

一组木质纤维素分解菌复合系的筛选及培养条件对分解活性的影响

王伟东¹ 崔宗均¹ 牛俊玲¹ 朴哲² 刘建斌¹

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100094; 2. 扬州大学 环境科学与工程学院,江苏 扬州 225009)

摘要 以麦秸垛下的土壤和麦秸堆肥为材料,利用限制性培养技术,经过多代淘汰及其不同系之间的组配,最终筛选构建了一组木质纤维素分解菌复合系。用羧甲基纤维素(CMC)糖化法和纤维素减重法研究了不同培养条件对复合系分解纤维素能力的影响。结果表明,以滤纸、棉花、稻草、CMC-Na和葡萄糖为碳源时,复合系在天然纤维素含量高的碳源(如滤纸、棉花)存在时表现出高的纤维素分解活性;利用蛋白胨和酵母粉作氮源时的纤维素分解活性远高于硝酸铵、尿素等无机氮源;以滤纸和酵母粉作为惟一碳、氮源时,最适发酵质量浓度分别为2.5和10.0 g L⁻¹,其分解活性最高峰均出现在发酵第5天。最适纤维素分解的pH为8.0。最适纤维素分解温度为60℃,大于60℃的高温抑制复合系对纤维素分解;复合系的适宜溶氧量(DO)为0.07~0.16 mg L⁻¹,过高过低的溶氧量均抑制纤维素分解。复合系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;培养条件;纤维素分解

中图分类号 S 154.39; X 712

文章编号 1007-4333(2004)05-0007-05

文献标识码 A

Construction of a composite microbial system of lignocellulose degrading and effect of cultural condition on the system capability

Wang Weidong¹, Cui Zongjun¹, Niu Junling¹, Piao Zhe², Liu Jianbin¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract A composite microbial system with capacity of degrading lignocellulose effectively was constructed by the techniques of restricted cultivation. That effect of cultural conditions on the capability of cellulose degradation of microbial community was investigated with CMC-Na saccharogenic powder and gravimetry. Composite microbial system could directly degraded carbon source with high natural cellulose content (such as filter paper and cotton). Cellulase activity using peptone and yeast powder as nitrogen source was higher than that of inorganic nitrogen source, such as urea and ammonium nitrate. The optimum fermentation concentration using filter paper and yeast powder as sole carbon and nitrogen source was 0.25% and 1.0%, respectively, and the highest level of cellulase appeared the fifth day after inoculation. The optimum temperature of degrading cellulose was 60℃, while the cellulase activity was inhibited when the temperature was more or less 60℃. The optimum pH for microbial community was 8.0. The optimum oxygen concentration for cellulose degradation was 0.07 - 0.16 mg · L⁻¹ and more or less oxygen concentration both were not contributed to degradation of cellulose. It is promising and important for the characteristic of microaerobic of composite microbial system to decrease the cost of composting engineering.

Key words cellulose degradation bacteria; composite microbial system; cultural condition; cellulose degradation

纤维素是可再生资源物质,总产量占地球植物干重的1/3~1/2^[1],所以,纤维素的分解利用对于

解决未来的能源危机与环境问题意义重大。但是,由于纤维素结构复杂,又与木质素结合形成难以分

收稿日期:2004-06-07

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(2002AA245031)

作者简介:王伟东,博士研究生;崔宗均,副教授,博士生导师,通讯作者,主要从事有机废弃物资源再利用研究,E-mail:acuizj@cau.edu.cn Tel:010-62733437

解的“木质纤维素”,纯培养微生物对其分解无能为力。在自然界,是在多种微生物的共同作用下木质纤维素被分解进入地球的碳素循环。所以,利用多种微生物的协同关系非常重要。近年来,人们重视了天然条件下微生物之间的协同关系,把这一理念应用于纤维素的微生物降解,崔宗均等^[2]曾经以4种高温堆肥为原料构建了一组高效稳定的纤维素分解菌复合系,把自然界中多种微生物协同降解纤维素的过程再现于人工培养条件下。该复合系8d可将水稻秸分解溶化,并已证明该复合系的功能、性质、组成稳定^[3],该复合系由常规平板培养可分离的菌种和难培养菌种组成。而发现复合系对筛选过程所用木质纤维素基质有一定专一性,为进一步完善复合系筛选技术,获得快速分解小麦秸秆的复合系,笔者以小麦秸秆为分解基质筛选了一组复合系,经1年多的连续继代培养证明该复合系已经稳定。本文将报道该复合系的筛选过程和碳源、氮源、pH、温度、氧含量对复合系纤维素分解活性的影响,为该材料应用于堆肥处理提供参考。

1 材料与方法

1.1 复合系的筛选

从长期堆积小麦秸秆的堆体底部和由小麦秸秆为原料的堆肥中取样,在100 mL三角瓶内装100 mL蛋白胨纤维素培养液(PCS),以1 g小麦秸秆作为碳源,瓶内放入滤纸条作为分解的外观指标,50 静止培养。当瓶内滤纸条完全分解,小麦秸秆软化时取5 mL培养液作为种子接到同样的新鲜培养基中。如此一直继代培养,淘汰失去分解能力的培养物,留下分解能力强的培养物。等留下的培养物到10代以上,仍然具有分解能力时,将培养物相互混合进行组配,继续继代培养;选择分解能力强,pH接近中性的培养物继续继代培养。培养过程中如分解能力下降,则淘汰或继续组配。经半年以上连续继代培养,选择仍保持高分解能力的培养物,进行保存和性质研究。

为了保证供试菌种的一致性,本试验中将连续继代培养的第74代培养液加体积分数为20%的甘油,分装后-70 冰冻保存,每次将其事先活化一代作为供试菌种。

1.2 培养条件

蛋白胨纤维素培养液(PCS):5.0 g蛋白胨,5.0 g纤维素(新华滤纸),5.0 g NaCl,2.0 g, CaCO₃,1.0

g酵母粉溶解在1L水中。接种量5%(体积分数),50 静止培养,使处于DO(溶氧量)为0.07~0.16 mg L⁻¹的微好氧条件。以下试验所用液体培养基体积无特别说明时均为100 mL。

1.3 纤维素分解活性测定方法(CMC糖化力法)

CMC糖化力法:见文献[4]。纤维素酶活性定义为:每分钟产生1 μg葡萄糖所需的酶量U。

重量减少法:将培养液5 000 r·min⁻¹离心15 min,倾去上清液,用盐酸和硝酸的混合液冲洗而消除菌体^[5],离心,清水洗,离心,105 烘干后称重,计算失重量和失重率。

1.4 分解底物碳源的种类和添加量对复合系纤维素分解活性的影响

1)碳源种类的影响。分别以5.0 g L⁻¹的葡萄糖、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、棉花、滤纸、稻草作1.2节中PCS的纤维素碳源,接种后50 静止培养,经24,72,120和168 h后用于测定CMC糖化活性;再将用同样方法培养72和120 h的培养物以称重法测定失重量和失重率。

2)碳源添加量的影响。分别以2.5,5.0,10.0,20.0和40.0 g L⁻¹的滤纸作为惟一碳源制作PCS,50 静止培养,测定CMC糖化活性及滤纸减重。

1.5 培养基氮源的种类和添加量对复合系纤维素分解活性的影响

1)氮源种类的影响。以1.0 g L⁻¹的硝酸铵、尿素、硫酸铵、牛肉膏、蛋白胨、酵母粉分别作PCS中的氮源,以滤纸为碳源,50 静止培养,测定CMC糖化活性及滤纸减重。

2)氮源添加量的影响。以0.5,1.0,2.0,5.0和10.0 g L⁻¹的酵母粉作为惟一氮源分别制作PCS,50 静止培养,测定CMC糖化活性及滤纸减重。

1.6 培养温度对复合系纤维素分解活性的影响

制作5.0 g L⁻¹的滤纸作碳源的PCS,培养温度分别设置为30,40,50,60,70和80 ,静止培养,测定CMC糖化活性及滤纸减重。

1.7 培养液的pH对于复合系分解活性的影响

制作5.0 g L⁻¹的滤纸作碳源的PCS,培养液pH分别调到4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0和10.0;50 静止培养,测定CMC糖化活性及滤纸减重。

1.8 培养液溶氧量对复合系纤维素分解活性影响

取4只直径6 cm的圆柱形广口瓶,加入PCS培养基,液深分别为2,4,6,8和10 cm,浸在每升培养液中的滤纸重量为5.0 g,50 静止培养。另设同

样高度处理,密闭培养。72 h 后,测定 CMC 糖化活性及滤纸减重。溶氧量测定用日本产 HORIBA OM-14 型 DO METER。

2 结果与分析

2.1 复合系的构建

利用 1.1 节描述的方法,经过 70 代以上的继代培养,得到了具有分解小麦秸秆和水稻秸秆能力的稳定的复合系。复合系 pH 调节能力强,在培养液 pH 5~9 的范围内都具有纤维素分解能力;在分解纤维素过程中,pH 先下降到 6.0 左右,此时滤纸旺盛分解,之后 pH 逐渐回升到 7~8 之间,并保持长时间稳定。在培养液滤纸添加量中 5.0 g·L⁻¹ 时,72 h 内几乎完全分解,在连续以此质量浓度添加滤纸的条件下,分解能力可持续 20 d 以上。到目前为止,经过 70 多代的继代培养,复合系各代在对培养液不同起始 pH 和发酵过程中的 pH 调节能力、滤纸分解能力上已经稳定。

2.2 培养液碳源种类和添加量对复合系纤维素分解活性的影响

1)碳源种类的影响。复合系在 5 种碳源上均能良好生长,但是在不同碳源上的纤维素分解活性差异明显(图 1)。其中以稻草为碳源在 72 和 120 h 的纤维素酶活性最高,分别为 43.5 和 53.1 U,其次是以滤纸为碳源,然后是棉花;而以 CMC 和葡萄糖为碳源的纤维素酶活极低。从这些纤维素材料的减重看,72 和 120 h 以滤纸为碳源的减重分别达到 0.485 和 0.491 g,减重率分别为 97.0%和 98.2%,为所有处理中最高的;其次为棉花和 CMC,最低的为稻草,72 和 120 h 的减重和减重率分别为 0.141 g 和 28.0%,0.147 g 和 29.4%,这应与材料本身的成分有关。总之,以天然纤维素为碳源的纤维素酶活要高于以 CMC 和葡萄糖为碳源的酶活,而且酶活

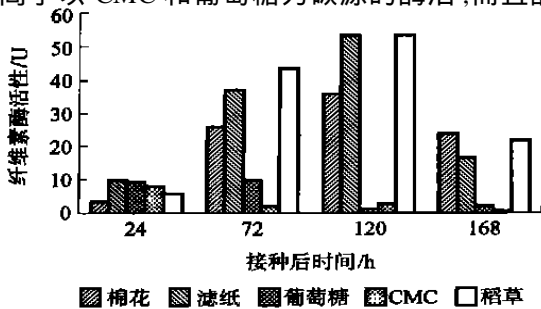


图 1 培养基碳源种类对纤维素酶活性的影响

Fig. 1 Effect of C source types on cellulase activity

与纤维素分解有很好的相关性。

2)碳源添加量的影响。以滤纸作为碳源操作方便而且便于观察。各碳源添加量下纤维素酶活随着培养时间的进行而增加,到 120 h 以后逐渐下降,所有处理均以 120 h 时的酶活最高,其中以 2.5 g·L⁻¹ 的碳源添加量纤维素酶活最高。试验还表明,随着滤纸质量增加,纤维素酶活降低(图 2)。因此,并不是碳源添加量越高纤维素酶活越高。滤纸减重是 40.0 g·L⁻¹ 的处理最大,70 和 120 h 分别为 1.638 和 1.911 g,但减重率为 41.0%和 47.8%;在减重率上以 2.5 g·L⁻¹ 的处理最高,70 和 120 h 分别为 96.4%和 98.0%。

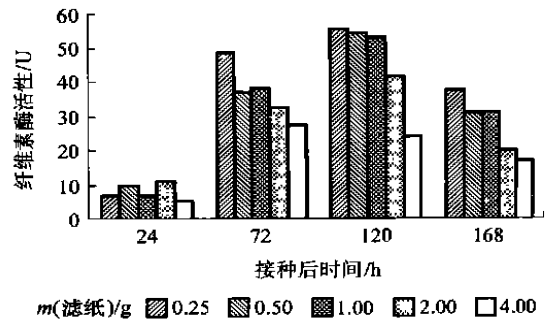


图 2 不同量的滤纸为碳源时纤维素酶的活性

Fig. 2 Effect of various C source concentrations on cellulase activity

2.3 培养基氮源的种类和添加量对复合系纤维素分解活性的影响

1)氮源种类的影响。以硝酸铵、硫酸铵、尿素、蛋白胨、牛肉膏、酵母粉为氮源的试验表明,以有机氮为氮源时纤维素的分解活性明显高于以无机氮为氮源时的分解活性,有机氮中以酵母粉为氮源的纤维素分解活性最高(图 3)。120 h 后滤纸的减重和减重率,以酵母粉为氮源时分别为 0.489 g 和 97.8%,是所有处理中最高的,以蛋白胨和牛肉膏为

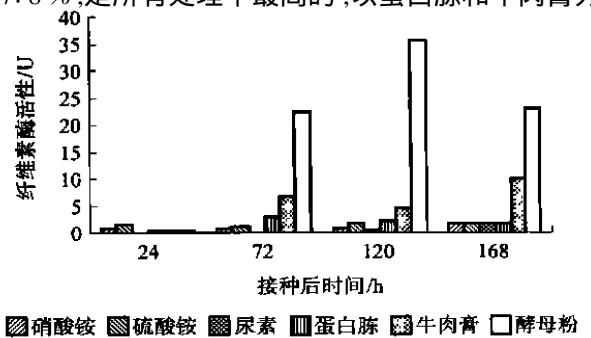


图 3 氮源对复合系纤维素酶活性的影响

Fig. 3 Effect of different N source types on cellulase activity

氮源时分别为 0.159 g 和 31.8%, 0.231 g 和 45.0%, 以无机氮为氮源时滤纸基本不降解, 所以, 此复合系适宜的氮源为有机氮。

2) 氮源添加量的影响。在以酵母粉为惟一氮源时, 各个时期随着氮源的增加纤维素酶活增加, 所有处理以添加量为 10.0 g L⁻¹ 的酶活最高。分解活性的高峰期在接种后 120 h (图 4)。滤纸的分解量也是 10.0 g L⁻¹ 处理最大, 120 h 后滤纸减重及减重率分别为 0.495 g 和 99.0%, 而以 2.0 g L⁻¹ 酵母粉为氮源的处理 120 h 后滤纸减重及减重率分别为 0.489 g 和 97.8%, 接种 168 h 后, 除了 0.5 g L⁻¹ 处理的滤纸减重比较低以外, 其他添加量差异不大。所以, 以酵母粉为惟一氮源时, 添加量不必大于 2.0 g L⁻¹。

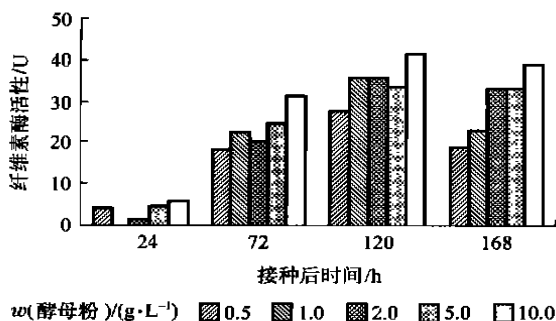


图 4 酵母粉质量浓度为碳源时的纤维素酶活性
Fig. 4 Effect of various N source concentrations on cellulase activity

2.4 培养温度对复合系纤维素分解活性的影响

在 30~80 范围内, 复合系都表现出了纤维素分解活性, 但是各处理的纤维素分解活性及滤纸分解量差异显著 (图 5)。以 60 处理的纤维素酶活为最高, 高峰期在接种后 72 h; 50 处理也具有较高的酶活, 酶峰值出现比 60 处理推迟, 在接种后

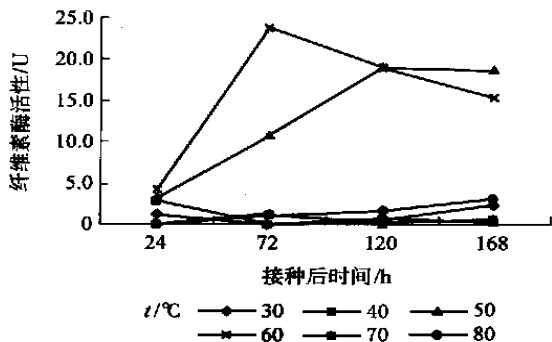


图 5 培养温度对于复合系纤维素酶活性的影响
Fig. 5 Effect of cultivation temperatures on cellulase activity

120 h; 而当温度低于 50 和高于 60 时, 纤维素酶的活性受到严重抑制。滤纸的分解量和分解率与酶活情况一致, 72 h 时 50 与 60 的处理滤纸减重分别为 0.478 和 0.492 g, 120 h 时分别为 0.489 和 0.495 g, 120 h 后二者的滤纸分解率分别为 97.8% 和 99.0%, 所以, 二者的滤纸分解量差别不显著; 而其他温度处理 120 h 后的滤纸减重都没有超过 30%。所以, 复合系适宜纤维素降解的温度范围在 50~60。

2.5 pH 对于复合系纤维素分解活性的影响

在 pH 4.0~10.0 范围内, 复合系的纤维素分解活性和滤纸的分解率差异很大。复合系最适宜的纤维素分解活性是 pH 为 8.0, 其酶活高峰在接种后 72 h, 一直到 120 h 都维持在较高的活性范围; 而 pH 为 4.0 和 10.0 时, 各个时期纤维素酶活显著低于其它处理 (图 6)。从滤纸减重和分解率看, 120 h 后 pH 8.0, 7.0, 9.0, 和 5.0 的处理滤纸减重和减重率分别为 0.491 g 和 98.2%, 0.489 g 和 97.8%, 0.424 g 和 84.8%, 0.390 g 和 78.0%, 在所有处理中以 pH 8.0 的处理当滤纸分解量最大。pH 小于 5.0 和大于 9.0 后, 纤维素酶活性和滤纸的分解量都显著下降, pH 4.0 和 10.0 的处理 120 h 后的滤纸减重仅为 0.279 和 0.282 g。所以, 此复合系比较适宜的 pH 范围在 5.0~9.0。

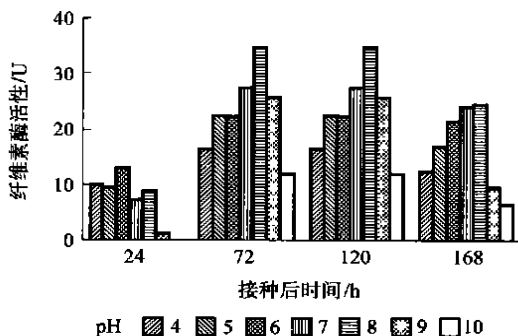


图 6 发酵液起始 pH 对复合系纤维素酶活性的影响

Fig. 6 Effect of different initial pH on cellulase activity

2.6 溶氧量对复合系纤维素分解活性的影响

从图 7 可以看出, 各培养基液体深度处理的纤维素酶活在接种后 120 h 都达到了高峰, 以 8 cm 处理的酶活最高, 其次是 6 和 10 cm 处理, 其他处理也具有较高的酶活性, 2, 4, 6, 8 和 10 cm 的溶氧量分别为 0.24, 0.16, 0.13, 0.09 和 0.07 mg L⁻¹, 所以, 此复合系在较低的溶氧量范围内保持纤维素分解能

力。另外,在同样液体深度密闭条件培养,滤纸同样可以降解,只是降解时间推迟到接种后7 d。在滤纸减重上,以8 cm处理减重率最高,达到了97.8%,4 cm以上的处理120 h的减重率都超过了80%(图8),滤纸减重率与酶活性保持一致。因此,复合系适宜的纤维素分解溶氧量范围以 $0.07 \sim 0.16 \text{ mg L}^{-1}$ 为宜。

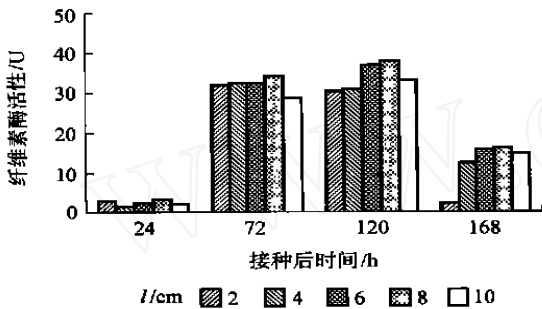


图7 溶氧量对复合系纤维素酶活性的影响

Fig. 7 Effect of different DO values on cellulase activity

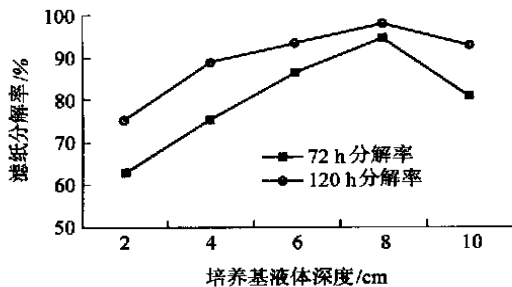


图8 不同溶氧量下的滤纸分解率

Fig. 8 Filter degradation ratio in different DO values

3 讨论

1) 从本试验中可以看出,以天然纤维素材料为碳源时,复合系的纤维素分解活性高于以容易利用的糖类为碳源时的分解活性。有人认为这是由于天然纤维素材料可以诱导复合系纤维素酶的合成^[6]。关于适宜的碳源质量浓度,研究结果表明,以 2.5 g L^{-1} 纤维素酶活和减重率最高,当滤纸增加到 40.0 g L^{-1} 时,滤纸的减重率只为 2.5 g L^{-1} 时的一半左右,所以随着滤纸含量的增加,纤维素酶活与滤纸减重率降低,适宜的碳源应在 5.0 g L^{-1} 为宜。

2) 从有机氮源与无机氮源的纤维素分解活性及滤纸减重结果分析,复合系以有机氮为氮源时的纤维素酶活及滤纸分解情况明显好于无机氮源,这与

前人在一些纤维素分解研究时利用的无机氮源不同^[7,8]。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,复合系是从纤维素含量和有机物含量极高的、旺盛发酵的堆肥及肥沃的草土混合物中分离构建得到。因此,在构建新的微生物复合菌系时,要注意其目标应用领域的条件与筛选复合系的功能一致,这样得到的微生物功能组合才有实际应用价值。

3) 环境的pH对于微生物生长代谢影响很大,一些微生物正是由于在生长过程中pH的改变导致功能的减弱和丧失^[9]。我们得到的复合系,在pH 5.0~9.0范围内,都具有高的纤维素酶活和滤纸分解活性,保证了复合系可以应用于广泛的pH范围。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^[5],细菌多为厌氧^[8,10]。而这个复合系在 $0.07 \sim 0.16 \text{ mg L}^{-1}$ 的微好氧条件相下表现出高的纤维素酶活性和滤纸分解能力,分析其原因,可能是由于复合系由多种微生物组成,在开始好氧条件下好氧微生物利用氧生长繁殖,当氧被利用到一定程度后,微好氧和厌氧微生物开始繁殖,而有研究表明纤维素在微好氧条件才能分解^[10],它们协同作用完成纤维素的分解,这充分体现了复合系的优势。复合系微好氧这一特性对于堆肥发酵过程尤其重要,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。

我们近4年的工作已经证明对微生物的富集培养物经过长期的连续限制性培养和组配,可以获得具有纯培养微生物不可比拟的功能、性质、组成稳定的复合系^[2~4],功能和性质稳定是组成稳定的反映,功能和性质稳定就可以达到应用的程度,而探明其复合系的微生物组成和结构是另一项必需而艰巨的工作。关于该复合系的主要微生物的组成,现阶段只用传统的平板分离法分离证明有5种菌落稳定存在,但它们5株混合培养物不具有分解能力,说明该复合系含有“难培养微生物”,只靠传统的平板分离鉴定技术难以描述其菌种结构。因此,正在利用DGGE、T-RFLP等分子生态学技术研究菌种组成。

(下转第44页)

容增大,阻抗相对变化值 Q 下降;

2) 冷冻鲫鱼解冻后其 Q 值 ($< 20\%$) 明显低于冰鲜鲫鱼 ($Q > 20\%$);

3) 利用伏安法测定鱼体 Q 值,可方便、有效地区别冰鲜和解冻鲫鱼。

参 考 文 献

- [1] Kitamikado M, Yuan C S, Ueno R. An enzymatic method designed to differentiate between fresh and frozen-thawed fish[J]. J Food Sci, 1990, 55:74~76
- [2] Hoz L, Yustes C, Camara J M, et al. α -Hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) differentiates unfrozen from frozen-thawed crawfish (*Procambarus clarkii*) and trout (*Salmo gairdneri*) meat [J]. Int J Food Sci Technol, 1992, 27:133~136
- [3] Barbagli C, Crescenzi S. Influence of freezing and thawing on the release of cytochrome oxidase from chicken's liver and from beef and trout muscle[J]. J Food Sci, 1981, 46:491~496
- [4] Kim J B, Murata M, Sagakuchi M. A method for the differentiation of frozen-thawed from unfrozen fish fillets by a combination of torryster readings and K values[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1987, 53:159~164
- [5] Fernandez M, Mano S, Garcia de Fernando G D, et al. Use of α -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) activity to differentiate frozen from unfrozen fish and shellfish[J]. Eur Food Res Technol, 1999, 209:205~208
- [6] Guillaume D, Bruno L F, Veronique M, et al. Comparison of methods of differentiating between fresh and frozen-thawed fish or fillets[J]. J Sci Food Agric, 2002, 82:1341~1345

(上接第 11 页)

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,等. 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] Haruta S, Cui Z, Huang Z, et al, Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability [J]. Apply Microbiology Biotechnology, 2002, 59:529~534
- [4] 朴哲,崔宗均,苏宝林,等. 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(1):59~61
- [5] Updegraff D M. Semimicro Determination of Cellulose in Biological Materials[J]. Analytical Biochemistry, 1969, 32:420~424
- [6] 刘洁. 天然纤维素生物降解机制和外切纤维素酶合成机制的研究[D]. 济南:山东大学, 1996
- [7] 山田秀明,别府辉彦,深田俊夫编. 微生物の机能开登[M]. 东京:学会出版・センター, 1998. 3~12
- [8] Johnson E A, Sakajoh M, Halliwell G, et al, Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum*[J]. Appl Environ Microbiol, 1982, 43:1125~1132
- [9] 单谷,罗廉,余世袁. pH 值对纤维素酶制备的影响[J]. 南京林业大学学报, 1999, 23(3):60~62
- [10] Schwarz W H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56:634~649