

纤维素降解菌绿色木霉 C-08 的筛选及酶学特性研究

白洪志¹, 杨谦^{1*}, 王希国¹, 李晶²

(1. 哈尔滨工业大学生命科学与工程系, 黑龙江哈尔滨 150001; 2. 黑龙江省科学院应用微生物研究所, 黑龙江哈尔滨 150010)

摘要 在环境破坏较少的野生森林土壤中, 通过刚果红平板、滤纸条液体培养等初筛, 并在摇瓶发酵复筛的基础上得到 1 株高效纤维素降解菌绿色木霉 C-08, 同时对其最适酶活、最适温度及其稳定性进行了测定。结果表明: CMCase 的最适 pH 值为 3.6, 最适温度是 60 °C, 在 30-50 °C 稳定性较强; FPase 的最适 pH 值为 4.8, 最适温度是 50 °C, 在 30-40 °C 稳定性较强。

关键词 绿色木霉; 纤维素酶; 酶学特性

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)17-05033-02

Screening of *Trichoderma viridin* C-08 Decomposition by Cellulose and Study on Enzymatic Property

BAI Hong-zhi et al (Department of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150001)

Abstract A strain producing cellulase was screened and isolated from wide forest soil by being cultured on plates of Congo red dyeing and in liquid medium with filter paper, then fermented in liquid medium. Result showed that the optimal reaction conditions of CMCase were 60 °C, pH 3.6. The enzyme activity was stable under the temperature ranging between 30 and 50 °C. The optimal conditions of FPase were pH 4.8, 50 °C. And enzyme activity was very stable under 30-40 °C.

Key words *Trichoderma viridin*; Cellulase; Enzymatic property

纤维素酶是一种复合酶^[1-3], 在饲料、酿造、食品和纺织工业等领域得到广泛的应用, 至今已有很多关于纤维素酶的研究报道^[4]。丝状真菌酶系齐全、降解活力较高, 在纤维素的生物转化中得到广泛应用。笔者在生态环境破坏较少的野生森林中采集土样, 从中筛选出高活力菌株绿色木霉 (*Trichoderma viride*) C-08, 并对其酶学特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料 土样: 采集于辽宁省宽甸县的天华山森林公园, 沈阳东陵区的水稻田及农户水稻秸秆堆底部。主要试剂: CMC, 新华滤纸, 水杨素, DNS。

1.2 方法

1.2.1 培养基。刚果红鉴别培养基: 依参考文献[5]略作改进。滤纸条液体培养基 (NH₄)₂SO₄ 3.0 g, FeSO₄·7H₂O 0.005 g, KH₂PO₄ 1.0 g, MnSO₄·H₂O 0.001 6 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, ZnSO₄·7H₂O 0.001 7 g, CaCl₂ 0.1 g, CoCl₂ 0.002 g, NaCl 0.1 g, 琼脂 20 g, 球磨纤维素 20 g, 蒸馏水 1 000 ml。去掉纤维素和琼脂后添加滤纸条即是滤纸条液体培养基。液体发酵培养基: 依参考文献[6], 去掉其中的 Tween-80。

1.2.2 菌株筛选。①富集和纯化: 先在刚果红平板上将土样平行放置 5 颗粒, 30 °C 恒温培养 4 d, 将生长良好的土样用无菌水冲洗下来, 在 PDA 平板上划线分离得到纯化的菌株。②初筛: 将得到的菌株分别用刚果红平板和滤纸条液体培养基进行平行筛选, 其中平板 5 次重复放在 30 °C 恒温箱中培养, 滤纸条液体培养 3 次重复放在 30 °C、150 r/min 的摇床上培养若干天, 依其在 2 种培养基上的生长情况决定取舍, 只要该菌株在任一种培养基上生长良好就决定对其进行复筛。③复筛: 在 30 °C、150 r/min 的摇床上, 将初筛得到的菌株用液体发酵培养基培养 5 d, 之后测其纤维素酶活。

1.2.3 酶活力测定。①粗酶液制备: 将发酵液以 5 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。②滤纸酶活 (FPase): 参考文献[7]略作改进, 将 50 mg 的滤纸浸入 1 ml 0.05 mol/L、pH

值 4.8 的柠檬酸缓冲液中, 后加入 1 ml 适当稀释的酶液, 在 50 °C 的水浴条件下反应 60 min, 加入 2 ml DNS 试剂终止反应, 沸水浴中煮沸 5 min, 用蒸馏水稀释至 5 倍后, 于 530 nm 比色。扣除酶液和底物的空白后, 通过标准曲线计算酶的活力。③内切酶活 (CMCase): 参考文献[8]略作改进, 以 1 ml 1% 的用 0.05 mol/L、pH 值 4.8 的柠檬酸缓冲液配制的 CMC 为底物, 除反应时间为 30 min 以外, 其余条件同滤纸酶活。④β-葡萄糖苷酶活 (βGase): 参考文献[9]略作改进, 以 1 ml 0.5% 的用 0.05 mol/L、pH 值 4.8 的柠檬酸缓冲液配制的水杨素为底物, 其余同 CMCase。

以 1 ml 酶液 1 min 产生 1 μg 葡萄糖为 1 个酶活单位 (U)。

1.2.4 酶学特性研究。①酶作用最适温度: 分别于温度 30、40、50、60、70、80 °C 下, 测定酶活力。②酶的热稳定性: 将酶液溶于 pH 值 4.8 的柠檬酸缓冲液中, 分别于 30、40、50、60、70、80 °C 下处理保温 240 min, 之后测定剩余酶活力。③酶作用的最适 pH 值: 配制不同 pH 值的 0.05 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液, 使酶解反应于不同 pH 值下进行, 测定酶活力。

2 结果与分析

2.1 产纤维素酶真菌的筛选 通过富集、初筛和复筛得到 22 株菌株, 结果见表 1。由表 1 可知, 菌株 C-08 的 CMCase 和 FPase 较高, 故以其作为纤维素降解菌的出发菌株进行研究。沈雪亮用刚果红培养基筛选到 1 株细菌效果很好^[10], 笔者在初筛的过程中发现, 在刚果红鉴别培养基上有褪色圈的菌株其纤维素酶活不一定就高, 2 种初筛方法得到的结果也完全不同。有的菌株在刚果红培养基上有褪色圈或者生长较快, 而在滤纸条液体培养基上生长缓慢甚至不长; 反之亦然。若只用 1 种方法初筛很可能得到产酶性能不好的菌株, 依据文献在刚果红上表现较好的经过复筛有的已经被淘汰, 初步判断木霉等菌株在滤纸条液体培养基上生长良好, 而青霉、曲霉等菌株在刚果红培养基上表现较好。

所筛的丝状真菌对刚果红培养基的表现一般是有透明圈但不明显, 原因可能是丝状真菌生长较快, 随着菌丝的生长, 分泌的纤维素酶降解纤维素以后退掉的染料被菌丝吸附, 并且也观察到了吸附现象。而细菌由于其平板上扩散能力

作者简介 白洪志 (1971-), 男, 内蒙古通辽人, 博士, 助理研究员, 从事环境微生物研究。* 通讯作者, 博士生导师, 教授。

收稿日期 2007-03-15

不强,导致其分泌的酶液通过渗透降解菌落周围的纤维素,从而形成水解圈。

表1 纤维素酶产生菌株的筛选结果

菌株	CMCase	FPase	β GASE	菌株	CMCase	FPase	β GASE
H-1	15.72	9.23	28.31	H-17	18.07	9.58	3.43
H-2	17.88	9.17	33.65	H-18	15.60	8.88	16.18
H-5	13.61	7.06	55.36	H-20	16.80	11.33	50.68
H-6	17.02	8.50	5.12	C-3	20.38	10.73	3.10
H-9	14.78	9.76	52.91	C-4	20.76	10.37	2.19
H-10	15.76	8.57	53.90	C-5	17.48	8.76	4.29
H-11	18.14	12.19	56.39	C-08	21.58	16.07	7.50
H-12	17.17	7.65	33.64	D-3	13.65	10.13	-0.83
H-13	18.71	6.98	36.02	SY-4	17.10	11.05	33.71
H-15	14.82	9.38	43.85	SY-9	15.65	6.30	9.37
H-16	13.35	9.16	43.73	T2	12.27	5.04	4.53

2.2 菌株的形态学特征 C-08在PDA培养基上菌落为黄绿色,后变绿。初生菌丝白色,在25℃下3~4d菌落直径可达6~8cm。显微镜下观察,可见明显的瓶颈状分生孢子梗,分生孢子近球形,呈团状生于孢子梗顶端,孢子梗基本呈二叉状分支。经鉴定,为绿色木霉(*Trichoderma viride*)。

2.3 菌株的酶学特性

2.3.1 酶反应的最适pH值。由图1可见,CMCase在pH值3.2~4.8酶活力较高,最适pH值为3.6;而FPase在pH值4.0~6.0酶活较高,pH值为4.8时,其活力达到最大值。所以,该菌株所产纤维素酶属于酸性酶,并且从图1中可以看出,CMCase和FPase分别代表菌株不同的纤维素酶活力,不应以其中的一种代表该菌株的纤维素酶活。

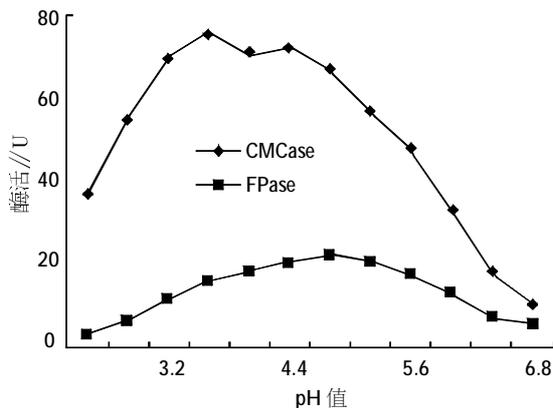


图1 pH值对C-08纤维素酶活力的影响

2.3.2 酶反应的最适温度。由图2可见,CMCase在40~60℃酶活较高,最适温度为50℃;FPase在50~60℃活性较高,最适温度是50℃,出此范围活性下降很快。同时可以看出,该菌株的温度适应范围很宽,50~60℃范围内酶的活力基本没变化,这为该菌株的应用提供了较宽的温度范围。

2.3.3 酶的热稳定性。由图3可见,CMCase在30~50℃范围内较稳定,FPase在30~40℃时最稳定,超过这个范围,酶活迅速下降。

3 小结

(1) 丝状真菌纤维素酶产生菌株宜用不同的方法筛选,刚果红鉴别培养基筛选菌株,透明圈的大小与酶活没有直接关系。纤维素酶产生菌的筛选,在初筛的基础上复筛必不可少。

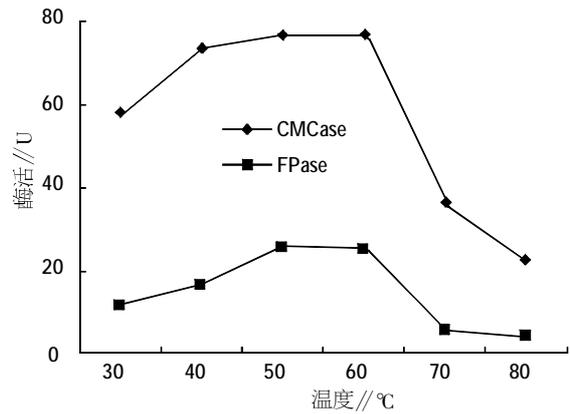


图2 温度对C-08纤维素酶活力的影响

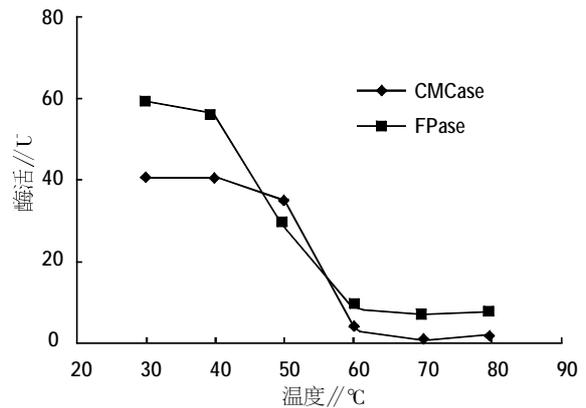


图3 C-08纤维素酶反应温度稳定性

(2) 该研究用2种初筛方法,结合复筛得到1株高活性纤维素降解菌株绿色木霉C-08。

(3) 绿色木霉C-08酶学特性研究表明:CMCase的最适pH值为3.6,最适温度是50℃,在30~50℃温度范围内稳定性较强;FPase的最适pH值为4.8,最适温度是50℃,在30~40℃温度范围内稳定性较强。

参考文献

- [1] GHOSE T K. Bioconversion of cellulosic substances into chemicals, energy, and microbial protein[M]. New Delhi: IIT, 1978.
- [2] GERRIT B, PETTERSSON B. Extracellular enzyme system utilized by the fungus for the breakdown of cellulose[J]. Eur J Biochem, 1985, 146: 301-308.
- [3] WOOD T M. Purification and some properties of a (1,4)- β -D-glucan glucohydrolase associated with the cellulose[J]. Biochem J, 1968, 109: 217-227.
- [4] 潘锋, 杨树林, 史小丽, 等. 宇佐美曲霉 Y-26 纤维素酶的纯化及酶学性质[J]. 南京理工大学学报, 2001, 25(4): 424-427.
- [5] 张宇昊, 王颀, 张伟, 等. 一种改进的纤维素分解菌鉴别培养基[J]. 纤维科学与技术, 2004, 12(1): 33-36.
- [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] MANDELS M, ANDREOTTI R, ROCHE C. Measurement of saccharifying cellulase[J]. Biotechnol Bioeng Symp, 1976, 6: 21-23.
- [8] MANDELS M, STERNBERG D. Recent advances in cellulose technology[J]. J Ferment Technol, 1976, 54(4): 267-286.
- [9] 楚春雪, 李多川, 郭润芳. 一株嗜热毛壳菌 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及特性[J]. 菌物学报, 2004, 23(3): 397-402.
- [10] 沈雪亮, 夏黎明. 产纤维素酶细菌的筛选及酶学特性研究[J]. 林产化学与工业, 2002, 22(1): 47-51.