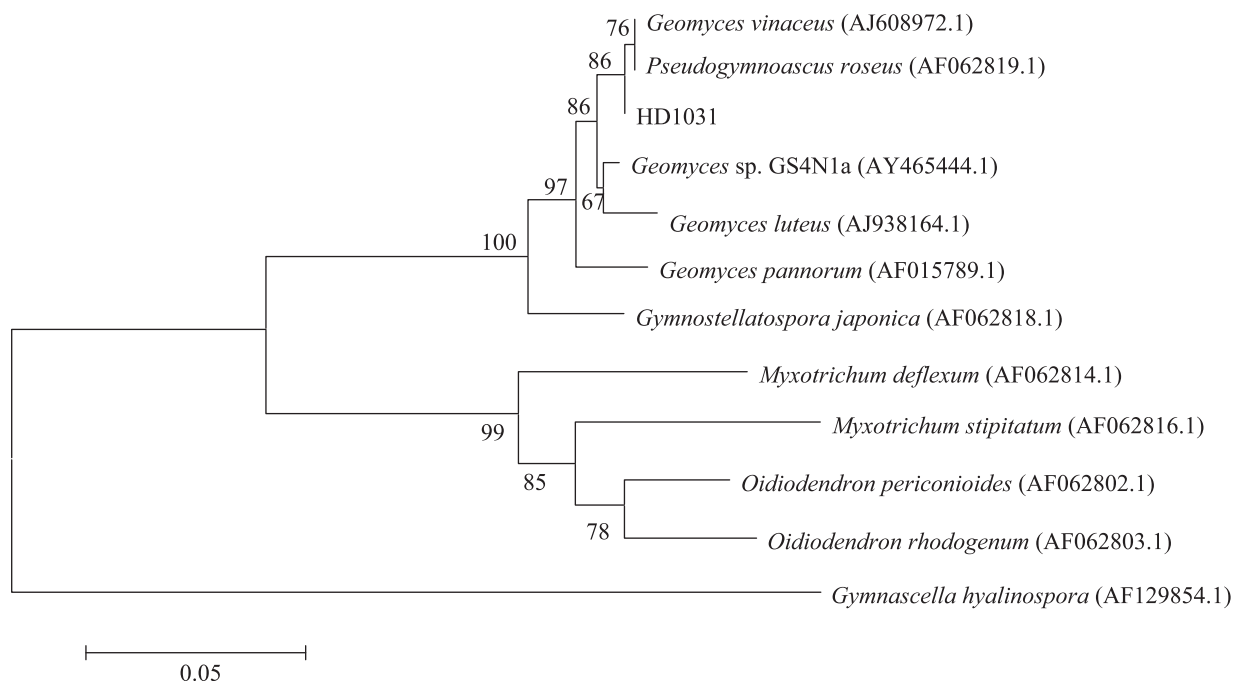


图 3 HD1031 菌株的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain HD1031

注: 括号中的序号代表序列 GenBank 中登录号; 分支点数字代表步长值; 标尺代表序列间分歧度。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.05 represents sequence divergence.

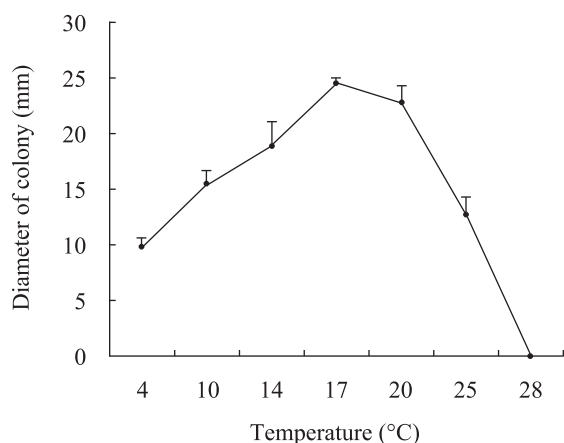


图4 HD1031菌株的生长温度曲线

Fig. 4 The growth curve of strain HD1031 at different temperatures

分别以不同浓度的 Avicel PH101 和玉米芯粉为碳源, 以不同浓度的硫酸铵和 Tryptone 为氮源, 进行液体发酵。图 5A、B 结果表明: 当 Avicel PH101 浓度为 2.0% 时发酵液酶活力最高, 当氮源浓度为 1.0% 时酶活力最高。

3.5.2 发酵温度和培养基初始 pH 的确定: 如图 5C 所示, 当发酵温度为 17 °C 时, 所产纤维素酶酶活力为 164.25 U/mL, 明显高于其他温度下所产酶活力。图 5D 显示, 初始 pH 为 5.0–6.0 时所产纤维素酶酶活较高。

3.6 酶学性质

3.6.1 最适反应温度: 图 6A 显示, HD1031 菌株

所产纤维素酶在 50 °C 时具有最高酶活力, 在 30 °C–60 °C 时酶活力高于 50%; 而温度低于 30 °C 和高于 60 °C 时酶活力均低于 40%。

3.6.2 温度对酶稳定性的影响: 结果如图 6B 所示, 当温度为 4 °C 时该酶的稳定性较好。20 °C–30 °C 时, 5 h 内相对酶活保持在 60% 以上, 特别是在 20 °C 时, 5 h 之内的相对酶活保持在 80% 以上, 这表明该酶在室温条件下具有较高的稳定性; 而当温度高于 60 °C 时酶的稳定性迅速下降; 70 °C 保温 5 h 后该酶基本失活。

3.6.3 酶的最适反应 pH: 图 6C 结果表明, pH 为 4.0–6.0 时酶活性较高, pH 6.0 时酶活力最高。在酸性环境中, pH 4.0 时的酶活力比 pH 3.0 和 pH 5.0 时的酶活力高, 这可能是由于粗酶中存在多种纤维素酶组分的原因。

3.6.4 pH 对酶稳定性的影响: 图 6D 显示, 当酶处于 pH 为 5.0–6.6 的环境中时较为稳定, pH 升高或降低, 稳定性均有所下降。但此酶在 pH 为 3.0–8.0 中保存 23 h 后, 剩余酶活仍大于 60%, 这说明该酶的 pH 稳定性范围较为广泛。

3.6.5 离子对酶的影响: 表 2 结果表明, Ba²⁺、Ca²⁺、Fe³⁺、Fe²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、EDTA、Mg²⁺、Zn²⁺ 和 NH₄⁺ 对 HD1031 的纤维素酶有正向促进作用, 尤其是 Ba²⁺、Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 对酶的促进作用较为显著。Mn²⁺、Hg²⁺ 对酶有抑制作用, 其中 Hg²⁺

表 1 不同碳源和氮源对产酶的影响

Table 1 Effect of different carbon source and nitrogen source on cellulase-producing

碳源 Carbon source	酶活 Enzyme activity (U/mL)	氮源 Nitrogen source	酶活 Enzyme activity (U/mL)	氮源 Nitrogen source	酶活 Enzyme activity (U/mL)
Straw powder	0	Yeast extract	256.50	Beef extract+(NH ₄) ₂ SO ₄	107.56
Corn-cob meal	68.60	Beef extract	271.38	Tryptone+(NH ₄) ₂ SO ₄	360.74
Avicel PH101	137.10	Tryptone	178.70	Yeast extract+(NH ₄) ₂ SO ₄	49.00
Avicel 4	0	KNO ₃	143.97	(NH ₄) ₂ SO ₄	158.86
Avicel 2	0	NH ₄ NO ₃	110.87		
Avicel PH101+ Corn-cob meal	342.80	Urea	0		

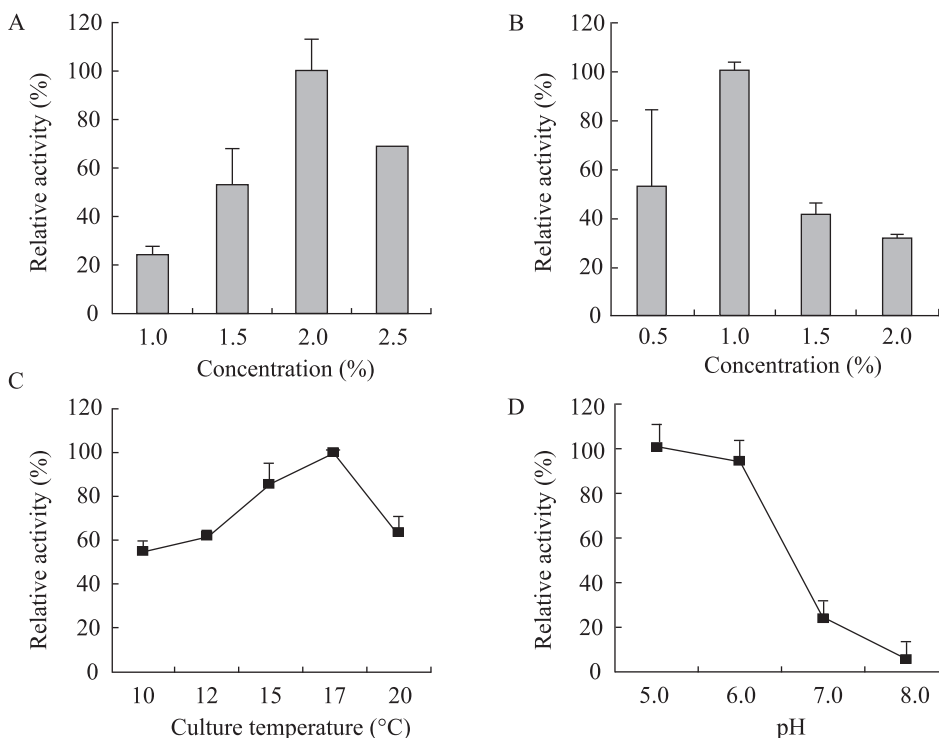


图 5 产酶条件的确定

Fig. 5 Determination of the enzyme producing condition

注: A: 碳源浓度; B: 氮源浓度; C: 培养温度; D: 初始 pH.

Note: A: The concentration of carbon source; B: The concentration of nitrogen source; C: Culture temperature; D: Initial pH.

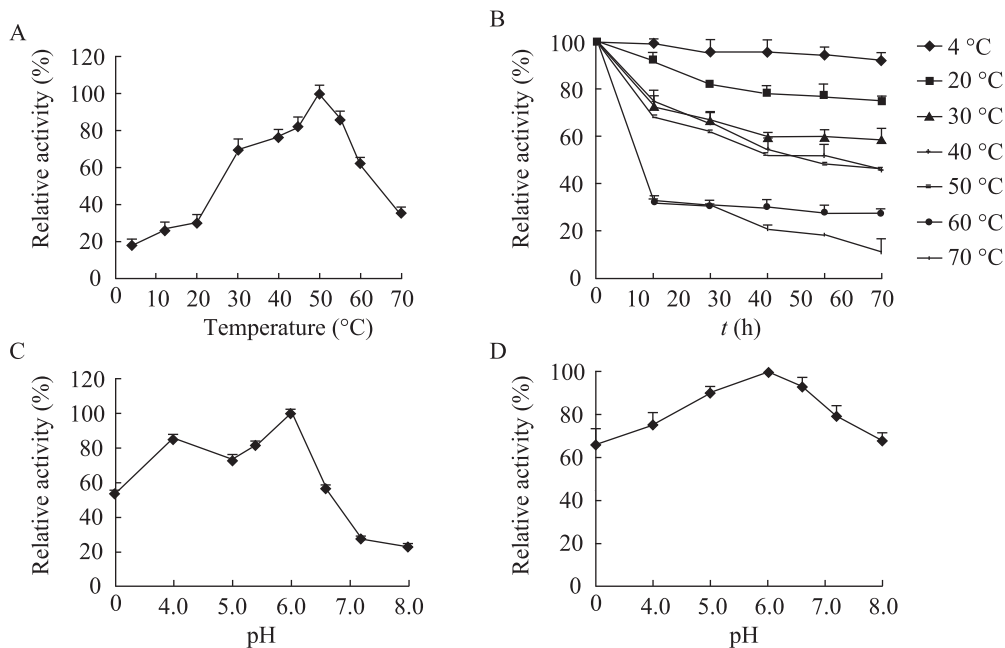


图 6 不同温度和 pH 对酶活的影响

Fig. 6 Effect of different temperature and pH on enzyme activity

注: A: 最适温度; B: 温度稳定性; C: 最适 pH; D: pH 稳定性.

Note: A: The optimum temperature; B: The temperature stability; C: The optimum pH; D: The pH stability.

表 2 不同离子对酶活的影响
Table 2 Effect of different ions on enzyme activity

离子 Ions	相对酶活 Relative activity (%)	离子 Ions	相对酶活 Relative activity (%)
Control	100	Mn ²⁺	65.30
K ⁺	106.10	Mg ²⁺	140.80
Ca ²⁺	178.57	Ba ²⁺	271.43
Cu ²⁺	122.45	Hg ²⁺	21.43
Fe ³⁺	126.53	Li ⁺	95.90
Co ²⁺	128.57	Zn ²⁺	155.10
Fe ²⁺	133.67	Na ⁺	115.30
EDTA	148.98	NH ₄ ⁺	160.20
I ⁻	104.35	NO ₃ ⁻	107.25
CO ₃ ²⁻	78.26	SO ₄ ²⁻	131.88
Cr ₂ O ₇ ²⁻	73.90	H ₂ PO ₄ ⁻	113.04

的抑制作用明显。K⁺、Na⁺、Li⁺对酶基本无影响。CO₃²⁻、Cr₂O₇²⁻对酶具有抑制作用, SO₄²⁻、H₂PO₄⁻对酶具有促进作用, 其中 SO₄²⁻的促进作用明显。而 Cl⁻和 NO₃⁻对酶活基本上无影响。

3.7 与其他菌株所产纤维素酶的比较

3.7.1 不同温度下的 CMC 酶活变化: 结果如图 7 所示, 中性纤维素酶和酸性纤维素酶随着温度的降低酶活迅速降低, 其中酸性纤维素酶在 10 °C 时即失去酶活, 而 HD1031 在 4 °C 时仍有 24.27% 的剩余酶活。以上说明该耐冷菌所产纤维素酶在常温或低温条件下仍能保持较高的酶活力。

3.7.2 滤纸崩解实验: 在 140 r/min、25 °C 条件下, HD1031 所产纤维素酶使滤纸条最先崩解, 崩解所需时间为 195 min。与此同时, 中性纤维素酶和酸性纤维素酶对滤纸条几乎没有水解(图 8)。这说明在实验条件下, HD1031 所产纤维素酶对滤纸的降解能力较高。

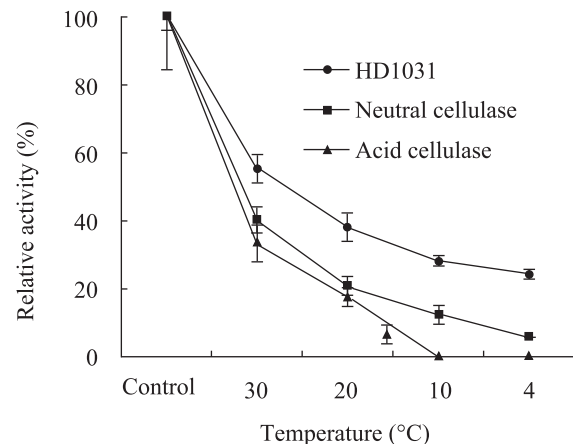


图 7 不同温度下的酶活变化

Fig. 7 Changes of enzyme activity under different temperatures

注: 对照分别为 HD1031 所产纤维素酶、中性纤维素酶和酸性纤维素酶在其最适温度下的酶活(HD1031: 50 °C; 中性纤维素酶: 65 °C; 酸性纤维素酶: 50 °C)。

Note: The contrasts are enzyme activity of the HD1031, neutral cellulase and acid cellulase in respective optimum temperature (HD1031: 50 °C; Neutral cellulase: 65 °C; Acid cellulase: 50 °C).



图 8 滤纸崩解实验结果

Fig. 8 Result of cellulase disintegrating the filter paper

注: A: 腐质霉; B: HD1031; C: 木霉.

Note: A: *Humicola* sp.; B: HD1031; C: *Trichoderma* sp..

4 结论

本实验通过对黄龙高山腐殖土样中分离出的一株能够分解结晶纤维素的 HD1031 菌株进行鉴定研究, 确定该菌株为一株玫红假裸囊菌 (*Pseudogymnoascus roseus*)。目前该菌在最适产酶条件下, 于装液量为 80 mL 的 500 mL 摇瓶中所产 CMC 酶最高酶活力为 830.5 U/mL, 较 250 mL 三角瓶的发酵产酶活力有较大提高。对 HD1031 粗酶液的性质进行研究发现, 该菌所产纤维素酶具有较广泛的 pH 耐受范围, 在室温下具有比较高的水解纤维素效率; 另外该菌株所产的纤维素酶具有 β -葡萄糖苷酶和滤纸酶活性, 且内切纤维素酶比例较高。

耐冷菌所产纤维素酶一般酶活较低, 例如, 张庆芳等在渤海海泥中分离的绿色木霉突变株所产纤维素酶为 67.30 U/mL, 经过条件优化产酶量达到 108.55 U/mL^[7]; 阚光锋等在南极海冰中分离的 *Pseudoalteromonas* sp. 545 所产 CMC 酶活为 35 U/mL^[16]; 曾胤新等从北极楚科奇海分离的 *Pseudoalteromonas* BSW20308 所产纤维素酶的酶活也较低^[5]; 现阶段的研究中酶活力稍高的

一株低温菌为张杰由若尔盖高原分离得到的一株缺陷短波单胞菌, 所产 CMC 酶活力为 15.6 IU^[8]。在纺织工业中使用的纤维素酶对内切纤维素酶的酶活力要求较高, 笔者分离的 HD1031 在低温下产 CMC 酶活力相对较高, 在此领域中具有较大的开发潜力。

致谢: 感谢中国科学院微生物研究所李春立老师在电镜观察上给与的指导和帮助, 感谢该所姚一建研究员在菌种鉴定上给予的帮助。

参考文献

- [1] 周秀梅, 夏黎明. 纤维素酶在织物整理中的应用[J]. 纺织学报, 2004, 25(3): 114-116.
- [2] 周爱晖. 纤维素酶在纺织品返旧整理中的应用[J]. 印染助剂, 2011, 28(2): 10-13.
- [3] 顾方媛, 陈朝银, 石家骥, 等. 纤维素酶的研究进展与发展趋势[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(1): 83-87.
- [4] Moyer CL, Morita RY. Psychrophiles and psychrotrophs[A]//Encyclopedia of Life Sciences[M]. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd, 2007: 1-6.
- [5] 曾胤新, 俞勇, 陈波, 等. 低温纤维素酶产生菌的筛选、鉴定、生长特性及酶学性质[J]. 高技术通讯, 2005, 15(4): 58-62.
- [6] 董硕, 迟乃玉, 张庆芳. 青霉 SWD-28 产低温纤维素酶发酵培养基研究[J]. 生物技术, 2011, 21(1): 84-88.
- [7] 陈亮, 迟乃玉, 张庆芳. 低温纤维素酶菌株 CNY086 选育及发酵培养基优化(I)[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1547-1552.
- [8] 黄玉兰, 李征, 刘晓宁, 等. 一株耐低温纤维素酶高产菌株的筛选、鉴定和产酶的初步试验[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 637-644.
- [9] 燕勇, 李卫平, 高雯洁, 等. rDNA-ITS 序列分析

- 在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 1938-1961.
- [10] 芦敬华, 石家骥, 葛克山, 等. 产中性纤维素酶特异腐质霉 H31-3复合诱变研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 74-78.
- [11] 陈亮, 迟乃玉, 张庆芳. 低温纤维素酶菌株 CNY086发酵条件优化 (II)[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1553-1556.
- [12] 陈丽燕, 张光祥, 黄春萍, 等. 两株高产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及酶学特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(4): 531-538.
- [13] Tsuneda A. Scanning electron microscopy of *Pseudogymnoascus roseus*[J]. Mycologia, 1982, 74(5): 844-847.
- [14] Jiang Y, Yao YJ. ITS sequence analysis and ascematal development of *Pseudogymnoascus roseus*[J]. Mycotaxon, 2005, 94: 55-73.
- [15] 何苏琴, 金秀琳, 罗进仓, 等. *Pseudogymnoascus roseus* 的生物学特性及液体发酵培养基的筛选[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1371-1376.
- [16] 钱文佳, 阚光锋, 徐仲, 等. 产低温纤维素酶南极细菌的筛选、生长特性及酶学性质的初步研究[J]. 食品科技, 2010, 35(1): 15-18.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2013-00-00; 接受日期: 2013-00-00

(下转 p.967)