

纤维素酶高产菌株的研究进展

李 雯,洪 艳,侯红萍

(山西农业大学 食品科学与工程学院,山西 太谷 030801)

摘 要: 纤维素酶是一种分解纤维素的高活性生物催化剂,具有广泛的应用价值。主要从高产纤维素酶菌株的自然选育、诱变育种、工程菌的构建以及多菌株混合发酵 4 个方面介绍了纤维素酶菌株的研究进展。

关键词: 微生物; 纤维素酶; 自然选育; 诱变育种; 工程菌的构建; 混合发酵

中图分类号: Q93-3; Q55; Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2009)08-0105-02

Research Progress in Cellulase High-yield Strains

LI Wen, HONG Yan and HOU Hong-ping

(College of Food Science and Engineering, Shanxi Agriculture University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Abstract: Cellulase, a kind of high active biocatalysts that could dissolve cellulose, is of extensive application values. In this paper, the latest research progress in cellulase high-yield strains covering four aspects including natural selection, mutation breeding, construction of engineering bacteria and mixed fermentation were introduced.

Key words: microbe; cellulase; natural breeding; mutation breeding; construction of engineering bacteria; mixed fermentation

资源和环境问题是人类在 21 世纪面临的最主要的挑战。生物资源是可再生性资源,地球上每年光合作用的产物达 $1.5 \times 10^{11} \sim 2.0 \times 10^{11} \text{t}$, 是人类社会赖以生存的基本物质来源。其中 90 % 以上为木质纤维素类物质^[1], 木质纤维素类物质中的纤维素又是地球上最丰富的多糖物质^[2], 然而目前这部分资源尚未得到充分的开发利用, 主要用于燃料、畜牧饲料与积肥, 不仅利用率低, 还对环境造成一定的污染^[3]。而纤维素酶的研究为此开辟了一条广阔的途径。特别是近 10 年来, 随着现代生物技术的迅速发展, 基因重组与其他一系列分子生物学技术得到了广泛的应用, 使这一领域的研究更为深入。

1 纤维素酶

纤维素酶是一种复合酶, 属生物催化剂, 是水解纤维素以获取葡萄糖的酶系, 它是由大约 14000 个葡萄糖残基通过 β -1,4-糖苷键连接而成的线性聚合物, 其基本重复单位为纤维二糖。纤维素酶包括纤维素内切酶、外切酶和 β -葡萄糖苷酶。3 种酶之间存在协同作用。因此, 只有当 3 个主要成分的活性比例恰当时, 才能有效地降解纤维素^[4]。

2 纤维素酶高产菌株的研究

2.1 产纤维素酶菌自然选育

基金项目 山西省科技厅攻关项目 (041030)。

收稿日期: 2009-04-02

作者简介 李雯(1985-), 女, 在读硕士, 研究方向: 食品微生物与发酵技术。

菌种的选育是纤维素酶生产的基础性工作, 为了生产高质量的纤维素酶产品, 许多专家进行了大量研究。

韩立荣、张双玺等采用纤维素刚果红平板培养基, 对采自陕西秦岭山区的土样和腐烂枝干进行初筛, 再以川楝残渣为惟一碳源进行摇瓶培养复筛, 最后对获得的高纤维素酶活力菌株进行形态学和分子生物学鉴定, 得到 4 株纤维素酶活性较高的菌株, 分别为枝状枝孢菌、萨氏曲霉菌、瓦克青霉菌和小不整球壳属, 从而为植物源农药残渣的资源化利用及其他废弃有机物的合理利用提供依据^[5]。

张秋卓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/mL 及 9.74 U/mL^[6]。

潘建梅通过刚果红染色鉴定和液体发酵法, 从连云港郊区采集的腐烂的苹果、橘子、葡萄、枣、红薯、树根等样品中分离筛选出一株产纤维素酶高的细菌。摇瓶产酶试验结果表明, 该菌株在培养基初始 pH8.0、35 °C、培养 30 h 产纤维素酶活力最高, 达 70 U/mL^[7]。

2.2 诱变育种

自然选育是利用菌种的自发突变选育出优良菌种的。自发突变的频率较低,出现优良性状的可能性较小,需坚持相当长的时间才能收到效果。而诱变育种则是得到高产菌株的一种简单有效的方法,能够大幅度改变菌种的遗传特性,从而获得高产突变菌株。具有方法简单、快速、收效显著等特点,在实际中应用广泛。

陈香等以从南京红山动物园土样及食草动物的粪便中分离出的高活力产纤维素酶菌株为出发菌株,经紫外线诱变处理后,其突变株产酶活力比出发菌株提高了 15.8 倍^[8]。

胡婷婷等以绿色木霉 T_0 为出发菌株,对其进行原生质体紫外诱变,得到的纤维素酶高产菌株 UVT₁₂ 的 CMC 酶活达到 1020.24 U/g,比出发菌株 T_0 提高 124.3 %^[9]。

武秀琴和王敏以黑曲霉为出发菌株,经紫外线(15 W,照射距离 30 cm 左右,照射时间 8 min)和亚硝酸(0.1 mol/L 的 NaNO_3 处理 5 min)的复合诱变,得到的突变菌株纤维素酶活力提高了 61.10 %,滤纸酶活力提高了 64.01 %^[10]。

侯红萍、杜文娟对从堆肥中分离筛选出的产纤维素酶活力较高的黑曲霉 D2 进行了微波诱变,得到了产酶活力最高的突变株 W41,其滤纸(FPA)酶活达到了 128.7 U/mL,比 D2 菌株提高了 23.3 %。经连续传代,其性能稳定^[11]。

2.3 工程菌的构建

纤维素酶基因克隆的研究始于 20 世纪 70 年代末,自 1982 年 Whittle 等人首次报道 *Cellulomonas fimi* 的纤维素酶基因被克隆以来,人们不断从细菌与真菌中发现分离纤维素酶系。到目前为止,据报道已有近 100 多个纤维素酶及木聚糖酶基因都可在大肠杆菌中克隆和表达,主要是内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖糖酶。

由于酶的耐热性在生产中具有实用意义,所以耐热细菌成为纤维素酶基因克隆的研究热点。陈路劼克隆了嗜热菌 *Geobacillus sp.* Strain TC-S8 的 β -葡萄糖糖苷酶 GL 基因,为纤维素酶工程菌株的构建奠定了基础^[12]。

郭成栓从一株产碱性纤维素酶的短小芽孢杆菌菌株 H9 中,克隆到了编码葡聚糖内切酶的基因,对其基因序列及酶的结构域进行了分析预测,同时将该酶的基因构建于大肠杆菌表达载体 pET20b 中,获得重组表达载体 pET20b-EglA,转化至大肠杆菌菌株 BL21(DE3)中进行表达^[13]。

韩笑通过一步法提取黑曲霉 AS3.796 的总 RNA,利用依据其他黑曲霉 β -葡萄糖糖苷酶(bgl)基因序列设计的一对特异性引物,采用 RT-PCR 方法扩增得到了该菌 bgl

基因 cDNA 片段。将目的片段与 pGEM-T 载体连接并转入大肠杆菌。序列测定结果表明该 cDNA 片段大小为 2583 bp,其基因序列与已公布的其他黑曲霉 bgl 基因的同源性最高可达 99 %。蛋白质分析结果表明该 β -葡萄糖糖苷酶属于糖苷水解酶家族 3 成员^[14]。

2.4 多菌株混合发酵

在长期生产实践中发现,纤维素的降解过程在微生物单独作用不能完成或只能微弱进行的,必须依靠两种或两种以上的微生物共同作用才能完成,微生物混合培养或混合发酵已越来越受重视。

田长城、许晖等对黑曲霉和芽孢杆菌混合纤维素酶液的活性进行了研究,确定了最佳的发酵产酶条件。结果表明,当黑曲霉和芽孢杆菌粗酶液的体积比为 4:1 时,酶活力最高,达 273.4 U/mL^[15]。

刘薇、徐尔尼等对串珠霉与链霉菌进行了 2 菌株混合发酵产纤维素酶的研究,确定了最佳的发酵产酶条件。其 CMC 酶、FPA 酶、 β -葡聚糖酶活分别为 3.83 IU/mL、1.56 IU/mL 和 2.56 IU/mL,比优化前分别提高了 1.11~5.57 倍、1.01~1.63 倍和 1.11~9.68 倍^[16]。

杨盛对 7 株黑曲霉与 1 株绿色木霉的生长及产酶情况进行了研究,确定了 4 种组合方式;通过比较 4 组混合菌的酶活大小,最终确定组合 2 为降解纤维素效果最好的混合菌。优化混合菌的最佳发酵条件为:接种量 8 %,250 mL 三角瓶装量 100 mL,玉米芯和麸皮为碳源(4:1),酵母膏为氮源,碳氮比为 4:1,起始 pH 值为 5.0、30 °C、150 r/min 恒温振荡培养 7 d,FPA 酶活达到 281.6 U/mL,分别是出发菌黑曲霉的 2.67 倍和绿色木霉的 2.74 倍^[17]。

3 结束语

天然纤维素的降解需要 3 种纤维素酶的协同作用,加之天然纤维素常伴以木质素和/或果胶,所以要获得高产完整活性的工程菌难度很大。人们对纤维素酶基因的兴趣主要集中在产纤维素酶的高产真菌及耐热细菌上,它们的外分泌性及耐热性在酶工业生产中具有实用意义。尽管纤维素酶基因克隆已取得了很大的进展,但纤维素酶的表达、分泌均较弱。

随着分子生物学技术的发展,纤维素酶基因的克隆和工程菌的构建将成为纤维素酶研究的热点,加之各种预处理方法的采用和下游产物的提取技术的应用,将会大大推动纤维素酶的研究和应用^[18]。

参考文献:

- [1] 高培基.纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能研究进展[J].自然科学进展.2003,13(1):21-29.

(下转第 111 页)

- [9] Guadalupe Z., Ayestara B. Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of tempranillo red wines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55 (26): 10720–10728.
- [10] Glories P. R. G, Maujean A. Dubourdieu D. John Wiley & Sons LTD. Handbook of enology Volume 2 The chemistry of wine stabilization and treatments.
- [11] 杨新元. 酵母甘露糖蛋白对白葡萄酒酒石和蛋白稳定性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, (6): 128–132.
- [12] Nisioutou A. A., Spiropoulos A. E., Nychas G. -J. E. Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentations[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 6705–6713.
- [13] Cerning, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiology. Review. 1990, 87: 113–130.
- [14] 朱力, 王显苏, D. GUERRAND, 等. 酵母多糖有效改善葡萄酒的整体口感和品质[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2005, (3): 60–63.
- [15] Lopez-Barajas, M. Lopez-Tamames, E., Buxaderas, S., Suberbiola, G., De la Torre-Boronat, M. C. Influence of wine polysaccharides of different molecular mass on wine foaming[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2001, 52 (2): 146–150.
- [16] Moreno-Arribas V, Pueyo E, Nieto F. J., et al. Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines[J]. Food Chemistry, 2000, 70 (3): 309–317.
- [17] Jones P. R., Gawel R, Francis I. L., et al. The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine[J]. Food Quality and Preference, 2008, 19 (6): 596–607.
- [18] Di?az-Rubi, M. E., Saura-Calixto F. Dietary fiber in wine[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2006, 57 (1): 69–72.
- [19] 刘丹. 对多糖测定方法的探讨[J]. 四川文理学院学报, 2008, (3): 49–51.
- [20] 王建壮, 安洁, 吕华冲. 植物多糖含量测定的方法学研究[J]. 海峡药学, 2008, (5): 48–50.
- [21] 鲁晓岩. 硫酸-苯酚法测定北冬虫夏草多糖含量[J]. 食品工业, 2002, 23 (4): 69–70.
- [22] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Anal Chem, 1956, 28: 350.
- [23] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. A colorimetric method for the determination of sugars[J]. Nature, 1951, 168: 167.
- [24] 罗毅, 潘细贵, 刘刚, 李运飞. 苯酚-硫酸法测定多糖含量显色方式的优选[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(1): 45–46.
- [25] 王忠民, 王跃进, 周鹏. 苯酚-硫酸法测定葡萄多糖含量[J]. 新疆农业大学学报, 2004, 27 (2): 87–90.
- [26] 张艳芳, 陈代, 问亚琴, 等. 一种用于葡萄酒多糖组分鉴定的薄层层析法[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2008, (5): 4–7.
- [27] Bergmaier D, Lacroix C, Guadalupe Macedo M., et al. New method for exopolysaccharide determination in culture broth using stirred ultrafiltration cells[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 57 (3): 401–406.

~~~~~

#### (上接第 106 页)

- [2] Rosanne M. Measurement of saccharification by cellulases[J]. Enzyme Microb. Technol, 1985, (7): 585.
- [3] 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.
- [4] 贺稚非, 等. 纤维素酶及应用现状[J]. 粮食与油脂, 2004, (1): 15–18.
- [5] 韩立荣, 张双玺, 祝传书, 等. 高效纤维素降解真菌的筛选和鉴定[J]. 西北农林科技大学学报, 2008, 9, 36(9): 169–174.
- [6] 张秋卓, 蔡伟民, 冯玉杰. 纤维素酶产生菌的筛选及产酶特性研究[J]. 酿酒科技, 2008, (4): 54–57.
- [7] 潘建梅. 产纤维素酶细菌的筛选及其产酶条件的研究[J]. 淮海工学院学报, 2008, 17(3): 65–67.
- [8] 陈香, 蒋立建, 韩刚, 韩冲. 紫外线诱变提高细菌产纤维素酶活力的研究[J]. 化学与生物工程, 2008, 25(2): 45–47.
- [9] 胡婷婷, 邱雁临. 原生质体紫外诱变选育纤维素酶高产菌株[J]. 化学与生物工程, 2008, 25(8): 58–60.
- [10] 武秀琴, 王敏, 等. 纤维素酶高产菌株的诱变选育[J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (23): 9817–9818.
- [11] 侯红萍, 杜文娟. 微波诱变筛选纤维素酶高产菌株[J]. 中国酿造, 2008, (24): 44–46.
- [12] 陈路劼. 降解纤维素嗜热菌的筛选及其功能基因克隆[D]. 福建农林大学, 2008.04–01.
- [13] 郭成栓.  $\beta$ -1,4-葡聚糖内切酶基因的克隆及表达[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2008, 36(12): 112–115.
- [14] 韩笑. 黑曲霉 bgl 基因的 cDNA 克隆及序列分析[J]. 生物学杂志, 2008, 25(4): 10–14.
- [15] 田长城, 许晖, 等. 黑曲霉和芽孢杆菌混合纤维素酶液的活性研究[J]. 中国饲料, 2008, (9): 26–28.
- [16] 刘薇, 徐尔尼, 等. 串珠霉与链霉菌混合发酵产纤维素酶条件的研究[J]. 中国酿造, 2008, (14): 26–29.
- [17] 杨盛. 高效降解纤维素混合菌的筛选及其产酶条件的研究[J]. 中国酿造, 2008, (21): 20–23.
- [18] 陈燕勤, 毛培宏, 等. 细菌纤维素酶结构和功能的研究[J]. 化学与生物工程, 2004, (6): 4–6.