

高酶活纤维素分解菌分离筛选的研究

岳思君, 李学斌, 李爱华, 蒙秋燕

(1. 宁夏大学生命科学学院, 宁夏银川 750021; 2. 宁夏大学西部生态与生物资源开发联合研究中心, 宁夏银川 750021)

摘要 [目的] 筛选有良好分解效果的纤维素分解菌。[方法] 以含菌秸秆、腐叶和玉米地土壤为材料, 经富集培养后, 根据水解圈直径进行纤维素分解菌初筛分离培养和复筛培养, 制取粗酶液, 测定CMC酶活力和滤纸酶活。[结果] 从各地采集的样品中共分离到6个菌株, 各菌株均能在羧甲基纤维素钠培养基上较好生长, 其中菌株H1、H2、H6生长最快, 而其余菌株则生长缓慢, 菌株H2的CMC酶活和滤纸酶活分别为0.211 4和0.295 0 IU/ml, 菌株H6的CMC酶活和滤纸酶活分别为0.201 6和0.280 2 IU/ml, 高于其他4种菌株; 菌株H4的产纤维素酶能力最低, CMC酶活和滤纸酶活分别为0.181 9和0.206 5 IU/ml。[结论] H2、H6菌株分解纤维素的能力最强。

关键词 纤维素分解菌; CMC酶活; 滤纸酶活; 水解圈

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)01-00011-02

Study on Isolation and Screening for Cellulose-decomposing Bacteria with High Cellulase Activity

YUE Si-jun et al (College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract [Objective] The aim was to screen cellulose-decomposing bacteria with good decomposition effect. [Method] With straw that contained bacterium, rotten leaves and soil in maize field as materials, after the enrichment culture, the bacteria was isolated and cultured according to the diameter of hydrolyzed circle for primary and secondary screening. The crude enzyme liquid was prepared for the determination of CMCase activity and filter paper enzyme activity. [Result] 6 strains were isolated from the examples in different places were isolated and all could grow well on the sodium carboxymethyl-cellulose medium. Among them, the strains H1, H2, H6 grew most quickly and other strains grew slowly. The CMCase activity and filter paper enzyme activity of H2 was 0.211 4 and 0.295 0 IU/ml resp., that of H6 was 0.201 6 and 0.280 2 IU/ml resp. and they were higher than that of other 4 strains. Producing cellulase ability of strain H4 was the lowest and its CMCase activity and filter paper activity was 0.181 9 and 0.206 5 IU/ml resp. [Conclusion] Strains H2, H6 had the strongest ability to decompose cellulose.

Key words Cellulose-decomposing microorganisms; CMCase activity; Filter paper enzyme activity; Hydrolyzed circle

纤维素是地球上数量最大的可再生资源, 占植物干重的35%~50%^[1], 它是地球上分布最广、含量最丰富的碳水化合物。对人类而言, 它又是自然界中数量最大的可再生性物质^[2]。目前, 对纤维素的降解利用主要采用生物手段, 利用微生物可将纤维材料转化为饲料、化工原料等, 具广阔的应用前景, 而这一应用前景的前提是要首先分离到能够有效分解纤维素的微生物菌种, 但目前得到的纤维素酶无论是来自动物、植物还是微生物的, 都不能满足大规模工业生产的需要。纤维素酶比活力较低、生产周期长、纤维素酶复合物的分子量十分庞大、单个酶组分没有水解纤维素的能力及菌株的纤维素酶活力仍然较低等原因一直是阻碍纤维素酶大规模生产应用的瓶颈问题^[3]。为此, 笔者利用纤维素刚果红鉴别培养基从不同分离源分离筛选出对纤维素具有良好分解效果的纤维素分解菌, 并对其酶活力进行了测定, 筛选出2株纤维素酶活较高的野生优良菌株。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品来源。含菌秸秆、腐叶和玉米地土壤等材料取自宁夏银川郊区。

1.1.2 培养基。

1.1.2.1 初筛分离平板培养基^[4-5]。CMC Na 10 g, MgSO₄ 0.25 g, K₂HPO₄ 0.5 g, NaCl 0.25 g, 琼脂11 g, 蒸馏水500 ml, 自然pH, 压力1.05 kg/cm², 灭菌20 min(用于菌培养后添加刚果红染色)。CMC Na 10 g, MgSO₄ 0.25 g, K₂HPO₄ 0.5 g, NaCl 0.25 g, 琼脂11 g, 蒸馏水500 ml, 刚果红0.2 g, 自然pH, 压力

1.05 kg/cm², 灭菌20 min。

1.1.2.2 复筛平板培养基^[6]。CMC Na 10 g, Na₂HPO₄ 1.25 g, KH₂PO₄ 1.25 g, 蛋白胨1.25 g, 酵母膏0.25 g, 蒸馏水500 ml, 自然pH, 压力1.05 kg/cm², 灭菌20 min。

1.1.2.3 扩大培养基。马铃薯100 g, 蔗糖10 g, 琼脂8.5 g, 蒸馏水500 ml, 自然pH, 压力1.05 kg/cm², 灭菌20 min。

1.1.2.4 产酶发酵培养基。麸皮80 g, 秸秆120 g, KH₂PO₄ 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 0.4 g, MgSO₄ 0.07 g, CaCl₂ 0.07 g, FeSO₄ 0.005 g, ZnCl₂ 0.001 g, 蛋白胨0.2 g, 尿素0.07 g, CMC Na 0.1 g, 蒸馏水250 ml, 搅拌均匀后装入圆口瓶, 每瓶20 g, 封口膜封口, 压力1.05 kg/cm², 灭菌20 min。

1.2 方 法

1.2.1 样品的富集培养。将样品各称10 g, 加入装有100 ml 灭菌生理盐水的烧杯中, 在磁力搅拌器上搅拌30 min, 静置, 取上清液10 ml, 在上清液中各加1 g 蔗糖^[7]。用封口膜包扎后110 r/min, 28℃摇床培养2 d。

1.2.2 初筛分离培养。将富集后的样品稀释到10⁻²、10⁻³后, 分别涂布到初筛分离平板培养基上, 每个样品接3个平板, 28℃培养5 d。没有加刚果红的培养5 d后用4 g/L的刚果红染色5 min, 再用0.9% NaCl 冲洗, 测水解圈直径, 并计算酶的相对比活力: A=水解圈直径/天数。

1.2.3 复筛培养。将初筛分离出的水解圈比较大的菌株点种到复筛平板培养基上, 每个平板点3个点, 28℃培养5 d。用4 g/L的刚果红染色5 min, 再用0.9% NaCl 冲洗, 测量水解圈的直径。将水解圈大的菌株蛇形划线到PDA斜面培养基上进行扩大培养。

1.2.4 粗酶液的制取。在每个斜面上加10 ml 无菌水, 制成孢子悬液, 吸取1 ml 加入到发酵培养基中, 28℃发酵, 5 d后停止发酵。各加入50 ml 蒸馏水搅拌后用4层纱布过滤,

基金项目 国家“863”计划项目(2005AA001330); 国家农业科技成果转化资金项目(2006GB2G300314); 宁夏大学自然科学基金重点项目(2004-029)。

作者简介 岳思君(1972-), 男, 宁夏吴忠人, 讲师, 从事微生物学、发酵工程方面的研究。

收稿日期 2008-10-16

4 000 r/min 离心15 min, 上清液即为粗酶液。

1.3 酶活力测定

1.3.1 CMC 酶活力测定^[8]。移取酶液0.5 ml 于试管中, 加入含0.5% CMC-Na 的柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 4.4) 1.5 ml, 然后在50℃水浴锅准确作用30 min 后, 立即按DNS 法测定糖。以国际单位为依据, 定义每分钟催化纤维素水解生成1 μmol 葡萄糖的酶量为1 个酶活力单位IU。

1.3.2 滤纸酶活的测定^[9]。将定性滤纸(中华一号1 cm×6 cm) 卷成小卷, 放进试管内, 加入3 ml 醋酸缓冲液, 再加入1 ml 粗酶液, 轻轻摇匀, 使滤纸完全浸泡在液体中, 50℃保温1 h 后按DNS 法测定还原糖, 以国际单位为依据, 定义每分钟催化纤维素水解生成1 μmol 葡萄糖的酶量为1 个酶活力单位IU。

2 结果与分析

2.1 纤维素刚果红鉴别培养基的分离结果 从各地采集的样品中共分离到6 个菌株, 分别编号为H1、H2、...、H6。其水解圈大小如表1 所示。

表1 不同菌株在CMC 平板上的水解圈大小

Table 1 Different sizes of the hydrolysis zones of different bacterial strains on the CMC plate

菌株 Strain	先加刚果红 Congo red in cellulose identification culture medium		后用刚果红染色 Congo red coloration later	
	直径 cm Diameter	A 值 A value	直径 cm Diameter	A 值 A value
H1	2.10	0.42	2.40	0.48
H2	2.30	0.46	2.80	0.56
H3	0.60	0.12	1.65	0.33
H4	0.65	0.13	1.85	0.37
H5	1.35	0.27	1.98	0.39
H6	1.68	0.34	2.57	0.51

注: 天数均为5 d。

Nte: The number of days are all 5 d.

由于CMC 属于大分子多糖衍生物, 纤维素分解菌能分泌纤维素酶而将CMC 平板培养基中的纤维素降解成小分子的低聚糖及纤维二糖、葡萄糖等。刚果红能将CMC 染成红色, 但对CMC 降解后产生的小分子低聚糖类物质无染色作用, 因此在产生CMC 酶的菌落周围会形成清晰的水解圈^[10]。刚果红纤维素平板培养是较好的分离筛选培养基, 其水解圈直径/ 天数比值大致反映酶活力高低。由表1 可见, 各菌株均能在羧甲基纤维素钠培养基上较好生长, 其中菌株H1、H2、H6 生长最快, 其余菌株则生长缓慢, 可见菌株H1、H2、H6 分解纤维素类物质的能力较强。

2.2 刚果红染色比较 试验中发现将分离菌株培养之后用刚果红染色分离效果比在培养前直接将刚果红加入到培养基中水解圈更为清晰, 效果更好。而且染色后用0.9% 氯化钠进行冲洗后水解圈比不用0.9% 氯化钠冲洗水解圈明显, 30 min 后会形成一圈一圈不同的颜色, 最后形成水解圈。原因可能是纤维素分解菌在分解纤维素过程中所形成的代谢产物会引起pH 变化。而刚果红染色剂变色主要与pH 值大小有关, 变色pH 值范围为3~6, 颜色逐渐由深蓝色变成浅紫色。

2.3 酶活力测定结果 由表2 可见, 菌株H2 的CMC 酶活为0.211 4, 滤纸酶活为0.295 0; 菌株H6 的CMC 酶活为0.201 6, 滤纸酶活为0.280 2, 酶活高于其他菌株; 菌株H4 的CMC 酶活为0.181 9, 滤纸酶活为0.206 5, 产纤维素酶能力最低。

表2 CMC 酶活力、FPA 酶活力测定结果

Table 2 Detection results of CMC enzyme activity and FPA enzyme activity

菌株Strains	IU ml		菌株Strains	IU ml	
	CMC	FPA		CMC	FPA
H1	0.196 7	0.226 2	H4	0.181 9	0.206 5
H2	0.211 4	0.295 0	H5	0.186 8	0.221 3
H3	0.172 1	0.236 0	H6	0.201 6	0.280 2

2.4 不同菌株酶活力的比较 由表1、2 可见, H2、H6 菌株的水解圈、CMC 酶活和FPA 酶活最高, 分解纤维素的能力最强, 确定为较优良的出发菌株, 可以进一步通过诱变提高其纤维素酶活力。6 个菌株中水解圈大的CMC 酶活力相对也比较高。由此, 可以用刚果红培养基分离鉴别纤维素分解菌, 水解圈的大小直接反映CMC 酶活的大小, 而FPA 酶活则与刚果红纤维素平板水解圈大小、CMC 酶活不成线性关系。

3 讨论

(1) 纤维素分解菌较早的分离方法是: 将滤纸片浸入含碳很少的液体培养基中, 再加入待测微生物样品。如果滤纸片被切断, 则说明所检测的样品中有可以产生纤维素酶的微生物存在。而现在分离方法很多, 效果也更加明显, 其中平板降解圈直接分离法具有快速、简捷、准确、可靠的特点。目前比较公认的分离方法是刚果红法。纤维素刚果红培养基用于识别产纤维素酶菌株和初步判定酶活性高低: 产酶愈多, 水解圈愈大, 产酶越快, 水解圈出现越早。叶姜瑜、陈敏通过试验改进了该培养基的成分使其更有利于菌落的生长^[5,11]。水解圈的大小与CMC 酶活、滤纸酶活、天然纤维素酶活的关系尚需进一步研究, 它们综合反映出菌株产纤维素复合酶的特性, 可为该菌株的具体应用领域提供理论依据。

(2) 目前纤维素酶的生产仍然存在酶催化活力低、生产周期长等问题, 选育高产优良菌种是提高纤维素酶活力的关键。产纤维素酶的生物种群相当广泛, 如细菌、真菌、放线菌及昆虫等, 而且同一微生物也可能因为不同的地区来源、不同的培养条件而使得纤维素酶的成分有很大差别。因此, 各国学者目前仍然在进一步选育优良性能的菌株, 特别是一些极端环境下(如高温、广适pH) 的高活性纤维素分解菌。一般而言从自然界直接选育得到的原始菌株的酶活性不高, 酶组分不全, 通常需要遗传改造。对分解纤维素的微生物的进一步选育研究仍将是今后纤维素酶高产菌和纤维素酶的发展趋势。

参考文献

- [1] LYNDL R, PAUL J W, VAN ZYL W H, et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577.
- [2] LYNDL R, WYMAN C E, GERNGROSS T U. Biocommodity engineering[J]. Biotechnol Prog, 1999, 15: 777-793.
- [3] 谷嵩, 刘昱辉. 纤维素酶的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(25): 7736-7737, 7747.

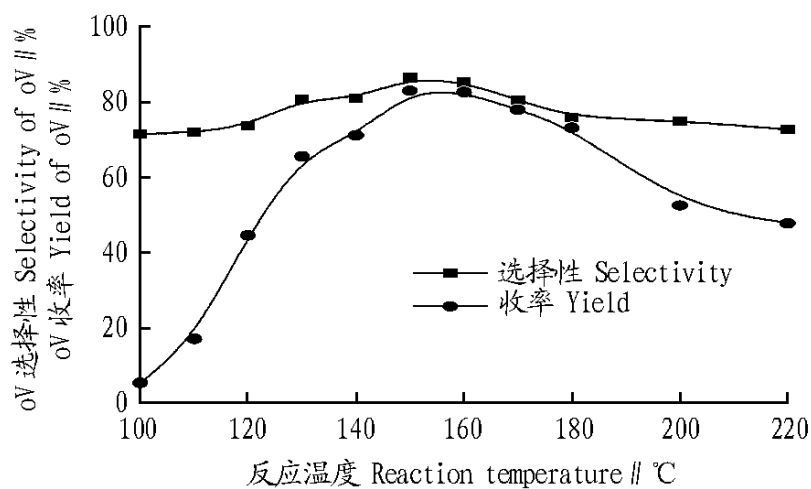


图5 反应温度对oV收率和选择性的影响

Fig. 5 Effect of reaction temperature on yield and selectivity of oV

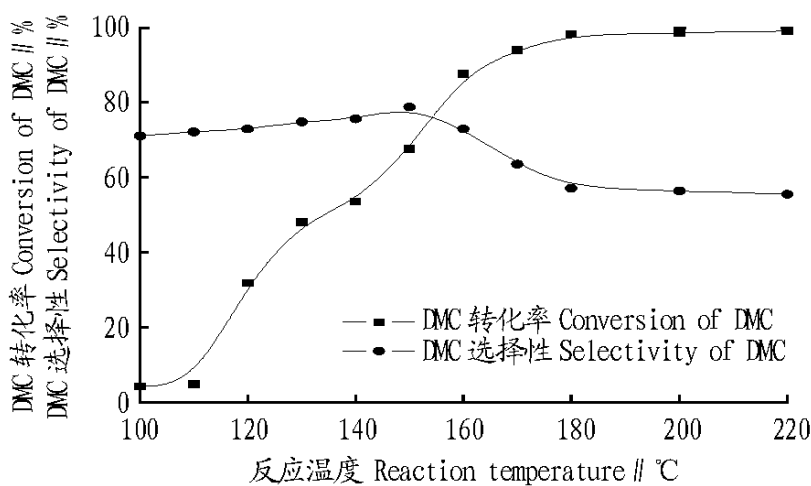


图6 反应温度对DMC转化率的影响

Fig. 6 Effect of reaction temperature on conversion and selectivity of DMC

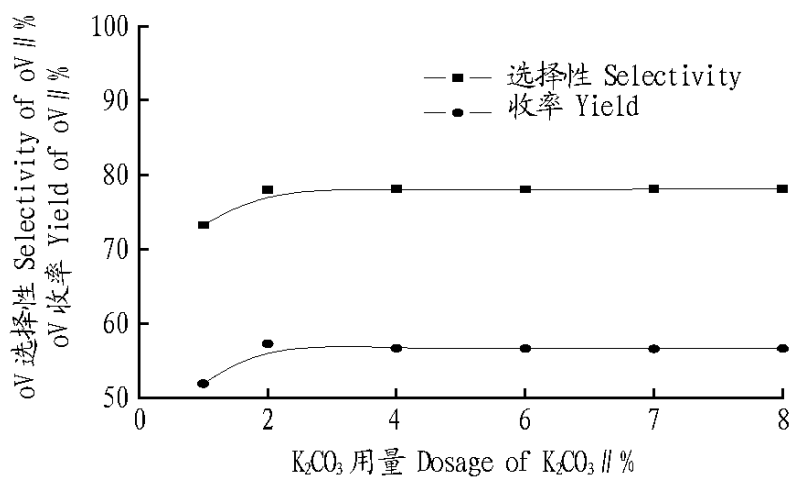


图7 催化剂用量对oV收率和选择性的影响

Fig. 7 Effect of K₂CO₃ dosage on yield and selectivity of oV

2.6 重复试验 由表2 数据看出,最佳工艺条件下目的产物oV的平均收率为88.1%,表明所得试验结果重现性较好。

表2 重复试验结果

试验	oV 选择性	oV 收率
Experimental times	Selectivity of oV	Yield of oV
1	94.3	88.1
2	94.4	88.1
3	94.5	88.0
4	94.5	88.1
平均 Mean	94.4	88.1

3 结论

(1) 采用DMC代替DMS作为甲基化试剂,以邻位香兰素为原料,在无水碳酸钾的作用下,能够合成邻藜芦醛(oV),反应条件温和,过程容易控制,所得目标产物通过GC检测后定量计算,收率较高。

(2) 制备oV的最佳工艺条件为:邻位香兰素和DMC的摩尔比为1.0:1.3,反应时间11 h,反应温度为150℃,催化剂K₂CO₃用量相对于邻位香兰素摩尔比是0.02。

参考文献

- [1] ROISANGA P, GRITSANAPAN W, SUNTORNSUK L. Determination of berberine content in the stem extracts of *Cosciniumferestratum* by TLC densitometry [J]. *The Pharmacologic Principles of Medical Practice*, 2006, 15(5): 373-378.
- [2] FUKUDA K, HIBYA Y, MUTOH M, et al. Inhibition of activator protein 1 activity by berberine in human hepatoma cells [J]. *Harta Medica*, 1999, 65(4): 381-383.
- [3] BAL R, CHAUDHARI K, SVASANKER S. Vapor phase O methylation of 2 naphthol over the solid bases alkali-loaded silica and Cs-loaded MCM41 [J]. *Catalysis Letters*, 2000, 70(1/2): 75-78.
- [4] BALASUBRAMANIAN V V, PANDURANGAN A, PALANCHAMY M, et al. Methylation of phenol over ion exchanged beta zeolites [J]. *Indian Journal of Chemical Technology*, 2000, 7(4): 149-154.
- [5] 薛建荣, 钟宏, 符剑刚. 碳酸二甲酯的用途及合成研究进展 [J]. *化工技术与开发*, 2006, 35(3): 8-13.
- [6] TUNDO P, SELVA M. The chemistry of dimethyl carbonate [J]. *Accounts of chemical Research*, 2002, 35(9): 706-716.
- [7] MEMOI S, SELVA M, TUNDO P. Dimethyl carbonate for eco-friendly methylation reactions [J]. *Chemosphere*, 2001, 43(1): 115-121.
- [8] BAUISTA F M, CAMPELO J M, GARCIA A, et al. Alkylation of phenol with dimethyl carbonate over APO4, A2O3 and APO4-A2O3 catalysts [J]. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, 1998, 63(2): 261-269.
- [9] SAMEDI O, SOPHET, ELISABETH B, et al. Dimethyl carbonate and phenols to alkyl aryl ethers via clean synthesis [J]. *Green Chemistry*, 2002, 4: 431-435.
- [9] 郝月, 杨翔华, 洪新. 秸秆纤维素分解菌的分离筛选实验 [J]. *中国饲料*, 2005(11): 15-17.
- [10] 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): 47-51.
- [11] 陈敏. 一种改进的纤维素分解菌鉴别培养基 [J]. *杭州师范学院学报: 自然科学版*, 2001, 18(6): 11-12.
- [12] 顿宝庆, 吴薇, 王旭静, 等. 一株高纤维素酶活力纤维素分解菌的分离与鉴定 [J]. *中国农业科技导报*, 2008, 10(1): 113-117.
- [13] PENG Y, HUANG Y C, CAI Y M, et al. Screening for *Streptomyces hygrosopicus* strains with high production of agricultural antibiotics by streptomycin resistance [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(1): 146-149.

(上接第12页)

- [4] 张宇昊, 王颀, 张伟, 等. 一种改良得纤维素分解菌鉴别培养基 [J]. *纤维素科学与技术*, 2004(12): 33-35.
- [5] 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基 [J]. *微生物学通报*, 1997, 24(4): 251-252.
- [6] 严文岱, 周东凯, 杨翔华. 玉米秸秆纤维素分解菌的选育研究 [J]. *生物学杂志*, 2005, 22(6): 29-31.
- [7] 管斌, 孙艳玲, 谢来苏, 等. 纤维素高产菌株的选育 [J]. *中国酿造*, 2002, 120(4): 18-20.
- [8] 李日强, 辛小芸. 天然秸秆纤维素分解菌的分离选育 [J]. *上海环境科学*, 2002, 21(1): 8-11.