

纤维素酶产生菌的筛选及产酶特性研究

张秋卓¹, 蔡伟民^{1,2}, 冯玉杰¹

(1. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090; 2. 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240)

摘要: 经纤维素刚果红平板初筛及摇瓶发酵复筛, 从菜地、腐烂的树根及朽木周围的土壤中筛选出 1 株高产纤维素酶真菌 ZM-4, 经鉴定为里氏木霉。以稻草与麸皮之比 3:1 为碳源、硫酸铵为氮源, ZM-4 于初始 pH4.5、30 °C、200 r/min 摇床中降解稻草 96 h, 产还原糖量达 1.842 g/L, 羧甲基纤维素酶活及滤纸酶活分别达 53.07 u 及 9.74 u。利用气相色谱对 ZM-4 降解稻草生成的还原糖组分进行了初步分析, 水解产物中以葡萄糖为主, 其含量是木糖含量的 45.10 倍。

关键词: 微生物; 纤维素酶; 里氏木霉; 气相色谱

中图分类号: Q814; O657.71; TQ925; Q55

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2008)04-0054-04

Screening of Cellulase-Producing Microorganism and Study of Its Enzymatic Property

ZHANG Qiu-zhuo¹, CAI Wei-min^{1,2} and FENG Yu-jie¹

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090; 2. School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Communication University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Primarily screened by cellulose-congo red plate and then screened by shake flask fermentation, an effective cellulase-producing fungus named ZM-4, identified as *Trichoderma reesei*, was isolated from vegetable gardens, soil around rotten trees roots and deadwood. With the mixture of rice straw and bran in the ratio of 3 to 1 as carbon source, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ used as nitrogen source, when ZM-4 fermented rice straw at pH4.5 for 96 h in 200 r/min shake bed under 30 °C, it could produce 1.842 g/L reducing sugars. Accordingly, its CMCA and FPA could achieve 53.07 u and 9.74 u respectively. Analyzed by gas chromatography, the compositions of reducing sugars in rice straw hydrolytes were determined. The results showed that glucose was the main component with its content 45.10 times of xylose content.

Key words: microbe; cellulase; *Trichoderma reesei*; gas chromatography

能源危机的出现使天然木质纤维素通过生物转化得到酒精等能源物质成为当前国际研究的热点^[1~3]。利用廉价的秸秆类农业废弃物作为原料生产燃料酒精是目前学者们研究的主要方向。

针对上海地区的农作物种植结构, 笔者选择稻草为目标降解物, 拟从菜地、腐烂的树根及朽木周围的土壤中筛选出纤维素酶活性高、且酶活稳定的稻草降解菌, 以提高稻草的可利用性, 同时为纤维素酶的生产以及燃料酒精生产起一定的指导作用。此外, 传统的 DNS 法^[4]只能测定水解液中的还原糖总量从而表征菌株活性, 本文拟利用气相色谱法对水解液中的还原糖成分进行具体分析, 从而为后续的酒精生产起一定的指导作用。

1 材料与方法

纤维素酶产生菌分离供试材料分别采自上海交通

大学校园内及上海市闵行区吴泾镇不同生态环境下有机质含量较高的土壤, 分别采自菜地、腐烂的白玉兰树根及朽木周围的土壤。

1.1 培养基

筛选时采用纤维素刚果红培养基: K_2HPO_4 0.50g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, 纤维素粉 1.88 g, 刚果红 0.20 g, 琼脂 14.00 g, 明胶 2.00 g, 用蒸馏水定容至 1 L, 调 pH5.0。富集与纯化培养基、种子培养基及液体发酵产酶培养基具体参照文献^[5,6]。

1.2 菌种筛选方法

取 10 g 土样置于 90 mL 无菌水中, 30 °C、200 r/min 振荡 2 h 后, 静置 30 min。取静置后的上清液 10 mL 接种到 90 mL 富集培养基中, 于 30 °C、200 r/min 摇床中振荡培养 3 d。以此摇瓶中的培养菌液作为菌源, 在同样条件下进行二次转接。

收稿日期: 2008-01-02

作者简介: 张秋卓(1982-), 女, 山东省淄博市人, 在读博士, 研究方向: 生物质能源的开发与利用。

通讯作者: 蔡伟民, 教授。

将二次转接培养后的菌液用无菌水分别稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 倍,涂布到纤维素刚果红平板上,于 30°C 培养箱中培养4 d。根据水解圈直径(H)与菌落直径(D)比值的大小进行初筛。将H/D值大于2.0的菌株作为复筛菌种。根据还原糖产量、内切纤维素酶酶活及滤纸酶活的大小进行复筛。

1.3 菌种鉴定方法

细菌依照《伯杰手册》(第八版)^[7]鉴定,真菌依照《真菌鉴定手册》^[8]鉴定。

1.4 菌体生长及总还原糖测定方法

将发酵后的菌液稀释10倍,用752型分光光度计在600 nm处测定光密度值(OD),以未接种的培养基等量稀释液作对照。总还原糖量按照DNS比色法^[4]测定。

1.5 酶活力测定

内切纤维素酶酶活(CMCA)及滤纸酶活(FPA)的测定均按照Ghose(1987)^[9]所述的方法进行。将每毫升酶液于1 min内催化纤维素类底物水解生成1 μmol 葡萄糖所需酶量定义为一个酶活力单位,即1U。

1.6 稻草水解产物中还原糖成分分析

将稻草水解产物中的还原糖衍生化,用气相色谱分析水解产物中还原糖的组成^[10]。色谱条件为:DB-5毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm i.d. $\times$ 0.25 μm);柱温:初温 180°C ,以 $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 220°C ,并在 220°C 保温20 min。进样量1 μL 。载气为氮气,流速为1.3 mL/min。氢焰检测器,检测器温度为 270°C 。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选结果

共筛选出18株能在纤维素刚果红平板培养基上产生透明水解圈的菌株,其中真菌5株、细菌13株。其中有4株菌的H/D值超过2.0,故将其作为后续复筛的目标物。对复筛目标物的产糖量、CMCA及FPA值测定后的结果表明,真菌ZM-4的3种指标值均明显高于其他3株菌,故将其作为后续研究的对象。

2.2 ZM-4的鉴定结果

图1为ZM-4放大3000倍后的扫描电镜照片。

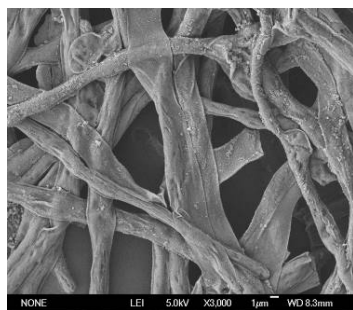


图1 ZM-4的扫描电镜照片

将分离纯化后的ZM-4接种于PDA培养基上,置 30°C 恒温箱中培养。肉眼可以观察到,菌落迅速蔓延,菌丝层较厚,致密呈束状,初期为白色、平坦,后期呈深绿色。PDA培养基的背面呈浅黄色。

制片后,在1000倍显微镜下观察到,其分生孢子梗分枝不规则,分枝与分生孢子梗近似直角,末端为小梗。小梗为瓶形,分生孢子呈长椭圆形,表面粗糙,布满小刺,初步鉴定为半知菌亚门,丝孢纲,丝孢目,丛梗孢科,木霉属,里氏木霉。

2.3 ZM-4降解稻草最优发酵条件及产酶条件的研究

2.3.1 不同碳源对ZM-4产还原糖的影响

将稻草与麸皮以不同比例混合作为碳源,测定ZM-4生长及产还原糖情况,结果见图2。

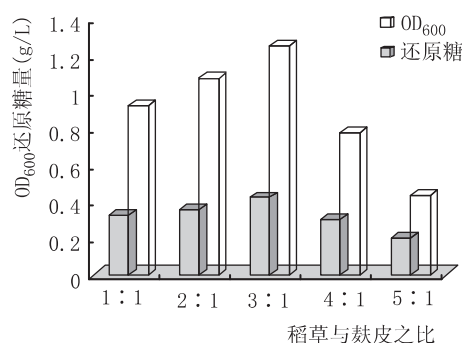


图2 不同碳源对ZM-4产还原糖的影响

由图2可以看出,随着稻草与麸皮比例的增加,OD₆₀₀值与还原糖量均呈现先增大后减小的趋势,产还原糖量与其生长状况成正比。其中以稻草与麸皮之比为3:1时,OD₆₀₀值及还原糖量均最高。因此,选择稻草与麸皮之比为3:1作为ZM-4降解稻草的最佳碳源。

2.3.2 不同氮源对ZM-4产还原糖的影响

分别以1%的蛋白胨、尿素、硫酸铵、谷氨酸钠及硝酸钠作为氮源,测定ZM-4生长及产还原糖情况,结果见图3。

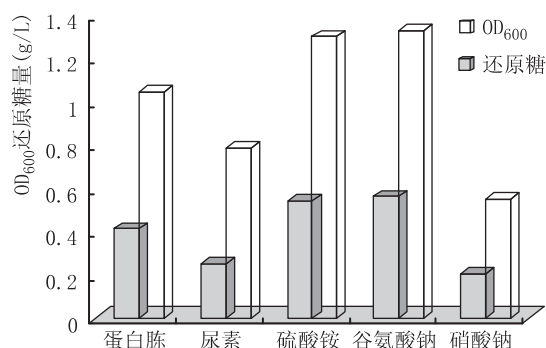


图3 不同氮源对ZM-4产还原糖的影响

由图3可以看出,ZM-4在以硫酸铵和谷氨酸钠为氮源时,生长状况较好且产还原糖量较高,其中以谷氨酸钠效果最好。

2.3.3 最适温度及初始 pH 值的确定

2.3.3.1 最适温度的确定

温度是影响细胞生长和发酵产酶的重要因素之一。随着温度的提高,反应速度也提高,即酶活提高;但温度升至太高会使酶变性增加,活性酶的量降低。因此细胞生长和发酵产酶均存在着一个最佳温度。分别研究了温度为 20℃、30℃、40℃、50℃及 60℃时 ZM- 4降解稻草后的产糖量及 CMCA 和 FPA 值,结果见图 4。

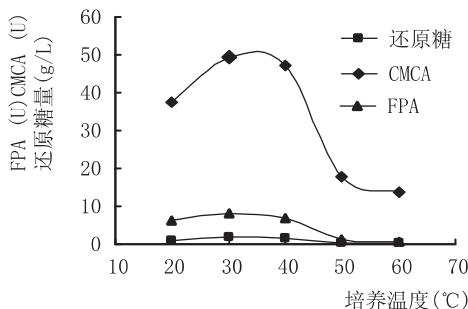


图 4 温度对 ZM- 4 产还原糖及 CMCA 和 FPA 的影响

由图 4 可知,还原糖量、CMCA 及 FPA 三者之间存在较明显的正相关性,三者均在温度为 30℃时达到最大值。因此选择 30℃作为 ZM- 4 降解稻草的最优温度。

2.3.3.2 最适初始 pH 值的确定

由于酶分子上存在许多酸性和碱性氨基酸的侧链基团,这些基团随着 pH 值的变化可以处于不同的解离状态。侧链基团的不同状态或者直接影响底物的结合和进一步作用,或者影响酶的空间结构,从而影响酶的活性。分别研究了初始 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0 时 ZM- 4 降解稻草后的产糖量及 CMCA 和 FPA 值,结果见图 5。

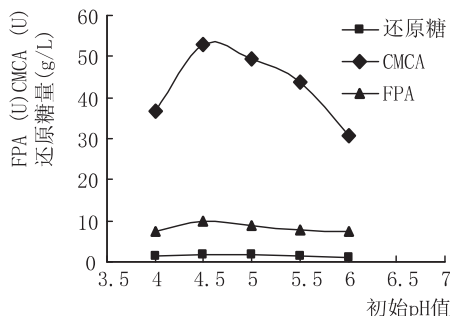


图 5 初始 pH 值对 ZM- 4 产还原糖及 CMCA 和 FPA 的影响

由图 5 可知,初始 pH 值为 4.5 时,还原糖量、CMCA 及 FPA 三者均达到最大值。因此选择 4.5 为 ZM- 4 降解稻草的最优初始 pH 值。

2.3.4 培养时间对 ZM- 4 产还原糖的影响

在 ZM- 4 降解稻草的最优发酵条件下,每隔 12 h 测定一次其生长状况及产糖情况,研究培养时间对 ZM- 4 生长及产还原糖的影响,结果见图 6。

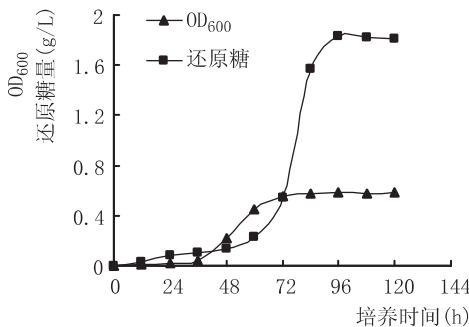


图 6 培养时间对 ZM- 4 产还原糖的影响

由图 6 可知,从 36 h 起,菌体进入对数生长期,72 h 起进入静止期。产糖量与生长情况成正相关性,也经历了迟缓期、对数期和静止期。但是 ZM- 4 从 60 h 开始才进入产糖对数期,比菌体生长对数期延迟了 24 h。这可能与纤维素酶的诱导合成机制有关。

2.4 ZM- 4 所产还原糖组成成分分析

将 ZM- 4 降解稻草后生成的还原糖衍生化,用气相色谱分析其组成。由于稻草水解产物以葡萄糖和木糖这两种单糖为主,因此对二者的具体含量进行了测定。首先,将不同浓度的葡萄糖(分析纯)和木糖(分析纯)分别进行 GC 分析,确定出其保留时间分别为 11.06 min 及 9.58 min。并绘制出葡萄糖和木糖的浓度标准曲线。结果表明,2 条标准曲线的方差分别为 0.9972 和 0.9971,具有很好的线性相关性,可用于后续稻草水解产物中葡萄糖和木糖的分析。图 7 是利用 GC 测定 ZM- 4 在最佳发酵条件下降解稻草后水解产物中的葡萄糖和木糖组成结果。

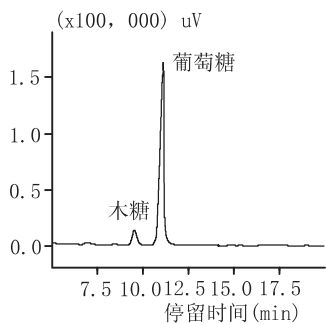


图 7 GC 分析稻草水解产物中还原糖组成

结合葡萄糖和木糖的标准曲线,求得水解产物中葡萄糖及木糖的浓度分别为 1.398 g/L 及 0.031 g/L,总糖共计 1.429 g/L。此结果比用 DNS 法测到的总还原糖含量(1.842 g/L)低 0.413 g/L,这可能是由于水解产物中的二糖和多糖不能被 GC 检测出,而能被 DNS 法检测出的缘故。因此,对于测定单糖而言,GC 比 DNS 法更精确。此外,ZM- 4 降解稻草后的水解产物中葡萄糖含量远远高于木糖含量,是木糖含量的 45.10 倍。由于木糖在后续的酒精生产中很难被酵母利用,因此,相对较少

的木糖含量是我们所期望的。因此,可以看出,ZM-4 是一株较好的纤维素酶产生菌。

3 结论

3.1 经纤维素刚果红平板初筛和摇床发酵复筛,从菜地、腐烂的树根及朽木周围的土壤中筛选出了 1 株高效稻草降解真菌 ZM-4,初步鉴定其为里氏木霉。

3.2 研究表明,ZM-4 以硫酸铵或谷氨酸钠为氮源时,产糖量相对较高。但因谷氨酸钠价格昂贵,且以其作为氮源时产糖量与硫酸铵相差不是很大,因此,综合经济角度考虑,选择硫酸铵作为 ZM-4 的最佳氮源。此结果与张继泉等^[1]的报道一致。

3.3 ZM-4 降解稻草的最优发酵条件及最优产酶条件为:以稻草与麸皮之比 3:1 为碳源,硫酸铵为氮源,初始 pH 为 4.5,发酵温度为 30℃。ZM-4 在最优发酵条件下降解稻草 96 h,总还原糖量达 1.842 g/L,CMCA 及 FPA 分别达 53.07 u 及 9.74 u。

3.4 利用气相色谱,对 ZM-4 降解稻草生成的还原糖组分进行了初步分析。结果表明,水解产物中的葡萄糖含量是木糖含量的 45.10 倍。

3.5 为进一步提高 ZM-4 的产糖及产酶能力,可以考虑对其进行诱变育种。此外,从纤维素酶的合成机制考虑,可以添加一些诱导剂进一步诱导纤维素酶的产生或

消除分解代谢产物对酶合成的阻遏作用。

参考文献:

- [1] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lingo cellulosic materials for ethanol production: a review [J]. Bioresource Technology, 2002, 83: 1- 11.
- [2] Chen M, Xia L M, Xue P J. Enzymatic hydrolysis of comcob and ethanol production from cellulosic hydrolysate [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2007, 59: 85- 89.
- [3] Carlos C A, O' scar J S. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities [J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 2415- 2457.
- [4] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Anal.Chem, 1959, 31: 426- 428.
- [5] 李振红, 陆贻通. 高效纤维素降解菌的筛选[J]. 环境污染与防治, 2003, 25(3): 133- 135.
- [6] 胡开辉. 微生物学实验 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2004.
- [7] Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th) [M]. Beijing: Science Press, 1984.
- [8] 魏景超. 真菌鉴定手册[M].上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [9] Ghose T. Measurement of cellulase activities [J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 58(2): 257- 268.
- [10] 黄雪松. 单糖与糖胺的水相乙酰化及其气相色谱测定[J]. 色谱, 2003, 21(5): 527.
- [11] 张继泉, 王瑞明, 孙玉英, 等. 里氏木霉生产纤维素酶的研究进展 [J]. 饲料工业, 2003, 24 (1): 9- 13.

(上接第 53 页)

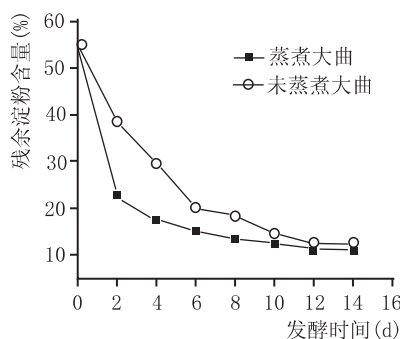


图 2 未蒸煮大曲与蒸煮大曲发酵情况比较

经蒸煮大曲的缘故。说明大曲淀粉在制曲过程中所发生的变性并不是不可逆转的变性,其在经过高温的处理后,在利用情况上与熟淀粉基本相同。

3 结论

通过对生淀粉、熟淀粉和未经蒸煮和蒸煮大曲发酵的对比实验得出:大曲中的淀粉能被大曲微生物所利用,大曲淀粉在利用速度上明显快于生淀粉,但却明显慢于熟淀粉的利用速度,大曲淀粉的利用速度介于生淀粉与熟淀粉之间,而且更偏向于熟淀粉,说明大曲淀粉性质既不同于生淀粉也不同于熟淀粉,但更偏向

于熟淀粉,其在制曲过程中淀粉的性质是向熟淀粉方向变化的,淀粉在制曲过程中经过一系列的作用发生了变性,其变性可能是由于大曲淀粉经过机械研磨而发生了物理变性,同时在制曲过程中因微生物及酶的作用发生了分子量下降的化学和生物变性。但其淀粉在制曲过程中到底发生了怎样的变性,其变性机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [2] 刘亚伟. 淀粉生产及其深加工技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- [3] 王昌富, 王远成, 郝向荣, 等. 丰谷酒业浓香型大曲生产技术与工艺参数[J]. 酿酒科技, 2006, (6): 35- 36.
- [4] 付万绪, 张海霞, 孟勤燕, 张亚维. 大曲生产工艺对糖化力的影响[J]. 酿酒科技, 2007, (2): 62- 64.
- [5] 王福荣. 酿酒分析与检测[M]. 北京: 化工工业出版社, 2005.
- [6] 任道群, 唐玉明, 廖建民, 姚万春. 影响泸型大曲淀粉酶活力测定的因素探讨[J]. 酿酒, 2003, 30(3): 20- 21.
- [7] Boggini G, Cattaneo M, Paganofi C, et al. Genetic variation for Waxy proteins and starch properties in Italian wheat germ plasm[J]. Euphytica. 2001, 199: 111- 114.