

产纤维素酶食用菌筛选及其培养基的优化

丁玉萍, 张 康, 叶红强, 王晓娟, 杨 莎, 梅 竹, 任欢欢

(佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘 要: 利用刚果红杯碟快速筛选法对大白菇、金针菇、香菇、竹荪、磷盖红菇、杏鲍菇6种食用菌产纤维素酶能力进行比较, 同时对高产纤维素酶食用菌的培养基最佳碳源和配方进行筛选、优化。结果表明: 磷盖红菇出现透明圈最大, 直径为20mm; 对比羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、豆渣、秸秆粉、葡萄糖4种碳源, 豆渣对磷盖红菇产纤维素酶有促进作用, 优化培养基为豆渣60g/L、硫酸铵2.0g/L、吐温-80 1.5mL/L、pH5.4。

关键词: 食用菌; 纤维素酶; 筛选; 培养基

Screening for Cellulase Producing Edible Fungi and Optimization of Medium

DING Yu-ping, ZHANG Kang, YE Hong-qiang, WANG Xiao-juan, YANG Sha, MEI Zhu, REN Huan-huan

(College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

Abstract: The ability of six edible fungi, *Russula delica* Fr, *Flammulina velutipe*, *Lentinus javanicus*, *Bamboo-sun*, *Russula lepida* and *Abalone mushroom*, to produce cellulase were compared using the Congo red saucer rapid screening method. Meanwhile, the optimum carbon source and medium formula for cellulase production were screened and optimized. The result showed that *Russula lepida* produced the largest transparent rings of 20 mm in diameter, showing its high yield of cellulase. Among the four kinds of carbon source, CMC-Na, bean dregs, straw powder and glucose, the bean dregs promoted *Russula lepida* to produce cellulase. The optimized medium for cellulase production by *Russula lepida* was bean dregs 60 g/L, ammonium sulfate 2.0 g/L, Tween-80 1.5 mL/L, and pH 5.4.

Key words: edible fungi; cellulase; screening; medium

中图分类号: Q939.99

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0236-04

食用菌在分类学上属于菌物界真菌门, 是一类可以食用的大型真菌^[1-2]。食用菌栽培所用碳源主要是锯末、秸秆等富含纤维素、半纤维素、木质素的物质, 食用菌分泌的胞外酶将这些大分子物质分解成小分子物质而利用, 说明食用菌含有丰富的纤维素酶系^[3-5]。目前对食用菌产多糖研究较多, 而对食用菌产纤维素酶研究较少。食用菌种类丰富, 不同菌种产生胞外酶的种类不同, 同一菌种不同生长期产胞外酶水平也不同^[6-7]。本实验利用刚果红杯碟快速筛选法^[8]对几种食用菌产纤维素酶能力进行对比研究, 筛选出高产胞外纤维素酶的食用菌, 并对其高产纤维素酶的培养基的最佳碳源和配方进行筛选和优化^[9-11], 旨在为食用菌家族中筛选出高产纤维素酶菌种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

1号: 大白菇; 2号: 金针菇; 3号: 香菇; 4号: 竹荪; 5号: 磷盖红菇; 6号: 杏鲍菇; 菌种由佳木斯大学生命科学学院发酵实验室提供。

1.1.2 培养基

改良PDA培养基: 麸皮5g(煮汁)、马铃薯20g(煮汁)、琼脂2g、可溶性纤维0.2g, 定容100mL, 装于三角瓶中。0.1MPa灭菌20min, 取出趁热倒平板, 冷却后备用。

液体种子培养基(g/L): KH_2PO_4 1.0、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0、蛋白胨0.2、微晶纤维素5.0、 CaCl_2 0.1、吐温-80 1.5mL, 用醋酸调pH 5.4。分装于250mL三角瓶, 每瓶装液量100mL, 加玻璃珠4~5粒, 0.1MPa灭菌20min。

基础培养基(g/L): 麸皮25(煮汁)、蛋白胨2、 KH_2PO_4 0.5、 MgSO_4 0.5、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, 吐温-80 1.5mL, 用醋酸调pH5.4。

A、B、C、D发酵培养基: 在基础培养基中分别添加CMC-Na 1g/L、豆渣(含水85%) 80g/L、秸秆粉10g/L、

收稿日期: 2011-09-11

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(C200938); 佳木斯大学大学生科技创新项目(Dz2011-063)

作者简介: 丁玉萍(1964—), 女, 高级工程师, 本科, 主要从事生物技术与微生物发酵研究。E-mail: 123dingyuping@163.com

葡萄糖10g/L, 即组成A、B、C、D共4种发酵培养基。分装、灭菌同上。

1.1.3 缓冲液配制

A液(0.1mol/L柠檬酸钠): 称取柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 21.014g, 加水溶解, 定容1000mL。

B液(0.1mol/L柠檬酸钠溶液): 称取柠檬酸钠($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) 29.412g, 加水溶解, 定容1000mL。

取A液57mL, B液43mL混合均匀即为pH值为4.4的柠檬酸缓冲液。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化

将食用菌菌种用接种铲转接至改良PDA平板培养基上, 置于26℃恒温培养箱培养6~7d, 待菌丝长满平板, 备用。

1.2.2 液体培养

用打孔器(直径约5mm)在平板培养基上取厚约2mm圆形带菌丝的培养基3块, 接入液体种子培养基中, 于115r/min旋转式摇床, 25℃培养, 测其酶活力^[12]。

1.2.3 粗酶液的制备

用100目筛过滤发酵液, 滤液经4000r/min离心20min, 上清液即为粗酶液。

1.2.4 刚果红杯碟快速筛选法

用打孔器(直径约7mm)在固体平板上打孔, 四周为样品孔, 注入各菌株发酵粗酶液, 中央孔为阳性对照, 注入1g/L高活性纤维素酶酶液。将液体注满孔, 不能溢出, 盖上皿盖, 放入45~50℃培养箱中静置培养2~4h, 然后打开皿盖, 培养箱温度升至60℃, 蒸干孔中液体。用0.1%的刚果红溶液浸没平板染色1h, 再用1mol/L的NaCl溶液洗脱, 每次洗脱时间为5min, 洗脱两次。具有一定纤维素酶活力的会出现较明显的透明圈。以培养基为空白对照^[8]。

1.2.5 CMC酶(CMCCase)活力测定方法^[13-14]

测定步骤: 取25mL具塞比色管, 依次加入2.0mL pH值为4.4的柠檬酸缓冲液, 1.0mL CMC-Na(称取0.5g CMC-Na溶于pH值为4.4的柠檬酸缓冲液中, 浸润2h, 摇均至完全溶解, 备用)溶液, 1.0mL粗酶液, 振荡3~5s, 于45℃水浴反应30min取出中止反应, 加2.0mL DNS, 然后在沸水浴中煮沸10min, 冷却至室温, 用蒸馏水定容至25mL。测定OD_{540nm}值。另取25mL具塞比色管做空白实验, 依次加入2.0mL pH值为4.4的柠檬酸缓冲液, 1.0mL CMC-Na溶液, 1.0mL粗酶液, 2.0mL DNS, 摇均, 立即在沸水浴中煮沸10min, 以下操作同试样管。

酶活力单位定义: 1mL液体酶, 在一定温度、pH值条件下, 30min水解底物产生相当于1μmol还原糖的酶量为1个酶活力单位, 以U/mL表示。从标准曲线中查出葡萄糖的微摩尔数。

$$\text{酶活力}(\text{U/mL}) = \frac{\text{葡萄糖含量}}{V}$$

式中: V为粗酶液体积/mL。

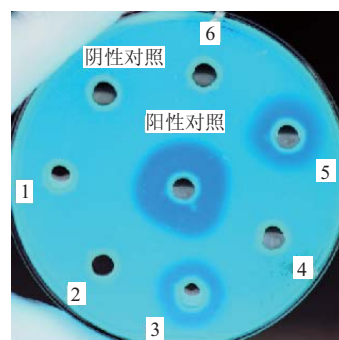
1.2.6 产纤维素酶培养基的优化试验

以刚果红杯碟法快速筛选出产纤维素酶食用菌为实验菌种, 对培养基的豆渣添加量、硫酸铵添加量、吐温-80添加量和初始pH值进行单因素试验, 在单因素试验基础上设计正交试验, 对食用菌产纤维素酶培养基进行优化^[15-16]。

2 结果与分析

2.1 刚果红杯碟法快速筛选高产纤维素酶食用菌

将6种食用菌菌株于液体种子培养基中培养, 在培养24、48、72、96h分别取发酵液进行刚果红快速平板法筛选, 培养96h的发酵液透明圈较明显, 于45℃静置培养4h蒸干染色, 结果如图1所示。图中阴性对照为原培养基, 未出现透明圈, 中央孔(阳性对照)出现较大透明圈, 其余1~6孔依次为大白菇、金针菇、香菇、竹荪、磷盖红菇、杏鲍菇的发酵液。6种菌只有5号磷盖红菇和3号香菇出现透明圈。5号磷盖红菇透明圈最大, 直径为20mm(阳性对照为25mm)。3号香菇透明圈较小, 直径为16mm。其余4种菌的发酵液没有出现透明圈, 未显现酶活力或酶活力较弱。



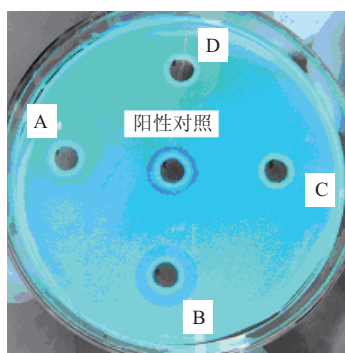
1. 大白菇; 2. 金针菇; 3. 香菇; 4. 竹荪; 5. 磷盖红菇; 6. 杏鲍菇。

图1 刚果红杯碟快速筛选高产纤维素酶食用菌

Fig.1 Rapid screening for high-yield cellulase producing edible fungi using Congo red plates

2.2 刚果红杯碟法快速筛选食用菌高产纤维素酶最佳碳源

将活化后磷盖红菇菌种接入A、B、C、D发酵培养基中, 于培养24、48、72、96h取发酵液进行刚果红快速平板法筛选, 根据透明圈大小筛选最佳碳源。结果表明: 培养48h培养基B出现明显的透明圈, 于45℃静置培养2h蒸干染色, 结果如图2所示。图中中央孔为阳性对照, 其余1~4孔依次为A、B、C、D共4种发酵培养基的发酵液, B培养基透明圈直径大于阳性对照, 其余3种发酵液没有出现明显透明圈, 未显现酶活或活力较弱。说明豆渣对食用菌产纤维素酶的促进和诱导作用明显强于CMC-Na、秸秆粉和葡萄糖, 因为72h和96h的发酵液A、C、D培养基仍未出现明显透明圈。



A.添加1g/L CMC-Na培养基; B.添加80g/L豆渣培养基;
C.添加10g/L 秸秆粉培养基; D.添加10g/L葡萄糖培养基。

图2 刚果红杯碟快速筛选食用菌高产纤维素酶诱导剂

Fig.2 Rapid screening for optimum carbon source for cellulase production by edible fungi using Congo red plate

2.3 磷盖红菇产纤维素酶培养基的优化

2.3.1 豆渣添加量对磷盖红菇产纤维素酶的影响

配制基础培养基5份, 每份豆渣添加量分别为40、60、80、100、120g/L, 分装、灭菌、接种后于摇床培养96h取出测其CMCase活力, 结果如图3所示。磷盖红菇产纤维素酶量随着豆渣添加量的递增呈正态分布, 当豆渣的添加量为80g/L时, 纤维素酶活力最高。这说明豆渣的添加量对磷盖红菇产纤维素酶有一定影响, 豆渣的最适添加量为80g/L。

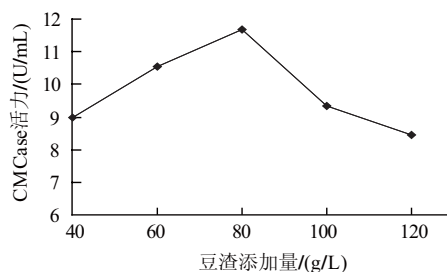


图3 豆渣添加量对磷盖红菇产纤维素酶的影响

Fig.3 Effects of the addition of bean dregs on cellulase production by *Russula lepida*

2.3.2 硫酸铵添加量对磷盖红菇产纤维素酶的影响

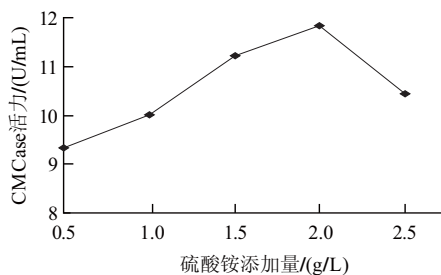


图4 硫酸铵添加量对磷盖红菇产纤维素酶的影响

Fig.4 Effects of ammonium sulfate on cellulase production by *Russula lepida*

配制基础培养基(暂不加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)5份, 每份添加豆

渣80g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分别添加0.5、1.0、1.5、2.0、2.5g/L, 分装、灭菌、接种后于摇床培养96h取出测其CMCase活力, 结果如图4所示。磷盖红菇产纤维素酶活性随硫酸铵添加量的增大, 呈正态分布, 当硫酸铵的添加量为2.0g/L时, 磷盖红菇产纤维素酶活性最高。

2.3.3 吐温-80添加量对磷盖红菇产纤维素酶的影响

配制基础培养基(暂不加吐温-80)5份, 每份添加豆渣80g/L, 吐温-80分别添加0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL/L, 分装、灭菌、接种后于摇床培养96h取出测其CMCase活力, 结果如图5所示。磷盖红菇产纤维素酶量随着吐温-80添加量的递增呈正态分布。当吐温-80的添加量为1.5mL/L时, 纤维素酶活力最高; 以后随着其添加量的增加, 磷盖红菇产纤维素酶活力呈下降的趋势, 说明表面活性剂吐温-80添加量适当, 促进磷盖红菇胞外纤维素酶的释放; 表面活性剂加量过大反而抑制胞外纤维素酶的产生。

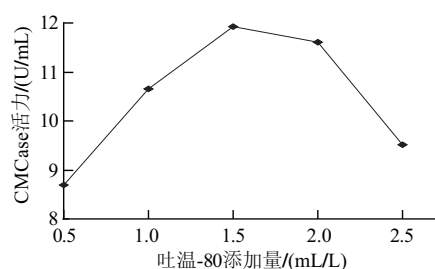


图5 吐温-80添加量对磷盖红菇产纤维素酶的影响

Fig.5 Effects of Tween-80 on cellulase production by *Russula lepida*

2.3.4 初始pH值对磷盖红菇产纤维素酶的影响

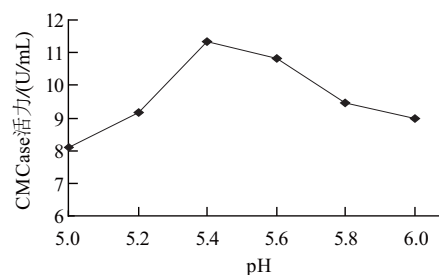


图6 初始pH值对磷盖红菇产纤维素酶的影响

Fig.6 Effects of initial pH on cellulase production by *Russula lepida*

配制基础培养基6份, 每份加豆渣80g/L, 用体积比1:1醋酸水溶液将6份培养基pH值分别调至5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0, 分装、灭菌、接种后于摇床培养96h取出测其CMCase活力, 结果如图6所示。在pH5.0~6.0之间, 随着pH值的增加磷盖红菇产胞外纤维素酶活力呈正态分布; 在pH5.4时, 磷盖红菇产纤维素酶活力达到最大值11.32U/mL。这说明磷盖红菇产纤维素酶的最适pH值应该在5.2~5.6之间。

2.3.5 正交试验

在单因素试验基础上,应用正交试验法对磷盖红菇液体深层培养基的4种因素(豆渣、硫酸铵、吐温-80的添加量和pH值)在3个水平上进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,每组做3次重复,取平均值。试验因素水平及结果见表1。

表1 正交试验结果
Table 1 Design and results of orthogonal test

试验号	因素				CMCase 活力/ (U/mL)
	A豆渣 添加量/(g/L)	B硫酸铵 添加量/(g/L)	C吐温-80 添加量/(mL/L)	D pH	
1	1(60)	1(1.5)	3(2.0)	2(5.4)	11.97
2	2(80)	1	1(1.0)	1(5.2)	10.64
3	3(100)	1	2(1.5)	3(5.6)	11.18
4	1	2(2.0)	2	1	11.57
5	2	2	3	3	11.48
6	3	2	1	2	11.95
7	1	3(2.5)	1	3	11.86
8	2	3	2	2	11.98
9	3	3	3	1	10.63
K_1	35.40	33.79	34.45	32.84	
K_2	34.10	35.00	34.73	35.90	
K_3	33.76	34.47	34.08	34.52	
R	1.64	1.21	0.65	3.06	

由表1可知,极差 $R_D > R_A > R_B > R_C$,说明因素D对磷盖红菇产胞外纤维素酶活力的影响最大,是主要影响因素,其次为因素A、B的影响次之、因素C影响最小。通过比较4个因素的K值得出:最适培养基配方为 $A_1B_2C_2D_2$,将此培养基配方与正交试验最大组(即第8组 $A_2B_3C_2D_2$)进行对比验证实验,产胞外纤维素酶的活力分别为12.18U/mL和11.97U/mL,前者明显高于后者,所以磷盖红菇产胞外纤维素酶的最佳培养基为 $A_1B_2C_2D_2$,即豆渣60g/L、硫酸铵2.0g/L、吐温-80 1.5mL/L、pH 5.4。

3 结论与讨论

3.1 采用刚果红杯碟快速筛选法对大白菇、金针菇、香菇、竹荪、磷盖红菇、杏鲍菇6种常见食用菌产纤维素酶能力进行了比较,磷盖红菇和香菇出现明显透明圈,磷盖红菇出现透明圈大于香菇,说明这两种菌产纤维素酶能力较强,6种菌株中磷盖红菇产纤维素酶能力最强。

3.2 采用刚果红杯碟快速筛选法比较磷盖红菇在CMC-Na、

豆渣、秸秆粉、葡萄糖配制的4种培养基中产纤维素酶的能力,豆渣培养基出现透明圈较早,并且最大,说明豆渣对磷盖红菇产纤维素酶有促进作用,4种碳源中豆渣是磷盖红菇产纤维素酶最佳碳源。

3.3 通过单因素试验和正交试验对磷盖红菇产纤维素酶培养基进行优化的结果是豆渣60g/L、硫酸铵2.0g/L,吐温-80 1.5mL/L, pH5.4。

采用刚果红杯碟快速筛选法对高产纤维素酶食用菌菌株和碳源进行筛选。此方法与测定酶活性单位相比,更直观、快捷,不受试剂、人为操作、仪器、方法等误差干扰,结果重现性好。

参考文献:

- [1] 马琼,张明英.香菇深层发酵胞外酶活力的研究[J].食品科学,2008,29(8):430-432.
- [2] 刘朝贵,邵坤,聂和平,等.不同培养料对鸡腿菇胞外酶活性影响的研究[J].西南师范大学学报,2008,33(1):40-42.
- [3] 黄清荣,丛发滋,刘新海,等.正交法优化白平菇深层培养基的研究[J].吉林农业大学学报,2006,28(1):18-21.
- [4] 刘妙莲,王洁.影响纤维素酶活力测定的几个因素[J].食品与发酵工业,2000,26(6):37-39.
- [5] 冯培勇,程显好,杨立红.茶薪菇产纤维素酶最佳液体发酵条件的研究[J].安徽农业科学,2008,36(3):868-869.
- [6] 丁少军,宋美静,池杏微,等.不同碳源条件下草菇内切型纤维素酶基因(egI)转录表达的分析[J].应用与环境生物学报,2005,11(4):419-422.
- [7] 裴建军,胡沂淮,邵蔚蓝.草菇半纤维素酶系统的诱导、分布及初步定性[J].无锡轻工大学学报,2003,22(1):61-64.
- [8] 罗颖,欧阳嘉,许婧,等.耐热纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及产酶条件优化[J].食品与生物技术学报,2007,26(1):84-89.
- [9] 孔新刚,李华,吴国莲.秸秆纤维素酶水解率测定方法的研究[J].新疆农业科学,2007,44(5):663-666.
- [10] 王宜磊.金针菇液体培养特性及胞外酶研究[J].微生物学杂志,2002,22(1):34-35.
- [12] 孙东平.灵芝液体发酵产纤维素酶的提取及性质分析[J].南京理工大学学报,2006,30(3):356-360.
- [13] 陈军,王雨净,夏志华.几种珍稀食用菌菌株纤维素酶系组分活性的比较[J].上海师范大学学报:自然科学版,2006,35(6):76-80.
- [14] 孔丽娟,朱启忠,辛倩,等.平菇产半纤维素酶条件及酶学性质初步研究[J].江苏农业科学,2009(4):379-380.
- [15] THMME P, WARREN R A J, GILKES N R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi[J]. Adv Microb Physiol, 1995, 37: 1-81.
- [16] AGUILAR R, RAMÍREZ J A, GARROTE G, et al. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse[J]. J Food Eng, 2002, 55(4): 309-318.