

王 娜,余 晗. 1 株桑枝分解真菌的筛选、酶学特性及降解能力[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):378-381.

1 株桑枝分解真菌的筛选、酶学特性及降解能力

王 娜,余 晗

(江苏科技大学生物与化学工程学院,江苏镇江 212018)

摘要:采用刚果红染色鉴定法,通过以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为碳源的分离培养基初筛和以桑枝粉为碳源的复筛培养基复筛,从桑园地边垛叠腐烂桑枝下土壤中筛选出 1 株产纤维素酶的真菌 P1,并对其酶学性质和对桑枝的降解能力进行了初步研究。结果表明,P1 能有效降解桑树枝条,最适生长 pH 值为 6,最适生长温度为 32 ℃。产生的纤维素酶为复合酶系,具有滤纸酶(FPAase)、羧甲基纤维素酶(CMCase)和 β -葡萄糖苷酶活性。FPAase 在发酵 4 d 活性最高,可达 10.695 U/mL; β -葡萄糖苷酶在 6 d 出现活力高峰,达 18.188 U/mL;CMCase 活力变化相对平缓,4~10 d 酶活力变化不大,保持在 9~11 U/mL 之间。FPAase 和 CMCase 均有较好的温度和 pH 适应性,在 40~60 ℃ 和 pH 值 4~6 的范围内均有较好活性。以 CMC-Na 为底物时 P1 的最大反应速率(V_{\max})和米氏常数(K_m)分别为 0.082 9 mg/(mL·min)和 0.554 5 mg/mL。基于形态学和 18S rDNA 序列鉴定 P1 为撕裂蜡孔菌(*Ceriporia lacerata*)。撕裂蜡孔菌是一种典型的木腐菌。该菌株有较好的酶活性和温度及 pH 适应性,能有效降解桑树枝条。

关键词:桑枝;真菌;酶学特性;降解

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0378-03

纤维素是地球上最为丰富的可再生资源 and 碳水化合物,占植物界碳素总量的 50% 以上^[1-2]。纤维素是一类线状大分子物质,由葡萄糖以 β -1,4-糖苷键连接而成,由于高度的水不溶性且外围又被木质素包围,除反刍动物瘤胃中的微生物可降解转化少部分纤维素外,大部分纤维素很难降解为可利用的葡萄糖。栽桑养蚕、缫丝织绸是我国传统产业,作为产业物质基础的桑树(*Morus alba* L.)附属物桑枝由于高度木质纤维化,利用率极低,剪伐后的桑枝和其他纤维素类秸秆一样大多在田间地头焚烧,或堆积在地头任其自然腐烂,不仅浪费资源,对环境也有不同程度的破坏。虽然桑枝具有较高的营养、药用和工业价值^[3-5],在菌类养殖中^[6-7]也得到了较好的应用,但利用率仅为 10% 左右。目前,通过微生物产纤维素酶降解纤维素是最经济环保的方法。纤维素酶是指把纤维素降解为纤维素二糖和葡萄糖等小分子可溶性物质的一组酶的总称,主要由 3 个主要成分组成^[8]。自然界中细菌、真菌、放线菌等许多生物体中可产生纤维素酶^[9],已报道的酶菌种就有 50 多个属上千个菌株^[10],受到酶活性低等因素的限制。筛选活性高、抗逆性好的纤维素酶,已成为微生物学、环境保护科学、饲料酶制剂工业等多学科研究的热点。本试验采用刚果红染色法从桑园周围的土壤中分离得到 1 株具有产纤维素酶活性的菌株 P1,通过形态学和 18S rDNA 分子生物学鉴定的方法,确定其为撕裂蜡孔菌;并对菌株降解桑枝过程中有关酶特性等进行了初步研究,为菌株应用提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

收稿日期:2013-10-08

基金项目:江苏科技大学大学生科技创新计划。

作者简介:王 娜(1976—),女,山东烟台人,硕士,副教授,主要从事生物活性物质开发和利用研究。E-mail:biojustwn@126.com。

桑枝:春季剪伐时收集健壮生长良好的枝条,剪成 5 cm 左右小段,50~60 ℃ 烘箱中烘干,粉碎后过 40 目筛,备用。

桑园周围土壤:采自中国农业科学院蚕业研究所(江苏镇江),土壤取 3 处,分别为桑树根际土壤、桑园地边垛叠腐烂桑枝下土壤、桑地空隙处土壤。取距土壤表层 10 cm 左右深处,自然风干后研磨成粉,备用。

1.2 培养基

分离培养基:CMC-Na 10 g、琼脂 10 g、无机盐溶液 100 mL、水 400 mL,pH 值 7。无机盐溶液(g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7、 KH_2PO_4 10、 CaCl_2 1.5、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 8.95、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.045 7、 ZnCl_2 0.008 5、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.018 3。

复筛培养基:桑枝粉 50 g、麦麸皮 2 g、琼脂 8 g、无机盐溶液 100 mL、水 400 mL,pH 值 7。无机盐溶液(g/L): NaNO_3 25、 KH_2PO_4 10、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3、 NaNO_2 1、 FeCl_3 0.1。

发酵培养基:烘干的 5 cm 左右长度桑树枝条 500 g,麦麸皮 10 g,按照复筛培养基配方加入无机盐溶液 200 mL,拌匀。

1.3 仪器与试剂

仪器:9600 型紫外可见分光光度计、DHZ-D 恒温振荡摇床、SW-CJ-1F 超净工作台、日本三洋高压灭菌锅、蔡司荧光显微镜等。试剂:均为国产分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司、上海生工生物工程技术有限公司;引物合成和测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.4 目的菌株的筛选

各取土壤样品 10 g 于灭菌三角瓶中,加入 100 mL 无菌水,封口后在 100 r/min 的转速下振荡 0.5 h。取 100 μL 该悬浮液均匀涂布在分离培养基上,37 ℃ 下恒温培养 24 h,样品重复 3 次。将长出的单菌落菌株挑出继续接种在固体分离培养基上培养,重复多次后得纯化菌株。将纯化菌株点接在分离培养基上 24 h,采用刚果红染色鉴定法^[11]染色 10~15 min,1 mol/L NaCl 溶液洗涤 15 min,观察菌落周围有无透

明圈。若有透明圈则初步证明该菌株具有产纤维素酶的能力,透明圈越大,产酶能力越强。挑选透明圈较大的菌株接种在固体复筛培养基上,37℃下恒温培养,观察菌株生长情况。挑选能有效以桑枝粉为碳源的菌株进行系列研究。

1.5 粗酶液的制备

取 1 L 三角瓶,装入 300 mL 液态复筛培养基(pH 值 6.0),灭菌后接入菌株,于 32℃、110 r/min 摇床振荡培养。定时定点取样,发酵液在 4℃、10 000 r/min 离心 20 min,上清液即为粗酶液。

1.6 酶活力测定

滤纸酶(FPAase)活力测定参照李振江等的方法^[12],以粉碎的新华滤纸为底物;羧甲基纤维素酶(CMCase)活力测定参照 Agnihotri 等的方法^[13],以 CMC-Na 为底物; β -葡萄糖苷酶活力测定参照周津等的方法^[14],以水杨酸苷为底物。以 1 min 由底物生成 1 μ mol 葡萄糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.7 酶学特性研究

1.7.1 反应最适温度 将粗酶液在 20、30、40、50、60℃的不同温度条件下,在 pH 值为 4.5 的 0.05 mol/L 的柠檬酸缓冲液中反应 1 h,按照 FPAase 和 CMCase 的方法测定酶活力。

1.7.2 反应最适 pH 值 分别设置 0.05 mol/L 的柠檬酸缓冲液的 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0,在最适温度下反应 1 h,按照 FPAase 和 CMCase 的方法测定酶活力。

1.7.3 CMCase 酶学动力学 调节底物羧甲基纤维素钠(CMC-Na)浓度([S])分别为 2、3、4、5、6 mg/mL,按 CMCase 活力测定方法测定酶促反应速率 $[v, \text{mg}/(\text{mL} \cdot \text{min})]$ 。用双倒数法作图,以底物浓度的倒数 $(1/[S])$ 为横坐标,酶反应速率的倒数 $(1/v)$ 为纵坐标,计算出米氏常数(K_m)及最大催化反应速率(v_{max})^[15]。

1.8 菌株鉴定

1.8.1 形态学鉴定 在生长平板上观察菌株菌落形态,菌丝体涂于载玻片上用乳酸石炭酸棉蓝染色液染色,置于蔡司荧光显微镜下观察菌体形态特征,参照《真菌鉴定手册》进行初步鉴定^[16]。

1.8.2 分子生物学鉴定 提取菌株的总 DNA 为模板,采用通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 18S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μ L:去离子水 18 μ L,10 \times Buffer 2.5 μ L,DNA 模板 2 μ L,dNTP 各 1 μ L,真菌通用引物 ITS1/ITS4 各 0.5 μ L,Taq 酶 0.5 μ L。PCR 反应条件:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环;72℃延伸 10 min。扩增产物由上海生工生物工程技术有限公司测序,将所得序列在 NCBI 基因库中通过 BLAST 与已知序列进行比对,最终确定 P1 的种类。

1.9 降解桑枝能力初步测定

将菌株接种在羧甲基纤维素钠培养基上,32℃、110 r/min 下振荡培养 4 d 后,作为种子菌丝体。取 20 mL 含种子菌丝体的培养基和适量无菌水拌匀在含 500 g 桑枝条的发酵培养基中,以搅拌均匀且培养基湿润为宜。将发酵培养基装在塑料袋内,两端封口,塑料袋表面戳少量洞通气,32℃条件下发酵培养。不定期观察菌株发酵桑枝能力。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

从采集的 3 种土样中分离获得 11 株能够在分离培养基上生长良好的真菌和细菌,采用刚果红染色鉴定法根据透明圈直径与菌落圈直径之比,从中筛选出 2 株产酶活力较高的菌株,命名为 P1(来自桑园地边垛叠腐烂桑枝下土壤)和 P2(来自桑树根际土壤)。将 P1 和 P2 分别接种在以桑枝粉为主要碳源的固体复筛培养基上,2 株菌均能生长,但 P2 生长缓慢,菌落圈非常小,表明其不能很好降解桑枝粉,因此选择 P1 作为研究对象,根据形态初步确定该株菌为真菌。

2.2 菌株生长特性

2.2.1 最适生长 pH 值 把固体复筛培养基的初始 pH 值分别调为 5、6、7、8、9,点接入菌株菌丝体,置于 30℃培养箱中恒温培养,4 d 后测定菌落圈直径大小(表 1)。结果表明,P1 为酸性菌,在 pH 值 6 左右时生长最好。

2.2.2 最适生长温度 将菌株点接至 pH 值 6 的固体复筛培养基平板上,置于恒温培养箱中培养,设培养温度分别为 28、30、32、35、37℃,静置培养 4 d 后测定菌落圈直径大小(表 1)。结果表明,菌株在试验温度条件下均能生长,最适温度在 32℃左右。

表 1 菌株 P1 的生长特性

培养基 pH 值	菌落直径 (mm)	温度 (℃)	菌落直径 (mm)
5	38.25 \pm 2.15	28	36.13 \pm 2.97
6	59.00 \pm 3.48	30	31.00 \pm 2.18
7	47.00 \pm 2.95	32	47.50 \pm 3.52
8	34.20 \pm 1.64	35	28.50 \pm 1.95
9	—	37	9.75 \pm 2.13

2.3 菌株酶活力变化

纤维素降解菌性能大多用 CMCase 和 FPAase 来衡量。通过液体发酵试验,从第 4 天开始间隔 48 h 测定 P1 的酶活力(表 2)。结果表明,菌株 P1 的 FPAase 活力在第 4 天达到高峰,为 10.695 U/mL;CMCase 活力变化相对平缓,第 4~10 天酶活力变化不大,始终保持在 5~7 U/mL 之间; β -葡萄糖苷酶在第 6 天出现活力高峰,达到 18.188 U/mL。本试验 3 种酶最佳产酶天数不一致,但基本上都保持在 4~6 d。

表 2 菌株 P1 不同发酵时间的酶活力

培养时间 (d)	酶活力 (U/mL)		
	滤纸酶	羧甲基纤维素酶	β -葡萄糖苷酶
4	10.695 \pm 1.277	5.532 \pm 0.820	9.908 \pm 0.032
6	5.098 \pm 0.250	6.326 \pm 1.393	18.188 \pm 1.303
8	4.954 \pm 0.013	6.133 \pm 0.356	9.908 \pm 0.021
10	6.157 \pm 0.435	6.639 \pm 0.917	10.774 \pm 0.764

2.4 酶学特性

2.4.1 酶最适反应温度 在不同的水浴反应温度下进行酶促反应,结果见图 1。由图 1 可知,该菌株的 FPAase 和 CMCase 在 20~60℃范围内均有一定的酶活性,40~60℃时活性较高,50℃达到高峰,说明酶促反应温度较广。

2.4.2 酶最适反应 pH 值 P1 所产纤维素酶为酸性酶,在

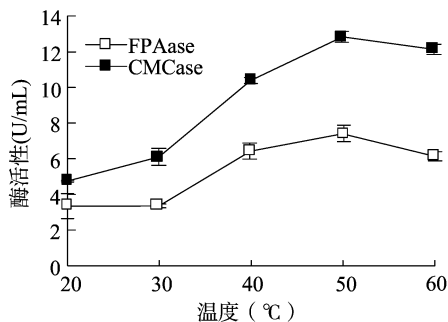


图1 温度对纤维素酶活力的影响

pH 值为 4.5~6.0 时, FPAase 活性保持在较高的水平, 酶活性随 pH 值的变化不大; 而 CMCase 活力在 pH 值为 4~6 时均明显高于 FPAase, 受 pH 值影响也较少, 表明 P1 所产纤维素酶的适宜酶促 pH 值范围较广 (图 2)。

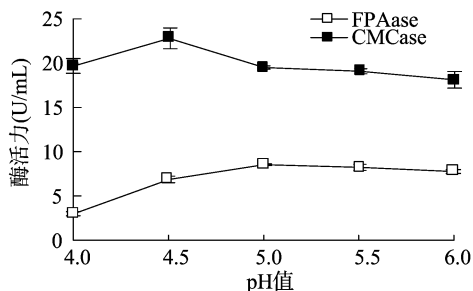


图2 pH值对纤维素酶活力的影响

2.4.3 酶促反应过程 K_m 及 V_{max} 的测定 用羧甲基纤维素钠 (CMC - Na) 做反应底物, 在 pH 值 5 的柠檬酸缓冲液和 50 °C 水浴反应温度下测定底物浓度 2~6 mg/mL 的酶促反应速率。采用双倒数作图, 求得菌株 P1 的 CMCase 的最大反应速率 V_{max} 和米氏常数 K_m 分别为 0.082 9 mg/(mL · min) 和 0.554 5 mg/mL (图 3)。

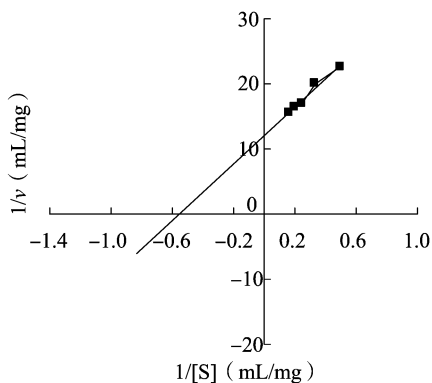


图3 酶促反应双倒数

2.5 菌株鉴定

2.5.1 菌株的形态特征 结合显微镜观察, 在固态桑枝粉复筛培养基上, P1 菌株白色, 菌落形态较大, 质地疏松, 不透明, 绒毛状, 干燥; 菌丝有隔, 出现膨大细胞 (图 4)。

2.5.2 菌株的 18S rDNA 鉴定 以菌株 P1 的 DNA 为模板, 用通用引物 ITS1/ITS4 扩增, 扩增出大约 720 bp 的片段。将菌株序列输入 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性比对, 结

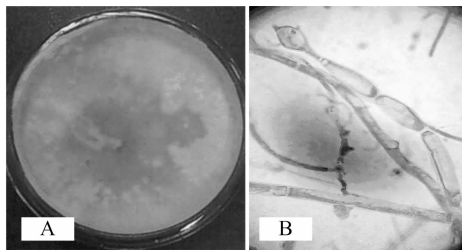
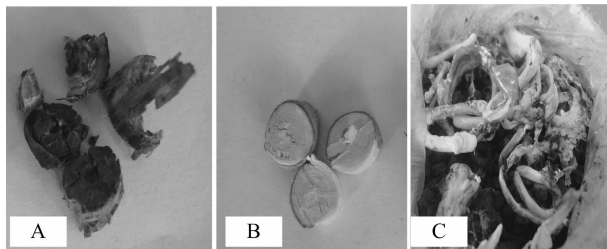


图4 菌株P1的形态特征

果表明, 同源性相近的序列均为撕裂蜡孔菌 (*Ceriporia lacera-ta*), 相似性均高达 99%。撕裂蜡孔菌是一种木材腐朽菌, 属于担子菌亚门 (Basidiomycete) 多孔菌目 (Polyporales) 蜡孔菌属 (*Ceriporia*)。目前, 国内外研究报道很少, 常出现于亚热带落叶阔叶林, 有很高的利用价值, 可应用到生物制浆造纸、抗癌药物和环境净化等领域, 在生产具有环保功能的木材防霉、防变色药剂方面也有一定前景, 对研究具有重要意义。

2.6 降解桑树枝条能力

将种子菌株菌丝体接入发酵培养基后, 初期 P1 菌株生长十分缓慢, 这可能是初期产生的纤维素酶量较少, 只能降解桑枝条表层组织中的纤维素, 可利用的营养物质较少; 后期随着酶量的增加和表层纤维素的破坏, 菌株可利用营养成分累积增多, 菌丝体快速生长; 在降解 30 d 时可明显看到白色菌丝遍布在枝条切段间, 50 d 时菌丝已经集结成子实体, 桑枝切段也明显发黑变质腐烂, 手捏即碎 (图 5)。



A—P1发酵后桑枝条; B—对照桑枝条; C—子实体

图5 菌株P1的降解能力

3 结论

本试验通过刚果红透明圈法和纤维素酶活性的测定, 从桑园土壤中筛选出 1 株较为理想的降解桑枝的菌株 P1, 在桑树枝粉为主要碳源的固体复筛培养基中, 菌株能较好生长。P1 为酸性菌, 最适生长温度在 32 °C, 最适生长 pH 值为 6。

对该菌纤维素酶活性分析结果表明, 该菌产生的纤维素酶属于复合酶系。在不同发酵时间对酶系中的 3 种酶活力测定结果: P1 的滤纸酶活力在 4 d 时活性最高, 可达到 10.695 U/mL; β -葡萄糖苷酶在 6 d 出现活力高峰, 达到 18.188 U/mL; 而 CMCase 活力变化相对平缓, 4~10 d 酶活力变化不大。P1 产生的 FPAase 和 CMCase 均有较好的温度和 pH 值适应范围。以 CMC - Na 为底物, 采用双倒数作图法计算获得 P1 的最大反应速率 V_{max} 和米氏常数 K_m 分别为 0.082 9 mg/(mL · min) 和 0.554 5 mg/mL。

P1 降解桑树枝的能力相对较弱, 酶活力较低, 但其产纤维素酶具有酶促反应条件温和、范围广等优良性质, 有望通过对其基因诱变提高产酶能力。

马莉,付关强,寇新昌,等.长岭碱茅群落草地大型土壤动物的多样性特征[J].江苏农业科学,2014,42(7):381-384.

长岭碱茅群落草地大型土壤动物的多样性特征

马莉¹,付关强²,寇新昌²,李红月²

(1.赤峰学院资源与环境科学学院,内蒙古赤峰 024000 2.东北师范大学城市与环境科学学院,吉林长春 130024)

摘要:5—9 月调查长岭碱茅群落大型土壤动物,共获得大型土壤动物 32 类,1 194 只,优势类群 3 类:蚁科、象甲科幼虫和虹蛹螺科。大型土壤动物的个体数在 6 月份最多,且与 5、7、8 和 9 月存在显著差异,类群数在不同月份之间无显著差异。多样性指数和均匀度指数在 5 个月份的变化均为 7 月 > 8 月 > 5 月 > 6 月 > 9 月;优势度指数变化为 9 月 > 6 月 > 5 月 > 8 月 > 7 月,土壤动物的多样性与丰富度和均匀度呈正相关,与优势度呈负相关,与个体数没有直接关系。大型土壤动物群落个体数和类群数在垂直方向上均存在显著差异,呈现明显的表聚性特征。

关键词:大型土壤动物;碱茅群落;多样性特征;长岭草地

中图分类号:S154.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)07-0381-04

土壤动物群落的多样性与土壤环境特征密切相关,不同的土壤类型中土壤动物的组成不同^[1-2]。同一生境不同土层土壤动物群落特征和生态分布亦存在差异,而这种差异恰恰可以反映出土壤环境条件是否优越^[3]。大型土壤动物是生态系统中的消费者和初级分解者,在生态系统的物质循环和能量流动中占有极其重要的地位^[4]。其还被看作是评价草地生态系统的生态功能和稳定性的指示生物^[5-7]。近年来,土壤动物用于指示退化草原生态系统的恢复治理的研究成为热点^[8-11]。本研究旨在研究长岭碱茅群落大型土壤动物多样性特征,通过对不同月份大型土壤动物组成和分布状况以

及不同土层的大型土壤动物变化,得出该区大型土壤动物多样性变化的规律,为生物多样性保护和退化草原地区生态恢复提供土壤动物学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区自然环境概况

研究区位于长岭县(123°44′~123°47′E,44°40′~44°44′N),属于松嫩草原。海拔高度在 140~160 m,地形比较低洼。该地为温带亚湿润季风性气候,年均温约 4.9℃,年降水量在 400 mm 左右,降水主要集中于 6—9 月份。蒸发量为 1 368 mm,约为降水量的 3 倍,湿润系数为 0.23,≥10℃积温为 2 579~3 144℃。地带性土壤为黑钙土。该地区自然植被是以羊草碱茅群落为优势种。

1.2 研究方法

1.2.1 样品采集与处理

在长岭选择典型且有代表性的碱

收稿日期:2013

基金项目:国家自然科学基金(编号:40871120,41171207)。

作者简介:马莉(1982—),女,内蒙古赤峰人,硕士,讲师,主要从事土地生态与区域发展研究。E-mail: mal947@163.com。

通过形态学和 18S rDNA 鉴定,确定 P1 为撕裂蜡孔菌。发酵试验表明,菌株 P1 能够很好地利用桑枝条,在桑枝条上长出子实体,使桑枝条腐烂变黑。

参考文献:

- [1] Lynd L R, Weimer P J, van Zyl W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577.
- [2] 张平平, 刘宪华. 纤维素生物降解的研究现状与进展[J]. 天津农学院学报, 2004, 11(3): 48-54.
- [3] 何雪梅, 廖森泰, 刘吉平. 桑树资源综合利用进展及开发对策[J]. 蚕业科学, 2005, 31(1): 4-7.
- [4] 黄盖群, 郭谨, 刘刚, 等. 桑树的药用价值及其开发应用[J]. 蚕学通讯, 2007, 27(4): 41-43.
- [5] 牛建设, 喻红芹, 张之亮. 桑皮纤维性能与开发利用现状的研究[J]. 上海纺织科技, 2008, 36(6): 19-20.
- [6] 陆娜, 闫静, 周祖法, 等. 桑枝屑栽培猴头菇栽培模式试验[J]. 食用菌, 2012(4): 37-38.
- [7] 姚利娟. 桑枝秀珍菇反季节高效栽培技术[J]. 蚕桑通报, 2012, 43(3): 56-57.

- [8] 燕红, 杨谦, 王希国. 两株芽孢杆菌产纤维素酶的研究[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(2): 83-86.
- [9] 谢占玲, 吴润. 纤维素酶的研究进展[J]. 草业科学, 2004, 21(4): 72-76.
- [10] 王颖. 纤维素酶产生菌的筛选[J]. 牡丹江医学院学报, 2009, 30(4): 90-92.
- [11] 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.
- [12] 李振红, 陆贻通. 高效纤维素降解菌的筛选[J]. 环境污染与防治, 2003, 25(3): 133-135, 153.
- [13] Agnihotri S, Dutt D, Tyagi C H, et al. Production and biochemical characterization of a novel cellulose - poor alkali - thermo - tolerant xylanase from *Coprinellus disseminatus* SW-1NTCC 1165[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2010, 26(8): 1349-1359.
- [14] 周津, 阮宏, 孙连魁. 绿色木霉 A10 纤维素酶的分离纯化及理化性质研究[J]. 西北大学学报: 自然科学版, 1994, 24(5): 465-469.
- [15] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长发. 生物化学: 下册[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 355-367.
- [16] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 367-378.