

一组高效稳定纤维素分解菌复合系

MC1 的产酶条件

崔宗均¹, 朴哲², 王伟东¹, 苏宝林¹, 于会泳¹

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; 2. 深圳企业博士后站芭田分站, 广东 深圳 518105)

摘要: 用 CMC 糖化法和纤维素减量法探讨了对一组高效稳定的纤维素分解细菌复合系 MC1 的产酶条件。结果表明, 在 6 种纤维素材料中, 可直接利用的天然纤维素含量高的 C 源(如滤纸、棉花)存在下表现出高活性; 利用蛋白胨和酵母粉作 N 源时的纤维素酶活性远高于硝酸铵、尿素等无机 N 源; 以滤纸和酵母粉作为惟一 C、N 源时, 最适发酵浓度分别为 0.5% 和 0.125%, 其产酶最高峰均出现在发酵第 5 d。MC1 最适纤维素分解温度为 55℃, 但 60℃ 以上的高温抑制 MC1 纤维素分解酶; MC1 的最适氧气浓度为 0.01 ~ 0.04 mg · L⁻¹, 过高过低的氧气浓度均抑制纤维素分解。MC1 的微好氧特点对堆肥工程降低生产成本具有重要意义。

关键词: 纤维素分解菌; 复合系; 产酶条件

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 - 2043(2004)02 - 0296 - 04

Conditions of Cellulase Production in the Presence of Microbial Consortia MC1 Capable of Degrading Cellulose with High Efficiency

CUI Zong-jun¹, PIAO Zhe², WANG Wei-dong¹, SU Bao-lin¹, YU Hui-yong¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Post Doctor Fellow Shenzhen, Songgang, Shenzhen 518105, China)

Abstract: The conditions of cellulase production of microbial consortia MC1 capable of degrading cellulose with high efficiency were investigated with CMC saccharogenic powder and gravimetry. The microbial consortia MC1 could directly degrade carbon source with high native cellulose content (such as filter paper and cotton). It has been found that cellulase activity using peptone and yeast powder as nitrogen source was higher than that using inorganic nitrogen source, such as urea and ammonium nitrate. The optimum fermentation concentrations using filter paper and yeast powder as sole carbon and nitrogen source were found to be 0.5% and 0.125%, respectively, and the highest level of cellulase was discovered at the fifth day after inoculation. The optimum temperature for degrading cellulose was 55℃, but the cellulase activity was inhibited when the temperature was over 60℃. The optimum oxygen concentration of MC1 was 0.01 ~ 0.04 mg · L⁻¹ and either higher or lower oxygen concentration was not available to degradation of cellulose. It may be promising and important for the characteristic of microaerobe of MC1 in decreasing the cost of composting engineering.

Keywords: cellulose degrading bacteria; composition of microbial consortia; conditions of cellulase production

纤维素是地球上最丰富的生物资源,约占植物总干重的 1/3 ~ 1/2^[1]。纤维素的生物分解对开辟新能源和防止污染环境有重要意义。因此,一直是生物技术领域研究的重点^[2,3]。但纤维素结构复杂,纯培养微生物难以有效地分解它。近年在纤维素生物分解中多种菌的协同作用逐渐引起人们的重视。笔者等曾从 4

种高温堆肥中,分离了 4 组纤维素分解菌群,又将其组合并用多种限制性培养技术分离构建成一组分解能力强而稳定的纤维素分解菌复合系 MC1^[2]。该复合菌系在 50℃ 静止液体培养下,48 h 把 0.5 g · 100 mL⁻¹ 滤纸崩解溶化,8 d 把 2 g · 100 mL⁻¹ 稻草分解成糊状,其分解能力在连续继代培养下已维持 2 a 以上。MC1 把自然界多种微生物的协同作用再现于人工培养物中,并可能成为比自然界的更稳定、分解效率更高的细菌群体。

因纤维素结构复杂,能够分解纤维素的酶是由多

收稿日期: 2003 - 06 - 22

基金项目: 国家教育部留学基金; “863 计划”(2002AA245031)

作者简介: 崔宗均(1957—),男,博士,副教授,主要研究方向为有机物微生物分解及有机废弃物资源再利用。

E-mail: acuizj@cau.edu.cn

个组分构成的复合酶。不同来源纤维素复合酶的酶成分不同,其酶活和分解能力也不相同^[3-5]。CMC 糖化力法是目前较常用的纤维素酶活测定手段,但微生物的培养条件和酶活测定条件对所测的酶活影响甚大。本文将报告以 CMC 糖化力法测定的 MC1 的纤维素酶活特性及诸培养条件对产酶的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

由本研究室分离构建的纤维素分解菌复合系 MC1^[2]。

1.2 培养条件

蛋白胨纤维素培养液 (PCS): 0.5% 蛋白胨, 0.5% 纤维素 (新华滤纸), 0.5% NaCl, 0.2% CaCO₃, 0.1% 酵母粉。无特别说明时培养体积为 100 mL, 接种量 5%, 55 °C 静止培养, 使处于 DO(溶氧量) 为 0.02 ~ 0.04 mg · L⁻¹ 的微好氧条件。

1.3 纤维素酶测定方法 (CMC 糖化力法)

详见文献[6]。

1.4 分解底物 C 源的种类和浓度对 MC1 纤维素酶活的影响

1.4.1 C 源种类的影响

分别以 0.5% 的葡萄糖、羧甲基纤维素 (CMC)、棉花、滤纸、麦秆、锯末作 1.2 节的 PCS 中纤维素 C 源, 培养 2 d 和 5 d 后用 CMC 糖化力法测定纤维素酶活; 再将用同样方法培养 5 d 的培养物, 5 000 r · min⁻¹ 离心, 倒上清液, 用盐酸和硝酸的混合液冲洗而消除菌体^[7], 离心, 清水洗, 离心, 105 °C 烘干后称重, 计算失重量和失重率。

1.4.2 C 源浓度的影响

分别以 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 4% 的滤纸作为惟一碳源制作 PCS, 55 °C 静止培养 72 h 后, 用 CMC 糖化力法测定纤维素酶活。

1.5 培养基 N 源的种类和浓度对 MC1 纤维素酶活的影响

1.5.1 N 源种类的影响

以 0.1% 的硝酸铵、尿素、硫酸铵、牛肉膏、蛋白胨、酵母粉分别作 1.2 节的 PCS 中纤维素 N 源, 培养 72 h 后用 CMC 糖化力法和滤纸 (FP) 糖化力法测定纤维素酶活。其中滤纸糖化力法是酶活测定反应中的碳源换为滤纸。

1.5.2 N 源浓度的影响

以 0.125%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2% 的滤纸作为

惟一碳源分别制作 PCS, 55 °C 静止培养 72 小时后, 用 CMC 糖化力法测定纤维素酶活。

1.6 培养温度对 MC1 纤维素酶活的影响

制作 0.5% 的滤纸作 C 源的 PCS, 培养温度分别设置为 30, 40, 50, 55, 60, 70 °C, 培养 72 h 后测定 CMC 糖化活性和减重活性 (1.4.1 节)、pH 值及培养液 OD 值。

1.7 培养液的溶氧量对 MC1 纤维素酶活及生长量的影响

向 4 只直径 6 cm 的圆柱形广口瓶中加入 PCS 培养基, 液深分别设置 2, 4, 6, 8 cm, 浸在培养液中的滤纸重量达到 0.5%, 55 °C 静止培养 72 h 后, 测定纤维素酶活 (CMC 糖化力)、溶氧量 (用上海 JPM-607 型测定)、pH 值; 取 2 组 150 mL 三角瓶中加入 100 mL PCS 培养基, 以 0.5 g 滤纸为碳源, 一组在 55 °C 静止培养, 另一组在 55 °C、150 r · min⁻¹ 振荡培养, 测定动态的生长量 (OD 值)、72 h 的溶氧量和纤维素酶活。

2 结果与分析

2.1 底物 C 源的种类和浓度对 MC1 纤维素酶活的影响

2.1.1 C 源种类的影响

MC1 在供试的所有 C 源中均能良好地生长, 但不同处理间纤维素酶活性有很大差别。6 种 C 源中对棉花和滤纸的分解活性最高, CMC 糖化活性在第 2 d 也较高, 第 5 d 更高, 滤纸的 CMC 酶活近 130 U; 用减重法测定时, 3 d 内 95% 以上的棉花和滤纸分解消失; 锯末、葡萄糖、CMC 为 C 源时, 2 种方法测得的纤维素酶活均很低 (葡萄糖和 CMC 未测减重活性); 麦秆作为 C 源时的活性介于前 2 类物质的中间, 5 d CMC 酶活近 80 U, 3 d 减重约 40%, 见图 1。在供试的 6 种 C 源中 CMC 糖化酶活与干物质失重率有很好的—致性。还可见, 除锯末外, 3 种天然纤维素作为 C 源时的纤维素分解活性显著高于葡萄糖和 CMC。

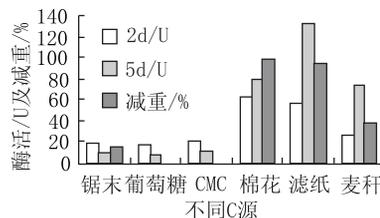


图 1 C 源的种类对 MC1 纤维素酶活的影响

Figure 1 Effects of various carbon sources on cellulase production

2.1.2 C 源浓度的影响

选择 MC1 分解活性高且便于肉眼观察的滤纸作为惟一的 C 源, 进行产酶历程实验结果, 发酵的前 5 d 所有浓度处理的纤维素酶活随着发酵时间延长而逐渐升高, 最高峰出现在发酵第 5 d。之后, 随着时间推移各处理的纤维素酶活迅速下降。在不同量(浓度)的 C 源作比较时, 以培养液的 0.5% 滤纸的分解活性最高, 其次是 0.25%, 在 1% 以上时底物量越多分解活性越低, 并不是底物越多分解活性越高, 见图 2。

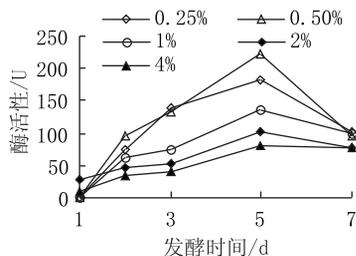


图 2 C 源浓度对 MC1 产酶效果的影响

Figure 2 Effects of concentrations of the carbon sources used on source on cellulase production

2.2 培养基 N 源的种类和浓度对 MC1 纤维素酶活的影响

2.2.1 N 源种类的影响

分别以硝酸铵、尿素、硫酸铵、牛肉膏、蛋白胨、酵母粉作为 PCS 培养基的 N 源进行发酵结果表明, 有机氮源(酵母粉、蛋白胨、牛肉膏)对 MC1 的产酶效果明显优于无机 N 源(硫酸铵、尿素、硝酸铵); 且有机复合 N 源不同处理间的差异不大, 而无机 N 源不同处理间差异较大。无机 N 源中硫酸铵处理的纤维素酶活性仅次于有机复合 N 源, 见图 3。

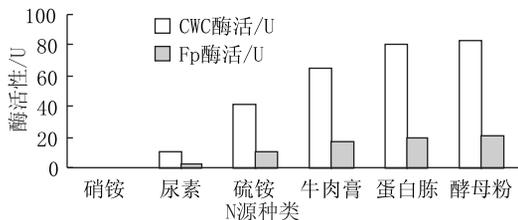


图 3 N 源种类对纤维素酶活的影响

Figure 3 Effects of various carbon sources on activities of cellulase

2.2.2 N 源浓度的影响

用不同浓度的酵母粉作惟一 N 源时, 最低浓度 0.125% 的 CMC 糖化活性最高, 从时间上发酵 1 d 后纤维素酶活随着发酵进程呈上升趋势, 发酵第 5 d 达到最高峰。当酵母粉浓度增加 1 倍到 0.25% 时纤维素酶活减到一半以下, 超过 0.5% 时, 在整个发酵过

程中几乎测不到纤维素酶活, 见图 4。但实际肉眼观察时, 酵母粉浓度 0.5% 的滤纸崩解最快, 过 72 h 后见不到滤纸的原来形状。

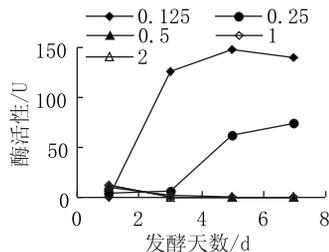


图 4 N 源浓度对纤维素酶活的影响

Figure 4 Effects of concentrations of the nitrogen sources on activities of cellulase

2.3 培养温度对产酶效果的影响

在培养温度 30 °C 下 MC1 复合菌系虽然有一定的生长量, 但测不出纤维素酶活性。随着培养温度的提高, MC1 复合菌的总生长量和纤维素酶活均迅速提高, 55 °C 时纤维素酶活性和生长量均达到最高峰, 当温度超过 60 °C, 菌的生长量和酶活开始急剧下降, 到 70 °C 时停止生长, 纤维素酶活也消失, 见图 5。由图 5 可见在不同温度条件下 CMC 糖化活性和滤纸失重率(%)的变化趋势相当一致, pH 值的变化也显示在 55 °C 时最低。说明在旺盛分解阶段 pH 值的降低和纤维素酶活升高是同步反应, 这一点在随时间的动态变化中也已证实^[2]。

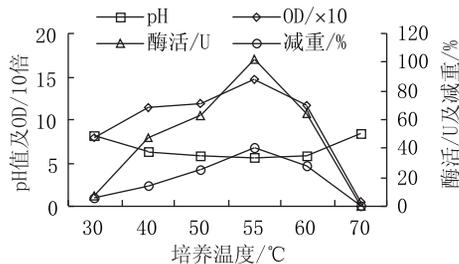


图 5 培养温度对产酶效果的影响

Figure 5 Effects of incubation temperature on cellulase production

2.4 培养液的溶氧量对 MC1 纤维素酶活及生长量的影响

设计同样直径不同液深, 控制静止培养体系的溶氧量, 来探讨了溶氧量与 MC1 纤维素酶活的关系。结果, 在发酵液深度为 2~6 cm 之间, CMC 糖化活性呈直线上升, 6 cm 时最高达 190 国际单位(U), 超过 6 cm 略微下降, 8 cm 密封时无活性。而发酵液溶氧量随液深增加而减少, 酶活最高的 6 cm 深度上为 0.01 mg · L⁻¹; pH 值也随着液体深度加深呈下降, 液深 6

cm 时 6.2, 然后不再下降, 见图 6。在外观上, 实际滤纸崩解的顺序为 6 cm 处理在 72 h 全部崩解完, 随后 8 cm 在第 4 d, 4 cm 在第 5 d 崩解, 2 cm 和 8 cm 密封处理永远崩解。说明溶氧量与 MC1 纤维素分解活性密切相关。在另一实验中, 振荡培养的 CMC 糖化活性在开始的 16 h 有微弱的测定值后完全变零, 微生物生长量也极其少, 见图 7、图 8。显然, MC1 在好氧条件下生长慢, 不分解纤维素。

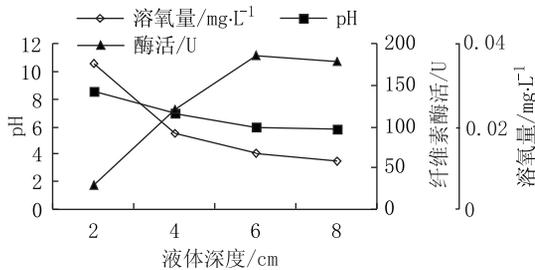


图 6 液体深度对纤维素酶活的影响

Figure 6 Effects of depth of cultivation solution on activities of cellulase

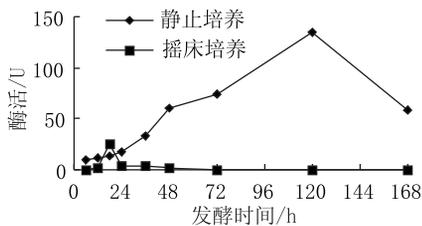


图 7 静止和振荡培养对产酶的影响

Figure 7 Effects of both static and stirring cultivations on cellulase production

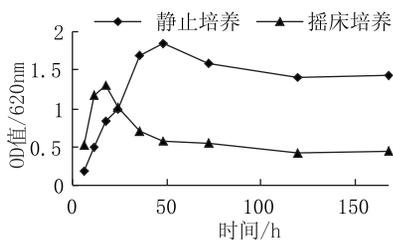


图 8 静止和振荡培养的 MC1 生长量

Figure 8 Effects of both static and stirring cultivations on MC1 biomass

3 讨论

由图 1 可见, MC1 对棉花和滤纸具有强烈的分解活性, 这一点是任何纯培养的纤维素分解菌不可比拟的^[8]。在不同来源的 C 源中可直接利用的天然纤维素含量越高, 纤维素酶活性显得越高, 似乎天然纤维素对 MC1 产纤维素酶有良好诱导的作用。而 C 源最佳发酵浓度为 0.5%, C 源过多纤维素分解活性受到抑

制, 对此有待于进一步研究。

在前人的纤维素分解菌研究中大部分培养基使用无机氮源^[3,4], 而 MC1 在有机复合 N 源中的纤维素分解活性明显优于无机 N 源。结合上述分解天然来源纤维素的分解活性, 可认为微生物的功能与它原来长期适应环境条件关系密切。MC1 原分离于旺盛发酵的堆肥样品中, 而堆肥中存在丰富的天然纤维素和有机氮源。因此进一步认为分离筛选微生物时, 把握目标应用领域的条件非常重要, 只有筛选功能对目标应用领域的各个条件有效时筛选的微生物才有价值。

在以往的纤维素分解研究中真菌类的培养条件常常是在好氧的振荡培养^[3], 细菌多为厌氧^[4,5]。而 MC1 在典型的好氧和厌氧下均不分解纤维素。只有在溶氧量 0.01 ~ 0.04 mg · L⁻¹ 的微好氧条件下才能很好地分解纤维素。这可能是多种菌复合系的一个特点, 有一定量氧气可给相对好氧的菌类提供条件, 而好氧菌类的活动减少氧气又可为相对厌氧菌创造局部厌氧, 使得多种菌协同代谢高效分解纤维素。这个特点也正适合堆肥化过程, 过多的通气不利于保持水分和温度, 不利于酶类反应, 过密闭又造成厌氧反应, 无法除臭, 堆肥发酵缓慢。同时微好氧下能够高效分解纤维素, 对降低堆肥化成本有重要意义。典型好氧堆肥^[9]成本下不来的主要原因之一在于通气费用^[10]。

参考文献:

- [1] 汪维云, 朱金华, 吴守一. 纤维素科学及纤维素酶的研究进展[J]. 江苏理工大学学报, 1998, 19(3): 20-28.
- [2] 崔宗均, 李美丹, 朴哲, 黄志勇, Masaharu Ishii, Yasyo Igarashi. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能[J]. 环境科学, 2002, 23(3): 36-39.
- [3] 山田秀明, 别府辉彦, 深沢俊夫. 微生物の機能開発[M]. 東京学会出版センター, 1998. 3-12.
- [4] Johnson EA, Sakajoh M, Halliwell G, Media A, Demain AL. Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 43: 1125-1132.
- [5] Schwarz W H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56: 634-649.
- [6] 朴哲, 崔宗均, 苏宝林, 路鹏, 王伟东. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的酶活特性[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(3): 74-79.
- [7] Updegraff D M. Semimicro Determination of Cellulose in Biological materials[J]. *Analytical Biochemistry*, 1969, 32: 420-424.
- [8] 日本セルロース学会. セルロース事典[M]. 東京: 朝倉邦造, 2000. 300-408.
- [9] Diaz L F, Savage G M, Eggert L Land Golueke C G. Composting and Recycling Municipal Solid Waste. Lewis Publishers, 1993. 121-174.
- [10] 有機質資源化推進会議. 有機廢棄物資源化大事典. 東京: 農文協. 1997: 7-50.