

高效纤维素降解真菌的筛选和鉴定

韩立荣,张双玺,祝传书,张 兴

(西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心 陕西省生物农药工程技术研究中心,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】分离筛选木质纤维素材料的高效降解菌,为植物农药残渣的资源化利用及其他废弃有机物的合理利用提供依据。【方法】采用纤维素刚果红平板培养基,对采自陕西秦岭山区的土样和腐烂枝干进行初筛,再以川楝残渣为惟一碳源进行摇瓶培养复筛,最后对获得的高纤维素酶活力菌株进行形态学和分子生物学鉴定。【结果】初筛获得了 38 株能够产生纤维素酶的菌株。在此基础上,对其中 15 株菌进行液体发酵并测定纤维素酶活性,得到 4 株纤维素酶活性较高菌株 F4-1、F1-3、F10-2 和 F2-3。经形态观察和 18S rDNA 基因片段分析,将这 4 株菌分别归为枝状枝孢菌(*Cladosporium cladosporioides*)、萨氏曲霉菌(*Aspergillus sydowi*)、瓦克青霉菌(*Penicillium waksmanii*)和小不整球壳属(*Plectosphaerella*)。【结论】获得的 4 株真菌均具有较高的降解天然纤维素的能力。

【关键词】 纤维素酶;菌株筛选;形态学特征;分子鉴定

【中图分类号】 Q93-331;S154.3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)09-0169-06

Screening and identification of superior fungus degraded cellulose

HAN Li-rong,ZHANG Shuang-xi,ZHU Chuan-shu,ZHANG Xing

(Research and Development Center of Biorational Pesticide,Northwest A&F University,Technology and Engineering Center of Biopesticide,Yanglinging,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】 This study isolated superior cellulose decomposing strains to provide rational application of plant-pesticide residue and other waste organic materials. 【Method】 The fungus were firstly screened in Congo red plate for cellulase,and then cultured in residues of chinaberry as only carbohydrate supply. The fungus were identified by morphological and molecular technology. 【Result】 The 38 strains of microbes producing cellulose were isolated by some distinct zones of clearing in cellulose-congo red argar medium. By measuring the enzyme activity of liquid culture filtrates,four strains F4-1,F1-3,F10-2 and F2-3 with high cellulose activity were obtained. These were confirmed as *Cladosporium cladosporioides*,*Aspergillus sydowi*,*Penicillium waksmanii* and *Plectosphaerella* sp. by the biological property and sequence of 18S rDNA. 【Conclusion】 These strains can degrade natural cellulose specially.

Key words: cellulase;screening of strain;morphological characteristic;molecular identification

纤维素是绿色植物细胞壁的主要成分,是地球上最丰富的有机物质,也是一类取之不尽,用之不竭的可再生能源。每年由于工业、农业生产可产生大量的纤维素废弃物,如农作物秸秆、锯木渣、植物农药残渣和生活垃圾等。如何有效利用这些废弃物,对解决环境污染及实现生物资源可持续性发展具有

* [收稿日期] 2008-06-04
[基金项目] 国家西部开发重大项目(2004BA901A14);陕西省“13115”项目(2007ZDGC-04)
[作者简介] 韩立荣(1979—),女,新疆塔城人,在读博士,主要从事农药及病虫害防治研究。E-mail:hlr4119@126.com
[通讯作者] 张 兴(1952—),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事植物化学保护和农药学研究。

重大意义。目前,纤维素废弃物主要是通过物理、化学、生物或者三者联合的处理方法,使这些物质可以用于生产燃料、有机肥、饲料添加物和化工原料等。因而纤维素作为一种可再生能源,它的开发和利用越来越受到人们的广泛关注。

微生物在自然界纤维素的降解中有着举足轻重的作用。我国纤维素酶的研究已有几十年的历史,并且已筛选出一批纤维素酶产生菌种。目前,用于生产纤维素酶的微生物大多属于真菌,如木霉属(*Trichoderma*)、曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)^[1-3]。然而,用于纤维素酶生产的菌株普遍存在酶活力较低的问题^[4-5]。因此,筛选优良菌种是提高纤维素酶活力,从而提高纤维素降解效率的关键。本研究对采集于陕西秦岭山区的土样、腐烂枝干等进行分离,获得了 4 株产纤维素酶高活性菌株,并对其进行形态学及分子生物学鉴定,以期为纤维素降解菌的有效利用及纤维素废弃物的进一步利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 微生物分离样品采自陕西秦岭山区不同海拔和生境的腐烂枝干及土壤。将川楝树皮粉碎,用体积分数 70% 酒精提取 2 h,过滤后的滤渣即为川楝残渣。

1.1.2 培养基 分离初筛培养基: KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g,明胶 2 g,球磨纤维素粉 20 g,琼脂粉 12 g,蒸馏水 1 000 mL,自然 pH。

产酶复筛培养基:蛋白胨 12 g,麦麸 30 g,植物农药残渣 20 g,NaCl 10 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g,水 1 000 mL,适当 pH。

1.2 菌种的筛选

1.2.1 菌种的分离与初筛^[6] 将采集的样品用无菌水稀释后,分别涂布于分离初筛平板培养基上,28℃下培养。待菌落长出后,挑取单一菌落再次培养于分离初筛平板培养基上,并于 3 d 后向培养皿中加入适量 1 mg/mL 的刚果红染液,染色 3 h,倾去染液,加入适量 1 mol/L 的 NaCl 溶液,浸泡 1 h,依据透明圈直径选择高产酶菌株。

1.2.2 菌种的复筛 用无菌水将初筛所获得的菌株斜面培养物制成孢子悬液(1×10^8 /mL),接种于装有 50 mL 产酶复筛培养基的 250 mL 三角瓶中,28℃、130 r/min 摇床培养 4 d,将所取样液 9 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液,参照文献

[7-8]的方法测定内切 β -葡聚糖苷酶活性(CMCase)和滤纸酶活性(FPase)。

1.2.3 各菌株对川楝残渣的酶解作用 将川楝残渣过筛(筛孔 0.3 mm),用开水煮沸 20 min,以除去材料本身所含的糖分,然后 60℃烘至恒重。用 2% H_2SO_4 和 2% NaOH 浸泡残渣过夜(固液比为 1:10),过滤,滤渣用水洗至中性后于 60℃烘干备用。

称取不同处理的川楝残渣 2 g,加入 20 mL pH 5.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和 1.3.2 制备的粗酶液 1 mL,置 50℃水浴水平摇床中酶解 24 h,测定酶解液中还原糖含量,并计算糖化率。纤维素含量测定采用王玉万等^[9]的方法。

糖化率/% = $\frac{\text{生成的还原糖含量}(\text{mg}) \times 0.9}{\text{底物中纤维素含量}(\text{g})} \times 100\%$ 。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 形态学特征 将复筛的 4 株真菌在查氏平板上培养 4 d,取样。将样品用 3% 戊二醛室温下固定 4~6 h,用磷酸缓冲液(pH6.8)冲洗 5~6 次,每次间隔 30 min。然后经系列丙酮脱水、醋酸异戊酯置换、 CO_2 临界点干燥、粘样、镀膜后,在扫描电镜下观察菌丝和孢子形态^[10]。

1.3.2 分子生物学鉴定 采用 rDNA ITS 基因序列分析^[11],以分离菌株的 DNA 为模板,PCR 扩增其 ITS 序列。扩增引物为 ITS1(5'-TCCGTAGGT-GAACCT-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'),进行 18S rDNA 的扩增,PCR 扩增产物经 TaKaRa 凝胶回收试剂盒进行回收,经连接、转化后,用 TaKaRa 质粒抽提试剂盒提取质粒后,在 ABI 测序仪上进行测序,将所得序列与 GenBank 数据库中序列进行 Blast 分析比对,并用 Clustal X 软件,对选取的相似性较高的菌株,与菌株 F10-2 进行多重序列匹配排列分析,用 Phylip(3.65)软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 菌种的分离筛选结果

采集的样品,经平板分离初筛和刚果红染液染色得到有清晰透明圈的菌落 38 株,其中细菌 16 株,放线菌 18 株,真菌 4 株。其在分离初筛平板培养基上的透明圈直径见表 1。试验发现,与真菌相比,单位时间、同一温度下细菌和放线菌菌株产生透明圈所需的时间短、透明圈较大。

表 1 菌株平板初筛的透明圈直径

Table 1 Clear haloes on the screening plate formed by these strains

菌株编号 Strain number	透明圈直径/cm Distinct zone	菌株编号 Strain number	透明圈直径/cm Distinct zone	菌株编号 Strain number	透明圈直径/cm Distinct zone
B3-1	0.85	B7-1	1.65	A2-2	1.18
B8-2	1.10	B20-2	1.65	A2-1	0.95
B20-1	1.00	B7-2	1.96	A2-3	1.00
B6-6	0.55	A4-1	0.98	A2-4	1.06
B16-1	2.00	A4-3	1.07	A11-1	0.94
B4-2	1.86	A4-4	1.35	A12-1	0.75
B12-1	1.00	A6-2	1.00	A17-1	1.29
B4-3	1.66	A8-1	1.17	A16-1	2.20
B6-3	0.85	A14-1	0.90	F2-3	0.83
B4-1	1.90	A14-2	1.18	F4-1	1.30
B14-1	1.76	A14-9	1.28	F1-3	1.07
B5-3	1.36	A8-2	1.15	F10-2	1.40
B17-1	1.39	A5-1	1.60		

2.2 菌株的复筛

根据初筛结果及不同菌株的产酶特性,挑选 15 株菌接入产酶复筛培养基,进行摇瓶产酶培养,4 d 后测定各菌株的 CMCase 和 FPase 活性,测定结果见表 2。由表 2 可以看出,筛选的各菌株均有一定的产纤维素酶能力,细菌和放线菌菌株的产酶能力

相对较弱,其原因可能是不同菌种对产酶条件需求不同,或不适合以天然纤维素材料为诱导碳源;4 株真菌有着较强的产酶能力,说明这些菌株可以利用天然纤维素作为诱导物进行产酶,其中菌株 F4-1 表现的产酶能力最强,其 CMCase 和 FPase 活性分别为 1.22 和 0.67 U/mL。

表 2 菌株 CMCase 和 FPase 活性的复筛

Table 2 Second screening of strains producing CMCase and FPase

U/mL

菌株 Strain	CMCase	FPase	菌株 Strain	CMCase	FPase	菌株 Strain	CMCase	FPase
B20-2	0.19	0.11	B7-1	0.06	0.05	F2-3	0.32	0.22
B16-1	0.15	0.12	B7-2	0.10	0.06	F4-1	1.22	0.67
B4-2	0.13	0.06	B4-1	0.18	0.12	F1-3	0.58	0.32
B4-3	0.09	0.06	A16-1	0.69	0.20	F10-2	0.95	0.73
B14-1	0.14	0.06	A5-1	0.49	0.21			

2.3 菌株对植物农药残渣的酶解

由以上试验可以看出,菌株 F4-1、F1-3、F10-2 和 F2-3 均可以产生较高活性的纤维素酶,为确定其对植物农药残渣的利用情况,进一步对这 4 株菌降解川楝残渣进行了初步探索。经测定,川楝残渣中纤维素、半纤维素和木质素含量分别为 25.15%,38.30%和 30.18%;经 2% H₂SO₄ 和 2% NaOH 预处理后,由于降低了川楝残渣中半纤维素和木质素

含量,使得纤维素相对含量分别提升为 40.84%和 57.93%。由糖化结果可知(表 3),这 4 株真菌所产纤维素酶均可以水解天然纤维素,其中菌株 F10-2 所产纤维素酶对底物作用最强,对未处理底物、2% H₂SO₄ 和 2% NaOH 预处理底物的糖化率分别为 13.30%,37.00%和 55.54%。可见,该菌株可以用于降解天然纤维素材料,但对于其产酶条件及底物酶解糖化的条件还需要深入研究。

表 3 川楝残渣经不同预处理后的酶解糖化率

Table 3 Different pretreatment of chinaberry residues and its saccharification

处理 Treatments	糖化率/% Saccharification			
	F4-1	F1-3	F10-2	F2-3
2% H ₂ SO ₄	18.00	15.42	37.00	11.00
2% NaOH	26.00	21.37	55.54	18.00
CK	9.00	7.00	13.30	4.00

2.4 菌株的鉴定

2.4.1 形态学特征观察结果 对筛选的 4 株产纤维素酶真菌进行扫描电镜形态学观察,结果见图 1。由图 1 可见,菌株 F4-1 在查氏平板上培养,菌落呈

粉状、平展,橄榄绿色,反面黑绿色;分生孢子梗多侧生在菌丝上,不分枝,表面平滑,分生孢子纺锤形,孢痕明显;气生菌丝色暗,直径 3.2~5 μm。菌株 F10-2在查氏平板上的培养特征为:菌落青绿色,棉

絮状;分生孢子梗聚成孢梗束,顶端生排列成帚状的间枝,有多次分枝;分生孢子卵圆形。菌株 F1-3,菌落青绿色,貌似青霉;分生孢子穗近圆形,分生孢子球形。菌株 F2-3,菌落白色,菌丝稀薄,在查氏平板上培养不产孢。

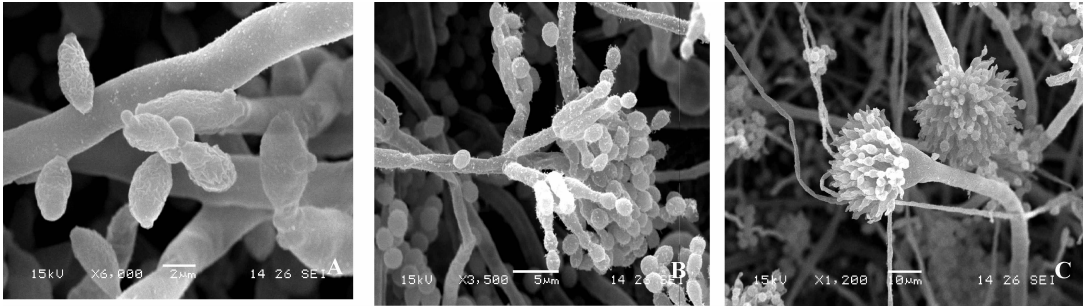


图 1 菌株的形态学特征
A. 菌株 F4-1;B. 菌株 F10-2;C. 菌株 F1-3
Fig. 1 Morphological characteristics of strains
A. Strain F4-1;B. Strain F10-2;C. Strain F1-3

2.4.2 分子生物学鉴定 为了进一步确定这 4 株产纤维素酶真菌的分类地位,在形态学鉴定的基础上进行了分子生物学鉴定。用所设计的引物扩增出 4 条约 600 bp 的条带(图 2),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 3~6。由图 3~6 可以看出,菌株 F4-1 与枝状枝孢菌(*Cladosporium cladosporioides*)、F1-3 与萨氏曲霉菌(*Aspergillus sydowi*)、F10-2 与瓦克青霉菌(*Penicillium waksmanii*)可聚于同一分枝,并且其同源性分别达到 98%,100%和 99%,因此可确定菌株 F4-1 为枝孢属枝状枝孢菌(*Cladosporium cladosporioides*),菌株 F1-3 为曲霉属萨氏曲霉菌(*Aspergillus sydowi*),菌株 F10-2 为青霉属瓦克青霉菌(*Penicillium waksmanii*);菌株 F2-3 与 *Plectosphaerella cucumerina* 归为一分枝,但其同源性只有 79%,因

根据《中国真菌志》^[12]和《植物病原真菌学》^[13],菌株 F4-1、F10-2、F1-3 和 F2-3 依形态学特征分别初步鉴定为,枝孢属(*Cladosporium*)、青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)和小不整球壳属(*Plectosphaerella*)。

而将其初步归为小不整球壳属(*Plectosphaerella*)。

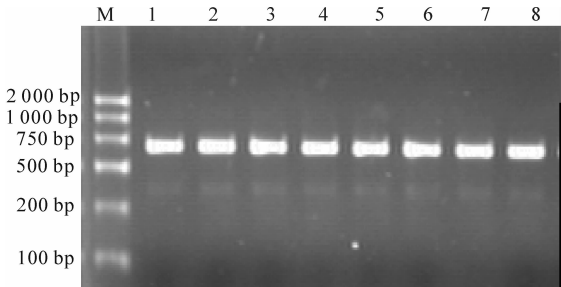


图 2 菌株 ITS 区域 PCR 扩增产物的电泳图
M. Marker;1~2. 菌株 F1-3;3~4. 菌株 F2-3;5~6. 菌株 F4-1;
7~8. 菌株 F10-2

Fig. 2 Agrose gel electrophoretic of ITS gene PCR products
M. Marker;1~2. ITS gene of strains F1-3 PCR products;
3~4. ITS gene of strains F2-3 PCR products;5~6. ITS gene of strains F4-1 PCR products;7~8. ITS gene of strains F10-2 PCR products

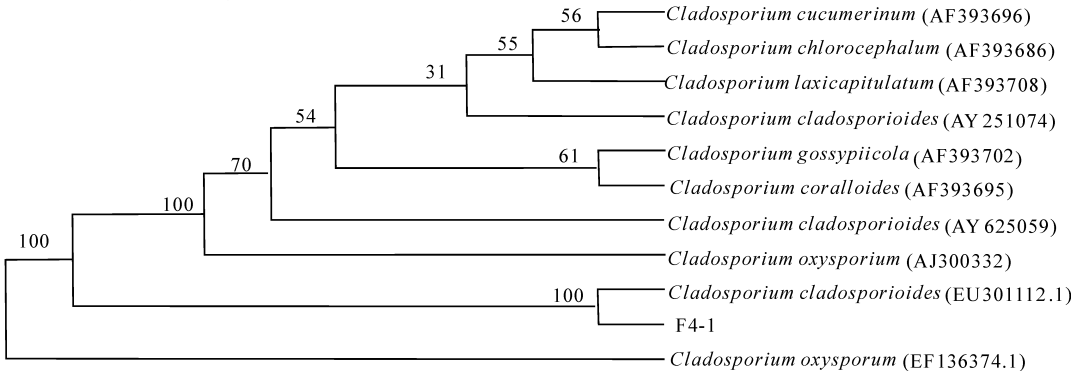


图 3 菌株 F4-1 与相关菌株的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree of strain F4-1 and its relatives.

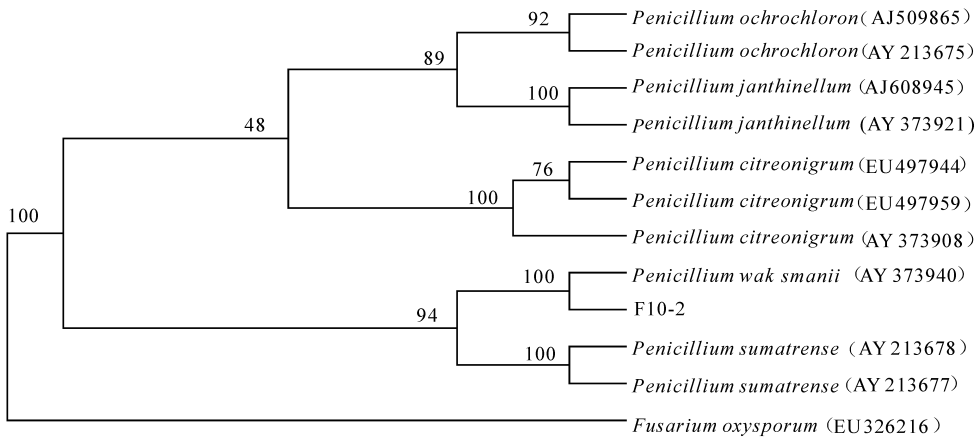


图 4 菌株 F10-2 与相关菌株的系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree of strain F10-2 and its relatives.

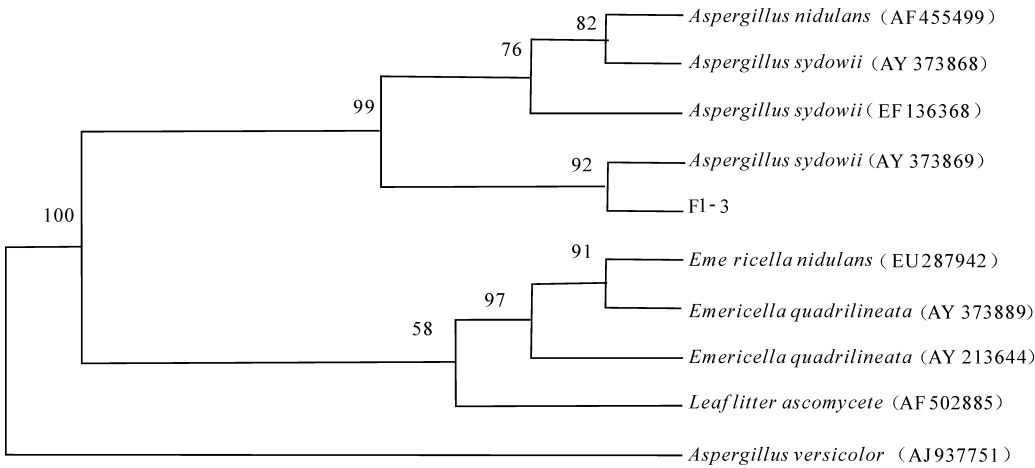


图 5 菌株 F1-3 与相关菌株的系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree of strain F1-3 and its relatives

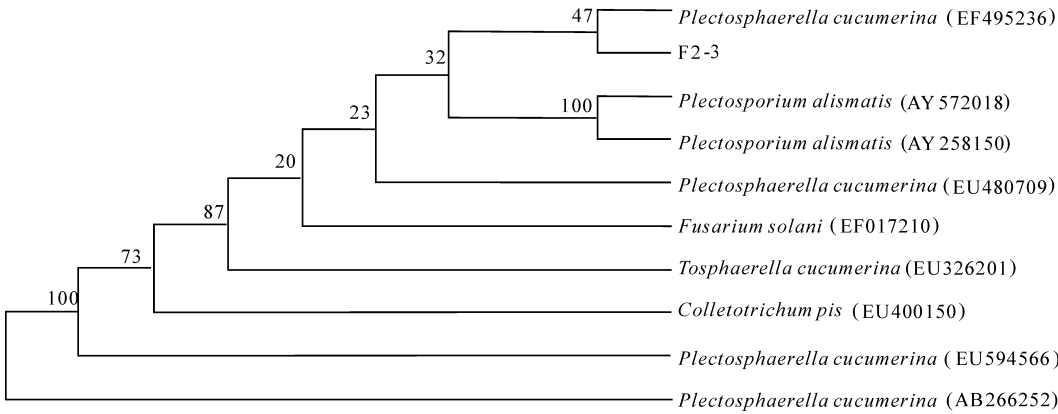


图 6 菌株 F2-3 与相关菌株的系统发育树
Fig. 6 Phylogenetic tree of strain F2-3 and its relatives

3 结论与讨论

本研究从采集的样品中,分离得到 38 株能在以

纤维素粉为惟一碳源的固体培养基上生长的菌株,经过以川楝残渣为惟一碳源的液体摇瓶培养,从中筛选出 4 株纤维素酶活性较高的真菌 F4-1、F1-3、

F10-2 和 F2-3。结合形态学观察与分子生物学鉴定结果,这 4 株菌分别为枝孢属枝状枝孢菌(*Cladosporium cladosporioides*)、曲霉属萨氏曲霉菌(*Aspergillus sydowi*)、青霉属瓦克青霉菌(*Penicillium waksmanii*)和小不整球壳属(*Plectosphaerella*)。

植物农药残渣是药用植物(根、茎、叶)经过有机溶剂高温萃取后的剩余部分,这一部分通常占药用植物干重的 95%左右。目前,我国已有烟碱、苦参碱、楝素等 30 种植物源农药登记生产,年植物源农药产量约 8 000 t,同时产生残渣高达 15 000 t 左右。这些残渣中含有大量的木质素、纤维素和半纤维素,3 种成分占残渣干重的 90%以上。本研究所筛选的 4 株真菌,均能在以川楝残渣为惟一碳源的培养基上,快速生长并产生纤维素酶,其所产纤维素酶又对川楝残渣具有较高的糖化作用。川楝残渣经过酸碱预处理后,这 4 种真菌的纤维素酶对川楝残渣纤维素的糖化率均有显著提高。这一特性对于资源化利用植物农药残渣具有重要的经济价值和现实意义。因此,植物农药残渣的资源化利用研究,对降低植物农药成本、环境保护和森林废弃物资源化利用等都具有巨大的经济价值和现实意义。

目前,所筛选的菌种,虽然具有一定的产酶和降解纤维素能力,但是应用于生产还不是很理想。在今后的研究中,可通过适宜的物理、化学因子及生物工程等方法进一步提高菌种的产酶能力。

[参考文献]

[1] Zhang Q,Lo C M,Ju L K. Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30 [J]. Bioresource Technology,2007,98(4):753-760.

[2] Yuko I,Enock Y P,Naoyuki O. Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus nige* [J]. Bioresource Technology, 2006,97:1030-1035.

[3] Solov'eva I V,Okunev O N,Vel'kov V V, et al. The selection and properties of *Penicillium verruculosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases [J]. Microbiology,2005,74(2):141-146.

[4] 汪金萍,徐尔尼,史立康,等. 高产纤维素酶生产方法的研究 [J]. 食品科技,2007(2):73-76.

Wang J P,Xu E N,Shi L K,et al. Study on the method of increasing cellulase production [J]. Food Science and Technology,2007(2):73-76. (in Chinese)

[5] 迟乃玉,张庆芳,刘长江,等. 纤维素酶高产菌株最适发酵条件的研究 [J]. 沈阳农业大学学报,2000,31(4):380-382.

Chi N Y,Zhang Q F,Liu C J,et al. Study of the fermentative condition of cellulose decomposition strain [J]. Journal of Shenyang Agricultural University,2000,31(4):380-382. (in Chinese)

[6] Zhang Y,Himmel M,Mielenz J. Outlook for cellulase improvement;screening and selection strategies [J]. Biotechnology Advances,2006,3:1-30.

[7] Mandels M,Sternbrg D. Recent advances in cellulose technology [J]. J Ferment Technol,1976,54(4):267-286.

[8] 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化试验方法和技术 [M]. 北京:高等教育出版社,1997:85-100.

Zhang L X,Zhang T F,Li L Y. Methods and techniques in biochemical experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 1997:85-100. (in Chinese)

[9] 王玉万,徐文玉. 木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木质素的定量分析程序 [J]. 微生物学通报,1987,14(2):82-84.

Wang Y W,Xu W Y. Ration analytical process for hemicellulose,cellulose and lignin in the solid-substrate fermentation of lingocellulose [J]. Microbiology,1987,14(2):82-84. (in Chinese)

[10] 康振生. 植物病原真菌的超微结构 [M]. 北京:中国科学技术出版社,1996:1-29.

Kang Z S. Ultrastructure of pathogenic fungi [M]. Beijing: Science and Technology Press of Chinese,1996:1-29. (in Chinese)

[11] Raeder U,Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi [J]. Letters in Applied Microbiol,1985,1:17-20.

[12] 张中义. 中国真菌志 [M]. 北京:科学出版社,2003.

Zhang Z Y. Flora fungorum sinicorum [M]. Beijing: Science Press,2003. (in Chinese)

[13] 张中义,冷怀琼,张志名,等. 植物病原真菌学 [M]. 成都:四川科学技术出版社,1991.

Zhang Z Y,Leng H Q,Zhang Z M,et al. Plant pathogenic mycology [M]. Chengdu: Sichuan Technology Press, 1991. (in Chinese)