

一组降解纤维素细菌的分离筛选及产酶特性研究

黄宁珍, 赵志国, 何成新*, 付传明, 郭伦发, 王新桂, 唐凤鸾

(广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006)
(中国科学院)

摘要: 用稀释法从腐殖泥中分离菌株, 根据它们在羧甲基纤维素钠(CMC-Na)-刚果红培养基上的透明圈直径及对滤纸的崩解能力, 获得7株纤维素分解细菌(编号: B-37、B-35、B-31、B-25、B-17、Z-a和Z-b), 其中菌株Z-b的纤维素崩解能力最强, 分子鉴定结果表明它与 *Stenotrophomonas maltophilia* 的16S rDNA序列有99.8%的同源性, 初步确定为嗜麦芽窄食单胞菌。适合7个菌株生长的C源为马铃薯浸出液, 无机盐组分为: CaCl₂ 0.20、MgSO₄ 1.25、NaCl 5.00、(NH₄)₂SO₄ 1.30、KH₂PO₄ 1.35、FeSO₄·7H₂O 0.015、Na-EDTA 0.02 g/L。在滤纸为唯一碳源的培养基中, 菌株Z-b的滤纸酶(FPase)和CMC酶(CMCCase)活性最大, 为0.099 U/mL和0.075 U/mL, 而在固体PSA上, 菌株B-31和B-37的FPase和CMCCase活性最高, 为0.131 U/mL和0.175 U/mL。7个细菌单独发酵, Z-b对滤纸的崩解能力最强, 滤纸块完全崩解成粉末状; 与真菌34混合发酵, 菌株组合Z-a+34、Z-b+34、B-31+34、B-25+34将滤纸完全水解为水溶性物质。可见, 各菌株的纤维素酶活与培养条件密切相关, 某些真菌、细菌间存在协同作用, 它们混合发酵可大大提高纤维素的水解效率。

关键词: 纤维素降解; 细菌; 分离筛选; 产酶特性; FPase; CMCCase; 混合发酵

中图分类号: Q946.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)05-0683-06

Screening a group of cellulose-degradation bacteria and their zymogenic characteristics

HUANG Ning-Zhen, ZHAO Zhi-Guo, HE Cheng-Xin*, FU Chuan-Ming,
GUO Lun-Fa, WANG Xin-Gui, TANG Feng-Luan

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract: Bacterial strains were isolated from humus mud by employing the dilution methods. Seven cellulose-degradation strains marked as B-37, B-35, B-31, B-25, B-17, Z-a, and Z-b were selected according to the hyaloid rings on the medium of carboxymethylcellulose sodium(CMC-Na)-Congo red and their efficacy of decomposing filter paper. Z-b had the strongest ability in decomposing filter paper among the seven strains and 16S rDNA analyzed indicated that it was *Stenotrophomonas maltophilia* owing to 99.8% homology. Comparing colony size of the seven strains in media with different carbohydrates and inorganic salt, we found that the potato extract and inorganic salt which contained CaCl₂ 0.20, MgSO₄ 1.25, NaCl 5.00, (NH₄)₂SO₄ 1.30, KH₂PO₄ 1.35, FeSO₄·7H₂O 0.015, Na-EDTA 0.02(g/L) were suitable for the bacteria growth. Studying cellulase activity of 7 strains in different cultivation conditions, it's found that Z-b had the highest filter paper(FPase)and CMC(CMCCase)activity in the media which filter paper as the only carbohydrate. They were 0.099 and 0.075 U/mL. But on PSA medium, it was B-31 and B-37 getting a highest cellulase activity. They were 0.131 and 0.175 U/mL. When fermented individually with filter paper, only Z-b could decompose the whole pieces of pa-

收稿日期: 2008-07-07 修回日期: 2009-04-30

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0630003A8)[Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangxi(0630003A8)]

作者简介: 黄宁珍(1968-),女,广西大化县人,副研究员,从事环境生理与分子生物学研究,(E-mail)huangnz@gxib.cn.

*通讯作者(Author for correspondence, E-mail: hecx@gxib.cn)

per into powders. But when fermented with fungus 34, the combinations of Z-a+34, Z-b+34, B-31+34, and B-25+34 could hydrolyze the whole filter paper into water-soluble compounds. It was obvious that the cellulase activity of the seven strains closely related with their cultivation condition. Cooperation exists between some fungi and bacteria, it could greatly improve the efficiency of cellulose hydrolyzation when mixed fermentation.

Key words: cellulose-degradation; bacteria; screening; zymogenic characteristics; FPase; CMCase; mixed fermentation

纤维素是植物秸秆的主要成分,所占比例约为40%,是一类地球上最大量可再生的能源物质(Tengerdy & Szakacs, 2003)。据不完全统计,我国各种作物秸秆年产量达6.05亿吨(牟建楼等, 2006)。利用生物或化学技术,将农作物秸秆转化为高附加值的生物质能源、生物材料、石油替代品等环境友好产品,是当前国内外重要的研究课题,其中,高效降解纤维素微生物种类的筛选是这项研究的核心内容之一。

产纤维素酶微生物种类很多,国内外目前已分离筛选到的种类有53个属的几千个菌株,其中,丝状真菌是研究最多、纤维素酶活性较高的纤维素降解类群,而细菌所产生的纤维素酶对天然纤维素的水解作用较弱,所筛选到的种类也远不如真菌多(史央等, 2002; 孟雷等, 2002; 张传富等, 2007)。丝状真菌为好气性微生物,许多发酵过程,如污物的纤维素类分解等,都是在少氧或缺氧环境中进行,因而,厌氧及兼性厌氧的纤维素分解细菌更具应用意义,如芽孢细菌具有耐酸、耐碱、耐高温等优势,更利于实际操作和工业生产。另外,由于天然纤维素结构复杂,单一菌株的酶难以使降解效率达到预期效果,而多个菌株混合发酵可明显加速纤维素类物质的分解,尤其是细菌与真菌间具有较强的相互作用(史央等, 2002)。而且,自然界中的纤维素分解菌远不止我们现在所知的属种,更多有潜在应用价值的微生物种类有待分离鉴定。因此,在本研究中,我们用稀释法从腐殖泥中筛选降解纤维素细菌,研究这些菌株的培养及产酶特性,并进行初步的真菌、细菌混合发酵实验,为同类研究和生产实践提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 材料

腐殖泥:(1)衣架加工尾料薄片状刨花堆沤腐烂形成的黑泥;(2)活性污泥。

1.2 方法

1.2.1 纤维素分解细菌的分离(稀释法) 制备 PSA

(200 g/L 马铃薯浸煮液,蔗糖 20 g/L,琼脂 15 g/L)平板和试管培养基,121 °C(10⁵ Pa)灭菌 30 min 后冷却备用。将腐殖泥用无菌水依次稀释成 10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ 倍溶液,各取 0.5 mL 涂抹于 PSA 平板上,每种溶液接种 3~5 皿。32 °C 培养箱培养。每隔 12 h 观测培养物的生长情况。将长出的细菌单菌落挑出,接种于装有 PSA 培养基的试管中,培养 24 h 后每天观测菌落的生长速度、形态及颜色等。根据细菌菌落的生长速度、形态及颜色的差异,将菌株分类并编号。

1.2.2 纤维素分解细菌的筛选鉴定 (1)菌株对 CMC 的利用和降解:制备 CMC 培养基[赫奇逊无机盐(梁如玉, 1997),CMC-Na 15 g/L,琼脂 15 g/L, pH7.0],灭菌并制成平板,冷却后接入菌株,每个菌株 3~5 皿,32 °C 培养箱培养,每隔 24 h 观测培养物的生长情况。培养 7 d 后,测量菌落直径,并用 10 mg/mL 的刚果红染色 12 h,倒掉染液,测量透明圈直径。根据菌株在 CMC 培养基上的生长情况,以及刚果红染色后透明圈的大小,确定菌株的纤维素分解能力。(2)对滤纸的崩解:制备滤纸培养基(赫奇逊无机盐, pH 7.0, 每瓶加入一块直径 9.0 cm 的滤纸),装瓶灭菌,冷却后接入菌株,每个菌株 3 瓶,32 °C 培养箱静置培养,每隔 2 d 观测滤纸的崩解情况,确定菌株的纤维素分解能力。(3)菌株的分子生物学鉴定:选择 1 株纤维素酶活高、滤纸崩解能力强的菌株,采用 16S rDNA 序列分析法对该菌株进行鉴定。细菌总 DNA 提取参照徐平(2003)的方法,16S rDNA 通用引物、PCR 扩增体系及反应条件、16S rDNA 测序和同源性比较等参照许玫英(2002)的方法,并根据实验需要进行适当调整。

1.2.3 纤维素分解菌的培养特性 (1)无机盐组分对菌株生长的影响:制备 4 种含不同无机盐的培养基,① MS(曹孜义, 2002),② 赫奇逊,③ BM(CaCl₂ 0.40, MgSO₄ 2.50, NaCl 10.00, (NH₄)₂SO₄ 2.60, KH₂PO₄ 2.70, FeSO₄ · 7H₂O 0.03, Na-EDTA 0.04 g/L),④ 1/2BM; 分别添加琼脂 15 g/L, pH7.0, 灭菌后制成平板。接入上述筛选所得菌株,

每个菌株 3 皿, 32 °C 培养箱培养, 每天观测并记录菌株的生长情况, 确定无机盐组分对菌株生长的影响。(2) 不同糖类对菌株生长的影响: 制备 4 种含有不同 C 源的培养基, ① 赫奇逊 + CMC-Na 15 g/L, ② 赫奇逊 + 蔗糖 15 g/L, ③ 赫奇逊 + 葡萄糖 15 g/L, ④ 马铃薯浸出液(马铃薯 200 g/L, 水煮沸 40 min 后 4 层纱布过滤, 取滤液); pH7.0, 灭菌后制成平板。接入上述筛选所得菌株, 每个菌株 3 皿, 32 °C 培养箱培养, 每天观测并记录菌株的生长情况, 确定不同糖类对菌株生长的影响。

1.2.4 菌株的纤维素酶活性及产酶条件 (1) C 源对酶活性的影响: 制备不同 C 源的培养基: 1/2BM 无机盐, 分别添加滤纸一张(直径 9 cm)、与滤纸等重的 CMC-Na 或稻草, pH7.0, 装瓶灭菌, 分别接入上述筛选所得菌株, 每个菌株 3 瓶, 32 °C 下静置培养 6 d 后, 测定 FPase 和 CMCase, 研究 C 源对酶活性的影响。(2) 培养基类型对酶活性的影响: 制备液体 H、LB、PS 和固体 PSA 培养基, 分装灭菌, 分别接入上述筛选所得菌株, 32 °C 下静置培养 5 d 后, 测定 FPase 和 CMCase, 研究培养基类型对酶活性的影响。(3) FPase 和 CMCase 测定方法: 将培养好的菌液(若是固体培养, 加入 2 倍体积去离子水, 搅拌均匀后浸提 20 min) 在 3 000 rpm 下离心 10 min, 上清液即为酶液。酶活采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法(李合生, 2000)测定, 酶活单位采用国际单位(U); 即每 1 min 酶解产生 1 μ mol 或 1×10^{-6} mol 葡萄糖的酶量作为一个酶活力单位。

1.2.5 与真菌组合发酵对滤纸的降解 以赫奇逊无机盐为基本培养基, pH7.0, 装瓶(约 50 mL), 每瓶加入直径 9 cm 的滤纸一张, 灭菌冷却后, 分别接入上述筛选所得细菌与真菌 34(本实验室筛选的纤维素降解真菌), 每个组合 3 瓶, 32 °C 培养箱静置培养, 每隔 2 d 观测滤纸的水解情况, 研究细菌与真菌组合发酵对滤纸水解效率的影响。

1.2.6 数据的处理与统计方法 所有数据均用 SPSS 统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 稀释法分离得到的菌株

根据菌落在 PSA 平板上的生长速度、颜色、大小等形态特征, 将陆续长出的形态特征不同的单菌落挑出, 接入 PSA 试管中, 共获得 39 个不同的细菌

菌株, 分别编号为 B-1~B-37、Z-a 和 Z-b。

表 1 各菌株在 CMC 培养基中的菌落直径、刚果红透明圈直径(n=4)及对滤纸的崩解效果

Table 1 The diameters of different colony and hyaloid circle of Congo red s in media containing CMC-Na

菌株编号 Strain ID	菌落直径 Colony diameter (cm)	刚果红透明圈直径 Diameter of Congo red hyaloid circles(cm)	滤纸的崩解程度 Collapse grade of filter paper
B-5	0.90	1.70	+
B-6	1.83	2.20	+
B-9	0.65	2.13	+
B-10	1.00	2.25	+
B-14	1.00	1.60	+
B-15	0.75	1.70	+
B-17	0.40	2.40	++++
B-22	1.50	2.00	+
B-25	0.80	1.00	++++
B-27	1.00	2.00	++
B-31	0.90	3.63	++
B-35	1.90	3.70	++
B-37	0.80	3.70	++++
Z-a	1.70	3.55	++++
Z-b	1.75	3.75	++++

注:“++++”滤纸全部粉碎;“++++”4/5 变成糊状;“+++”3/5 变成糊状;“++”2/5 变成糊状;“+”仅边缘溃烂。

2.2 纤维素分解细菌的筛选鉴定

2.2.1 菌株对 CMC-Na 的分解利用 将分离得到的菌株接种在以 CMC-Na 为唯一 C 源的筛选培养基上, 培养 7 d 后, 生长良好、并出现明显的刚果红透明圈的菌株有 13 个, 它们的编号、菌落平均直径和透明圈平均直径见表 1。结果显示, 所筛选到的菌株在以 CMC-Na 为唯一碳源的培养基上能缓慢生长。刚果红染色后, 透明圈直径最大的几个菌株分别为 Z-b、B-37、B-35、B-31、Z-a, 透明圈直径依次为 3.75、3.70、3.70、3.63、3.55 cm, 其次是 B-6、B-9、B-10、B-17、B-22、B-27, 透明圈直径在 2.0~2.4 cm 之间; B-5、B-14、B-15 和 B-25 的透明圈直径较小, 在 1.7 cm 以下。透明圈直径较大的菌株, 说明它们对 CMC-Na 的分解利用能力较强。根据上述结果, 初步筛选出 5 株纤维素分解细菌, 分别为: Z-b、B-37、B-35、B-31、Z-a, 其中 Z-b 的透明圈直径最大, 暗示其纤维素降解能力可能最强。

2.2.2 单个菌株对滤纸的崩解效果 观测各个菌株在赫奇逊培养基中对滤纸块的崩解效果发现, 培养一周后, 滤纸边缘及折叠处开始溃烂, 之后滤纸的溃烂程度逐渐严重; 培养 21 d 后观测, Z-b 使滤纸完全崩解成粉末状; Z-a、B-37、B-25、B-17 使整张滤纸的

4/5 变成糊状; B-22、B-27、B-35 使整张滤纸的 2/5 变成糊状; 其余菌株对滤纸的崩解效果较差(表 1)。综合上述结果, 对滤纸崩解能力比较大的 5 个菌株依次为: Z-b、Z-a、B-37、B-25、B-17, 其中 Z-b 的崩解速度最快、崩解程度也最彻底。

2.2.3 纤维素分解细菌的筛选结果 培养环境不适会影响细菌对纤维素的降解能力, 由此可能导致漏筛一些具有良好应用潜力的菌株。因此根据上述结果, 将 CMC-Na 分解利用、滤纸崩解能力分别从强到弱排列, 以排在前 5 位菌株作为筛选目标, 以进行进一步实验, 这些菌株共有 7 个, 分别为 Z-b、Z-a、B-37、B-35、B-31、B-25 和 B-17。

2.2.4 菌株的分子鉴定 对菌株纤维素降解能力最强的菌株 Z-b 进行 16s rDNA 序列分析, 结果表明, 该菌株与 *Stenotrophomonas maltophilia* 的 16S rDNA 序列有 99.8% 的同源性, 因此, 应属嗜麦芽窄食单胞菌。

2.3 纤维素降解细菌的培养特性

在不同无机盐的培养基上, 多数菌株在 1/2 BM 无机盐培养基上的菌落直径相对较大。而在不同 C 源的培养基中, 以马铃薯浸出物为 C 源时, 7 个菌株的菌落直径明显大于其它三种 C 源(表 2)。根据上述结果, 培养基“1/2 BM+20% 马铃薯浸出物”可用于 7 个菌株的繁殖和保存。

表 2 纤维素分解细菌在不同盐及糖类培养基上的生长情况(培养 4 d, 培养温度 32 °C)
Table 2 The growth of cellulose-degradation strains cultivation 4 days at 32 °C in different media

菌株编号 Strain ID	不同无机盐培养基上的菌落直径 Colony diameters in different salts media without carbohydrates (cm)				不同糖类培养基上的菌落直径 Colony diameters in Hejixun media containing different carbohydrates (cm)			
	MS	BM	1/2 BM	赫奇逊 Hejixun	赫奇逊+蔗糖 Hejixun+sucrose	赫奇逊+葡萄糖 Hejixun+glucose	赫奇逊+CMC-Na Hejixun+CMC-Na	赫奇逊+马铃薯 Hejixun+potato
B-17	0.25 c	0.30 b	0.40 a	0.35 ab	0.65 b	0.35 c	0.30 c	1.30 a
B-25	0.45 b	0.60 a	0.60 a	0.50 ab	0.70 b	0.65 b	0.70 b	1.00 a
B-31	0.40 c	0.55 b	1.05 a	0.60 b	0.60 c	1.60 b	0.65 c	2.00 a
B-35	0.55 c	0.90 a	0.85 a	0.75 b	1.05 b	0.70 c	0.50 d	2.00 a
B-37	0.55 c	0.70 b	0.80 a	0.60 c	0.60 d	1.10 b	0.75 c	2.40 a
Z-a	0.75 a	0.70 a	0.75 a	0.75 a	0.75 c	0.70 c	0.90 b	2.70 a
Z-b	0.70 a	0.70 a	0.70 a	0.75 a	0.65 c	0.65 c	1.0 b	3.00 a

注: 每行数字后小写字母相同表示差异不显著($P>0.05$), 不同表示差异显著($P<0.05$), 下同。BM: CaCl₂ 0.40、MgSO₄ 2.50、NaCl 10.00、(NH₄)₂SO₄ 2.60、KH₂PO₄ 2.70、FeSO₄·7H₂O 0.03、Na-EDTA 0.04 g/L。

2.4 培养条件对 FPase 及 CMCase 活性的影响

(1) C 源: 将菌株 Z-a、Z-b、B-37、B-35、B-31、B-25 和 B-17 培养在含有不同 C 源(滤纸、CMC-Na、稻草)的无机盐培养基中, 测定各菌株的 FPase 和 CMCase(表 3), 结果表明, 7 个菌株在以滤纸为 C 源的培养基中酶活较大; 统计分析结果显示, 以滤纸为 C 源, Z-a、Z-b、B-17、B-25、B-31 五个菌株的 FPase 和 CMCase 明显大于以 CMC-Na 或稻草为 C 源。由此可见, C 源的类型对各菌株的 FPase 和 CMCase 影响较大, 滤纸是诱导其酶活达到较高水平的 C 源。而在以滤纸为 C 源的培养基中, 7 个菌株中以 Z-b 的 FPase 和 CMCase 活性最大, 分别为 0.099 和 0.075 U/mL。(2) 培养基类型: 将菌株 Z-a、Z-b、B-17、B-25、B-31、B-35 和 B-37 培养在 H、LB、PS 和 PSA 四种不同类型的培养基中, 分析各菌株的 FPase 和 CMCase 活性(表 4), 结果显示, 在液体 H 和 LB 培养基中, 除了 B-31 的 CMCase、Z-a 和 Z-b 的 FBase 有差异之外, 其它菌株的 CMCase

和 FBase 差异不大; 在液体 PS 培养基中, 除了 B-31 有较低的酶活性外, 其它 6 个菌株的酶活为零, 这种结果可能与 PS 培养基中糖含量较高、纤维素酶产生了产物抑制的原因有关; 而在固体 PSA 培养基中, 几乎所有菌株的 CMCase 和 Fbase 明显大于其它三种培养基, 这可能是由于 PSA 是固体培养基, 在培养过程中起支架作用, 使菌体与培养基自然分开, 因此, 从很大程度上消除了产物抑制的发生, 另外, 固体培养保证了充足氧气供应, 利于好氧性细菌的生长。比较 7 个菌株在 PSA 上的酶活发现, B-37 和 B-31 酶活性最大, 其 FPase 和 CMCases 分别为 0.131 和 0.175 U/mL。

2.5 与真菌组合发酵对滤纸的水解效果

分别将 7 株细菌和 34 号真菌同时接入同一培养基中共培养 20 d, 结果发现, 试验中各组合菌株对滤纸的水解效果均好于单个细菌菌株, 其中组合 Z-a+34、Z-b+34、B-31+34、B-25+34 对滤纸的水解效果最好, 培养液中粉末状的滤纸沉渣全部消失, 溶

液清亮透明(表 5, 图 1), 表明这 4 个细菌和真菌复合作用可将滤纸全部降解为水溶性化合物。

表 3 不同 C 源培养基中纤维素分解菌的 FPase 与 CMCase (培养 6 d, 培养温度 32 °C)

Table 3 FPase and CMCase of cellulose-degradation strains cultivation 6 days at 32 °C in media with different carbohydrates

菌株 Strain ID	酶种类 Kinds of cellulase	酶活性 Cellulase activity (U/mL)		
		1/2BM 无机盐 + 滤纸	1/2BM 无机盐 + CMC-Na	1/2BM 无机盐 + 稻草
B-17	FPase	0.077 a	0.058 b	0.059 b
	CMCase	0.064 a	0.041 b	0.044 b
B-25	FPase	0.072 a	0.056 b	0.057 b
	CMCase	0.063 a	0.041 b	0.042 b
B-31	FPase	0.078 a	0.063 b	0.069 b
	CMCase	0.062 a	0.052 b	0.038 c
B-35	FPase	0.080 a	0.067 bc	0.071 ca
	CMCase	0.063 a	0.043 b	0.040 b
B-37	FPase	0.082 a	0.066 b	0.065 b
	CMCase	0.064 a	0.040 b	0.060 a
Z-a	FPase	0.098 a	0.078 b	0.064 c
	CMCase	0.051 a	0.034 b	0.035 b
Z-b	FPase	0.099 a	0.083 b	0.057 c
	CMCase	0.075 a	0.039 b	0.038 b

3 讨论

在自然界中, 由细菌所产生的纤维素酶活性较低, 对天然纤维素的水解作用较弱(沈雪亮等, 2002)。张辉等(2004)从牛粪堆肥中筛选出的好氧纤维素降解菌群的 FPase 为 0.011~0.090 U/mL, CMCase 为 0.102~0.260 U/mL; 郝月等(2005)筛选出的 6 个天然秸秆纤维素降解菌中, FPase 和 CMCase 分别为 0.18~0.19、0.19~0.21 U/mL。本实验所分离的纤维素降解细菌, 虽然纤维素酶活也不高, FPase 在 0.066~0.131 U/mL 之间, CMCase 在 0.085~0.175 U/mL 之间, 但这些菌株在寡营养(仅以简单无机盐与滤纸为营养)及静置液体培养条件下对滤纸纤维有很好的崩解效果, 说明它们对营养要求简单, 对培养条件要求也不严格, 这为实际操作和工业生产提供了更大的方便和操作空间, 因此, 在实践中具有良好的应用潜力。

在产酶条件研究中, 不同的菌株产酶条件不同。罗颖等(2007)研究发现, 耐热纤维素酶产生菌 SH2 在麸皮、玉米芯、CMC 等三种不同 C 源中, 以玉米芯为 C 源时 CMCase 活性最高; 而蔡兴旺等(2005)

研究发现, 纤维单孢菌(*Cellulomona* spp.)在以 1.0% 的葡萄糖为 C 源时, 其 CMCase 活性达到最大。本研究发现, C 源、培养基成分和培养方式对纤维素降解细菌的纤维素酶活性均有影响, 滤纸为 C 源和固体培养方式, 均利于这些菌株 FPase 和 CMCase 活性的提高, 这一结果提示, 通过改善培养条件, 极有可能大幅度提高这些菌株的酶活性。

表 4 不同类型培养基纤维素分解菌的 FPase 与 CMCase (培养 5 d, 培养温度 32 °C)

Table 4 FPase and CMCase of cellulose-degradation strains cultivation 6 days at 32 °C in different media

菌株 Strain ID	酶种类 Kinds of cellulase	酶活性 Cellulase activity(U/mL)			
		H	LB	PS	PSA
B-17	FPase	0.044 b	0.048 b	0 c	0.066 a
	CMCase	0.052 b	0.053 b	0 c	0.085 a
B-25	FPase	0.052 b	0.051 b	0 c	0.110 a
	CMCase	0.066 b	0.069 b	0 c	0.141 a
B-31	FPase	0.057 b	0.065 b	0.037 c	0.131 a
	CMCase	0.066 c	0.086 b	0.042 d	0.175 a
B-35	FPase	0.071 b	0.068 b	0 c	0.110 a
	CMCase	0.039 a	0.040 a	0 b	0.081 c
B-37	FPase	0.070 b	0.071 b	0 c	0.131 a
	CMCase	0.076 b	0.077 b	0 c	0.175 a
Z-a	FPase	0.084 b	0.064 c	0 d	0.127 a
	CMCase	0.034 b	0.035 b	0 c	0.091 a
Z-b	FPase	0.057 c	0.083 a	0 d	0.067 b
	CMCase	0.038 b	0.039 b	0 c	0.088 a

表 5 赫奇逊培养基中各组合菌株对滤纸的水解效率(培养 20 d)

Table 5 Filter paper hydrolyzation efficiency of different strain-combination in Hutchinson medium

菌株组合 Strain combination	滤纸水解情况 Filter paper hydrolyzation
Z-a+34	滤纸完全水解, 无沉渣
Z-b+34	滤纸完全水解, 无沉渣
B-37+34	滤纸大部分水解, 有少量沉渣
B-35+34	滤纸大部分水解, 有少量沉渣
B-31+34	滤纸完全水解, 无沉渣
B-25+34	滤纸完全水解, 无沉渣
B-17+34	滤纸大部分水解, 有少量沉渣
Z-b	滤纸全部崩解成粉末, 有较多沉渣
CK	滤纸块完好无损

由于天然纤维素结构复杂, 单一菌株的酶产量和活性均难以使降解效率达到预期效果, 目前普遍认为多个菌种复合发酵(特别真菌、细菌复合发酵)对纤维素的降解效率比单菌发酵好。崔宗均等(2002)从堆肥样品中筛选出一组纤维素分解菌系 MCI, 对滤纸的分解率达 94%; Anshu & stayawati

(2003)发现混合菌系在堆肥中的作用明显好于单菌株,接种混合菌系通过 30 d 堆肥,木质素含量从 30.21% 降到 20.21%,半纤维素从 35.50% 降到

18.56%,纤维素从 18.21% 降到 6.18%。本实验将筛选的纤维素降解细菌与纤维素降解真菌组合发酵,初步获得纤维素水解效率相当高的 4 个菌组,它

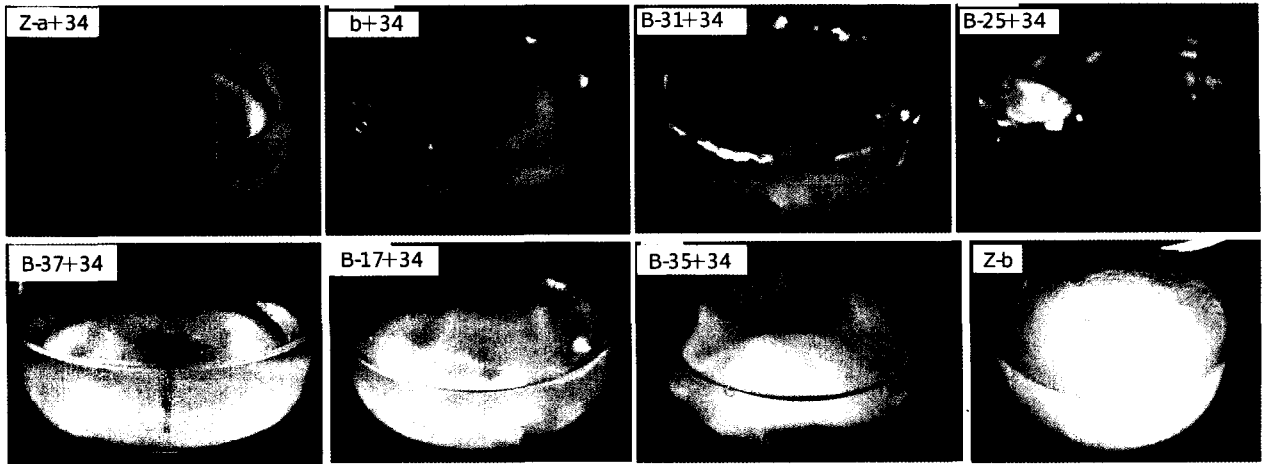


图 1 7 株细菌和真菌(34)复合发酵水解滤纸的效果

Fig. 1 Filter paper hydrolyzation efficiency of different strain-combination

们均能将滤纸纤维完全水解为水溶性化合物,是目前纤维素水解效率最高的菌组之一,其发酵液内所含的纤维素酶种类及其相互之间的协同作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- 曹孜义,刘国民. 2002. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社
- 李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社
- 梁如玉. 1997. 农业微生物学[M]. 北京:中国农业科技出版社
- 牟建楼,王颖,张伟,等. 2006. 浅谈农作物秸秆资源的综合利用[J]. 科技情报开发与经济,16(14):132-134
- Anshu S, Satyawati S. 2003. Effect of microbial inocula on mixed solid waste composting, vermicomposting and plant response[J]. *Compost Science & Utilization*, 11(3):190-199
- Cai XW(蔡兴旺), Lu FP(路福平), Du LX(杜连祥). 2005. Screening for combined anaerobic hypercellulolytic fungi and its cellulolytic enzymes production(兼性厌氧纤维素降解菌的筛选和产酶研究)[J]. *Industrial Microbiol*(工业微生物), 35(1):6-9
- Cui ZJ(崔宗均), Li MD(李美丹), Piao Z(朴哲), et al. 2002. Selection of a composite microbial system mcl with efficient and stability cellulose degradation bacteria and its function(一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能)[J]. *Environ Sci 环境科学*, 23(3):36-39
- Hao Y(郝月), Yang XH(杨翔华), Zhang J(张晶), et al. 2005. Isolation and screening on straw cellulose-decomposing microorganisms(秸秆纤维素分解菌的分离筛选)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 21(7):58-60
- Luo Y(罗颖), Ou YJ(欧阳嘉), Xu J(许婧), et al. 2007. Screening and identification of a thermostable cellulase-secreting bacteria and its optimization for cellulase production(耐热纤维素酶产

- 生菌的筛选、鉴定及产酶条件优化)[J]. *J Food Sci Biotech* (食品与生物技术学), 26(1):84-89
- Meng L(孟雷), Chen GJ(陈冠军), Wang Y(王怡), et al. 2002. The polymorphism of cellulases(纤维素酶的多型性)[J]. *J Cellulose Sci Tech* (纤维素科学与技术), 10(2):47-55
- Shen XL(沈雪亮), Xia LM(夏黎明). 2002. Studies on screening of cellulase producing bacteria and enzymatic characteristics thereof(产纤维素酶细菌的筛选及酶学特性研究)[J]. *Chem Indu Fore Prod*(林产化学与工业), 2(1):47-51
- Shi Y(史央), Jiang AQ(蒋爱芹), Dai ZC(戴传超), et al. 2002. Advanced in microbiological mechanism and application of straw degradation(秸秆降解的微生物学机理研究及应用进展)[J]. *J Microbiol*(微生物学杂志), 22(1):47-50
- Tengerdy RP, Szakacs G. 2003. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation[J]. *Biochemical Engineering*, 13(2-3):117-179
- Xu P(徐平), Li WJ(李文均), Xu LH(徐丽华), et al. 2003. A microwave based method for genomic DNA extraction from actinomycetes(微波法快速提取放线菌基因组)[J]. *Microbiology* (微生物学通报), 30(4):82-84
- Xu MY(许玫英), Cen YH(岑英华), Deng SE(邓穗儿), et al. 2002. Isolation and identification of a theophylline-degrading bacterial strain(一株茶碱降解菌的分离和鉴定)[J]. *Acta Microbiol Sin*(微生物学报), 42(5):526-533
- Zhang H(张辉), Yang QY(杨启银), Dai ZC(戴传超), et al. 2004. Analysis of aerobic cellulolytic microorganisms in cow feces compost and its conditions for producing enzyme(牛粪堆肥中好氧纤维素降解菌群及产酶条件研究)[J]. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学), (06):146-150
- Zhang ZF(张传富), Gu WJ(顾文杰), Peng KF(彭科峰), et al. 2007. Present situation of research on microbial cellulase(微生物纤维素酶的研究现状)[J]. *China J Bio Informatics*(生物信息学), 5(1):34-36