

二株高活力纤维素分解菌 EA₃-867 和 N₂-78 的 获得及其特性的比较

中国科学院上海植物生理研究所纤维素酶组 上海酒精二厂*

(上 海)

拟康氏木霉 (*Trichoderma pseudokoningii* Rifai) 野生型菌株 AS 3.3002 和木₃, 分别经多种物理化学因素(高能电子、⁶⁰钴、紫外线、亚硝基胍、硫酸二乙酯等)诱变处理后, 得到二株变异菌株 EA₃-867 和 N₂-78。它们的固体曲、液体曲和酶制剂的各项纤维素酶活力测定结果, 均比野生型菌株明显提高。N₂-78 菌株经摇瓶培养 60 小时, 其 CMC 糖化力为 255 毫克葡萄糖/毫升酶液, 滤纸糖化力为 8.2 毫克葡萄糖/毫升酶液, 棉花糖化力为 13.4 毫克葡萄糖/毫升酶液, 分别比野生型菌株提高 14.6 倍、5.3 倍和 7 倍。由 EA₃-867 和 N₂-78 的固体曲制取的纤维素酶粗制剂, 其各项纤维素酶活力测定结果, 均较 Onozuka R-10 纤维素酶制剂为高。上述野生型菌株及变异菌株均具有果胶酶、半纤维素酶、淀粉酶和少量蛋白酶的活力。变异菌株中果胶酶的活力较野生型菌株为高, 淀粉酶和蛋白酶活力则较低。同时, 变异菌株的形态也与原始菌株有明显差异。上述四株菌的孢子致死温度相同, CMC 糖化、滤纸崩溃和滤纸糖化的最适 pH 相近, 最适温度相同, 分别为 pH 4.4、60°C, pH 4.8、60°C 和 pH 4.8、60°C。

在选育高活力纤维素分解菌时, 有些作者采用诱变的方法选育纤维素酶活力高的木霉菌株^[1-6]。我们曾报道过用各种物理化学因素处理木霉属菌株 AS 3.3002, 得到一株纤维素分解活力较高的菌株 EA₃-867^[7]。该菌株在破碎植物细胞壁等方面已被国内有关单位广泛使用^[8,9]。后来, 我们又以木霉属菌株木₃ 为出发菌株, 经高能电子和亚硝基胍处理, 获得另一株纤维素分解活力更高的诱变菌株 N₂-78。

本文对上述几株木霉属菌的固体培养物、液体培养物(摇瓶), 和由它们制成的酶制剂的纤维素酶等酶活力作了分析和比较; 并比较了它们的菌落、菌丝和孢子形态, 以及生长速度, 纤维素酶性质等。试验表明, EA₃-867 和 N₂-78 是二株纤维素酶活力较高的优良菌株。

材 料 和 方 法

一、菌种

出发菌株: 野生型木霉 AS 3.3002 原编号为 1096 和木₃, 由纤维素酶菌种筛选小分队供给, 经鉴定, 均属于拟康氏木霉 (*Trichoderma pseudokoningii* Rifai)。

二、培养基

(一) 斜面培养基

1. 马铃薯汁培养基(%) : 马铃薯 20¹⁾, 纤维素粉 2, 琼脂 2;

2. 酵母膏蛋白胨培养基(%) : 酵母膏 0.1, 蛋白胨 0.2, 纤维素粉 2, 琼脂 2;

3. 麦芽汁培养基(%) : 5—7° Brix 麦芽汁,

本文于 1977 年 6 月 30 日收到。

* 参加菌种诱变工作的还有上海化纤六厂。广东省微生物研究所邓庄等同志协助进行菌种鉴定和形态观察。

1) 每 200 克去皮马铃薯加蒸馏水煮沸半小时后, 经纱布过滤, 取滤液稀释至 1000 毫升即成, 然后, 加纤维素粉和琼脂各 2 克配成。

纤维素粉 2, 琼脂 2;

4. 合成培养基(克): 每升溶液中含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4, KH_2PO_4 2.0, 尿素 0.3 (或 KNO_3 1.0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, CaCl_2 0.3, FeSO_4 0.005, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0016, ZnCl_2 0.0017, CoCl_2 0.002, 纤维素粉 20, 琼脂 20。

(二) 平板分离培养基

成份同上, 另加 0.12—0.15% 胆酸钠, 以限制菌落的扩散生长, 便于菌落的分离。但经多次诱变后, 菌落直径显著缩小。因此, 用变异株为出发菌株时, 可不加胆酸钠。

(三) 固体曲培养基

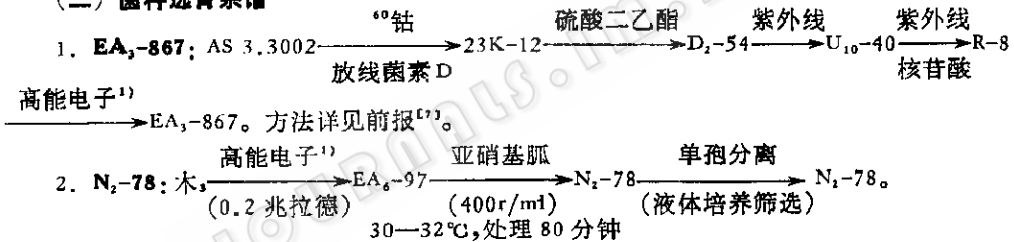
500 毫升三角瓶装 15—20 克稻草粉(或 9 份

三、诱变方法和菌种选育系谱

(一) 诱变程序

出发菌株 → 单孢纯化 → 斜面培养 → 分生孢子或萌发分生孢子悬浮液的制备 → 诱变处理 → 平板分离培养 → 活菌计数, 并移接至斜面培养 → 三角瓶固体培养(初筛) → 三角瓶固体培养(复筛) → 斜面传代 → 三角瓶培养(第二次复筛) → 斜面传代 → 优良菌株保藏。

(二) 菌种选育系谱



四、酶制剂制备

培养 3 天的固体曲, 加 10 倍重量的水浸泡 1 小时 (30°C), 用尼龙布或合成纤维棉过滤, 滤液低温离心 20 分钟 (3000 转/分), 上清液加 3 倍体积冷丙酮 (0°C 以下)。低温离心 30 分钟 (3000 转/分), 收集沉淀, 真空干燥成粗酶制剂(丙酮粉)。

五、酶活力测定

(一) 各种酶液的制备

1. 固体曲: 称取培养 3 天的相当于 1 克干曲的鲜曲, 加 35 毫升水, 于 30°C 左右浸泡 1 小时, 离心 5 分钟 (3000 转/分), 上清液即为 1:35 的固体曲酶抽提液。本文除特别说明外, 固体曲酶抽提液, 均指此种液体。

2. 液体曲: 培养 60 小时的液体曲, 离心 5 分钟 (3000 转/分), 上清液即为液体曲酶液。

3. 酶制剂: 将酶制剂配成 1%、0.5% 或 0.1% 的水溶液。

稻草粉加 1 份麸皮), 加入 2.2—2.5 倍于原料重量的水, 水中含对原料计的 2.5% 硫酸铵, 于 30°C 培养 3 天。

(四) 液体培养基

1. 种子培养基(%): 米糠 1, 麸皮 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, KH_2PO_4 0.1, CaCO_3 0.1, 葡萄糖一次结晶母液(上海葡萄糖厂供给) 1.500 毫升三角瓶中装培养基 100 毫升, 30°C 于旋转式摇床 (104 转/分) 培养 32—35 小时, 作二级培养的种子用。

2. 二级培养基: 上述种子培养基中以 1% 稻草粉代替米糠, 其余相同。接种菌丝体, 接种量 6%(V/V), 30°C 旋转式摇床培养 60 小时。

(二) 酶活力测定方法

1. CMC 酶解活力

(1) CMC 糖化力(以还原糖表示)

A 法: 0.5 毫升适当稀释的酶液, 加 2 毫升 0.625% 羧甲基纤维素钠盐溶液¹⁾ [简称 CMC 溶液, 原品由上海长虹塑料厂出品, 粘度 (PM₁₀) 300—600 厘泊。], 50°C 水浴中反应 30 分钟, 加 2.5 毫升 DNS 试剂终止反应, 煮沸 5 分钟, 于 540 毫微米波长下比色, 由比色读数换算成每毫升酶液作用半小时后产生的葡萄糖毫克数。

B 法: 基本上按 Mandels 的方法^[10], 0.5 毫升适当稀释的酶液, 0.5 毫升 1% CMC 溶液(溶

1) 由上海原子核研究所协助, 用静电加速器产生的高能电子照射孢子悬浮液。

2) 500 毫升 1% CMC 溶液, 加 100 毫升 0.05M 柠檬酸-0.1M 磷酸氢二钠缓冲液和 200 毫升水即成, pH4.4。

于 0.05 M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH 5.0), 50℃ 反应 30 分钟, 加 1 毫升 DNS 试剂煮沸 5 分钟, 于 540 毫微米波长下比色, 由比色读数换算成每毫升酶液作用半小时后产生的葡萄糖毫克数。规定在上述条件下, 每分钟产生 1 微克分子葡萄糖为 1 个酶活力单位。

(2) CMC 液化力^[11](以粘度表示)

2.5 毫升适当稀释的酶液, 加 2.5 毫升 0.2 M pH 5.0 的醋酸缓冲液和 5 毫升 1% CMC 溶液, 30℃ 反应 10 分钟, 用粘度计测定并求出反应前后反应液的比粘度, 按下式求出 CMC 酶活力:

$$\text{CMC 酶活力} = \left(\frac{1}{\text{反应后比粘度}} - \frac{1}{\text{反应前比粘度}} \right) \times \frac{1000}{\text{反应时间(分)}}$$

2. 滤纸酶解活力

(1) 滤纸崩溃法(静止法)

试管 (15 × 1.5 厘米) 内加 4 毫升酶液 (固体曲酶提取液或液体曲原液) 及 1 毫升柠檬酸 (0.05 M)-磷酸氢二钠 (0.1 M) 缓冲液 (pH 4.8), 再投入一张 1 × 3 厘米新华 1 号 (快速) 滤纸, 50℃ 静止保温 1 小时后, 观察滤纸崩溃程度。

(2) 滤纸糖化力

A 法 (静止法): 吸取前法所得之反应液 0.5 毫升, 用 DNS 试剂定糖, 扣去空白后, 换算成每毫升反应液在 1 小时产生的葡萄糖毫克数 (简称滤纸糖);

B 法 (静止法): 基本上根据 Mandels 的方法^[10], 试管 (15 × 1.5 厘米) 中加 0.5 毫升酶液及 1 毫升柠檬酸缓冲液 (0.05 M, pH 4.8), 试管底部预先竖放一张卷曲的 1 × 6 厘米的 Whatman 1 号滤纸 (约重 50 毫克), 50℃, 静止保温 1 小时, 用 DNS 试剂法测定形成的还原糖, 扣去空白后, 换算成每毫升酶液产生的葡萄糖毫克数 (简称滤纸糖);

C 法 (震荡法): 反应液同前述 B 法, 但反应在震荡器上震荡 (80—90 次/分, 振幅 5 厘米) 进行。

(3) 滤纸崩溃法(震荡法)

25 毫升容量瓶中注入 4 毫升酶液 (酶制剂为 1% 浓度) 及 1 毫升柠檬酸 (0.05 M)-磷酸氢二钠

(0.1 M) 缓冲液 (pH 4.8), 并放入 2 张 1 × 1 厘米 Whatman 1 号滤纸, 于震荡器上震荡 (80 次左右/分, 振幅 5 厘米), 观察二张滤纸全部崩溃成糊状所需的时间。再按外山法^[12]计算活力单位。

3. 棉花糖化活力^[10]

带塞试管 (11 × 1.5 厘米) 中, 加 1.0 毫升酶液 (不稀释) 和 1 毫升柠檬酸缓冲液 (0.05 M, pH 4.8), 及 50 毫克脱脂棉, 于 50℃ 水浴中, 静止保温 24 小时, 用 DNS 法测定形成的还原糖, 扣去空白后, 换算成每毫升酶液作用 (24 小时) 产生的葡萄糖毫克数 (简称棉花糖)。

4. 果胶酶活力

(1) 粘度法: 0.5 毫升 1% 浓度的酶制剂溶液, 加 4.5 毫升水及 5 毫升 1% 的果胶溶液 (苹果果胶, B. D. H 产品, 溶于 0.2 M, pH 5.0 的醋酸缓冲液中), 30℃ 恒温水浴中反应 10 分钟, 测定反应前后粘度的变化, 求出相对粘度和比粘度, 换算成每毫升酶液的活力单位数。本法不适用液体曲酶液。

(2) 还原糖法: 2 毫升适当稀释的酶液, 加 0.5 毫升 0.5% 的多聚半乳糖醛酸溶液 (Light 产品, 溶于 0.1 M, pH 4.5 醋酸缓冲液中), 30℃, 反应 30 分钟, 用 DNS 法测定形成的半乳糖醛酸, 扣去酶液空白, 换算成每毫升酶液 (半小时) 作用形成的半乳糖醛酸毫克数。

5. 半纤维素酶^[13]

以玉米芯中提取的半纤维素为底物, 用甲基间苯二酚法测定酶解形成的木糖, 换算成每毫升酶液作用 (半小时) 产生的木糖毫克数。

6. 淀粉酶活力

0.5 毫升适当稀释的酶液, 加 2 毫升 1% 的可溶性淀粉 (溶于 0.02 M, pH 4.8 醋酸缓冲液中), 50℃ 反应 30 分钟, 用 DNS 法测定形成的还原糖, 扣去空白, 换算成每毫升酶液作用 (半小时) 形成的葡萄糖毫克数。

7. 蛋白酶^[13]

以酪蛋白为底物, 用福林试剂测定形成的酪氨酸, 规定每分钟形成 1 微克酪氨酸为 1 个活力单位 (u)。

六、可溶性蛋白质^[14]

以牛血清蛋白为标准, 用福林试剂测定。

结 果

一、诱变菌株和野生菌株的形态比较

在麦芽汁培养基上,野生型菌株 AS 3.3002 和木₃的菌丝伸展迅速,菌苔平整,绵毛状。初浅绿,后变为深橄榄色,背面蜜黄色。匍匐菌丝粗,直径达 9—10 微米,充满颗粒状细胞质。直立气生菌丝较细,约 3 微米,有些扭曲成螺旋状。厚垣孢子稀少,多生于菌丝间,偶有顶生者,近球形,无色,直径 6—10 微米。分生孢子梗长,主枝直径 4.5—5 微米,顶端着生小梗或短侧枝中下部有侧枝,侧枝长短不一,排列不规则,对生,互生,间隔距离不等,瓶梗生于侧枝及主枝上端,多呈直角,排列不规则,单生、互生或双对生,形似酒瓶,但基部明显内缩,而呈纺锤状或梭形,有时向主轴方向弯曲,长 4.5—6 微米,直径 2.5—3.0 微米,有的可长达 10—12 微米。分生孢子大多呈椭圆形或长椭圆形,稍有稜角。电子显微镜观察,孢子纵向有明显剖面,孢子顶端圆,基部往往平截,大多 $3.5—4.5 \times 1.8—2.5$ 微米,最大的可达 $5.0—5.8 \times 2.5—3.0$ 微米,但长度不超过 6.0 微米。孢子大小和形态变化较大(尤其是木₃)。这两株菌应属于 Rifai 分类系统中的拟康氏木霉 (*Trichoderma pseudokoningii*, Rifai)。

变异株 EA₃-867 在麦芽汁培养基上较原始菌株 AS 3.3002 生长慢,菌苔较薄,产生孢子少,但分生孢子梗的分枝较多而密,直接着生于主枝的小梗少。分生孢子梗的主梗及侧枝往往弯曲,侧枝稍长。N₂-78 与木₃比较,生长速度明显降低,菌落变小,菌苔薄,孢子产生慢且少,分生孢子梗的分枝稍多而密,长椭圆形及近圆柱形的分生孢子比例增多,孢子长度增加,可达 6.5—

7.4 微米 \times 1.8—2.5 微米。AS 3.3002 和 EA₃-867 菌落反面均为浅绿黄色,木₃和 N₂-78 则均为蜜黄色。

四株菌在马铃薯-葡萄糖培养基上培养三天后的形态比较见表 1。可见野生型菌株和变异株在菌落形态、生长速度、孢子形成等方面有明显的差异。变异菌株的菌落明显缩小,生长变慢,孢子形成迟而稀少(图版 I 1—4)。其中 N₂-78 菌落最小,生长最差,孢子最少。EA₃-867 的菌落颜色比 AS 3.3002 略淡,木₃为草绿色。N₂-78 为黄绿色,在马铃薯-纤维素粉或合成培养基-纤维素粉琼脂平板上,EA₃-867 和 N₂-78 菌落颜色都较野生型菌株浅。诱变菌株在以上几种培养基平板上经常分泌较多的黄色色素,色素的形成与氮源种类无关(硝态氮、氨态氮或有机氮),在液体培养滤液中也常有黄色色素加深的现象,此结果与 Norkrans^[15] 报告相似。尚不清楚黄色色素与酶活力的关系。还可看到菌丝,小梗和孢子形态上的一些变化(表 1):N₂-78 菌株较木₃,菌株菌丝加粗,小梗伸长,孢子变长和变大。同在麦芽汁培养基上一样,经常见到 N₂-78 有较长的柱形孢子,EA₃-867 有时也有。它们的电子显微镜照片见图版 II-5—8,这种柱形的孢子是否与纤维素酶活力的提高有关值得进一步研究。AS3.3002 经诱变后,菌丝也加粗,但小梗缩短,光学显微镜和电子显微镜观察都表明四株菌株的分生孢子壁是光滑的,没有小疣状突起,在显微镜下单个孢子看不出有颜色,成堆时呈绿色。根据以上孢子特征,AS3.3002 和木₃不应归入绿色木霉。

四株菌株的分生孢子悬浮液经不同温度处理后,在马铃薯-葡萄糖琼脂平板上,于 30℃ 培养 3 天,观察孢子存活情况,结果表明经 80℃ 以上处理后,不能萌发生长。

表 1 AS 3.3002, EA₃-867, 木₃ 和 N₂-78 的形态比较*

形态描述	菌落			菌丝				分生孢子小梗				分生孢子						
	直径 (厘米)	孢子 形成	菌落 颜色	菌落 色素	形态	基质 菌丝 分枝 角度	气生 菌丝 分枝 角度	直 径 (微米)	分枝 方式	形 状	分枝 方式	长 (微米)	宽 (微米)	形 状	长 (微米)	宽 (微米)	孢壁	颜色 单个成堆
AS 3.3002	4.8	快	深绿	无色	较挺直	直角	锐角	1.5—3.5	互生	瓶形,基部稍窄,中部宽,顶部窄,稍弯曲	互生	8.6—17.0	1.5—2.5	卵形、倒卵形	3.5—5.0	2.0—3.5	光滑	无色绿色
EA ₃ -867	0.9	慢	绿	淡黄	较挺直	直角	锐角	3.5—5.0—(7.0)	互生	瓶形,基部稍窄,中部宽,顶部窄,稍弯曲	互生	5.0—12.0	1.5—3.5	卵形、倒卵形、少量柱形	3.5—5.0	2.0—3.5	光滑	无色绿色
木 ₃	3.5	快	草绿	淡黄	扭曲	锐角	锐角	1.5—3.5—(5.0)	互生	瓶形,基部稍窄,中部宽,顶部窄,稍弯曲	互生	5.0—10.0	1.5—2.5	卵形、倒卵形	3.5—5.0	2.0—3.5	光滑	无色绿色
N ₂ -78	0.8	慢	黄绿	深黄	较挺直	直角	锐角	3.5—5.0	互生	瓶形,基部稍窄,中部宽,顶部窄,稍弯曲	互生	10.0—17.0	1.5—3.5	较多、柱形少量卵形倒卵形	3.5—7.0—(8.5)	2.0—3.5	光滑	无色绿色

* 培养在马铃薯、葡萄糖琼脂平板培养基上。

表 2 四株菌的固体曲纤维酶活力比较*

测定项目	CMC 酶解活力			滤纸酶解活力			棉花糖化力		
	CMC 糖化力 (毫克糖/克曲)			滤纸糖化力 (毫克糖/毫升酶)			棉花糖化力 (毫克糖/毫升酶)		
	A 法			A 法			A 法		
	B 法			B 法			B 法		
酶活力	1332	1610	43	44	565	1**	0.33	1.92	2.40
酶的来源	3960	4900	113	140	1086	++	0.57	2.63	5.59
1096	1198	1417	33	41	386	↓	0.39	1.54	3.26
EA ₃ -867	4943	5435	143	155	1302	+++	0.72	3.08	6.95
木 ₃									
N ₂ -78									

* 培养基: 见正文。

** 滤纸膨胀软化度为+; 滤纸破碎断裂,但仍成形为++; 滤纸完全崩溃,呈糊状为+++。↓代表滤纸崩溃程度比“+”差。

二、变异菌株和野生型菌株的纤维素酶活力比较

(一) 固体曲

在稻草粉固体培养基上,与野生菌株比较,EA₃-867,尤其是 N₂-78 的菌丝生长差,孢子形成慢而少。比较不同菌株在稻草粉麸皮固体培养基上生长 3 天的酶活力表明(表 2),变异株比野生型菌株,无论是 CMC 酶解活力,滤纸酶解活力、棉花糖化活力均有不同程度的提高,其中以 CMC 酶解活力增加最多(2—3 倍),其次是滤纸酶解活力(震荡法,1 倍多),静止法测定的滤纸糖和棉花糖增加量较少;可溶性蛋白质略有增加。从两株野生型菌株来看,木₃的 CMC 活力低于 AS 3.3002,但滤纸活力和棉花糖均高于 AS 3.3002,可能暗示木₃的 C₁ 酶活力高于 AS 3.3002,两株变异菌株中, N₂-78 的纤维素酶对各种底物的酶解活力和可溶性蛋白质含量都比 EA₃-867 的要高。

(二) 液体曲(摇瓶)

四株菌株震荡培养 60 小时,培养滤液在外观上有明显的差异,AS 3.3002 呈淡黄色,木₃呈灰绿色,EA₃-867 呈黄色, N₂-78 呈清彻透明的亮黄色。在培养过程中,菌丝均结成小球,但结球形状、大小、结构都有不同。AS 3.3002、木₃和 EA₃-867 的菌丝成球较大而松散,有时聚成条状或块状,但 N₂-78 菌丝成球,小而紧密,成鱼籽状。

四株菌株的纤维素酶活力有明显差异。AS3.3002 和木₃经诱变后,纤维素酶对各种底物的酶解活力都大幅度增长(表 3)。其中以 N₂-78 的活力最高。液体曲与固体曲相比,野生型菌株各项纤维素酶活力都低于固体曲酶液的活力,而变异株均明显高于固体曲酶液的活力,故变异株在液体培养中活力提高倍数均比固体培养物

中高得多。摇瓶中 N₂-78 生长 60 小时,与同样培养的木₃相比,CMC 活力,滤纸糖(震荡法)增加 10 多倍;滤纸糖(静止法)和棉花糖也分别增加了 7 倍多和 6 倍。本液体培养条件可能更适合这二株变异株(尤其是 N₂-78)产生纤维素酶。此外,在培养滤液中还测定到较高的果胶酶、半纤维素酶,一定的淀粉酶活力,以及少量的蛋白酶活力。果胶酶活力在变异株中也有所提高,其余几种酶都略有减少。

(三) 酶制剂

生长 3 天的固体曲制成丙酮粉。各种酶活力测定的结果列于表 4。变异菌株中纤维素酶活力增加的情况基本上同固体曲类似。CMC 糖化力、CMC 液化力,滤纸糖(震荡法)增加较多,滤纸糖(静止法)和棉花糖增加较少。由四株菌制成的酶制剂中, N₂-78 各项纤维素酶活力仍为最高。

诱变后,除纤维素酶活力显著提高外,可溶性蛋白,果胶酶和半纤维素酶也有一定增加,但淀粉酶和蛋白酶,同液体曲一样,由变异株制成的酶制剂中,活力都减低。

由变异株制成的固体曲、液体曲和酶制剂中,各种酶活力与原始菌株比较,见表 5。

由 EA₃-867 和 N₂-78 菌株制成的固体曲酶制剂与 Onozuka R-10 纤维素酶制剂,在相同条件下进行各种活力比较。结果见表 6。除果胶酶活力外,其它纤维素酶活力,由 EA₃-867 和 N₂-78 菌株制成的固体曲酶制剂均高于 Onozuka R-10。

三、变异菌株和野生型菌株纤维素酶特性的比较

分别测定了由四株菌制成的固体曲的酶液中纤维素酶反应最适条件。图 1 和图 2 是 AS3.3002 菌株的 CMC 糖化力和滤纸

表 3 四株菌的液体曲(棉糖)酶活力比较*

测定项目 酶活力 酶的来源	CMC 酶解活力			CMC 液化力 (单位/ 毫升酶)	滤纸酶解活力			棉花糖 (毫克糖/ 毫升酶)	果胶酶活力 (毫克糖/ 毫升酶)	半纤维素 酶活力 (毫克糖/ 毫升酶)	淀粉酶活力 (毫克糖/ 毫升酶)	蛋白酶活力 (单位/ 毫升酶)	可溶性蛋白 含量 (毫克/毫升酶)
	CMC 糖化力 (毫克糖/毫升酶)		滤纸 崩解 (静止)		滤纸糖 (毫克糖/毫升酶)								
	A 法	B 法			A 法 静止法	B 法 静止法	C 法 震荡法						
AS3-3002	18.4	15.3	405	1-***	0.08	1.02	0.76	1.5	0.48	7.3	5.5	3.6	0.96
EA3-867	130.0	97.0	1378	++	0.50	3.60	3.62	9.9	0.53	6.0	4.8	2.1	1.65
木3	23.8	17.4	230	1	0.10	1.54	0.88	1.9	0.48	5.8	5.8	2.7	1.00
N2-78	288.0	255.0	4056	+++	0.92	8.20	10.60	13.4	0.56	4.5	4.5	1.8	2.40

* 培养条件: 见正文。

** 符号说明见表 2。右上角的“+”或“-”号是表示同一等级中较强或较弱的。

表 4 四株菌的纤维素酶粗酶制剂酶活力比较*

测定项目 酶 活 力 酶的来源	CMC 酶 解 活 力			滤纸 崩 溃 (静止)	滤 纸 酶 解 活 力			棉花糖化力 (毫克糖/ 毫升酶)	果 胶 酶		半纤维素酶 活力 (毫克糖/ 毫升酶)	淀粉酶活力 (毫克糖/ 毫升酶)	蛋白酶活力 (单位/ 毫升酶)	可溶性蛋白 含量 (毫克/ 毫升酶)	
	CMC 糖 化 力 (毫克糖/克酶)		CMC 液化力 (单位/ 毫升酶)		滤纸 糖 化 力 (毫克糖/毫升酶)	A 法 (静止)	B 法 (静止)		C 法 (震荡 法)	粘度法 (单位/ 毫升酶)					还原糖法 (毫克糖/ 毫升酶)
	A 法	B 法													
AS3-3002	21500	15250	1435	++	0.52	3.46	4.44	32.5	162	1.10	4.68	11.8	5.6	2.6	
EA ₃ -867	80000	38000	3188	+++	0.64	5.40	11.85	46.0	322	1.24	4.94	7.2	4.6	3.7	
木 ₃	22000	16000	1088	++	0.82	3.76	5.82	41.0	93	1.17	4.94	10.0	5.0	2.5	
N ₄ -78	108000	69000	3617	+++	0.96	7.00	18.00	52.5	118	1.15	8.32	5.2	2.6	4.5	

* 粗酶制剂指丙酮粉。CMC 液化力。滤纸活力、棉花糖和可溶性蛋白测定用 0.5% 浓度酶制剂; 果胶酶、半纤维素酶、蛋白酶用 1% 浓度酶制剂测定。丙酮粉得率(对干曲)为 5% 左右。

** 说明见表 2。

表 5 变异株 EA₃-867 和 N₂-78 与野生型菌株 AS 3.3002 和木₃ 的各种酶制剂活力比较

测定结果 酶的来源 比较内容	测定项目	CMC 糖化力		CMC	滤纸糖化力			棉花	果胶酶		半纤维	淀粉酶	蛋白酶	可溶性 蛋白质
		A 法	B 法	液化力	A 法 静止法	B 法 静止法	C 法 震荡法	糖化 力	粘度 法	还原 糖法	素酶			
EA ₃ -867 比 AS3.3002 增加的倍数	固体曲	2.0	2.0	0.9	0.7	0.4	1.3	0.8						0.2
	酶制剂	2.7	1.5	1.2	0.3	0.6	1.7	0.4	1.0	0.1	0.1	-0.4*	-0.2	0.4
	液体曲	6.0	5.3	2.4	2.6	2.5	3.6	5.6		0.1	-0.2	-0.2	-0.4	0.7
N ₂ -78 比木 ₃ 增加的 倍数	固体曲	3.1	2.8	2.4	0.9	1.0	1.1	0.5						0.3
	酶制剂	3.9	3.3	2.3	0.2	0.9	2.1	0.3	0.3	0	0.7	-0.5	-0.5	0.8
	液体曲	11.1	13.6	16.6	7.3	4.3	11.0	6.0		0.2	-0.3	-0.2	-0.3	1.4

* “-”代表活力降低的倍数。

表 6 EA₃-867 和 N₂-78 纤维素酶粗酶制剂与酶制剂 Onozuka R-10 的活力比较

测定结果 酶来源	测定项目	CMC 糖	CMC 液	滤纸崩渍活力 (震荡法)		滤纸糖化力	棉花糖化力	果 胶 酶	可溶性蛋
		化力	化力					(还原糖法)	白质
		(毫克糖/ 毫升酶)	(单位/ 毫升酶)	崩渍时 间 (分钟)	单位/ 毫升酶	(毫克糖/ 毫升酶)	(毫克糖/ 毫升酶)	(毫克酶/ 毫升酶)	(毫克/ 毫升酶)
Onozuka R-10		210	2810	26	1440	2.08	1.80	2.6	3.8
EA ₃ -876		520	4500	17	2200	2.40	2.80	2.6	4.9
N ₂ -78		700	6391	14	2680	2.88	3.12	2.6	5.4

注：以上测定除滤纸糖化力和棉花糖化力是用 0.1% 浓度酶制剂外，其余都是用 1% 浓度。CMC 糖化力用 B 法，滤纸糖化力用 B 法（静止法）。

糖化力的 pH 曲线和温度曲线。其余三株菌的酶反应 pH 曲线和温度曲线与此完全一样，唯在活力上，总是变异菌株的显著高于野生菌株。

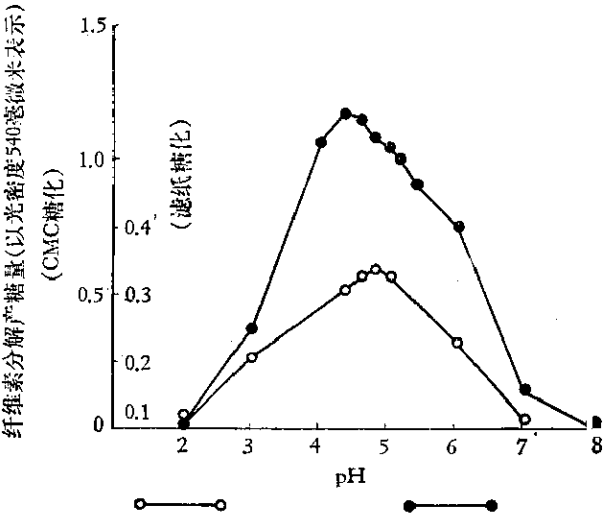


图 1 AS 3.3002 菌株纤维素酶 CMC 和滤纸糖化活力的 pH 曲线
○—○ 滤纸糖化活力 ●—● CMC 糖化活力

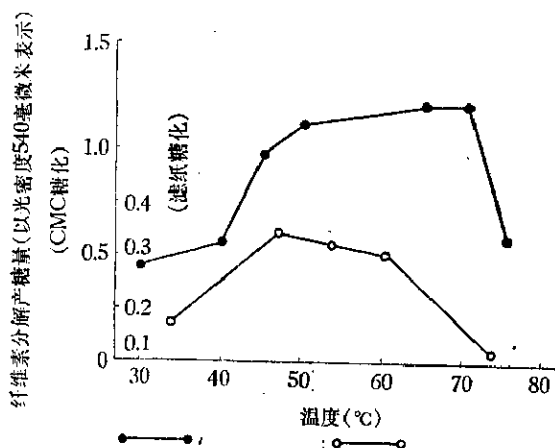


图2 AS 3.3002 菌株纤维素酶 CMC 和滤纸糖化活力的温度曲线

○——○ 滤纸糖化活力 ●——● CMC 糖化活力

(一) CMC 糖化力

几株菌的纤维素酶反应最适 pH 都是 4.4 (50°C 反应), 但最适 pH 与反应温度有关, 如 N₂-78 的纤维素酶在 30°C 时最适 pH 为 5.0, 40°C 时为 4.8, 50°C 时为 4.4, 60—75°C 时为 4.0—4.4。用 CMC 糖化力测定的纤维素酶耐热性较高, 从 30°C 开始, 随着温度升高, 糖化力迅速增加, 最适温度均为 60°C, 70°C 以上酶活力显著下降。这种酶的耐热性又与反应 pH 有关, 即在不适合的 pH 条件下, 酶易因温度升高, 而失活, 如 N₂-78 纤维素酶的 CMC 糖化力在 pH 2 或 7 时, 如温度在 40°C 以上, 便开始降低; pH 3 或 6 时, 温度 50°C 以上, 活力开始降低, 而在较适宜的 pH 4 与 5 之间时, 温度 60°C 以上, 酶活力才开始降低。

(二) 滤纸糖化力 (A 法)

四株菌株的纤维素酶的最适 pH 均为 4.8 (50°C 反应), 最适温度均为 50°C。

(三) 滤纸崩溃法 (静止)

四株菌株的纤维素酶的最适 pH 均为 4.8 (50°C 反应), 最适温度均为 60°C。

讨 论

当前, 纤维素酶在应用上的主要问题

之一, 是要获得活力高的纤维素酶菌种^[16]。木霉属是迄今被认为纤维素酶系成分最全面, 分解天然纤维素活力最高的一类菌^[10, 17, 18]。但是, 对于木霉属的分类过去曾经相当混乱^[19]。开始, 有人把木霉全部归入绿色木霉 (*Trichoderma viride* Pers. ex Fries) 一种; 但较多的作者倾向于分成几个种, 如康氏木霉 (*Trichoderma koningi* Oud) 和绿色木霉二种, 或白木霉 (*Trichoderma album* Preuss), 黄绿木霉 (*Trichoderma glaucum* Abbott), 康氏木霉和木素木霉 (*Trichoderma lignorum* Tode ex Harz)。最近, Rifai 根据大量的工作, 将木霉属分成 9 个种群^[20]。我们的 AS 3.3002 和木霉菌株类似 Rifai 分类系统中的长梗木霉或拟康氏木霉, 但从分生孢子梗排列较紧密, 小梗基部的明显收缩, 以及孢子长度不超过 6 微米等几个特征来看, 应属于拟康氏木霉。

Mandels 等将野生型菌株 QM6, 经高能电子照射处理后, 分离到一株纤维素酶活力比原始菌株高二倍的 QM9123^[1]。以后, 通过进一步诱变处理, 得到活力更高的 QM9414^[2, 17]。国内也有人用紫外线和亚硝酸^[5], ⁶⁰钴^[6]等照射木霉, 得到纤维素酶活力提高的菌株。我们得到的 EA₃-867 和 N₂-78 菌株, 纤维素酶活力均有较大幅度的提高, 且在使用 4 年多的过程中活力稳定。看来, 亚硝基胍、高能电子以及 γ -射线、紫外线可能是木霉属菌种较有效的诱变因子。同时, 多次物理化学因素的复合处理, 往往可以累积正向变异, 使活力逐步提高。出发菌株的选择也有一定意义, 如我们曾进一步用物理化学方法诱变 EA₃-867, 但纤维素酶活力增加不多, 要进一步增加酶活力较困难。后来改用纤维素酶活力与 AS 3.3002 差不多的木霉菌株 (仅 C₁ 酶活

力较高)进行诱变,得到的 N_2-78 , 其纤维素酶活力提高较多。我们还看到菌落形态、长势与纤维素酶活力间有一定的相关性。就现有资料看,纤维素活力高的菌株都是生长差、菌落小的。其他作者也观察到类似的现象^[1,5],故挑取小菌落的办法看来可以作为挑选高产变异株的一种参考。

关于纤维素酶的活力的测定方法,至今没有统一,美国 Mandels 等主要测定其 CMC 糖化力,滤纸糖化力和棉花糖化力^[10,18]。日本外山等主要测定其滤纸崩溃活力^[12], Yamane 等是测定其 CMC 糖化力和液化力^[22]。国内许多单位分别采用了上述各种方法,并作了各种修改,因而使方法更加多样化,这造成了无法相互比较活力的情况。方法不统一的原因,首先是因为纤维素酶是一个复合酶,各个酶组分并没有完全搞清楚,对 C_1 和 C_2 概念、看法和作用尚有争论^[16,23];其次是测定方法上的困难。因为纤维素酶作用的底物纤维素是固体的,酶与底物接触以及反应产物扩散所受的限制,常常影响酶活力的表现。在我们试验中,变异菌株的酶液,用滤纸和棉花为底物,用静止保温的方法测定时,酶活力不能充分表现,而改用震荡法或可溶性 CMC 为底物时,活力得到充分表现,就是这个原因。不过可溶性 CMC 仍是部分可溶的,且纤维素酶对它的分解活力受其中羧甲基取代度的影响。在测定酶活时,要求底物浓度过量,但由于酶对固体底物的作用受到限制,实际上底物总不会有效地过量,因而,所有测定结果都大大受酶液稀释度的影响。只有调整酶液稀释度,使每个测定中反应产物量(即还原糖)相近进行酶活力比较,才是比较合理的^[10,18]。本工作中,纤维素酶活力的测定采用了比较多的方法,是为了对变异菌株的纤维素酶活力水平作多方面的考查。CMC 糖化力主要代表外切 $\beta 1,4$ -葡

聚糖酶的活力,CMC 液化力主要代表内切 $\beta 1,4$ -葡聚糖酶的活力,滤纸崩溃法和棉花糖化力则相对代表 C_1 酶活力,滤纸糖化力代表“纤维素糖化”酶活力^[20,12,17,18]。看来,各种方法之间有很好的相关性。在实际使用时,可挑选有代表性的几种方法,如 CMC 糖化力(B法)、滤纸糖化力(B法)、滤纸崩溃法(静止)或棉花糖化力。

据报道^[16], QM9414 是迄今国际上液体培养时纤维素酶活力最高的菌株。我们采用他们所用的测定方法,表明 N_2-78 菌株纤维素酶活力,在 CMC 糖化力(47 单位/毫升酶),滤纸糖化力(8.20 毫克/毫升酶),棉花糖化力(13.4 毫克糖/毫升酶)和可溶性蛋白质含量(2.4 毫克/毫升酶)等方面都超过 QM9414 的一般水平。与其最高水平比较,虽然 CMC 糖化力略低,但滤纸糖化力和棉花糖化力仍高于 QM9414,而且,培养时间大大缩短了。由于我们没有 QM9414 菌株,无法直接进行比较。从酶制剂活力比较测定结果(表 6)及过去的工作^[9]也可看到,EA₃-867 和 N_2-78 两菌株的纤维素酶制剂超过日本的 Onozuka R-10。

本试验中,诱变处理后,变异株中纤维素酶各组分活力的同步提高,可能表明木霉属纤维素酶的各个组分的合成受同一遗传控制系统调节。变异株纤维素酶活力的增高是数量上增加,还是结构上变化,以及诱变后纤维素酶活力提高的原因,有待进一步探讨。

参 考 资 料

- [1] Mandels, M., J. Weber and R. Parizek: *Appl. Microbiol.*, 21:152, 1971.
- [2] Mandels, M. et al.: Paper Presented at Army Science Conference, West-point, New York, 1972.
- [3] Morozova, E. S.: *Symp. on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, p. 193, Aulanko, Finland, 1975.
- [4] 西沢一俊: 食品工业 9: 61, 1966.

- [5] 四川省生物研究所纤维素酶组: 遗传学报, 2: 157, 1975。
- [6] 西北水土保持生物土壤研究所微生物室糖纤组: 微生物育种学术讨论会文集, 98 页, 北京, 科学出版社, 1975。
- [7] 上海化学纤维六厂, 上海酒精二厂, 上海植物生理研究所纤维素酶组: 同上, 89 页, 1975。
- [8] 中国科学院遗传研究所五室二组: 遗传学报, 1: 57, 1974。
- [9] 上海植物生理研究所细胞生理室: 植物学报, 17: 245, 1975。
- [10] Mandels, M. and J. Weber: *Adv. Chem. Ser.*, 95:391, 1969.
- [11] Osmundsvåg, K. and J. Goksøyr: *European J. Biochem.* 57:405, 1975.
- [12] Toyama, N.: *Adv. Chem. Ser.*, 95:359, 1969.
- [13] 北京大学制药厂编: 微生物学和酶学基本知识, 北京, 科学出版社, 1971。
- [14] Tsu-Lee Huang et al.: *J. Ferment. Technol.* 49:574, 1971.
- [15] Norkrans, B.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 9: 91, 1967.
- [16] Reese, E. T.: *Biotechnol. and Bioengineering Symp.*, 5:77, 1975.
- [17] Pathak, A. N. and T. K. Ghose: *Process Biochemistry*, 8:35, 1973.
- [18] Mandels, M.: *Biotechnol. and Bioengineering Symp.*, 5:81, 1975.
- [19] 中国科学院微生物研究所: 常见与常用真菌, 206 页, 北京, 科学出版社, 1973。
- [20] Rifai, M. A.: *Mycol. Papers*. No. 116, 1969.
- [21] Mandels, M.: *Symp. on Enzymatic Hydrolysis of Cellulase*, p. 81, Aulanko, Finland, 1975.
- [22] Yamane, K. et al.: *J. Biochem.* 67:9, 1970.
- [23] Wood, T. M.: *Biotechnol. and Bioengineering Symp.*, 5:111, 1975.

ISOLATION OF TWO MUTANT STRAINS OF *TRICHODERMA PSEUDOKONINGII* RIFAI EA₃-867 AND N₂-78 WITH HIGH CELLULASE YIELDS AND COMPARISON OF THEIR CHARACTERISTICS

Cellulase Research Laboratory, Shanghai Institute of Plant
Physiology, Academia Sinica and the Shanghai Distillery No. 2
(Shanghai)

1. Two mutants EA₃-867 and N₂-78 with high cellulase yields were obtained from the wild strains of *Trichoderma pseudokoningii* Rifai AS 3.3002 and Mo₃ respectively by mutagenic treatments with various physical and chemical agents (high energy electrons, ⁶⁰Co, ultraviolet ray, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, diethyl sulfate, etc.). The cellulase activities of their koji, shake flask cultures, and enzyme preparations were distinctly higher than those of their parents. The mutant N₂-78 reached quite high activity level when cultured in shake flasks on a simple medium containing milled straw, wheat bran, nutrient salts plus waste glucose molasses for 60 hours, and showed the highest cellulase saccharifying activities on CMC, filter paper and cotton, namely 255, 8.2, and 13.4 mg glucose/ml enzyme respectively, or 10.4 and 6 times more than those of its parent Mo₃. Such cellulase activity levels are higher in comparison to the data reported in the literatures.

2. The enzyme activities of cellulase preparations prepared from koji of EA₃-867 and N₂-78 were compared with the Japanese commercial cellulase preparation "Onozuka R-10". The cellulase activities of EA₃-867 and N₂-78 on CMC (saccharifying and liquefying activities), filter paper degradation, and filter paper and

cotton saccharification were all higher than those of the "Onozuka R-10", while pectinase activity was about the same.

3. Beside cellulases, the strains AS 3.3002, Mo₃, EA₃-867 and N₂-78 could also produce and secrete active pectinase, hemicellulase, and some amylase and small amount of proteinase. In mutant strains not only the cellulase activities were enhanced, but pectinase was also increased.

4. As compared with the wild strains AS 3.3002 and Mo₃, the mutants EA₃-867 and N₂-78 showed differences in the size, color, and growth rate of the colonies, and in the production and morphology of conidia. They formed smaller colonies, grew more slowly, and produced less and longer conidia. But the lethal temperature for conidia of all the four strains was the same.

5. The enzymatic characteristics of the mutants and wild strains were similar. The optimal pH and optimal temperature for the saccharification of CMC and of filter paper, and for filter paper degradation were 4.5 and 60°C, 4.8 and 50°C, 4.8 and 60°C respectively for all four strains.

6. The method of mutation induction, assay and the levels of cellulase activities are discussed.