

高效纤维素降解菌的筛选

李振红 陆贻通

(上海交通大学资源与环境系, 上海 201101)

摘要 比较研究了刚果红脱色、滤纸崩解等几种纤维素分解菌筛选方法,并从腐木、腐竹、腐叶等样品中筛选获得4株高效纤维素降解菌,其中细菌1株(嗜纤维菌属),真菌3株(木霉菌属)。该细菌可在4d内将滤纸平板完全降解为粘质。通过改变酶解条件,确定Z-2为进一步优化对象,并进行了相应的单因子优化实验,初步确定其最佳产酶条件为:培养温度30℃,初始pH4.5,不含尿素,GLC和纤维素含量分别为0.4%和0.6%。

关键词 筛选 纤维素分解 微生物

Screening on the cellulose-decomposing microorganisms Li Zhenhong, Lu Yitong. Department of Landscape and Environmental Science, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201101

Abstract: Several methods for screening on the cellulose-decomposing microorganisms, including decolour of congo red, decomposing of filter paper etc., were compared. Four strains were found from rotten wood, bamboo, leaves and soil. One is Cytophaga, which has the ability to decompose the filter paper into viscosity on the plate in four days; the others are Trichodermas. Through changing conditions for the enzyme reaction, Z-2 was decided to be the object, which should be optimized more. Then the single factor optimization of Z-2 was done, and the results showed that the optimum conditions are: the cultural temperature is at 30℃, the original pH value is 4.5, without urea, the concentration of GLC and cellulose is 0.4% and 0.6% respectively.

Keywords: Screening Cellulose-decomposing Microorganisms

植物纤维素约占植物体干重的33.4%~50%,是地球上最丰富的有机物质。但是,由于纤维素中存在许多高能的氢键,因此其水解、利用均很困难。世界上平均每年约生成1500~2000亿t植物性有机物,其中约有一半为纤维素类物质,仅能利用一小部分。绝大部分都被弃置^[1],因此如何更有效地开发和利用纤维素资源已成为当今世界的热门课题之一。能够降解纤维素的微生物有很多,可是目前的研究却大多集中在有限的几个菌株上,如康宁木霉、里氏木霉等。然而这些菌株仍然存在着产酶成本高,酶活性不稳定,作用pH范围狭窄等问题。因此寻找更多、更高效、作用范围更广泛的新菌种是十分必要的。作者研究比较了几种纤维素降解菌筛选方法,并从自然界筛得高效纤维降解细菌1株,真菌3株。该细菌可在4d内将滤纸平板完全降解为粘质,初步鉴定为嗜纤维菌属。此外,3株真菌均为木霉菌,降解活性也很高,其中一株在发酵培养第6d,滤纸酶活(FPA)即可达到51U/mL。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

采集到腐木、腐竹、腐叶及土样共10份。

1.2 培养基

以下培养基均在1.05 kg/cm²、灭菌20 min后使用。

斜面培养基 细菌:Hutchinson 滤纸斜面培养基;真菌:PDA 斜面培养基。

分离筛选培养基 Dobus 培养基,Hutchinson 滤纸平板;刚果红平板培养基(g/L)^[2];MC-Na 平板培养基1(g/L)^[3];MC-Na 平板培养基2(g/L)^[4]。

液体摇瓶培养基 细菌:CMC-Na 培养基(g/L)^[4];真菌:参阅文献[3]。

1.3 滤纸前处理

1%稀醋酸浸泡一夜,用碘液检查是否有淀粉,若已去除完全,则用2%苏打水冲洗至中性,干热灭菌后备用。

1.4 培养方法

分离筛选路线 分离筛选路线见图1。

液体培养方法 将菌种接种于含有10 mL Dobus 培养基的试管中培养14 d,或接种于50 mL 培养基的300 mL 三角烧瓶中,在30℃、180 r/min 条件下培养6 d。

平板培养方法 初筛时采用点种法将样品点种在平板的中央;分离时采用稀释混匀法。刚果红脱色

第一作者:李振红,女,1978年生,2000年毕业于安徽大学生物系微生物专业,上海交通大学在读硕士。

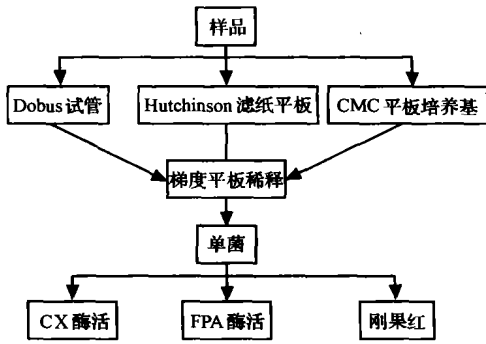


图 1 分离筛选路线

实验中,用 $\Phi = 6 \text{ mm}$ 的打孔机,从生长均匀的平板上打孔,获得均一大小的琼脂块,然后将其置于刚果红平板中央。30 C 条件下培养 5 d。

1.5 测酶方法

标准曲线的绘制 DNS 法^[5]绘制标准曲线。

粗酶液的制备 真菌:取新鲜发酵液 10 mL, 4000 r/min 下离心 10 min, 上清液即为粗酶液;细菌:直接取新鲜发酵液作为粗酶液。

CX 酶活力测定 移取含有 0.5% CMC-Na 的醋酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 4.4) 1.5 mL 于试管中,加入酶液 0.5 mL,于 50 C 保温 30 min 后,按 DNS 法测糖。在上述条件下,定义每分钟催化纤维素水解生成 1 μg 葡萄糖的酶量为一个酶活力单位 U。

滤纸酶活(FPA)的测定 将新华 1 号滤纸(1 cm \times 6 cm)卷成小卷,放进试管内,加入 1.5 mL HAc-NaAc 缓冲液(pH=4.8),再加入 0.5 mL 酶液,轻轻摇匀,使滤纸完全浸泡在液体中,50 C 保温 1 h 后,按 DNS 法测糖。在上述条件下,定义每分钟催化纤维素水解生成 1 μg 葡萄糖的酶量为一个酶活力单位 U。

1.6 酶学性质研究

在不同 pH 和温度条件下测定 FPA,进一步了解酶反应特性。

1.7 最佳产酶条件研究

改变培养条件,添加不同物质,分别测定 FPA,力求找到较好的产酶条件。

2 结果与讨论

2.1 菌株的初筛

从采集的样品中共分离得到细菌 3 株,分别命名为 X-1、X-2、X-3;真菌 12 株,分别命名为 Z-1、Z-2……Z-12。其中 X-1 和 Z-2、Z-3 系来自于同一个样品,即腐烂的竹片。

在初筛过程中共使用了 3 种培养基,其中

Dobus 和 Hutchinson 培养基以处理后的滤纸作为限制性碳源,而 CMC 平板培养基以羧甲基纤维素为限制性碳源。筛选结果表明,以滤纸为碳源时,其上可生长的微生物种类繁多,细菌、真菌、放线菌均有所生长,而以羧甲基纤维素为碳源时,生长的微生物较少,且绝大部分是真菌类。可见以滤纸作为初筛碳源可取得较好的效果。

2.2 酶活的测定

2.2.1 GLC 标准曲线

用 DNS 法,在波长为 520 nm 条件下,测定一系列已知样品,制备标准 GLC 曲线,制备过程见表 1,绘制结果见图 2。

表 1 葡萄糖标准曲线测定结果

| | 空白 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 含糖总量/mg | 0 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 1.2 | 1.4 |
| 葡萄糖液/mL | 0 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 1.2 | 1.4 |
| 蒸馏水/mL | 2.0 | 1.6 | 1.4 | 1.2 | 1.0 | 0.8 | 0.6 |
| DNS 试剂/mL | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| 加热 | 均在沸水中加热 5 min | | | | | | |
| 冷却 | 立刻用流动水冷却 | | | | | | |
| 蒸馏水/mL | 21.5 | 21.5 | 21.5 | 21.5 | 21.5 | 21.5 | 21.5 |
| 光密度/O.D. | 0.000 | 0.264 | 0.427 | 0.592 | 0.754 | 0.811 | 1.112 |

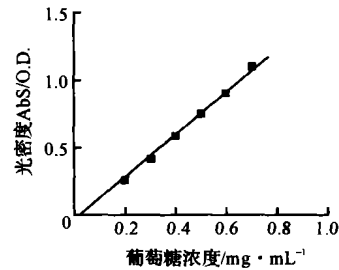


图 2 葡萄糖标准曲线

2.2.2 测酶结果与讨论

将初筛获得的菌株分别接种至摇瓶培养基中,6 d 后分别测 CX 和 FPA 相应酶活,测定结果见表 2。

表 2 脱色及 CX 和 FPA 活力测定结果

| 菌种 | CMC 酶 | FPA | 透明圈 /直径 | 菌种 | CMC 酶 | FPA | 透明圈 /直径 |
|-----|--------------------------|--------------------------|------------|------|--------------------------|--------------------------|------------|
| | /U · mL ⁻¹ | /U · mL ⁻¹ | | | /U · mL ⁻¹ | /U · mL ⁻¹ | |
| X-1 | 14 | 9 | 1.1 | Z-6 | 24 | 17 | 1.2 |
| X-2 | 16 | 11 | 1.3 | Z-7 | 85 | 29 | 2.8 |
| X-3 | 10 | 7 | 1.0 | Z-8 | 24 | 15 | 1.2 |
| Z-1 | 18 | 22 | 1.5 | Z-9 | 60 | 27 | 2.5 |
| Z-2 | 73 | 35 | 3.4 | Z-10 | 12 | 24 | 2.3 |
| Z-3 | 54 | 29 | 2.0 | Z-11 | 22 | 19 | 1.1 |
| Z-4 | 22 | 18 | 1.5 | Z-12 | 24 | 26 | 3.0 |
| Z-5 | 55 | 24 | 1.2 | | | | |

由表 2 可以看出,与真菌类相比,细菌的酶活普遍偏低,与它们在滤纸平板上较高的分解速度不匹配。例如 X-2 菌在滤纸平板上,4 d 内即可将滤纸完全降解为透明的粘质,而测出的酶活却只有十几

个单位每毫升,据分析这与细菌降解纤维素的机理有关。真菌降解纤维素是依靠分泌大量的胞外酶进行的,因此测定酶活时只需收集发酵上清液作为粗酶液即可,而大多数细菌对纤维素的降解并非是靠胞外酶进行的,有些细菌甚至需要附着在纤维上,才能将其慢慢降解,因此采用细菌发酵液直接测定酶活显然是不可靠的^[5]。由于滤纸是聚合度和结晶度都居中等的纤维材料,因此能够较真实地反映天然纤维素的情况,以其为底物测得的酶活可以用来表征纤维素酶系的总糖化能力,反映了3类酶组分的协同作用^[6]。1984年,国际理论和应用化学协会的发酵委员会确认滤纸酶活力测定法为纤维素酶活力测定标准方法。但是由于滤纸酶活的测定存在着测定时间长,操作烦琐等问题,因此在筛选过程中常常采用CX酶活力代替FPA。据文献^[6]报道CX与FPA之间存在着很好的一致性,可是从上表列出的结果来看,这两者之间的一致性并不是很强,特别对一些CX酶活力较低的菌种,例如:Z-1,Z-4,Z-10,Z-12,其FPA并不是特别低。经分析认为,CX与FPA之间良好的一致性往往是针对某一种酶,而非一个酶系而言的。

2.3 刚果红脱色实验结果

从表2可看出,脱色圈与直径的比值同FPA之间的一致性较好,如果用来作为初筛培养基,可以很快识别出纤维降解能力的高低,大大方便了筛选。但是染料浓度的高低、每皿中培养基的多少常常会导致培养基本身的背景值大小不一,因此限制了观察的效果。在实际操作中,应对这两点加以注意,力求在同等背景条件下进行观察。

2.4 酶解条件与酶活的关系

选择作用效果较好的菌Z-2、Z-3、Z-7进一步检测酶解条件对酶活力的影响。从图3可以看出,Z-7在pH从3.6到5.6范围内酶活均较稳定,而Z-2和Z-3则仅在pH从4.0到5.2之间比较稳定。图4表明了酶解温度对酶活力的影响,3种菌在40℃到55℃范围内酶活力均较稳定,高于55℃酶活力的下降会很快,这与一些报告^[7]相符,说明大多数纤维素酶由于受自身性质的限制,其最适作用温度往往低于60℃。

2.5 产酶条件优化结果

根据前述工作选定Z-2作为进一步优化菌株。在原始培养基基础上,改变培养温度、pH、尿素含量、纤维素含量、GLC含量,进行单因子优化实验,并测定相应酶活,所得结果如表3。

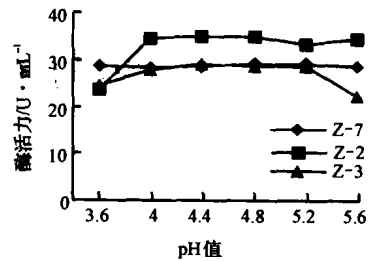


图3 酶解 pH 对酶活的影响

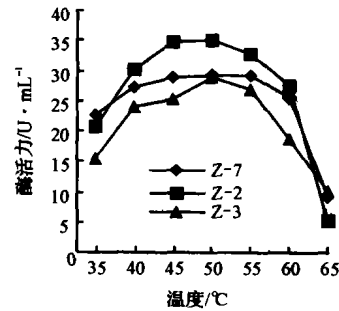


图4 酶解温度对酶活的影响

表3 优化实验结果

| 温度 / °C | 酶活 / U·mL ⁻¹ | pH | 酶活 / U·mL ⁻¹ | 尿素 / % | 酶活 / U·mL ⁻¹ | GLC / % | 酶活 / U·mL ⁻¹ | 纤维 / % | 酶活 / U·mL ⁻¹ |
|---------|-------------------------|-----|-------------------------|--------|-------------------------|---------|-------------------------|--------|-------------------------|
| 25 | 31 | 4.0 | 31 | 0.03 | 36 | 0.05 | 37 | 0.1 | 14 |
| | | 4.5 | 40 | 0.06 | 30 | 0.1 | 41 | 0.2 | 13 |
| | | 5.0 | 32 | 0.12 | 25 | 0.2 | 39 | 0.4 | 19 |
| 30 | 35 | 5.5 | 35 | 0.24 | 16 | 0.4 | 51 | 0.6 | 36 |
| | | 6.0 | 35 | 0.48 | 7 | 0.8 | 22 | 0.8 | 43 |
| 35 | 22 | 6.5 | 29 | 0.96 | 5 | 1.0 | 17 | 1.0 | 47 |

表3表明,尿素的含量越高对菌株的产酶越不利,这与报道^[7]具有一致性。适当的GLC可以促进菌株的生长,对产酶有利,但是过多的GLC却会抑制酶的产生,显然该现象与负反馈机制有关。同时,由于真菌产生的纤维素降解酶属于诱导酶类,因此适当的增加底物会有效地刺激菌株产酶,但是纤维含量与酶活并非成正比,当纤维素含量达到0.5%以上时,酶活增加就已经不再明显。

3 结论

(1) 筛选获得嗜纤维菌属细菌1株,木霉属真菌3株,均具有很高的纤维素降解能力。其中细菌可在4d内将滤纸平板完全降解为粘质。

(2) 以滤纸作为碳源进行筛选可以更有效地衡量菌株对纤维素的降解能力,其筛选效果优于直接以CMC作为碳源进行的筛选,且FPA可以更好地反映对纤维素的降解能力。

(下转第153页)

小。过大的空调器虽然可使室内干球温度快速下降,但与此同时也增加了墙内湿积累,进而增加了霉菌污染的机会。

除温度和湿度外,霉菌的食物来源也是引起霉菌繁殖的重要因素^[4,5],这些食物来源为普遍用于建筑物的建筑材料,例如,子囊菌类便是以发生化学变化的建筑材料为食物来源的霉菌。因此,须进行建筑材料的改革,在材料中掺入抑制菌类繁殖而对人体不构成危害的物质,从而减少霉菌污染源。此外,用杀虫剂定期清理各种表面可以有效控制室内微生物污染。

建筑物中过大的湿含量将加速霉菌的蔓延,当湿含量为 7 g/kg 时,微生物的浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$,当湿含量的值大于 15 g/kg 时,其浓度达到 2080 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。因此,建筑结构内湿度大不仅为霉菌等微生物的繁殖提供了有利条件,而且导致建筑材料的结构损坏,引起建筑材料发生化学变化,为霉菌提供了广泛的食物来源。建筑物内霉菌一旦产生,要想根除几乎是不可能的^[6],因此,控制室内霉菌污染应从建筑物的设计、建筑材料的选取、空调系统的通风设计等入手^[7],把霉菌污染控制在最低水平。

4 结 论

基于对建筑墙体内湿气迁移过程的研究,详细分析了霉菌污染产生的原因。实例分析则通过夏、冬两季平均气候条件下的实际计算,得出了相应工况下沿墙厚度温度分布、相对湿度分布及湿积累量等重要规律。计算结果表明,建筑物墙内的湿积累量较大,为霉菌的生长与繁殖提供了有利的环境条件。特

别是在热湿气候地区,随着时间的延续墙内的湿气含量越来越大,从而加剧了人居环境内的霉菌污染程度;因而在建筑设计及施工中不容忽视。反之,通过利用湿度控制策略,这一问题可以得到缓解。

室内空气品质目前的标准仍有许多是基于常识而不是基于科学制定的,在我国仍缺乏综合考虑室内空气品质问题的建筑。通过热流和水蒸气流迁移过程的分析,可以提出相应对策来控制暖通空调系统和建筑围护结构的湿度以减少霉菌生长。因此,控制室内霉菌污染要从建筑设计之初进行充分考虑,以免对空调设计提出过高要求。如何将室内空气品质问题综合考虑到建筑设计和维护工作的具体实施中,以及其实施效果如何等方面仍需进一步探讨。

参考文献

- 1 Shakin W. The causes and control of mold and mildew in hot and humid climates. ASHRAE Transactions, 1992, 98(1):1282~1292
- 2 Tenwolde A. Steady-state one-dimensional water vapor movement by diffusion and convection in a multilayered wall. ASHRAE Transactions, 1985, 91(1A):322~342
- 3 林瑞泰. 多孔介质传热传质学. 北京:科学出版社,1995
- 4 Lotz W A. Moisture problems in buildings in hot humid climates. ASHRAE Journal, 1989, 31(4):26~27
- 5 Carpenter S. Waterloo region green home. ASHRAE Journal, 1996, 38(10):43~46
- 6 Gottfried D A. Green building environmental control: a case study. Heating/Piping/Air Conditioning, 1997, 69(2):71~78
- 7 Molhave L. Volatile organic compounds, indoor air quality, and health. Indoor Air, 1991, (1):357~376

责任编辑:闵 怀 (收到修改稿日期:2002-09-28)

(上接第 135 页)

(3) 刚果红脱色平板可以有效地衡量微生物对纤维素的降解能力,并通过脱色圈/直径比的形式表现出来,但是效果的明显与否常常受背景影响较大,因此在实际操作中应力求背景值的统一。

(4) 对所研究菌种来说,在 pH 为 4.0~5.2 范围内,酶解 pH 对酶活力影响不大,但是当温度高于 55 $^{\circ}\text{C}$ 时,酶活下降迅速。

(5) 通过单因子优化实验得出 Z-2 菌的最佳产酶条件:培养温度 30 $^{\circ}\text{C}$; 初始 pH 4.5; 不含尿素; GLC 含量 0.4% 左右; 纤维素含量 0.6% 左右。

参考文献

- 1 许修宏,肖玉珍,陈建平等. 高效纤维素分解菌分离筛选的研究.

东北农业大学学报,1998,29(4):330~333

- 2 王淑军,扬从发,陈 静. 用于降解秸秆的纤维素酶产生菌的筛选研究. 粮食与饲料工业,2001,49(12):21~23
- 3 李日强,辛小芸,刘继青. 天然秸秆纤维素分解菌的分离选育. 上海环境科学,2002,21(1):8~11
- 4 石晶瑜,张 功. 分解纤维素菌 HT₃ 的筛选及酶活测定. 内蒙古师大学报自然科学,1998,27(1):66~68
- 5 傅 力. 纤维素酶测定方法的研究. 新疆农业大学学报,2000,23(2):45~48
- 6 李亮亮,牛 森. 纤维素酶活力测定方法的比较研究. 辽宁农业科学,2001,(4):16~18
- 7 张加春,王权飞,余尊祥. 里氏木霉的纤维素酶产生条件研究. 食品与发酵工业,2000,26(3):21~23

责任编辑:陈泽军 (收到修改稿日期:2002-10-25)