

高效丢糟纤维素分解菌的筛选及产酶研究

程 驰^{1,2} 周 健¹ 罗惠波¹ 杨欣怡¹ 刘小俊¹ 周 祥¹

(1.四川理工学院生物工程学院,四川 自贡 643000;2.生物资源与生态环境教育部重点实验室,四川大学生命科学学院,四川 成都 610064)

摘要: 从白酒丢糟堆腐物中筛选出5株分解丢糟纤维素能力强的菌株,以其中降解能力最强的绿色木霉S7为出发菌株。通过对其固态发酵产酶条件的单因素优化试验,初步确定其固体培养基中丢糟粉与麸皮的最适质量比为4:1,硫酸铵2%,初始pH值为4.0,30~35℃发酵96h,羧甲基纤维素酶活和滤纸酶活分别达到57.08 μg/min·mL和26.02 μg/min·mL。

关键词: 白酒丢糟; 纤维素酶; 绿色木霉; 固态发酵

中图分类号: Q939.97; TS262.3; TS971; Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2012)06-0096-03

Screening of A High-efficiency Cellulose-decomposing Bacteria Strain and Study on Its Cellulase-producing Conditions

CHENG Chi^{1,2}, ZHOU Jian¹, LUO Huibo¹, YANG Xinyi¹, LIU Xiaojun¹ and ZHOU Xiang¹

(1. Department of Biology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000; 2. Key Lab for Resource and Biological Ecological Environment of Education Ministry, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: 5 high-efficiency cellulose-decomposing bacteria strains were isolated from liquor spent grains, among them, *Trichoderma viride* strain S7 with the strongest decomposing capability was used as the starting strain for single factor optimization test of its cellulase-production conditions by solid fermentation, and the optimized conditions were summed up as follows: the optimum mass ratio of spent grains powder and wheat bran was 4:1 in solid culture mediums, ammonium sulphate content was 2%, initial pH value was 4.0, and 96 h fermentation at 30~35℃, finally, the activities of carboxymethyl cellulase and filter paper enzyme could reach up to 57.08 μg/minomL and 26.02 μg/minomL respectively.

Key words: spent grains; cellulase; *Trichoderma viride*; solid fermentation

丢糟是酿酒业最主要的副产物,我国每年白酒丢糟都在2500万t以上^[1]。除部分淀粉、粗蛋白和粗脂肪外,白酒丢糟中还含有20%左右的粗纤维。由于丢糟含水量高,易霉烂腐败,难以为人类所充分利用,造成巨大的资源浪费和严重的环境污染。利用纤维素酶生产菌将其纤维素水解为可发酵糖,并进一步转化为乙醇或适口性好的饲料产品,将是极有前景的丢糟综合利用途径,而这一过程的关键是筛选出可高效降解或转化纤维素的菌株。

本研究从白酒丢糟堆腐物中分离筛选到纤维素降解能力强的1组菌株,并挑选其中降解能力最强的一株进行固态发酵产酶条件研究,为后续的白酒丢糟综合利用研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料及培养基

基金项目:酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金项目(NJ2011-15);四川省教育厅项目(11ZB249);自贡市科技局重点科技计划项目(11-04);四川理工学院“大学生创新基金重点项目”(TJZ201103)。

收稿日期:2012-03-22

作者简介:程驰(1975-),男,四川成都人,实验师,博士研究生,主要从事微生物遗传学研究。

优先数字出版时间:2012-05-16;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120516.1627.001.html>。

样品:自贡某白酒厂丢糟堆腐物。

发酵原料:从自贡某酒厂购买的新鲜白酒丢糟,含水量63.7%,自然风干后粉碎,过1mm筛;麸皮购于自贡长土镇某饲料站。

纤维素培养基:KNO₃(2 g/L),KH₂PO₄(1 g/L),MgSO₄(0.5 g/L),NaCl(1 g/L),Na₂HPO₄(1 g/L),CMC-Na(20 g/L),琼脂(20 g/L),自然pH值。液体培养基不加琼脂。

滤纸培养基:KNO₃(2 g/L),KH₂PO₄(1 g/L),MgSO₄(0.5 g/L),NaCl(1 g/L),Na₂HPO₄(1 g/L),新华滤纸条(1 cm×6 cm),自然pH值。

增殖培养基:PDA+2%的丢糟浸提液(10 g丢糟粉置于500 mL水中,搅匀,于80℃水浴中浸提1 h),自然pH值,121℃灭菌20 min(不加琼脂为液体培养基)。

细菌培养基:牛肉膏蛋白胨固体培养基^[2]。

真菌培养基:PDA 培养基^[2]。

固态发酵培养基:丢糟粉 90%,麸皮 10%(每 5 g 固体加 15 mL 营养液^[3]),自然 pH 值。

1.2 实验方法

1.2.1 纤维素分解菌的筛选

初筛:取少量混合堆腐物样品,分别加入适量无菌水,充分振摇后吸取上清液 1 mL,按 10^{-2} ~ 10^{-6} 5 种不同稀释倍数处理后涂布到纤维素培养基上,30 °C 培养 3~5 d,然后用 1 mg/L 的刚果红溶液染色 10 min,弃去染液,再用 1 mol/L 的 NaCl 溶液脱色。

复筛:选取生长良好、水解圈直径与菌落直径之比在 1.20 以上菌落增殖培养后,接种 1 mL 菌(孢子)悬液(浓度控制在 3.0×10^6 ~ 5.0×10^6 个/mL)于 20 g 固体发酵培养基中,30 °C 静置发酵 3 d,4 d,5 d 和 7 d,水洗,105 °C 烘至恒重。每种处理设 3 个重复。

减重率=(处理前干重-处理后干重)/处理前干重×100%。

1.2.2 纤维素分解菌的鉴定

菌株鉴定参考《常见细菌系统鉴定手册》和《真菌鉴定手册》。

1.2.3 酶活测定

葡萄糖标准曲线:取 10 支试管,以 0.1 mL 递加分别加入葡萄糖标准溶液(1.0 g/L)0~0.9 mL,蒸馏水定容至 1 mL 后各加 DNS 试剂 0.5 mL,摇匀,沸水浴 5 min,冷却后于 530 nm 处测吸光值。绘制标准曲线,用 Matlab 软件对数据进行最小二乘拟合,求得相关系数和线性方程。

粗酶液的制备:取固态发酵培养后的成曲 1.0 g 至锥形瓶中,加蒸馏水 10 mL,30 °C、200 r/min 振荡浸提 30 min,静置后取上清液于 4 °C、5000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液。

羧甲基纤维素酶活(CMCCase)测定:取适当稀释的酶液 2 mL,加 pH4.6 的 10.0 g/L CMC-Na 缓冲液 2 mL;40 °C 准确酶解 5 min 后加 DNS 试剂 2 mL,煮沸显色 5 min,迅速冷却后在 530 nm 下测吸光值。

滤纸酶活(FPA)测定:向试管中加 1 cm×6 cm 的新华滤纸 1 条,适当稀释的粗酶液 2 mL 和 0.2 mol/L, pH4.6 的醋酸缓冲液 2 mL,40 °C 准确酶解 60 min 后,迅速加入 DNS 试剂 2 mL,煮沸 5 min,水冷却后测 OD₅₃₀ 值。

以上测定中,空白对照均为 100 °C 处理 15 min 的酶液;酶活定义:1 min 催化底物产生 1 μg 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活单位(U,μg/min);酶活力值均按干燥后的发酵曲折算得出。

1.2.4 固态发酵条件对酶活的影响

在固态发酵培养基的基础上,分别对固体培养基质

(丢糟粉与麸皮)配比、发酵时间、氮源和起始 pH 值进行单因素实验,每个实验做 3 个平行。发酵结束后测定粗酶液的羧甲基纤维素酶活(CMCCase)和滤纸酶活力(FPA)。

2 结果与分析

2.1 纤维素降解菌的分离筛选

经刚果红染色,从纤维素培养基上得到 23 株生长迅速的菌种。其中,刚果红染色后透明圈直径与菌落直径比在 1.20 以上的有 7 株。但刚果红染色平板法是半定量的,适于大样本筛选。因水解圈直径和酶活之间呈对数关系,酶活差异低于 2 倍时则难以肉眼鉴别^[4]。若以丢糟为主要培养基质的降解率情况则能较全面测定纤维素酶组分总活力。当减重率≥30%、直径比>1.20 时,仅有 5 株符合条件(表 1),其中 S7 表现出最佳降解纤维素能力,S3、S11 次之。与之相对应,5 株菌的酶活力测定结果与筛选结果基本相符,S7 的纤维素酶活力和滤纸酶活力均最高(51.30 U/mL 和 25.92 U/mL)。综合考虑,以 S7 作为出发菌株进行固态发酵产酶条件研究。

表 1 5 株较优菌株的透明圈直径/菌落直径比和对滤纸的减重效果

项目	菌株				
	S3	S7	S10	S11	S13
透明圈直径/菌落直径	1.28	1.10	1.41	1.28	1.25
丢糟减重率(%)	18.91	21.78	17.33	20.4	19.67
CMCase(U/mL)	32.76	51.3	30.78	43.74	34.56
FPA(U/mL)	19.44	25.92	14.4	22.32	17.46

2.2 菌株的鉴定

根据《真菌鉴定手册》^[5],初步鉴定 S7 为绿色木霉(*Trichoderma viride*)。

2.3 出发菌株 S7 固态发酵产酶条件

2.3.1 固体培养基质配比对产酶的影响

由图 1 可看出,适量增加麸皮粉即能显著提高纤维素酶活力,不添加或过多添加麸皮,酶活力均较低。说明适量麸皮能诱导酶的生成,水解丢糟中的纤维素生成葡萄糖,为自身提供能量和碳源;但麸皮含量过高,基质透气性变差,不利于好氧的绿色木霉 S7 发酵。当丢糟粉与麸皮的比例为 1:4 时,S7 的发酵效果最好,CMCase 和 FPA 分别达到 53.04 U/mL 和 26.60 U/mL,并与筛选时丢糟与麸皮质量比为 1:9 时的产酶效果(表 1)接近,因此,可以认为 S7 固态发酵时丢糟粉与麸皮的适宜比为 1:4。

2.3.2 发酵时间对产酶的影响

按孢子悬液浓度 3.0×10^6 ~ 5.0×10^6 个/mL 接种至固态培养基,30 °C 培养 24 h 后开始测酶活,并且每 24 h 测 1 次。发酵时间对产酶的影响分析结果见图 2。

图 2 表明,S7 在 24 h 时已分泌一定的纤维素酶,但

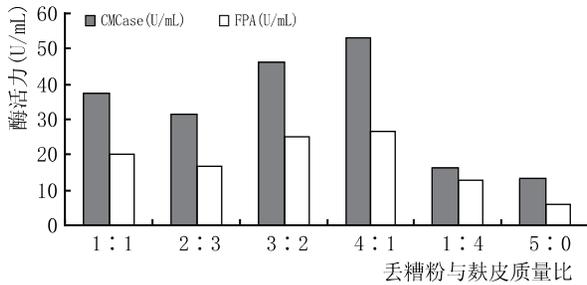


图1 固体培养基质配比对产酶的影响

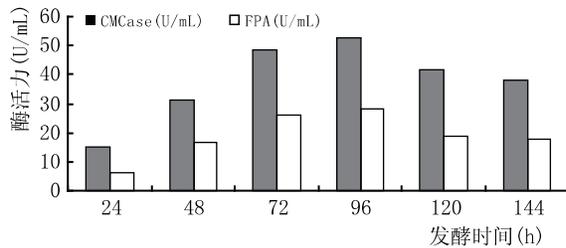


图2 发酵时间对产酶的影响

酶活较低;当培养至96 h时,CMCase和FPA均达到最高值,此后随发酵时间延长,酶活力逐渐下降。

2.3.3 氮源对产酶的影响

以6种氮源进行试验,等量替换固态发酵培养基营养液中所用的硫酸铵,氮源对产酶的影响结果见图3。

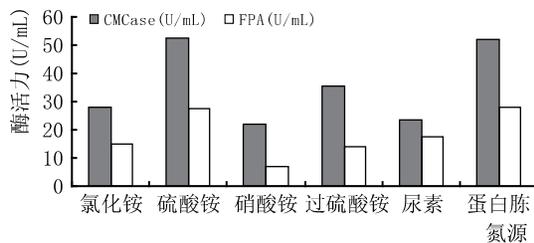


图3 氮源对产酶的影响

图3结果表明,除硫酸铵和蛋白胨以外其余4种氮源均不能很好促进S7产酶,此外,硫酸铵和蛋白胨对于促进S7分泌纤维素酶有着相似的作用,但硫酸铵略优于蛋白胨。

2.3.4 发酵温度对产酶的影响

按5℃递加,分别在20~45℃下培养96 h后测定酶活发现,发酵温度对S7产酶有较大影响,结果见图4。

图4结果表明,只有在30℃和35℃时,产酶量几乎相等且最高,而温度低于25℃或高于35℃时,酶活力均较低。检查培养基质发现,低温(20℃)状态下,菌丝短小,生长缓慢,而高温(40℃)下代谢过旺,菌丝枯萎,颜色黯淡。

2.3.5 起始pH值对产酶的影响

因S7来自酸性白酒丢糟堆腐物,所以为得到理想的

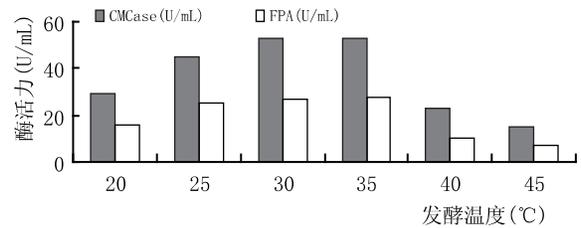


图4 发酵温度对产酶的影响

发酵条件,分别用0.1 mol/L的柠檬酸缓冲液调节固体培养基的初始pH值至2.0、3.0、4.0、5.0、6.0和7.0,在之前所得的最适条件下培养发酵。酶活力结果见图5。

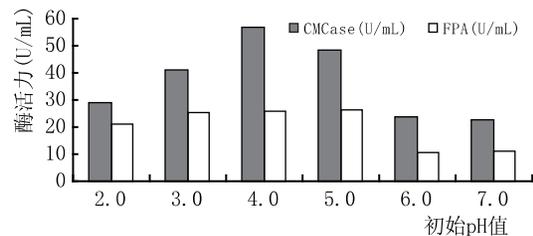


图5 初始pH值对产酶的影响

从图5结果表明,在pH4.0时酶活最高,CMCase与FPA分别达到57.08 U/mL和26.02 U/mL,并略高于此前筛选时自然pH值时的酶活力。

3 结论

本研究从长期堆腐的白酒丢糟中筛选出了5株纤维素酶活性较高的菌株,其中S7对酒糟的实际分解能力最高达到21.7%,初步鉴定为木霉,可用作分解丢糟纤维素的优良菌株。以丢糟粉和麸皮为基质的固体培养基对S7的发酵条件进行研究,得到适宜的产酶条件:丢糟粉与麸皮的质量比例为1:4,以硫酸铵或蛋白胨为氮源,初始pH值为4.0,30~35℃发酵96 h,CMCase与FPA分别达到57.08 U/mL和26.02 U/mL,有较高的工业应用价值。

参考文献:

- [1] 李新社,陆步诗.大曲丢糟代替米糠生产小曲的效果研究[J].酿酒,2006(7):65-66.
- [2] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].4版.北京:高等教育出版社,2007:85-120.
- [3] 郑佑兴,段明星,徐文联,等.高活性纤维素酶菌株的筛选及其产酶条件的研究[J].微生物学杂志,1996,16(1):35-38.
- [4] SHARROCK KR. Cellulose assay methods: a review [J]. Biochem Biophys Method,1988,17(2):81-105.
- [5] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979:493-494.