

几种食用菌产胞外纤维素酶对比及其产酶条件的优化

丁玉萍, 韩诚武, 赵永勋, 申 健, 靖桂云, 董良杰

(佳木斯大学 生命科学院, 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了比较,同时对高产纤维素酶食用菌的最佳工艺条件进行了优化。结果表明:磷盖红菇出现透明圈最大,直径为 20 mm;磷盖红菇产纤维素酶最佳工艺条件为摇床转速 105 r/min,培养初始 pH 5.4,培养时间 72 h,培养温度 26℃。

关键词:食用菌;纤维素酶;工艺条件

中图分类号:S 646.120.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)23-0119-03

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。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、木质素等大分子物质,这些大分子物质被食用菌分泌的胞外酶将其分解成小分子物质而被利用。说明食用菌含有丰富的纤维素酶系。目前对食用菌的研究多集中于糖方面,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,同一菌种不同生长时期产胞外酶水平也不同。现利用刚果红杯碟快速筛法对几种食用菌产纤维素酶进行对比研究,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最佳工艺条件进行了优化,旨在为食用菌产纤维素酶的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

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,均由佳木斯大学生命科学学院发酵实验室提供。

改良 PDA 培养基:麸皮 5 g(煮汁),马铃薯 20 g(煮汁),琼脂 2 g,可溶性纤维 0.2 g,定容 100 mL,装于三角瓶中。0.1 MPa 灭菌 20 min,取出趁热倒平板,冷却后备用。液体发酵培养基(g/L):豆渣(含水 85%)60 g,蛋白胨 2 g,磷酸二氢钾 0.5 g,硫酸镁 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g,吐温-80 1.5 mL,用醋酸调 pH 5.4,分装于 250 mL 三角瓶装,每瓶装液量 80 mL,加玻璃珠 4~5 粒,0.1 MPa 灭菌 20 min。

缓冲液配制:A液(0.1 mol/L 柠檬酸钠):称取柠檬

酸 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 21.014 g,加水溶解,定容 1 000 mL。B液(0.1 mol/L 柠檬酸钠溶液):称取柠檬酸钠 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 29.412 g,加水溶解,定容 1 000 mL。取 A 液 57 mL,B 液 43 mL 混合均匀即为 pH 为 4.4 的柠檬酸缓冲液。

1.2 试验方法

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 6~7 d,待菌丝长满平板,备用。

1.2.2 液体培养 用打孔器(直径约 5 mm)在平板培养基上取厚约 2 mm 圆形带菌丝的培养基 3 块,接入液体发酵培养基中,于 110 r/min 旋转式摇床,26℃ 培养,测其酶活力。

1.2.3 粗酶液的制备 用 100 目筛过滤发酵液,滤液经 4 000 r/min 离心 20 min,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 7 mm)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 1 g/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 2~4 h,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 1 h,再用 1 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,每次洗脱时间为 5 min,洗脱 2 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^[1]。

1.2.5 CMC 酶活测定方法 CMC-Na 溶液配制:称取 0.5 g CMC-Na 溶于 pH 为 4.4 的柠檬酸缓冲液中,浸润 2 h,摇均至完全溶解,备用。取 25 mL 具塞比色管,依次加入 2.0 mL pH 为 4.4 的柠檬酸缓冲液,1.0 mL CMC-Na 溶液,1.0 mL 粗酶液,震荡 3~5 s,于 45℃ 水浴反应 30 min 取出中止反应,加 2.0 mL DNS,然后在沸水浴中煮沸 10 min,冷却至室温,用蒸馏水定容至 25 mL。

第一作者简介:丁玉萍(1964-),女,本科,高级工程师,现主要从事生物技术与微生物发酵研究工作。

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

收稿日期:2012-07-23

测定 OD_{540} 值。另取 25 mL 具塞比色管做空白试验,依次加入 2.0 mL pH 为 4.4 的柠檬酸缓冲液,1.0 mL CMC-Na 溶液,1.0 mL 粗酶液,2.0 mL DNS,摇匀,立即在沸水浴中煮沸 10 min,以下操作同试样管。酶活单位定义:1 mL 液体酶,在一定温度、pH 条件下,30 min 水解底物产生相当于 $1 \mu\text{mol}$ 还原糖的酶量为 1 个酶活力单位,以 U/mL 表示。单因素试验:按 1.2.2 操作接种磷盖红菇 18 瓶,于 110 r/min 旋转式摇床 26℃ 培养,间隔 24 h 取出 3 瓶(平行试验),测 CMC 纤维素酶活(CMCase),研究培养时间对磷盖红菇产胞外 CMCase 的影响。按 1.2.2 操作接种磷盖红菇 15 瓶,分成 5 组,分别于 24、26、28、30、32℃ 摇床培养,培养 72 h 取出测 CMCase,取其平均值,研究发酵温度对磷盖红菇产胞外 CMCase 的影响。配置液体发酵培养基 5 份,用 1:1 醋酸分别调节 pH 至 4.6、5.0、5.4、5.8、6.2,分装、灭菌、冷却、接种操作同上,于 26℃、110 r/min 摇床培养 72 h,测其酶活力,各做 3 组平行试验取其平均值,研究发酵初始 pH 对磷盖红菇产胞外 CMCase 的影响。按 1.2.2 操作接种磷盖红菇 15 瓶,分成 5 组,每组 3 瓶(平行试验),分别于 95、100、105、110、115 r/min 旋转式摇床,26℃ 培养 72 h 取出测 CMCase 酶活力,研究摇床转速对磷盖红菇产胞外 CMCase 的影响。正交实验:在单因素试验基础上,应用正交实验法对磷盖红菇产纤维素酶工艺条件的 4 种因素(培养时间、温度、摇床转数和初始 pH)在 3 个水平上进行正交实验,每组试验 3 次重复。选择正交实验表 $L_9(3^4)$ 进行深层培养基的优化。

2 结果与分析

2.1 刚果红杯碟快速筛选高产纤维素酶食用菌

将 6 种食用菌菌株分别于液体发酵培养基中培养,分别在培养 24、48、72、96 h 取发酵粗酶液进行刚果红快速平板法筛选,透明圈较明显的是培养 96 h 的发酵液(图 1)。图中 7 号样为阴性对照的原培养基未出现透明圈,中央孔为阳性对照的 1 g/L 高活性纤维素酶酶液出现较大透明圈,其余 6 孔依次为大白菇、金针菇、香菇、竹荪、磷盖菇、杏鲍菇 6 种菌的发酵粗酶液。6 种菌只有 5 号磷盖菇和 3 号香菇出现透明圈。5 号磷盖菇透明圈最大,并且培养 24、48、72、96 h 的发酵液均出现透明圈,3 号香菇透明圈较小,并且初次出现透明圈是培养 96 h 的发酵液,其余 4 种菌的发酵液没有出现明显透明圈,未显现酶活或酶活力较弱。

2.2 磷盖红菇产纤维素酶工艺条件的优化

2.2.1 发酵时间对磷盖红菇产胞外 CMCase 的影响

由图 2 可知,磷盖红菇产胞外 CMCase 规律是培养 48~96 h 酶活力较高,之后随培养时间的延长,酶活力逐渐下降,所以,磷盖红菇产胞外 CMC 纤维素酶的最佳时间在 72 h 左右。

2.2.2 发酵温度对磷盖红菇产胞外 CMCase 的影响

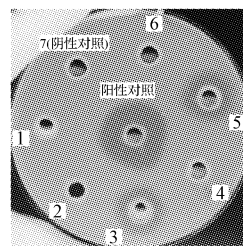


图 1 刚果红杯碟快速筛选高产纤维素酶食用菌

Fig. 1 Cellulose-degrading edible strains screened by congo red saucer rapid screening method

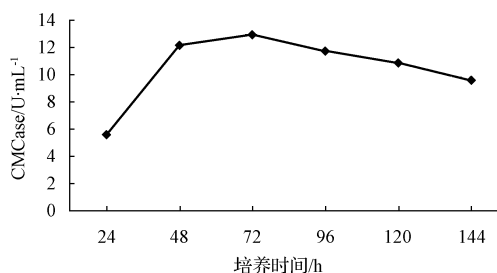


图 2 培养时间对磷盖红菇产胞外 CMCase 的影响

Fig. 2 Effects of the fermentation time on *Russula lepida* to produce extracellular CMCase

由图 3 可知,发酵温度在 24~28℃ 范围内,酶活力较高,温度高于 28℃,产酶受影响,所以,磷盖红菇产胞外 CMC 纤维素酶的最佳温度在 26℃ 左右。

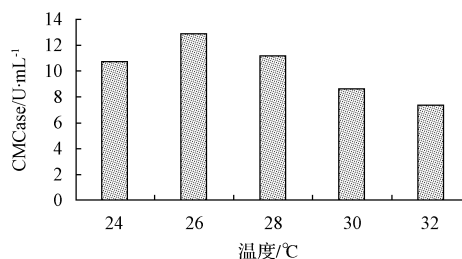


图 3 发酵温度对磷盖红菇产胞外 CMCase 的影响

Fig. 3 Effects of the fermentation temperature on *Russula lepida* to produce extracellular CMCase

2.2.3 初始 pH 对磷盖红菇产胞外 CMCase 的影响

由图 4 可知,初始 pH 在 4.6~5.4 范围内,纤维素酶活

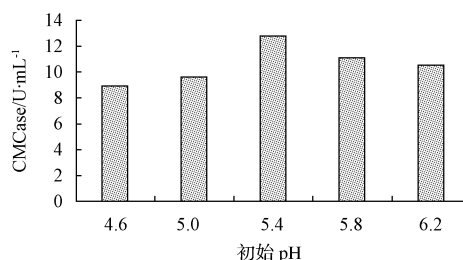


图 4 初始 pH 对磷盖红菇产胞外 CMCase 的影响

Fig. 4 Effects of the fermentation initial pH on *Russula lepida* to produce extracellular CMCase

力随着 pH 的增大而显著增加;当 pH 为 5.4 时,酶活力达到最大;pH 在 5.4~6.2 范围内,酶活力下降,所以磷盖红菇产胞外 CMC 纤维素酶的最佳 pH 为 5.4。

2.2.4 摇床转速对磷盖红菇产胞外 CMCase 的影响

由图 5 可知,摇床转速在 95~105 r/min 范围内,酶活力随着转速的增大而显著增加;当摇床转速为 105 r/min 时,酶活力达到最大值;摇床转速在 105~115 r/min 范围内,酶活力随着转速的增大而下降,所以磷盖红菇产胞外 CMC 纤维素酶的最佳摇床转速为 105 r/min。

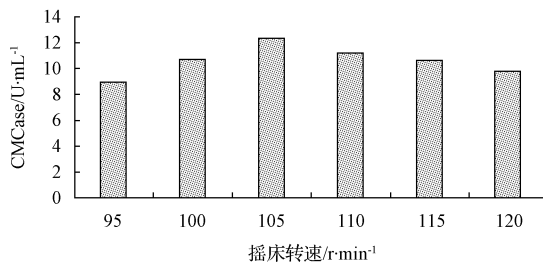


图 5 摇床转速对磷盖红菇产胞外 CMCase 的影响

Fig. 5 Effects of the fermentation initial pH on *Russula lepida* to produce extracellular CMCase

2.2.5 正交实验 由表 1 可知,极差 $R_B > R_D > R_C > R_A$

表 1 正交实验因素水平及结果

试验编号	A	B	C	D	CMCase(3 次平均值)
No.	转速/r·min ⁻¹	pH	时间/h	温度/℃	/U·mL ⁻¹
1	1(100)	1(5.2)	3(96)	2(26)	11.57
2	2(105)	1(5.2)	1(48)	1(24)	11.75
3	3(110)	1(5.2)	2(72)	3(28)	11.68
4	1(100)	2(5.4)	2(72)	1(24)	12.17
5	2(105)	2(5.4)	3(96)	3(28)	12.28
6	3(110)	2(5.4)	1(48)	2(26)	12.45
7	1(100)	3(5.6)	1(48)	3(28)	12.06
8	2(105)	3(5.6)	2(72)	2(26)	12.48
9	3(110)	3(5.6)	3(96)	1(24)	11.63
K_1	35.80	35.00	36.26	35.55	
K_2	36.51	36.90	36.33	36.50	
K_3	35.76	36.17	35.48	36.02	
R	0.75	1.90	0.85	0.95	

Comparison of Extracellular Cellulase of Several Edible Fungus and Optimization of Fermentation Condition

DING Yu-ping, HAN Cheng-wu, ZHAO Yong-xun, SHEN Jian, JING Gui-yun, DONG Liang-jie
(College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: The ability of six kinds of edible mushroom, *Russula delica* Fr, *Flammulina velutipe*, *Lentinus javanicus*, *Bamboo-sun*, *Russula lepida* and Abalone mushroom to produce cellulase were compared by using the Congo red saucer rapid screening method. Meanwhile, the optimal fermentation conditions were optimized. The results showed that the *Russula lepida* appeared the most transparent rings for 20 mm in diameter. Among four kinds of carbon sources, CMC-Na, bean dregs straw powder, glucose, the bean dregs an promote the *Russula lepida* to produce cellulase. The optimal fermentation conditions for the *Russula lepida* to produce cellulase was shaking speed 105 r/min, initial pH 5.4, time 72 h, temperature 26℃.

Key words: edible fungus; cellulase; fermentation conditions

R_A ,说明 B (pH)对磷盖红菇产胞外纤维素酶活的影响最大,是主要影响因素,其次为 D (温度),C(时间)的影响次之、A(转速)影响最小。由此得出磷盖红菇产胞外纤维素酶的最佳工艺条件为 $A_2B_2C_2D_2$,即摇床转速 105 r/min,培养初始 pH 5.4,培养时间 72 h,培养温度 26℃。

3 结论与讨论

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 2 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。通过单因素试验和正交实验优化磷盖红菇产胞外 CMC 纤维素酶的最佳工艺条件为摇床转速 105 r/min,培养初始 pH 5.4,培养时间 72 h,培养温度 26℃。采用刚果红杯碟快速筛选法对高产纤维素酶食用菌菌株筛选。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] 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.
- [2] 李亮亮,牛森. 纤维素酶活力测定方法的比较研究[J]. 辽宁农业科学,2001(4):16-18.
- [3] 沈建,孙凌燕,奚菊红,等. 纤维素水解液对鸡腿菇纤维素酶诱导特征[J]. 上海师范大学学报(自然科学版),2007,36(6):63-67.
- [4] 潘美英,赵红卫,黄瑾,等. 一株纤维素分解菌利用枳实废渣产酶条件的研究[J]. 四川环境,2005,24(6):10-13.
- [5] 董朝蓬,杜林方,段真. 植物凝集素研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2003,15(1):71-76.
- [6] 施巧琴,陈松生,林琳,等. 重金属在食用菌中的富集及对其生长代谢的影响[J]. 真菌学报,1991,10(4):301-311.
- [7] 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.
- [8] 杨洁,阿力木,李福成,等. 饲用纤维素酶活力测定方法的改进[J]. 新疆大学学报(自然科学版),2005,22(3):322-324.
- [9] 孙凌燕,曾雅梅,程雷,等. 水解纤维素对杏鲍菇产纤维素酶的促进作用研究[J]. 食品与机械,2007,23(6):14-16.