

纤维素降解菌株的筛选及其产酶条件优化

高星爱¹, 黄泉¹, 张永锋¹, 赵新颖¹, 程孟秋², 刘鹏¹, 刘思言²

(1. 吉林省农业科学院, 吉林长春 130033) (2. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林长春 130118)

摘要: 为了寻求快速有效降解沼气发酵有机质中的高分子化合物, 本实验从腐殖质土壤中筛选到一株高效降解纤维素菌株, 在以羧甲基纤维素钠为唯一碳源的液体培养基中培养, 所产生的纤维素酶对玉米芯和滤纸均表现出较强降解能力。其次做了对菌株培养条件优化的实验, 结果表明, 菌株的最佳降解纤维素条件为反应温度 30℃、发酵液接种量为 1%、0.75% 羧甲基纤维素钠为碳源、1.5% 胰蛋白胨为氮源, 优化菌株培养条件后, 纤维素酶活力增加了 2.8 倍。

关键词: 纤维素降解菌; 筛选; 酶活性; 培养条件优化

文章编号: 1673-9078(2012)11-1500-1503

Studies on Screening of Methane Fermentation Cellulose degrading Bacteria and its Optimization of Culture Conditions

GAO Xing-ai¹, HUANG Xiao¹, ZHANG Yong-feng¹, ZHAO Xin-ying¹,
CHENG Meng-qi², LIU Peng¹, LIU Si-yan²

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, 130033, China)

(2. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: In order to be effective, rapid degradation of organic polymer compound biogas fermentation, from soil degradation to a plant screening high efficiency degradation cellulose strain. In sodium carboxyl methyl cellulose as the only carbon source of liquid medium training strains, the cellulose enzyme produced for several and filter paper are show have better degradation ability. Next to the optimization of the strains of the culture condition experiment results show that the best cellulolytic strains of the conditions for the reaction temperature 30℃, fermented liquid 1% inoculated quantity, carbon source sodium carboxyl methyl cellulose 0.75%, had 1.5% nitrogen pancreatic specially designed, and so on. Optimization strains after the culture condition, cellulose enzyme activity has increased 2.8 times.

Key words: cellulose-degrading bacteria; screening; enzyme activity; optimization of culture conditions

我国的纤维素资源十分丰富, 是自然界中存在量最大的可再生能源。全世界每年产农作物秸秆近 2000 亿 t, 中国每年达 6 亿 t 以上, 是人类活动中不可缺少的基本物质^[1]。它是以葡萄糖以糖苷键连接的长链多聚体, 具有高强度的网状结构, 是一种难分解的成分。因此对它的开发利用却有限, 从而造成了资源的浪费。若能把废弃物中的纤维素转化为简单糖类, 即可以解决环境污染问题, 又可以作为沼气发酵原料, 有效缓解当前的能源危机, 所以国内外对微生物分解转化农作物秸秆中的纤维素研究极为重视^[2]。

收稿日期: 2012-06-27

基金项目: 吉林省科技厅国际合作项目(20120755); 吉林省博士后科技项目(93660)

作者简介: 高星爱(1978-), 女, 博士, 助研, 研究方向: 从事能源微生物与生物质资源综合利用研究

通讯作者: 刘思言(1979-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 从事生物技术研究

目前生物纤维素酶的研究主要表现在降解纤维素菌株的筛选及反应条件优化^[1-3]、纯化^[4-6]、分解机理^[3]、发酵工艺^[7-8]、生物炼制^[5]、应用^[4-6]等方面。但实际应用中, 驯化高酶活性、高效率的降解纤维素菌种至关重要。因此, 本文利用在自然环境中筛选分离到的纤维素分解菌株, 通过玉米芯和滤纸降解能力的表现, 优化了其中之一的菌株培养反应条件, 为实际沼气生产中有效的处理粪便、秸秆等提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取腐熟好的猪粪、牛粪、秸秆、沼气发酵池等周边环境的土壤, 采集的样品放入塑料袋中, 封口, 置于冰箱中 4℃ 条件下保存。

1.2 菌种的筛选及培养基组成

1.2.1 菌种的筛选

制备 1% 的土悬液, 震荡培养 30 min。吸取 0.1 mL

土悬液,涂布于细菌固体培养基上,在 30 ℃条件下培养,进行划线分离单菌落^[6],纯化培养并保存。

1.2.2 细菌培养基(LB培养基 g/L)组成

酵母 5.0 g,胰蛋白胨 10 g,氯化钠 10 g,琼脂 20 g,pH6.8~7.2,用蒸馏水定容至 1000 mL。

1.2.3 纤维素分解细菌的鉴定培养基

羧甲基纤维素钠 5 g,胰蛋白胨 10 g,氯化钠,琼脂 20 g,H₂O 1000 mL。将菌种划线培养于羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为唯一碳源的固体培养基的上述平板,30 ℃培养 2 d后在培养皿中加少许 1 M NaCl 溶液固定菌群,随后用 1%刚果红染色,静置 10 min,观察透明圈产生的清晰度。

1.3 测定方法

1.3.1 细胞生长曲线的测定

挑取菌株单菌落,置于盛有 50 mL LB 液体培养基的三角瓶中,振荡培养 12 h,然后取 2 mL 菌悬液置入另外盛有 100 mL LB 液体培养基的三角瓶中振荡培养。每 24 h 取样一次通过分光光度法测定菌体浓度,必要时对发酵液进行适当倍数的稀释。然后以时间为横坐标,以 OD₆₆₀ 为纵坐标,绘制菌体生长曲线。

1.3.2 各项指标的测定

还原糖的测定是利用 DNS 法(3,5-二硝基水杨酸)比色法^[9]。羧甲基纤维素酶(CMC)活力和滤纸酶(FP)活力测定参照^[10]。

1.4 菌株产纤维素酶条件的优化

1.4.1 最佳培养温度的影响

挑取菌株单菌落,置于盛有 50 mL LB 液体培养基的三角瓶中,在 10℃-50℃培养 2 d,(180 r/min),每隔一定时间取发酵液,测各发酵液 660 nm 处的吸光度值和 550 nm 处的酶活性,确定最佳培养温度。

1.4.2 培养时间的影响

在最佳培养温度条件下振荡培养(180 r/min),培养 0~5 d,(180 r/min),每隔一定时间取发酵液,测各发酵液 660 nm 处的吸光度值和 550 nm 处的酶活性,确定最佳培养时间。

1.4.3 起始 pH 值的影响

按最佳培养温度、时间,分别于 0.1 M 乙酸钠(pH 5~6),三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)(pH 7~8)和碳酸氢钠(pH 9~10)等不同的缓冲液中,测定粗酶液的酶活力,确定最佳起始 pH 值。

1.4.4 接种量的影响 3.6×10⁻⁵(CFU/mL)浓度的菌分别置于 0.25~5.0%的接种量下培养,确定最适菌接种量。

1.4.5 碳源、氮源的影响

分别对 1%葡萄糖、淀粉、蔗糖、羧甲基纤维素钠、滤纸、甘露醇等 6 种碳源和 NH₄NO₃、尿素、KNO₃、

(NH₄)₂SO₄、牛肉膏、NaNO₃、蛋白胨、NH₄Cl、酵母、胰蛋白胨等 11 种氮源进行了产纤维素酶活力的比较。

2 结果与讨论

2.1 纤维素分解菌的筛选



图 1 13 种菌株的 DNS 显色效果图

Fig.1 DSN show color rendering by 13 kinds of strain

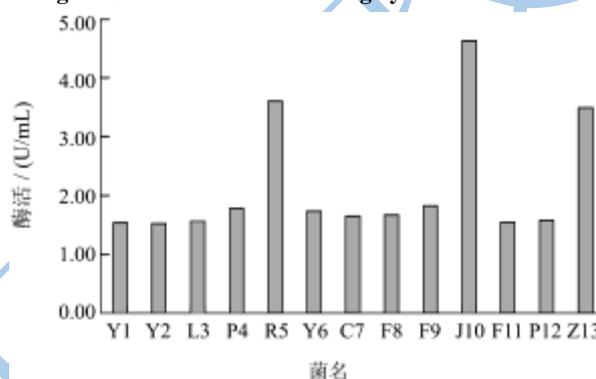


图 2 13 种菌株的 CMC 酶活性

Fig.2 CMC enzymes activity by 13 kinds of strain

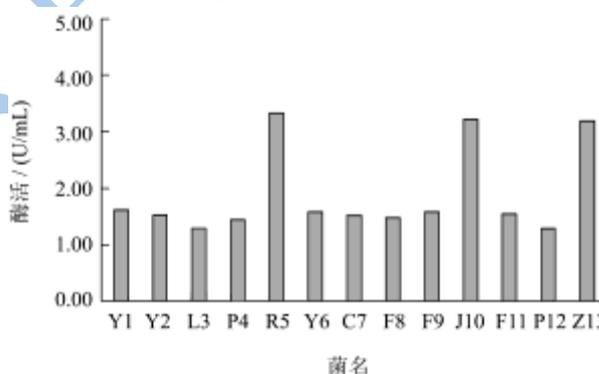


图 3 13 种菌株降解玉米芯效果图

Fig.3 Effect of corn cob degradation enzyme activity by 13 strains

在土壤选出 13 种菌株接种于以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为唯一碳源的液体培养基上培养。以滤纸为基质测定 CMC 酶活性。图 1 为 DNS 显色效果图,从图中可以看出 R5, J10, Z13 三个菌株表现为深色。图 2 中表现出 3 个菌株的 CMC 酶活性,分别为 R5, 3.6 U/mL; J10, 4.65 U/mL; Z13, 3.5 U/mL。图 3 是玉米芯为基质测定酶活性结果图。13 种菌株中 3 个优良菌株活性分别表现为 R5 3.33 U/mL; J10 3.22 U/mL; Z13 3.21 U/mL。

2.2 产纤维素酶条件的优化

2.2.1 培养时间对产酶活力的影响

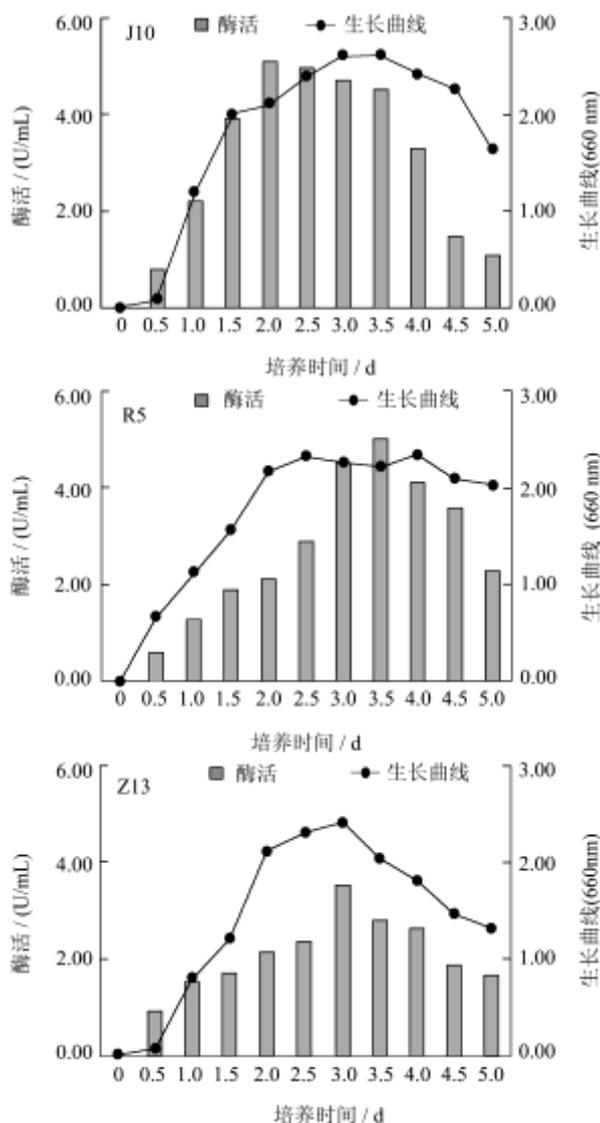


图4 J10, R5, Z13 等三种菌株的培养时间对纤维素酶活力及生长曲线的比较

Fig.4 Cellulase activity and cell growth of J10, R5, Z13 strains according to the incubation time

图4所示3种优良菌株的培养时间对酶活力及生长曲线的变化趋势。J10 菌株随着培养时间的增长,纤维素酶活性呈抛物线变化趋势,在培养2 d处酶活力达最高值,说明菌株在前2 d之内生长迅速,此后2~3 d保持相对稳定,进入生长对数期,4~5 d后菌株开始死亡分解,酶活力也明显降低。因此,J10 菌株达到最大酶活时间较短,持续产酶时间较长,从而得到最佳培养时间为2 d的菌株J10。

2.2.2 温度对产酶活力的影响

发酵温度是影响产酶的重要因素,由图5所示,温度在30℃酶活性达最高值,但温度较低时酶活降低,可能与J10菌株生长不良有关。结果表明在30℃下培养J10产酶为最佳。

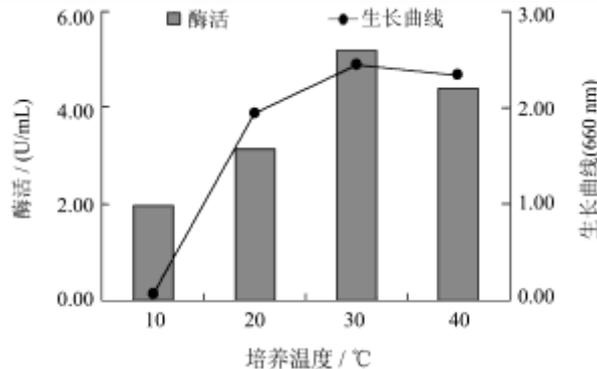


图5 菌株培养温度对纤维素酶活力及生长曲线

Fig.5 Cellulase activity and cell growth of J10 strain according to the incubation temperature

2.2.3 接种量对产酶活力的影响

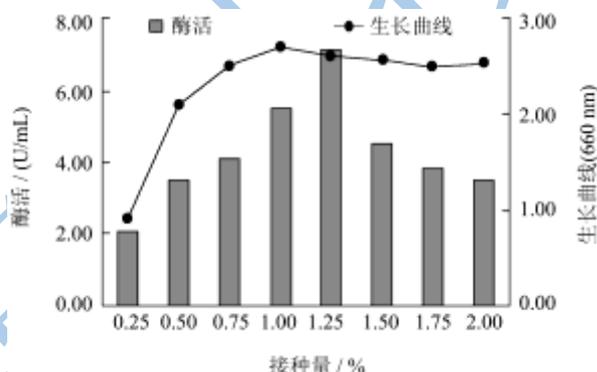


图6 接种剂浓度对产酶活力的影响

Fig.6 Effect of inoculum concentration on the production of Cellulase by J10

由图6所示,接种量为1.25%时,酶活性较高;接种量大于1.25%时,酶活性随接种量增加而降低,可能接种量增加,菌株抑制分泌纤维素酶,导致产酶活性降低。因此,最佳接种量定为1.25%。

2.2.4 最佳碳源的选择与最佳浓度对产酶的影响

表1 不同碳源对产酶的影响

Table 1 Effect of various carbon sources on the production of cellulase by J10

碳源	细胞生长曲线(660nm)	酶活/(U/mL)
葡萄糖	2.04	6.80
淀粉	2.03	4.91
蔗糖	1.97	4.03
羧甲基纤维素钠	1.95	7.20
滤纸	1.95	5.44
甘露醇	2.00	3.50

结果显示,菌株J10在以羧甲基纤维素钠为碳源的培养基中产酶能力最强(表1)。进一步研究了不同浓度CMC-Na对菌株产酶的影响,结果如图7所示,CMC-Na浓度在0.5%~0.75%时,酶的活性随着CMC-Na浓度的升高而升高,浓度为0.75%时酶活力

达到最高,增加 CMC-Na 的浓度,酶活呈现下降趋势。

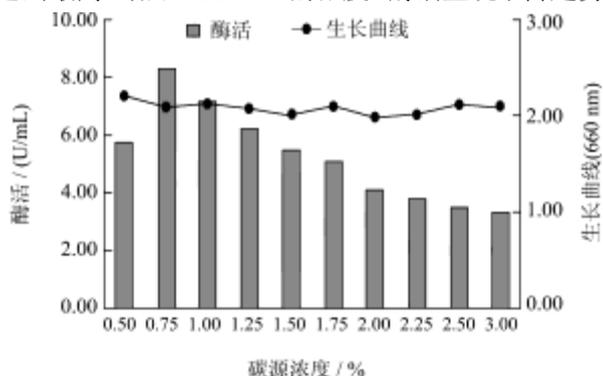


图7 最佳碳源浓度对菌株产酶的影响

Fig.7 Effect of CMC-Na concentration on the production of cellulase by J10

2.2.5 最佳氮源的选择与最佳浓度对产酶的影响

表2 不同的氮源对产酶活力的影响

Table 2 Effect of various nitrogen sources on the production of cellulase by J10

氮源种类	细胞生长曲线(660nm)	酶活/(U/mL)
NH ₄ NO ₃	1.659	3.66
尿素	1.72	3.72
KNO ₃	1.97	3.97
NaNO ₃	2.21	4.21
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.32	5.32
牛肉膏	2.34	6.34
蛋白胨	2.37	6.37
NH ₄ Cl	2.43	6.43
酵母	2.47	6.55
胰蛋白胨	2.406	8.3

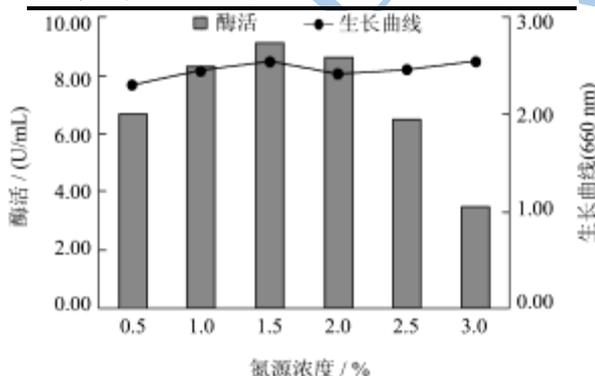


图8 最佳氮源浓度对菌株产酶的影响

Fig.8 Effect of tryptone concentration on the production of cellulase by J10

实验结果显示,菌株 J10 在以胰蛋白胨为氮源的培养基中产酶能力最强(表 2)。进一步研究了不同浓度胰蛋白胨对菌株产酶的影响,结果如图 8 所示:胰蛋白胨浓度在 0.5%~1.5%时,酶的活性随着 CMC-Na 浓

度的升高而升高,浓度为 1.5%时酶活力达到最高;其次增加胰蛋白胨的浓度,酶活力呈现下降趋势。

3 结论

通过以上试验,筛选到一株高效降解纤维素菌株 J10,以滤纸为基质测定 CMC 酶活性, J10 是 4.65 U/mL;以玉米芯为基质测定 CMC 酶活性, J10 是 3.22 U/mL。即所产生的纤维素酶对玉米芯和滤纸均表现出较强的降解能力。对菌株培养条件进行优化实验,结果表明,菌株的最佳降解纤维素条件为反应温度 30℃、1%发酵液接种量、0.75%羧甲基纤维素钠为碳源、1.5%胰蛋白胨为氮源,纤维素酶活力增加了 2.8 倍。沼气发酵前期主要是降解废弃物中的纤维素,筛选高酶活力纤维素降解菌株,对提高菌株生产能力及酶的活性和稳定性方面开展深入研究,同时优化产纤维素酶菌株的发酵条件,发挥菌株的最大生产能力,以实现降解纤维素等高分子化合物为主要成分的沼气发酵原料的目的。

参考文献

- [1] 王全,李术娜,李红亚,等.产芽孢纤维素降解细菌XN-13菌株筛选及酶活力测定[J].中国农学通报,2009,25(11):180-185
- [2] 张立静,李术娜,朱宝成.高效纤维素降解菌短小芽孢杆菌(Bacillus pumilus) T-7的筛选、鉴定及降解的研究[J].中国农学通报,2011,27(7):112-118
- [3] 岳思君,李学斌,李爱华,等.高酶活纤维素分解菌分离筛选的研究[J].安徽农业科学,2009,37(1):11-12,15
- [4] 黄金保.纤维素快速热解机理的分子模拟研究[D].四川:重庆大学,2010
- [5] 宋金涛,梁日忠.纤维素类生物质炼制燃料乙醇的多产品共生模式研究[J].现代化工,2009,29(7):80-84
- [6] 张名佳.纤维素酶高效水解、回收再用与反应机理的研究[D].天津:天津大学,2010
- [7] 崔思颖,朱明军,李晶博,等.正交实验法优选细菌纤维素的发酵工艺研究[J].现代食品科技,2009,25(12):1451-1453
- [8] 白洁瑞,李轶冰,郭欧燕,等.不同温度条件粪秆结构配比及尿素、纤维素酶对沼气产量的影响[J].农业工程学报,2009,25(2):188-193
- [9] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars [J]. Analytical chemistry, 1959, 31: 426-428
- [10] 胡丹,刘霞,雷颖.高产纤维素酶青霉菌的筛选和产酶条件的研究[J].现代食品科技,2009,23(3):14-17