

高活性纤维素酶菌株 778-1 的筛选鉴定与产酶条件的研究

王义甫 邹邦基 葛英华 王基选

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

我们从湖南省隆回县河岸土中分离筛选到产生高活性纤维素酶的野生菌株 778-1, 其酶活性比优良的木霉野生菌株高一倍^[1,2], 并对秸秆类天然纤维素有较强的降解作用。此菌株按《青霉鉴定手册》^[3] 鉴定属于散枝亚组微紫青霉系 (*P. janthinellum* series) 鱼肝油青霉 (*P. piscarium westling*) 和微紫青霉 (*P. janthinellum biourge*) 的中间类型。最适培养基成分为: 苞米秸粉 (1号) 10g, 营养盐溶液 (NaNO_3 1.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%) 30ml。pH5.5—6.0, 25—30℃ 培养 96 小时。在此条件下该酶分解滤纸、CMC、棉花的活性分别为 200—220 mg/g·h、4000—4200mg/g·h 580—650mg/g·h。在上述培养基中加入 0.2—0.6g 豆饼粉酶活性可以进一步提高。

材料和方法

(一) 材料

磷酸膨胀纤维素、羧甲基纤维素钠 (CMC) 是上海长虹塑料厂出品, 粘度 (pH6) 600—1000 厘泊。脱脂棉是沈阳红卫制药厂出品。1号苞米秸粉通过 1mm、0.5mm、0.25mm 筛孔的比例为 4:2.5:3.5; 2号苞米粉为 6.5:2.0:1.5; 稻草粉为 1:4:5。

(二) 培养基

1. 磷酸膨胀纤维素培养基成分为 (g/l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCl_2 0.1, NaCl 0.1 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0016, ZnCl_2 0.0017, CoCl 0.002 磷酸膨胀纤维素 20, 琼脂 20。

2. 滤纸条培养基: 营养盐成分同上, 不加琼脂, 用滤纸条代替磷酸膨胀纤维素。

3. 固体曲培养基: 以苞米秸粉为基质, 营养盐溶液 (KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 总氮量根据试验变动在 0.2—0.4%) 30ml。

4. 液体培养基成分 (g/100ml): 葡萄糖 0.25, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 麸皮 0.8, 豆饼粉 0.5, 蛋白胨 0.1, 稻草粉 2.0

(三) 培养方法

条件试验采用固体曲培养法。试验菌株保存于滤纸条培养基上, 试验前先移植到马铃薯葡萄糖斜面, 培养一周后挑取斜面培养物一块 (约 1cm^2) 接种到固体曲培养基上, 用无菌玻璃棒压碎与培养基充分搅匀, 培养 96 小时后测定酶活性。

液体培养: 300ml 三角瓶装培养基 50ml, 接种量 5% (v/v), 30℃ 旋转摇床 (120 转/分) 上培养。种子培养 30 小时, 二级培养 60 小时。

(四) 酶活性测定

将 10g 生长好的三角瓶固体曲, 加水 200ml, 于 30℃ 保温 1 小时, 用中速新华定性滤纸过滤得 1:20 酶提取液。用 DNS 定糖的方法测定此酶液水解 CMC, 滤纸及棉花的活性。另用下法测定此酶水解秸秆类天然纤维素的能力: 称取 1号苞米秸粉或稻草粉 1g 置于带塞的 50ml 三角瓶中, 加 1:20 酶浸出液 8ml, pH4.85 0.1M 柠檬酸缓冲液 3ml, 蒸馏水 4ml, 摇匀, 50℃ 酶解 24 小时, 过滤, 测定还原糖, 用失活的酶作对照。

(五) 蛋白质测定

酶液离心 10 分钟 (4000 转/分), 以牛血清蛋白为标准, 用 Lowry 法测定酶液中蛋白质含量。

本文于 1981 年 3 月 2 日收到。

本工作承张宪武教授指导, 齐祖同同志指导鉴定菌种, 卢风勇和张淑贤同志参加部分工作。孙绿荷、孙玉璞同志协助进行毒性试验。戴祥鹤、刘惠敏同志协助拍摄照片, 在此一并致谢。

实验结果

(一) 菌种筛选与鉴定

1. 菌种筛选: 用磷酸膨胀纤维素平板法, 从全国各地土壤, 枯枝落叶等试样中, 分离出能使磷酸膨胀纤维素降解成透明的

真菌 1681 株, 将其先移植到马铃薯葡萄糖斜面, 培养一星期后分别接种到磷酸膨胀纤维素琼脂试管和滤纸条培养基上, 选出能强烈降解磷酸膨胀纤维素, 而在磷酸膨胀纤维素琼脂试管中形成透明区深和分解滤纸条快的菌株 151 株。再在以苞米秸粉

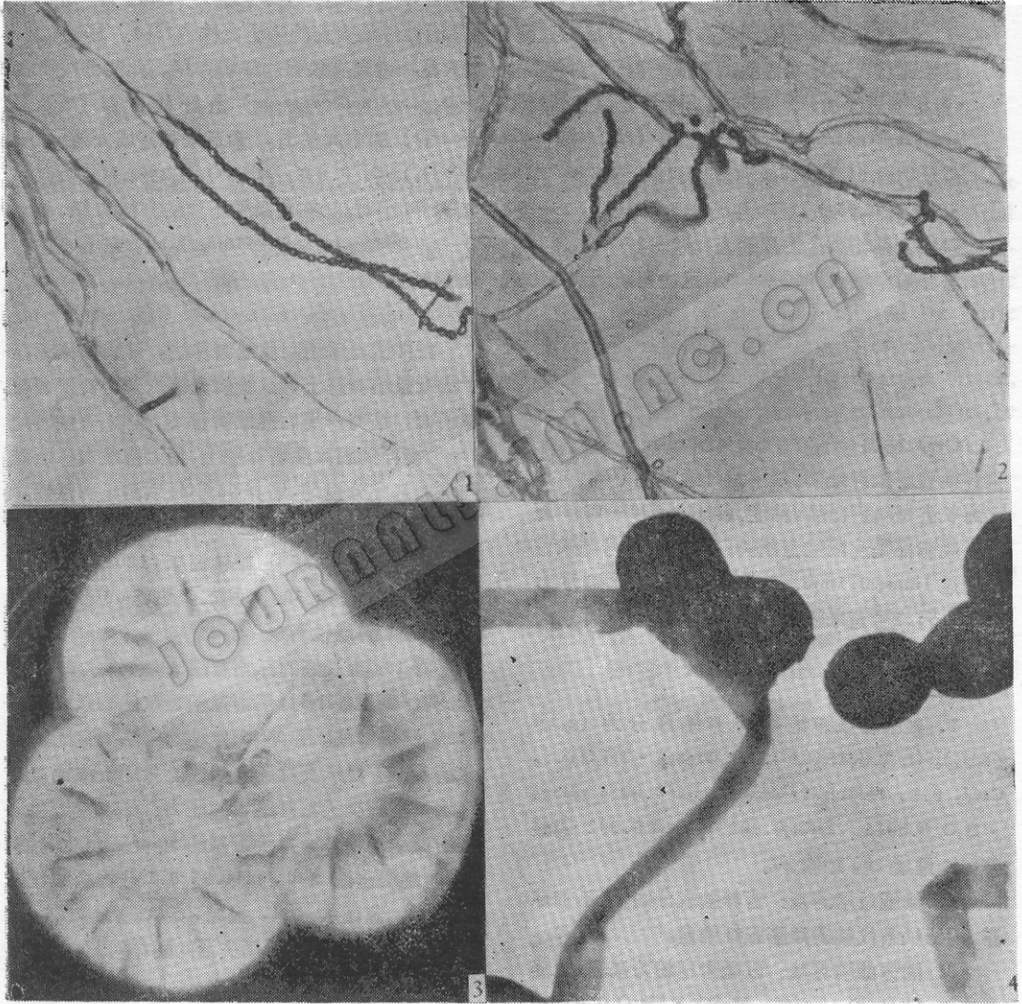


图1 778-1 菌株形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of strain 778-1

1, 2: 分生孢子梗与分生孢子 (450 \times)

Conidiophores and conidia

3: 在查氏琼脂上菌落形态

Colony on Czapek's agar

4. 分生孢子形态电子显微镜照片(8900 \times)

Conidia observed by electron microscope

为基质和 1% 硫酸铵为氮源的固体曲培养基(固液比 1:3)上进行复筛,培养 4 天,测定酶活性选出酶活性较高的木霉 6 株,黑曲霉 2 株,烟曲霉 2 株和青霉 3 株。最后从中选出酶活性最高的 778-1 菌株,属于青霉 (*Penicillium* sp.)

2. 菌种鉴定: 778-1 菌株菌落特征: 在查氏琼脂上 25℃ 培养 7 天,直径 4—4.5 cm,絮状、白色、具不明显的放射状沟纹,分生孢子结构稀少(图 1)。无渗出液,菌落反面呈极淡的褐色至粉红色,边缘部分呈淡紫色。培养 10 天直径达 6—6.5 cm,菌落呈“湿润状”。37℃ 生长良好。在麦芽汁琼脂, SA 琼脂(查氏琼脂加 1% 玉米浆)和马铃薯葡萄糖琼脂上菌落特征近于在查氏琼脂上的特征,但生长较在查氏琼脂上快。在麦芽汁(10Brix)琼脂培养基上,15℃ 左右自然光照培养,10 天菌落呈极淡的灰绿色。

菌株形态特征如图 1。根据其帚状结构明显散开,瓶梗形状和菌落特征应属于散枝亚组微紫青霉系中颜色较淡的类群^[3]。由于其分生孢子结构极少,大多数

只具单轮生和不完整的帚状枝,结合其瓶梗和分生孢子形状大小及菌落特征,近于鱼肝油青霉,但未观察到分生孢子有明显小刺,故又不同于鱼肝油青霉而接近微紫青霉。同时因未观察到更为复杂的分生孢子结构所以又与微紫青霉有差异,因此我们认为 778-1 菌株是微紫青霉和鱼肝油青霉的中间类型

3. 毒性试验: 用小鼠进行了三天急性中毒试验,用兔子进行了二十天的亚急性中毒试验和六个月的慢性中毒试验。纤维素酶曲用量分别为饲料的 100%、80%、30%。在各类试验期间动物活动与生长正常,对兔进行剖检结果未见异常现象,初步证明此菌无毒性。

(二) 产酶条件

1. 氮源: 用不同无机氮作氮源(总氮量为 0.2%)制曲,结果以氯化铵、硫酸铵和硝酸钠为氮源时菌株产酶活性较高,用硫酸铵和氯化铵作氮源培养物呈酸性,用硝酸钠和尿素作氮源培养物常呈碱性,当用硝酸钠和硫酸铵或硫酸铵与尿素为混合氮源时培养物不呈较强的酸性或碱性,酶

表 1 不同氮源对比对酶活性的影响

Table 1 Effect of nitrogen source on cellulase activity

氮源 Nitrogen source 酶活性 Cellulase activity (mg/g DMh) 配比 Ratio	NaNO ₃ :(NH ₄) ₂ SO ₄				(NH ₄) ₂ SO ₄ : 尿素 (Urea)			
	分解滤纸 Filter paper	分解 CMC	分解棉花 Cotton	培养后 pH Final pH	分解滤纸 Filter paper	分解 CMC	分解棉花 Cotton	培养后 pH Final pH
10:0	84.5	3164	419.1	7.35	79.0	2939	374.9	4.5
8:2	91.7	3401	460.7	6.90	90.9	3036	390.1	5.5
6:4	102.8	3410	553.0	6.65	105.5	3071	418.7	6.5
4:6	85.8	3186	526.8	6.65	101.1	3058	426.4	6.8
2:8	71.2	2891	444.2	4.50	96.7	2948	443.5	7.0
1:9	69.1	2851	413.8	4.50	92.8	2512	340.6	7.1
0:10	72.6	2939	387.4	4.25	84.5	2561	332.7	7.25

mg/g DMh = mg glucose/g dry wt of medium in an hour

表 2 氮源用量与酶活性之间的关系

Table 2 Correlation between nitrogen source and cellulase activity

酶活性 Cellulase activity (mg/g DMH)	NaNO ₃ :(NH ₄) ₂ SO ₄ 3:2			(NH ₄) ₂ SO ₄ : 尿素 urea 1:1			NH ₄ NO ₃		
	分解滤纸 Filter paper	分解 CMC	分解棉花 Cotton	分解滤纸 Filter paper	分解 CMC	分解棉花 Cotton	分解滤纸 Filter paper	分解 CMC	分解棉花 Cotton
0.1	101.3	2055	322.1	79.7	1879	304.9	78.5	2992	394.7
0.2	117.5	3225	442.9	130.7	2829	427.7	99.7	3212	419.8
0.25	140.3	3740	508.9	152.5	3287	489.1	119.5	3590	459.4
0.30	225.9	3960	654.7	153.1	3199	493.0	146.5	3528	450.1
0.35	225.7	4048	641.5						
0.40	232.0	4180	667.3	165.7	3555	530.6	182.2	3643	467.3
0.50	186.3	3908	592.0	36.0	1007	86.5	168.3	3652	468.6

表 3 豆饼粉作氮源对酶活性的影响

Table 3 Effect of soybean cake powder used as supplemental source on cellulase activity

豆饼粉(%) Soybean cake powder (%)	酶活性 Cellulase activity (mg/g DMh)					
	细苞米秸粉 Fine maize straw powder			粗苞米秸粉 Coarse maize straw powder		
	分解滤纸 Filter paper	分解 CMC	分解棉花 Cotton	分解滤纸 Filter paper	分解 CMC	分解棉花 Cotton
2	245.2	4038	644.8	181.8	3520	506.2
4	248.8	4413	611.8	187.1	3527	525.7
6	254.7	4375	612.3	185.5	3727	586.4
8	246.0	4241	649.3	200.0	3914	521.6
10	260.5	4387	688.0	184.0	3665	423.1
对照 (Control)	208.4	4121	579.0	182.3	3494	512.2

活性都有不同程度提高。用硝酸钠与硫酸铵作氮源的最适比为 3:2, 硫酸铵与尿素为 6:4 与 4:6 (见表 1)。用硝酸钠与硫酸铵 3:2 作氮源, 总氮用量在 0.1—0.4% 范围内酶活性随氮源用量增加而增高。无论用 3:2 硝酸钠与硫酸铵或 1:1 硫酸铵与尿素或硝酸铵作氮源, 其最适总氮用量都为 0.4% (表 2)。用较细的 1 号苞米秸粉为碳源, 3:2 硝酸钠与硫酸铵为氮源, 总氮

用量在 0.4% 基础上再加适量豆饼粉作补充氮源能显著提高分解滤纸和棉花的酶活性, 但在同样条件下用较粗的 2 号苞米秸粉制曲, 再加豆饼粉的作用就没有这样显著 (表 3)。

2. 碳源与诱导: 以苞米秸粉为碳源时, 用较细的 1 号苞米秸粉制曲比用较粗的 2 号苞米秸粉要好 (表 3), 前者分解滤纸酶活性为 208.4mg/g.h, 后者只有 182.3

mg/g.h。

用葡萄糖、蔗糖等作固体曲的补充碳源及用带β糖苷键的纤维二糖、乳糖和纤维素粉等作诱导剂对酶活性均未见有显著

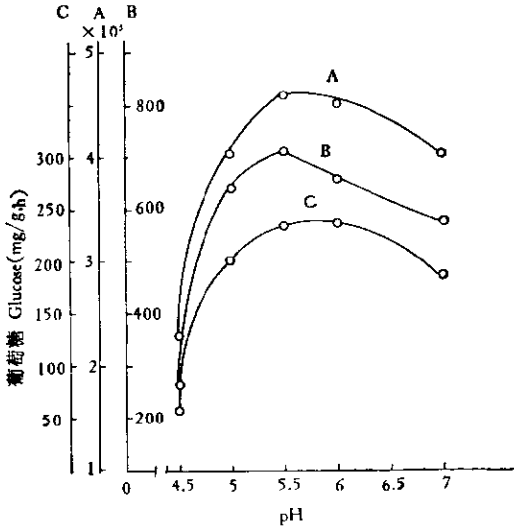


图2 不同初始 pH 对酶活性的影响

Fig. 2 Effect of different initial pH on cellulase activity

A: 分解 CMC; B: 分解棉花 Cotton
C: 分解滤纸 Filter paper

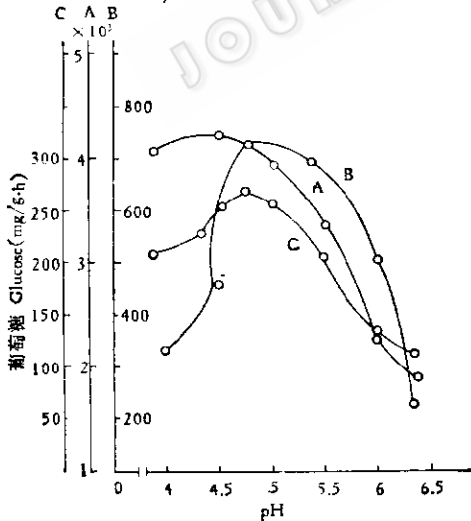


图3 不同酶解 pH 对酶活性的影响

Fig. 3 Effect of pH on cellulase activity

A: 分解 CMC; B: 分解棉花 Cotton
C: 分解滤纸 Filter paper

作用。

3. pH、温度与时间：最适产酶初始 pH(灭菌后)是 5.5—6.0。当初始 pH 低于 5.5 时,酶活性下降(图 2)。采用固体曲培养基,在培养过程中难以用加碱或加酸的方法控制培养基的 pH。我们用 3:2 硝酸钠和硫酸铵作混合氮源调节培养物 pH,使 pH 稳定在适合产酶条件范围内,从而提高了酶活性。

4. 最适产酶培养温度为 25—30℃,时间为 84—96 小时。

(三) 酶解条件

分解滤纸、CMC 和棉花的最适 pH 分别为 4.8—5.3、4.5 和 4.7—5.0 (图 3)。最适酶解温度前二者为 60℃,后者为 4.5—55℃ (图 4)。

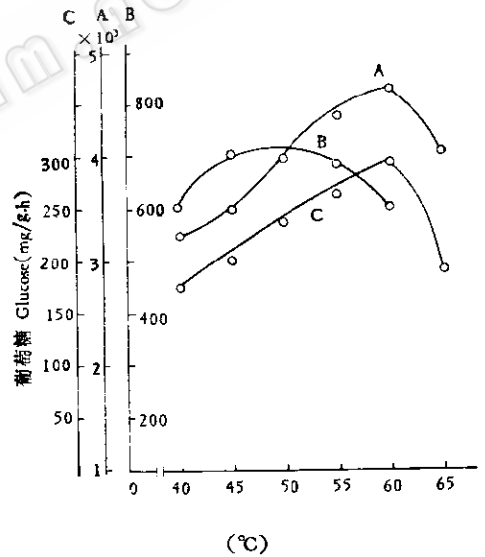


图4 不同酶解温度对酶活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on cellulase activity

A: 分解 CMC; B: 分解棉花 Cotton
C: 分解滤纸 Filter paper

讨 论

我国植物生理研究所等单位用紫外线和高能电子诱变康氏木霉 1096 和木₃ 分别得到 EA₃867 (*T. pseudokoningii*) N₂78 (*T.*

pseudokoningii) 变株^[1], 其他研究单位也先后获得较优的纤维素酶变株, 但以后在提高酶活性方面没有较大的突破, 至今 EA₃867 和 N₇8 仍属国内较优的菌株。

我们将 778-1 菌株与美国诱变菌株 QM9414 和 EA₃867 做了比较试验。各菌株分别在推荐的适宜培养基中培养^[1,4,6-9] 然后进行各种酶活性测定。试验结果表明 QM9414 固体曲分解滤纸、CMC 的酶活性分别为 114.4、1645mg 葡萄糖/g.h。分解棉花活性为 864.8mg 葡萄糖/g.24h。液体培养分解滤纸、CMC 的活性为 7.7、103.8mg 葡萄糖/ml.h, 分解棉花的活性为 30.6mg 葡萄糖/ml.24h。固体曲酶解稻草粉净得糖率为 8.8%, 液体培养为 12.2% 778-1 菌株固体曲分解滤纸、CMC、棉花的酶活性分别为 255.5、4213mg 葡萄糖/g.h, 分解棉花活性为 700.2mg 葡萄糖/g.24h。液体培养分解滤纸、CMC 活力为 6.9、287.7mg 葡萄糖/ml.h, 分解棉花活性为 16.9mg 葡萄糖/ml.24h。固体曲酶解稻草粉净得糖率为 15%, 液体培养为 15.5%, 它的固体曲分解滤纸及 CMC 酶活性比 QM9414 高一倍, 而分解棉花酶活性低于 QM9414。在液体培养中 778-1 菌株分解棉花酶活性低于 QM9414, 分解 CMC 酶活性高于 QM9414。EA₃867 固体曲分解滤纸、CMC 的活性为 229.7、4956mg 葡萄糖/g.h, 分解棉花活力为 626.6mg 葡萄糖/g.24h, 固体曲酶解稻草粉净得糖率为 9.2%, 液体培养为 9.8%。778-1 菌株固体曲分解滤纸及棉花酶活性高于 EA₃867, 分解 CMC 酶活性低于 EA₃867。作为衡量提高粗饲料营养价值的主要指标酶解秸秆得糖率, 无论固体曲或液体培养均显著超过 EA₃867 和 QM9414。各供试株固体曲酶液(1:20 提取) 每毫升可溶性蛋白质含量差异很少, 液体培养酶液每毫升可溶性蛋

白质含量 778-1 菌株略低于 QM9414。

目前国外又进一步诱变 QM9414 得 MCG77 变株^[6], 因为我们没有这一菌株不能直接对比。MCG77 是 QM9414 的调节突变株^[9], 它的最高纤维素酶产率, 按分解滤纸酶活性计算为 100mg 葡萄糖/l.h, 778-1 菌株发酵周期为 60 小时, 比 MCG77 还短, 它的酶产率按滤纸酶活性计算为 115 mg 葡萄糖/l.h 仍不低于 MCG77。

迄今国内外报道的纤维素酶活性较高的优良菌株多属木霉, 认为它是纤维素酶系成分最全, 分解天然纤维素酶活性最高的一类菌。然而我们获得的高酶活性的菌株属于青霉, 它不仅酶系全, 而且酶活性远超过木霉野生菌株, 因此此菌的获得, 证明从木霉以外的菌群筛选更优越的纤维素酶菌株是完全可能的。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海植物生理研究所纤维素酶组等: 微生物学报, 18(1): 27-38, 1978。
- [2] 中国科学院西北水土保持生物土壤研究所: 微生物育种学术讨论会文集, 科学出版社出版, 北京, 1975, p.98。
- [3] Raper, K. B. et al.: A manual of the Penicillia. Williams and Wilkins co., Baltimore pp. 294-309, 1949.
- [4] Reese, E. T.: Symposium on Biotechnol. and Bioeng., No. 5, published by John Wiley & Sons, 1975, p. 77.
- [5] Vilela, L. C. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 41 (2): 235-238, 1977.
- [6] Mandels, M. et al.: "Cellulase and their Applications" ed. by Gould, R. F., 1969. pp. 391-414.
- [7] Mandels M. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 16 (10): 1471, 1974.
- [8] Updegraff, D. M. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 13(1): 77, 1971.
- [9] Gallo, B. J. et al.: *Biotechnol. and Bioeng. Symposium*, No. 8, "Biotechnology in Energy Production and Conservation, published by John Wiley & Sons, 1978, pp. 89-101.

STUDIES ON THE SELECTION AND IDENTIFICATION OF *PENICILLIUM JANTHINELLUM* SERIES 778-1 WITH HIGH CELLULASE ACTIVITY AND THE CONDI- TIONS FOR ENZYME PRODUCTION

Wang Yifu Zou Bangji Ge Yinghua Wang Jixuan

(*Institute of Forestry and Pedology, Academia Sinica, Shenyang*)

A wild strain 778—1 with high cellulase activity was obtained from red loam. In semisolid culture, the optimum conditions for enzyme production are maize straw powder 10g, soybean cake powder 0.2g, nutrient salt solution (NaNO_3 1.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%) 30 ml, $\text{pH} 5.5$ — 6.0 , at 25 — 30°C for 96 hours. Under those conditions, its enzyme activities toward filter paper, CMC and cotton degradation reached 240—250, 4200—4400, and 650—700 mg glucose/g DMh respectively. In shake flask culture,

the optimum conditions for enzyme production are in medium containing (g/100ml) glucose 0.25, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, wheat bran 0.8, soybean cake powder 0.5, peptone 0.1, rice straw powder 2.0, at 29 — 30°C for 60 hours. Under such conditions, its enzyme activities for filter paper, CMC and cotton reached 6.9, 287.7 and 16.9 mg glucose/ml.h respectively. Its ability to degrade straw appeared to be stronger than that of *Trichoderma reesei* QM 9414.