

纤维素分解菌协同作用研究

岳思君^{1,2}, 郑蕊¹, 李爱华^{1,2}, 李梦菊¹

(1. 宁夏大学生命科学学院, 宁夏银川 750021; 2. 宁夏饲料工程技术研究中心, 宁夏银川 750021)

摘要 [目的]研究纤维素分解菌木霉、青霉、黑曲霉3种菌株之间的协同作用。[方法]将木霉、青霉、黑曲霉进行纯种发酵, 添加纯种发酵粗酶液后测定 CMC 酶相对酶活力, 采用混菌发酵观察滤纸分解度, 测定 CMC 酶活力。[结果]混菌发酵的纤维素酶活力明显高于纯种发酵的酶活力。[结论]青霉、木霉、黑曲霉3种菌株之间存在两两协同关系。

关键词 纤维素分解菌; 协同作用; 混菌发酵; 酶活力

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)27-12892-02

Study on the Synergetic Effect of Cellulose Decomposing Microorganisms

YUE Si-jun et al (School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract [Objective] The aim was to study the synergetic effect of cellulose decomposition microorganisms. [Method] Three species of fungi strains were cultivated respectively and produced their crude enzyme liquid. CMCase relative activity was determined by adding crude enzyme liquid. The CMCase activity and filter paper breakdown were determined through the mixed fermentation. [Result] The CMCase activity of the mixed fermentation is higher than that of the pure strain fermentation. [Conclusion] There were synergistic interactions between *Trichoderma koningii* and *Penicillium* spp., between *Trichoderma koningii* and *Aspergillus niger*, between *Penicillium* spp. and *Aspergillus niger*.

Key words Cellulose decomposition microorganisms; Synergetic effect; Mixed bacteria fermentation; Enzyme activity

在纤维素酶水解纤维素、产葡萄糖的过程中, 葡萄糖和纤维二糖对纤维素酶有强烈的反馈抑制作用, 这就影响了纤维素的水解速度和程度。如果将能分解纤维素的菌与能利用葡萄糖和纤维二糖的菌混合发酵, 在发酵过程中, 由于葡萄糖和纤维二糖被另一种菌吸收利用, 就能大大减弱酶的反馈抑制。国内外学者都在致力于研究能加速纤维素降解的高效微生物, 史玉英发现芽孢杆菌单独在滤纸上不能扩散生长, 分解滤纸能力较弱; 如果同时接种木霉, 由于细菌能随着真菌的生长而扩散, 滤纸分解速度加快^[1]。也有人发现纤维素分解菌(产黄纤维单胞菌)与其伴生菌(腐臭假单胞菌)之间具有协同作用^[2]。世界上所选育出来的优良纤维素分解菌几乎都是木霉属菌株, 而木霉菌普遍缺乏一种限制因子—— β -葡萄糖苷酶^[3]。它可以使纤维二糖积聚, 从而反馈抑制酶活, 降低酶解效率, 影响纤维素水解为葡萄糖。因此, 在进行纤维素大分子降解的研究过程中要考虑到微生物之间的协同效应。

笔者以微生物之间的协同效应为立足点, 一方面以天然玉米秸秆纤维素粉为碳源培养青霉、木霉、黑曲霉并获得各菌的粗酶液, 通过添加每种菌的粗酶液来影响供试菌株; 另一方面采用双菌混合培养, 测得其纤维素酶活, 探讨3种菌的协同关系, 以期为高效降解纤维素的混菌发酵提供理论依据。

1 材料与方

1.1 菌种 黑曲霉(*Aspergillus niger* Van Teghem)、青霉(*Penicillium* spp.)、康宁木霉(*Trichoderma koningii* Oudem)为宁夏大学饲料工程技术研究中心保藏菌种。

1.2 培养基 马铃薯蔗糖琼脂培养基(PDA): 马铃薯 200 g, 蔗糖 20 g, 琼脂 15~20 g, 水 1 000 ml, pH 自然, 压力 1.05

kg/cm², 灭菌 20 min。

CMC-Na 刚果红培养基: (NH₄)₂SO₄ 2 g, MgSO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 1 g, NaCl 0.25 g, CMC-Na 1 g, 琼脂 22 g, 刚果红 0.4 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 自然, 压力 1.05 kg/cm², 灭菌 20 min。

液体培养基: KH₂PO₄ 2.0 g, (NH₄)₂SO₄ 1.4 g, MgSO₄·7H₂O 0.3 g, CaCl₂ 0.3 g, FeSO₄·7H₂O 0.005 g, MnSO₄ 0.001 6 g, ZnCl₂ 0.001 7 g, CoCl₂ 0.002 g, 蛋白胨 0.5 g, 尿素 0.3 g, 碱处理后的玉米秸秆粉 10 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 值 5.5~6.0, 压力 1.05 kg/cm², 灭菌 20 min。

天然玉米秸秆粉的制备和处理^[4]: 将玉米秸秆剪成 2~3 cm 的小段, 烘干后粉碎至 60 目, 加入浓度 2% 的 NaOH 溶液至固液比为 1:4, 在 85 °C 水浴处理 1 h, 水洗至中性, 烘干备用。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化。将黑曲霉、康宁木霉、青霉菌株分别划线接种于马铃薯蔗糖琼脂培养基(PDA)上, 28 °C 斜面活化培养 3 d。

1.3.2 粗酶液的制备。将黑曲霉、木霉、青霉菌株分别接种到装有 50 ml 液体培养基的三角瓶中, 摇床培养(28 °C, 140 r/min)3 d。取培养液 20 ml, 用 4 层纱布过滤, 滤液在 4 000 r/min, 离心 15 min, 取上清液即为粗酶液。

1.3.3 CMC 相对酶活力测定。将 3 种霉菌粗酶液用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后分别注入到平板中, 迅速摇匀使酶液覆盖整个平板, 放置一段时间, 直至表面没有液体流动为止, 接种供试菌株, 28 °C 培养 3 d。分别测量每个平板上菌落培养 3 d 的透明圈直径, 取平均值计算 CMC 酶相对活性 A。

$A = \text{透明圈直径}(\text{cm}) / \text{菌体培养时间}(\text{d})$

1.3.4 CMC 酶活力测定^[5]。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 值 4.4) 1.5 ml, 然后在 50 °C 水浴锅中准确作用 30 min 后, 立即按 DNS 法测定糖含量。以国际单位为依据, 定义每分钟催化纤维素水解生成 1 μ mol 葡萄糖的酶量为一个酶活力单位 IU。

1.3.5 滤纸分解度观察。滤纸的处理^[6]: 用浓度 1% 醋酸浸

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 2009-06-08

泡 24 h,用碘液检查确定无淀粉后,再用浓度 2% 苏打水冲洗至中性,晾干,将处理后的滤纸剪成 1 cm × 6 cm 纸条待用。

取 18 cm × 1.5 cm 试管 1 支,加入 8 ml 粗酶液,再加入 pH 值为 4.4 的柠檬酸缓冲液 2 ml,摇匀后加入上述滤纸一条和几滴二甲苯,置于 50 °C 水浴中静置 24 h 后稍加振动,观察其酶活力的分解强度:“+”,滤纸内部有少量膨胀小泡;“++”,滤纸边缘及内部有膨胀小泡;“+++”,滤纸整齐膨胀并小幅度下弯;“++++”,滤纸整齐膨胀,较大幅度下弯;“+++++”,滤纸不定形。

2 结果与分析

2.1 CMC 相对酶活力测定结果

纤维素是由葡萄糖戊基以 β-1,4 糖苷键连接而成的线状大分子物质,纤维素水解酶能将其糖苷键水解使其变成纤维二糖和葡萄糖。水解后的糖类同刚果红染料可形成红色沉淀,颜色浓郁,所以此水解圈在菌落生长过程中便逐渐清晰可见。而且,水解圈的大小基本上可以反映菌株的相对酶活力,即水解圈大的相对酶活力大,水解圈小的相对酶活力小。刚果红纤维素平板培养是较好的分离筛选培养基,其透明圈直径/天数比值大致反映酶活力高低。粗酶液是以天然玉米秸秆纤维素粉为碳源,诱导菌株产生分解纤维素的酶。比较木霉、青霉、黑曲霉纯种发酵和添加纯种发酵粗酶液后纤维素酶活力的变化(表 1)发现,添加粗酶液可以提高 CMC 酶相对酶活力,对单菌生长均有明显的促进作用。在木霉培养基中添加青霉粗酶液,木霉的透明圈直径平均增加了 20.59%,添加黑曲霉粗酶液透明圈直径平均增加了 16.17%;在青霉培养基中添加木霉粗酶液,青霉的透明圈直径平均增加了 18.37%,添加黑曲霉粗酶液透明圈直径平均增加了 12.86%;在黑曲霉培养基中添加木霉粗酶液,黑曲霉的透明圈直径平均增加了 18.75%,添加青霉粗酶液透明圈直径平均增加了 22.50%。每种菌的粗酶液含有不同的纤维素酶系,它们可以促进其他 2 种菌降解纤维素,表现出了不同纤维素分解菌酶系之间的协同作用。

表 1 CMC 相对酶活力的测定结果

Table 1 The determination results of CMC case relative activity

菌种	直径/cm	A	菌种	直径/cm	A
Strains	Diameter	Avalue	Strains	Diameter	Avalue
M	2.04	0.68	Q(H)	1.83	0.61
M(Q)	2.46	0.82	H	0.96	0.32
M(H)	2.37	0.79	H(M)	1.14	0.38
Q	1.62	0.54	H(Q)	1.17	0.39
Q(M)	1.89	0.63			

注:M 表示木霉;Q 表示青霉;H 表示黑曲霉;M(Q) 表示接种木霉培养基中加入青霉的培养液,即观察青霉的粗酶液对木霉生长的影响,M(H)、Q(M)、Q(H)、H(M)、H(Q) 同理。

Note: M stands for *Trichoderma* spp.; Q stands for *Penicillium* spp.; M(Q) stands for adding *Penicillium* spp. culture solution to medium inoculated with *Trichoderma* spp. for observing the effects of crude enzyme liquid of *Penicillium* spp. on the growth of *Trichoderma* spp. M(H), Q(M), Q(H), H(M) and H(Q) could be explained as the same.

2.2 CMC 酶活力测定结果

滤纸分解度同时也能反映酶活力的大小,崩解程度越高则酶活力越大;反之,则越小。由表 2 可见,混菌发酵对滤纸的分解力均大于单独培养的菌

株,其中,木霉和青霉混合发酵粗酶液对滤纸的分解能力较强,青霉和黑曲霉、木霉和黑曲霉次之。CMC 酶活力测定结果表明,混菌培养得到的 CMC 酶活力均高于单菌株培养的酶活力。混菌培养中青霉和木霉菌株组合得到的酶活较各自单独培养明显提高,CMC 酶活达到 0.459 9,并且是混菌培养中酶活力最高的,青霉和黑曲霉 CMC 酶活为 0.398 1,木霉和黑曲霉 CMC 酶活为 0.379 6,混菌发酵 CMC 酶活明显高于纯种发酵。滤纸分解度观察、CMC 酶活力测定结果(表 2)和表 1 CMC 相对酶活力的测定结果一致,说明青霉、木霉、黑曲霉 3 菌株之间存在两两协同关系,即促进菌株生长和提高产酶能力。

表 2 滤纸分解度、CMC 酶活力测定结果

Table 2 The determination results of filter paper decomposition and CMC enzyme activity

菌种	滤纸分解度	CMC 酶活力	菌种	滤纸分解度	CMC 酶活力
Strains	Filter paper decomposition	IU/ml CMC enzyme activity	Strains	Filter paper decomposition	IU/ml CMC enzyme activity
H	+	0.040 1	M + Q	++++	0.459 9
M	+	0.268 5	M + H	+++	0.379 6
Q	+	0.231 5	Q + H	+++	0.398 1

3 讨论

纤维素酶是一种诱导酶,在纤维素利用过程中产生明显的产物(纤维二糖和葡萄糖),阻遏纤维素酶的活性结构与底物的结合,直接影响纤维素酶系对纤维素材料的协同作用效率,使农作物秸秆这一重要的自然资源的利用受到了限制。所以,在构建生物酶解天然纤维素的连续反应体系方面,更多的就是要构建多菌种体系的发酵,使糖有效地为微生物所利用,使发酵体系中的糖含量维持在低水平,尽量消除酶系在与底物反应降解过程中所受到的降解物的阻遏作用,使纤维素酶系以最大的速度对底物进行水解。在真菌发酵生产纤维素酶的研究过程中发现,虽然木霉是公认的最好的纤维素酶生产菌,但仍存在两方面不足,一是木霉的毒性嫌疑大,二是木霉产生的 β-葡萄糖苷酶活性普遍偏低。许多曲霉属菌株如黑曲霉(*Aspergillus niger*)、海枣曲霉(*A. phoenicis*)等都能产生高活力的 β-葡萄糖苷酶。而且,曲霉是公认的产纤维素酶活较强的安全菌株。张海等^[8]、陈璘娜等^[9]对木霉和曲霉混合培养,不仅使 β-葡萄糖苷酶活力比单纯培养木霉提高 3.2 倍,而且内切纤维素酶和纤维二糖水解酶活性也同时增加 24% 和 5%。木质纤维素降解酶的研究与应用主要集中于产酶量大、酶系组成比较齐全の木霉和白腐菌等菌株。不同来源的木质纤维素降解酶的酶系组成往往也不同,青霉属(*Penicillium*)真菌不仅能分泌比较全的降解天然木质纤维材料的聚糖酶系,而且较木霉纤维素酶能产较多 β-葡萄糖苷酶。而与白腐菌相比,青霉菌又具有易培养和生长快的优势^[10-11]。试验选择青霉、木霉、黑曲霉这 3 种产纤维素酶的真菌为试验菌株,通过粗酶液测试和混菌培养证实 3 菌株之间存在两两协同关系。

虽然微生物混菌培养在很多领域中的作用已经得到充分肯定,部分成果已成功应用于实践,但对大多数混合菌体

(下转第 12911 页)



图1 鲤鱼嗜水气单胞菌菌体(12 000 ×)

Fig.1 *Aeromonas hydrophila* of carp (12 000 ×)

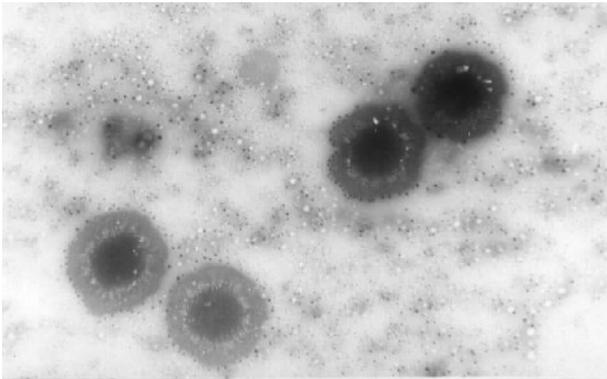


图2 电镜下菌体形态假象(8 000 ×)

Fig.2 The conformation illusion of *Aeromonas hydrophila* by electron microscope (8 000 ×)

较简单,但电镜负染色技术的要求和限制条件较多,影响因素较复杂。其影响因素是:①菌悬液的纯度和浓度:制备菌悬液时,需对优势菌株进行纯培养(挑取单菌落接种于液体培养基中进行摇床培养)。该试验得到的菌悬液浓度为 1.0×10^8 cfu/ml,电镜下无杂菌生长,菌体分布均匀,无凝聚现象;试验未使用牛血清白蛋白等分散剂,说明此菌悬液的纯度和浓度较适宜,电镜负染效果较好。②染色时机的掌握,该试验染色未在样品完全干燥后进行菌体悬液在铜网上静置的时间比在染液中稍长,这可避免不带菌现象,以及电镜下菌体的形态假象问题。③支持膜:试验时需根据不同生物

标本选择不同支持膜,如细胞色素 C 展层技术用火棉胶,无蛋白展层用碳膜,低温电镜用特殊微筛支持膜等^[4]。

(2)嗜水气单胞菌的感染范围非常广泛,可引起甲鱼^[5]、蟹^[6]、鸡^[7]等患病,也可引起人类腹泻及食物中毒等^[8-9],是鱼类疾病的主要病原菌,其发病率和死亡率都很高,往往给淡水养殖业造成巨大的经济损失。嗜水气单胞菌为弧菌科气单胞菌属,致病因子有外毒素、内毒素、胞外酶等,此外,菌毛是一种重要的粘附因子,影响菌株的毒力;采用电镜负染色技术检测菌毛形态,根据其形态将其分为 W 菌毛和 R 菌毛, W 菌毛较长,易弯曲呈波浪状,菌毛数量少,与嗜水气单胞菌的粘附及血凝作用有关, R 菌毛短而硬,菌毛数量多,且周身分布,与嗜水气单胞菌的自凝作用有关,而与血凝作用无关。电镜观察 S 层菌株的缺失,可判定嗜水气单胞菌分离株的致病力; S 层蛋白有规则的排列在菌体表面,包裹着菌体,具有抗吞噬、抗补体等生物学功能^[10]。

(3)电镜负染色是分子生物学和分子病毒学研究不可缺少的关键性技术,应用电镜负染色技术检测鲤鱼嗜水气单胞菌,30 min 即可进行电镜观察,有助于对病原菌作出快速诊断,对症治疗,减少渔业经济损失。此方法在其他细菌、病毒的检测中也值得借鉴。

参考文献

(上接第 12893 页)

系中菌间相互关系和作用机制的研究尚不够深入。因此,目前对于具有协同作用关系的菌株筛选和组合还是一个随机的过程,缺乏有效的理论指导,而且对于已经应用的混菌培养体系也不能有效地协调菌间的关系,使其达最佳生态水平,发挥最大效应。这严重地阻碍了混菌发酵的发展和运用。因此,如果从生理、代谢和遗传角度对混合菌间关系和协同作用机制进行深入研究,对混菌发酵理论与应用都将有巨大的突破。

参考文献

[1] 史玉英. 纤维素分解菌群的分离和筛选[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(3): 59-62.
 [2] 中国科学院植生所纤维素酶组. 纤维素分解菌与伴生菌的分离鉴定及其协同作用[J]. 微生物学报, 1978, 18(2): 147-152.
 [3] BRUMBAUER A, JOHANSSON G. Fractionation of cellulase and β -glucosidase in a *Trichoderma reesei* culture liquid by use of two-phase partitioning[J]. Bioseparation, 1997(7): 287-295.

[1] 李伯勤, 张圣明. 医学超微结构基础[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2003.
 [2] 薄爱华, 孙树勋, 李继伦. 医用电子显微学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
 [3] 潘厚军, 吴淑勤, 董传甫, 等. 鳊致病性嗜水气单胞菌 GYK1 株的鉴定、毒力及溶血性[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(1): 23-29.
 [4] 屈建国, 温瑞福, 徐洪涛, 等. DNA 电镜技术及其应用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13(12): 395-398.
 [5] 董国忠, 石亚素, 斯国静. 甲鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 浙江预防医学, 2004, 16(8): 80-81.
 [6] ZHU Y X, CAO G L, XUE R Y, et al. The identification and characteristic of *Aeromonas hydrophila* from Eriocheir sinensis[J]. Journal of Suzhou University (Natural Science), 2002, 18(3): 100-106.
 [7] 李鹏, 陶茂晖, 李晓云, 等. 雏鸡嗜水气单胞菌感染的诊断[J]. 畜牧与兽医, 2005, 37(6): 72-73.
 [8] 王琳娜. 嗜水气单胞菌感染导致群体性腹泻的病原学分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(5): 921-922.
 [9] 董利平, 周缀琴. 一起嗜水气单胞菌引起的食物中毒[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005(7): 637.
 [10] 张翠娟, 宇宙亮, 赵宝华, 等. 嗜水气单胞菌研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(7): 46-50.

[4] 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.
 [5] 郝月, 杨翔华, 洪新. 秸秆纤维素分解菌的分离筛选试验[J]. 中国饲料, 2005(11): 15-17.
 [6] 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.
 [7] 刘德海, 杨玉华, 张发旺, 等. 饲用纤维素酶活力测定方法的探讨[J]. 饲料工业, 2002, 23(4): 34-35.
 [8] 张海, 颜日祥. 用混合培养法提高木霉 A10 的纤维素酶活性[J]. 西北大学学报, 1990, 20(2): 73-79.
 [9] 陈璐娜, 顾金刚, 徐凤花, 等. 产纤维素酶真菌混合发酵研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2007(4): 16-21.
 [10] JORGENSEN H, MORKEBERG A, KROGH K B R, et al. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species; Effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis[J]. Enzyme & Microbial Technol, 2005, 36: 42-48.
 [11] 孙究响, 曲音波, 刘自勇. 青霉木质纤维素降解酶系研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(5): 736-740.