

降解纤维素的真菌分离、筛选及其酶活测定^{*}

林远声, 列璞怡

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 210275)

摘要: 在自然界环境和活性污泥中筛选出4种分解纤维素能力较强的真菌, 并将这4种菌株单独或以不同的组合形式在羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为惟一碳源的产酶培养基中进行产酶特性的研究。混合菌种在发酵培养基中培养144 h后达到产酶高峰, 酶活力最高可达到 $33 \mu\text{mol}/\text{mL}$, 超过菌种的单独培养。这4种菌均对李坑污水有一定的降解能力, 若能继续进行研究, 对实际应用有一定前景。

关键词: 纤维素 CMC-Na; CMC 酶活; 真菌

中图分类号: Q503 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) S1-0082-04

广州李坑垃圾填埋场日常的渗滤液中含有较多的纤维素和木质素, 这两种都是难降解物质, 导致水的色度难以下降, 影响水处理质量, 因此寻找能有效降解它们的菌株非常重要。纤维素降解菌很多, 包括真菌、放线菌和细菌, 常见的如木霉 *Trichoderma*、青霉 *Penicillium*、镰刀菌 *Fusa. urn*、链霉菌属 *Streptomyces*、纤维素诺卡氏菌 *Nocardia chllula*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、纤维单胞菌属 *Chluzomonas*、黑曲霉 *Aps. niger*、烟曲霉 *Neurospora crassa* 等。研究表明, 真菌对纤维素有较好的降解能力。纤维素的降解是在纤维素酶的作用下进行的, Wood等^[1]提出3种酶, ①C₁ 酶: 这是对纤维素最初起作用的酶, 它破坏纤维素链的结晶结构, 起水化作用; ②C_x 酶: 这是作用于经C₁ 酶活化的纤维素、分解 β -1,4 键的纤维素酶。主要包括内切-1,4- β 葡聚糖酶和外切-1,4- β 葡聚糖酶; ③ β -葡萄糖苷酶: 即为将纤维二糖、纤维三糖及其它低分子纤维糊精分解为葡萄糖。上述3种纤维素酶在分解纤维素时, 任何一种酶都不能单独裂解晶体纤维素, 只有3种酶共同存在并协同作用时, 才能完成水解过程。国内外学者都在致力于研究能加速纤维素降解的高效微生物, 史玉英等^[2]发现芽孢杆菌 Ba 单独在滤纸上不能扩散生长, 分解滤纸能力较弱; 如果同时接种木霉 F, 由于细菌能随着真菌的生长而扩散, 滤纸分解速度加快。也有人发现纤维素分解菌(产黄纤维单胞菌) 与其伴生菌(腐臭假单胞菌) 之间具有协同作用^[3]。

本实验通过在广州李坑垃圾填埋场活性污泥及

附近土壤中大量筛选并分离得到四种优良真菌, 并对它们的降解特性, 最适产酶条件以及对李坑污水处理的初步研究, 发现混合菌种在发酵培养基中酶活力优于单独培养。实验结果表明良好菌株混合培养能增加其对纤维素的降解能力, 在实际生产中为污水中纤维素的有效降解提供了理论依据。这4种菌均对李坑污水有一定的降解能力。

1 实验材料

实验材料: 广州李坑垃圾填埋场活性污泥及附近土壤。

初筛培养基: PDA 培养基 (马铃薯 200 g, 蔗糖 20 g, 琼脂 15~18 g, 1 000 mL, pH 值自然);

复筛培养基: CMC Na 10 g, (NH₄)₂SO₄ 4 g, KH₂PO₄ 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 白朊 1 g, 琼脂 16 g, 蒸馏水 1 000 mL;

发酵产酶培养基: CMC Na 10 g, (NH₄)₂SO₄ 4 g, KH₂PO₄ 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 蛋白朊 10 g, 牛肉膏 5 g, 水 1 000 mL。

2 实验方法

2.1 菌种分离

从长期被造纸黑液污染的污泥中, 含有枯枝落叶的土壤中和长年雨淋日晒的朽木上大量取样, 接入液体选择培养基, 在30℃恒温振荡驯化培养一周, 在固体选择培养基平板上进行划线分离, 经反复地驯化培养和划线分离, 8周后获得降解纤维素的纯菌种^[4]。

* 收稿日期: 2004-04-12

基金项目: 广东省科技厅科技资助项目 (027-422015)

作者简介: 林远声 (1944年生), 男, 副教授; E-mail: lsslys@zsu.edu.cn

将纯菌种接种固体复筛培养基中, 在 30 ℃条件下培养 15 d 观察菌的生长状况及培养基的变色程度, 选取菌株生长快、培养基变色程度大的菌株作为纤维素分解菌, 将该菌株接种于以羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 为唯一碳源的固体培养基上进行复筛, 根据菌丝的生长速度及 CMC Na 的液化程度, 选出纤维素降解菌的优良菌株。

2.2 纤维素分解菌的单独与混合发酵培养

取 250 mL 的锥形瓶, 装入 100 mL 的培养基, 并以体积比为 15% 的接种量接种, 使其活菌数达到 1×10^9 个/mL, 30 ℃、200 r/min 的摇床震荡培养, 每隔 24 h 测量 CMC 酶活。

2.3 β-D-葡萄糖酶液 (CMC 酶) 制备与酶活力测定方法

培养液经 3 000 r/min 离心 10 min, 上清液为粗酶液, 取 0.1 mL 上清液加入 1.9 mL 质量分数为 1% 的 CMC Na 溶液, 在 50 ℃下水解 20 min, 加入 1.5 mL DNS 进行沸水浴 10 min, 定容至 25 mL, 在 520 nm 处比色。在上述条件下产生 1 μmol/min 还原糖所需的酶量为一个酶活单位^[9]。

2.4 各纤维降解菌对李坑污水的降解

将已培养好的种子液各 20 mL 加入 250 mL 锥形瓶中, 加入李坑污水至 100 mL, 于 30 ℃、200 r/min 的摇床震荡培养, 每隔 24 h 测量 COD_{Mn}。

3 实验结果

3.1 纤维素分解菌的分离筛选和纯化

按照“培养—分离单菌落—初筛—复筛”的方法, 在广州李坑垃圾填埋场填埋的活性污泥及附近土壤的降解物中分离得到 4 种可对纤维素进行有效降解的菌株。根据这 3 种菌的生长环境条件, 菌落的形态大小进行初步鉴定, 命名为: 纤 1, 纤 2, 纤 3, 纤 4 (表 1)。

3.2 纤维素分解菌的单独和混合培养对纤维素酶活的影响

3.2.1 制作葡萄糖标准曲线 无水葡萄糖 80 ℃烘干至恒质量, 准确称取 1.000 g 溶于 100 mL 水中, 加热使其溶解, 冷却, 加水稀释到 1 000 mL。取 1 mg/mL 标准葡萄糖液各 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL, 补加水至 2.0 mL, 加入 1.5 mL DNS 试剂, 具塞沸水中加热 10 min, 冷却后定容到 25 mL, 分光光度计 520 nm 波长下测 A 值, 3 次重复实验的均值用量小乘法相拟合 $Y = aX + b$ 一元线性方程^[9]。

3.2.2 纤维素降解菌的培养与测定 将纤维素降解菌进行单独或混合培养, 培养液经 3 000 r/min 离

表 1 4 种菌在 PDA 培养基培养的菌落形态和个体形态的镜检结果

Tah 1 Four types of fungus colony shape and individual shape under microscope

菌落	菌落形态	镜检	初步鉴定
纤 1	粉红色, 不透明, 正反面颜色单调一致, 扁平, 湿润, 与基质结合不牢固, 有酒精味道	单细胞, 椭圆形, 一端芽殖	赤酵母属
纤 2	橙色, 不透明, 湿润, 正反面颜色单调一致, 隆起, 与基质结合不牢固, 易挑起	单细胞, 椭圆形, 一端芽殖	赤酵母属
纤 3	白色, 不透明, 湿润, 正反面颜色单调一致, 隆起, 与基质结合不牢固, 易挑起	单细胞, 圆形, 在麦芽汁中长时间生成湿粘浮膜	圆形酵母属
纤 4	黑色, 干燥, 绒状, 不透明, 正反面颜色单调一致	孢子头球状, 黑色, 分子孢子梗平滑	黑曲霉

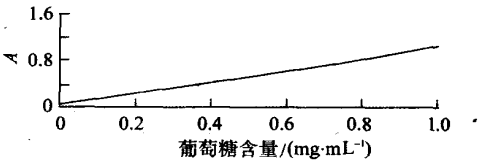


图 1 标准葡萄糖曲线
Fig 1 Nomal glucose curve

心 10 min, 上清液为粗酶液, 取 0.1 mL 上清液加入 1.9 mL 质量分数为 1% 的 CMC Na 溶液, 在 50 ℃下水解 20 min, 加入 1.5 mL DNS 进行沸水浴 10 min, 定容至 25 mL, 在 520 nm 处比色, 每 24 h 比色 1 次, 测其酶活, 根据每天对纤维素降解菌种的比色结果, 与标准葡萄糖曲线对照, 由 A 引出葡萄糖量 (m_1)。另将各上清液各 0.1 mL, 加水 1.9 mL, 再加 1.5 mL DNS, 沸水浴 10min, 520 nm 比色, 测得粗酶液的葡萄糖值 (m_2)。将葡萄糖量 (m_1) 减去葡萄糖值 (m_2) 得到真正由 CMC 酶降解 1% CMC 溶液得到的葡萄糖值, 由光密度值引出的葡萄糖量, 通过公式计算纤维素分解菌的酶活力。

$$\text{酶活力} = \frac{A \times 10 \times 1000}{20} (\mu\text{mol/L})$$

表 3 不同培养时间单独和混合菌种的酶活力

Tab 3 Single or combination fungus's enzyme activity in different incubate time							
时间	酶活力/($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)						
	纤 1	纤 2	纤 3	纤 4	纤 1+2	纤 1+3	纤 2+3
第 1 天	0	14	3.55	8.68	10.5	16.5	7.5
第 2 天	0	15.5	7.5	13.7	16.5	19	23.5
第 3 天	1	16	7.5	13.4	16.5	17.5	22
第 4 天	2	19.5	3	16.4	17	33	24
第 5 天	7.5	24.5	19	15.3	17.5	15	8.5
第 7 天	10.5	28.5	20.5	16.5	22	14.5	5.5
第 8 天	1	5.5	16	7.8	10.5	8.5	5

3.3 碳源对各菌酶活影响

在发酵产酶培养基中, 分别以 1.0% 的蔗糖、CMC Na、可溶淀粉、麦芽糖和 0.5% 的 CMC Na 为碳源, pH 自然, 30 ℃, 200 r/min 摇床 48 h, 测量 CMC 酶活。

表 4 碳源对各菌产酶能力影响

Tab 4 Influence of silicon source to fungus's zymogenic ability					
$\rho/\%$	纤 1	纤 2	纤 3	纤 4	
蔗糖 1.0	8.0	6.75	17.25	6.0	
CMC-Na 0.5	1.9	0.45	5.25	2.65	
CMC-Na 1.0	2.0	0.65	6.55	1.55	
可溶淀粉 1.0	3.65	1.65	8.25	3.4	
麦芽糖 1.0	10.75	12.9	17.75	9.1	

3.4 氮源对各菌产酶能力的影响

发酵产酶培养基中, 分别以 1.0% 的牛肉膏、尿素、蛋白胨、酪蛋白、酵母粉和 2% 的蛋白胨为氮源, pH 自然, 30 ℃, 200 r/min 摇床 48 h, 测量 CMC 酶活($\mu\text{mol mL}$)。

表 5 氮源对各菌产酶能力的影响

Tab 5 Influence of nitrogen source to fungus's zymogenic ability				
w/%	纤 1	纤 2	纤 3	纤 4
牛肉膏 1.0	3.85	2.15	11.4	2.85
尿素 1.0	6.05	1.15	2.35	2.6
蛋白胨 1.0	3.7	2.1	2.3	6.0
蛋白胨 2.0	4.5	3.55	1.9	3.9
酪蛋白 1.0	2.25	2.0	1.85	3.65
酵母粉 1.0	4.75	1.9	1.4	1.45

3.5 pH 值对各菌产酶影响

在发酵产酶培养基分别加入适量 Na_2SO_4 、 KOH , 调节 pH 值分别为 4、5、6、7、8、9、10, pH 自然, 30 ℃, 200 r/min 摇床 48 h, 测量 CMC 酶活。

表 6 pH 值对各菌产酶影响

Tab 6 Influence of PH to fungus's zymogenic ability				
pH	纤 1	纤 2	纤 3	纤 4
4	1.5	0.95	2.15	2.0
5	1.9	0.6	1.75	2.2
6	1.55	0.5	2.35	0.85
7	1.45	0.35	0.85	0.7
8	1.05	0.55	1.5	0.55
9	1.9	0.5	1.65	0.65
10	1.35	0.55	1.25	0.2

3.6 各菌对李坑污水的降解情况

由图 2 可看出, 各种菌对李坑污水都有一定的降解能力。其中纤 1、纤 2 在 0~48 h 有较明显的降解能力。但在 48 h 后所有菌对污水的降解明显减缓。

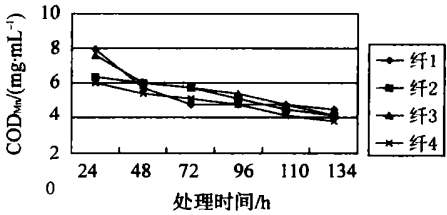


图 2 各菌对李坑污水的降解

Fig 2 Fungus degrade the polluted water of Likeng

4 讨论

在表 3 中发现培养时间的不同对产酶的影响较大, 其中纤 1、纤 2、纤 3、纤 1+2 都在第 7 天 CMC 酶活力最高, 而纤 1+3 和纤 2+3 的混合培养在四天达到酶高峰。混合菌种培养时, CMC 酶活力较快达到最高值, 酶活也比单独培养时高。而后略有上升和下降, 这为菌种产酶时间的准确提供了一定的理论依据, 防止在实际生产中错过最佳的产酶时机。

从表 4 可看出, 对于纤 1、纤 2、纤 4 而言, 麦芽糖是它们最理想的碳源。

从表 5 中可看出, 蛋白胨和牛肉膏是这 4 种菌比较理想的氮源。

由表 6 中可见, 这 4 种菌适于在中性偏酸的环境中产 CMC 酶。

在图 2 中可看到所筛选的 4 种菌株均能对李坑污水有降解作用, 在刚开始 48 h 内, 效果比较明显, 到了 48 h 后, 降解明显减缓, 这应该是污水中可提供的营养基本耗尽, 而降解时产生的物质对菌体生长及降解有抑制作用。以后还要不断改善降解条件, 使之能用于实际污水处理中。

筛选的 4 种菌株均能较大程度的降解纤维素

说明这些菌株具有产生纤维素酶的特性, 或者具有合成这类胞外酶的基因; 如将这类野生菌株进一步遗传改造, 将会更大程度的加速纤维素的降解, 为污水、污泥中的纤维素处理, 秸秆等农业废弃物的有效开发利用提供优势微生物菌种资源。

菌种在发酵产酶培养基中生长, 不断降解培养基的 CMC Na, 生成葡萄糖, 所以测 CMC 酶活时, 需要取 0.1 mL 上清液加 1.9 mL 蒸馏水, 在 50 °C 下保温 20 min, 再加 1.5 mL DNS 进行沸水浴 10 min, 定容至 25 mL, 在 520 nm 的比色, 通过对照标准葡萄糖直线, 找出对应的葡萄糖含量。将粗酶液比色后得到的葡萄糖值减去此时葡萄糖量, 才为真正酶活。

自然状态下, 纤维素的彻底降解是在微生物体系中多种微生物长时间相互作用的结果, 这一过程仅靠一种微生物是无法实现的。这是由于分解纤维素的酶是由多种组分组成的酶体系, 因此, 在进行纤维素大分子降解的研究过程中要考虑到微生物的产酶体系之间的协同效应^[3,4]。本实验的结果表明

真菌的混合培养具有协同效应。

参考文献:

- [1] WOOD T M, MACCPAE S I. In bioconversion of cellulose substance into energy, chemicals and microbial protein[M]. T. K. Ghose Gall, India, 1978: 111— 141.
- [2] 史玉英. 纤维素分解菌群的分离和筛选[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(3): 59— 62.
- [3] 中国科学院植物生理研究所纤维素酶组. 纤维分解菌与伴生菌的分离鉴定及其协同作用[J]. 微生物学报, 1978, 18(2): 147— 152.
- [4] 孙先锋, 张志杰, 崔红军, 等. 造纸黑液木质素降解微生物的分离和降解特性研究[J]. 环境工程, 2002, 20(3): 78— 81.
- [5] 宋颖琦, 刘睿倩, 杨谦, 等. 纤维素降解菌的筛选及其降解特性的研究[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2004, 34(2): 197— 200.
- [6] 陈春洪, 祁哲师, 陈蔽, 等. 里氏木霉纤维素酶产生条件的研究[J]. 微生物学通报, 1998, 25.

Separate and Screen Fungus Which can Biodegrade Cellulose and Assay Its Enzyme Activity

LIN Yuan sheng, LIE Pu yi

(School of Life Sceinces, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: This experiment separated four types of fungus which can biodegrade cellulose from natural environment and active sludge, then putted them and their different combinations into the culture medium which only use CMC Na as silicon source, studied their zymogenic characteristics. After 144 hours the fungous combinations achieved their peak zymogenic production, enzyme activity come to 33 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, much more than the single fungi. These four types of fungus can also biodegrade polluted water of Likeng, if we continue to research them, they could be used to treat polluted water.

Key words: cellulose; CMC Na; CMC enzyme activity fungi