

# 一株纤维素分解菌的分离及其粗酶性质研究

张毅民<sup>1</sup>, 吕学斌<sup>1</sup>, 万先凯<sup>1</sup>, 但汉斌<sup>2</sup>, 王 虹<sup>1</sup>, 孙亚凯<sup>1</sup>

(1 绿色合成与转化教育部重点实验室, 天津大学 化工学院, 天津 300072;

2 纽约城市大学 莱曼学院生物科学系, 纽约 10468)

**摘要:** 从堆肥、牛粪、马粪、土壤等样品中共分离出 35 株微生物菌株, 其中的 1 株霉菌 F<sub>10</sub> 表现出最高酶活力。对比研究发现, F<sub>10</sub> 在固体发酵实验中具有接近于绿色木霉 AS3.3711 的酶活力, 而在液体发酵实验中则高于绿色木霉 AS3.3711。研究结果表明, 当碳源物质为羧甲基纤维素(CMC)、氮源物质为硝酸铵时, F<sub>10</sub> 具有最佳产酶效果, 产酶时间为 48~84 h; 当 pH 为 5.0 温度在 40~60 ℃时, 相应的滤纸酶活力、CMC 酶活力及棉花酶活力最高为 16.6、43.6、0.4 U/g; 而当 pH 位于 4.0~5.0 温度为 50 ℃时, 相应的滤纸酶活力、CMC 酶活力及棉花酶活力最高分别为 9.1、29.5、0.25 U/g; 当温度超过 60 ℃时, 酶活力急剧下降。该研究可为生物肥料工业和发酵饲料工业的微生物学研究提供借鉴方法。

**关键词:** 纤维素分解菌; 筛选; 发酵; 酶活力

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)02-0069-04

## Isolation of a cellulose-decomposing microorganisms and investigation of its crude enzyme properties

ZHANG Yi-min<sup>1</sup>, LÜ Xue-bin<sup>1</sup>, WAN Xian-kai<sup>1</sup>, DAN Han-bin<sup>2</sup>, WANG Hong<sup>1</sup>, SUN Ya-kai<sup>1</sup>

(1 Key Laboratory of Green Chemical Technology, School of Chemical Engineering and Technology,

Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2 Department of Biological Sciences Lehman College, City University of New York, New York 10468, USA)

**Abstract:** Thirty-five strains of cellulose-decomposing microorganisms were isolated from manures of horse, cattle, compost and soil. Among them, F<sub>10</sub> had the highest enzyme activity. With AS3.3711 as the enzyme activity reference, F<sub>10</sub> demonstrated a quite satisfactory behavior in the related solid fermentation studies; its liquid fermentation results were even a little higher than that of the AS3.3711. Experiments also showed that F<sub>10</sub> had the best performance enzyme producing property when carboxymethyl cellulose (CMC) was chosen as the carbon source, ammonium nitrate as the nitrogen source, and the relevant time scale for it was set in 48~84 h. When pH was 5.0 and temperature was from 40 ℃ to 60 ℃, the highest enzyme activities of filter paper, CMC as well as cotton could go up to 16.6, 43.6 and 0.4 U/g, respectively; while temperature was fixed at 50 ℃ and pH was from 4.5 to 5.0, the correspondent highest enzyme activities were 9.1, 29.5 and 0.25 U/g. When the temperature was higher than 60 ℃, the enzyme activities descended rapidly. This research provided lessons for biology fertilizer industry and fermenting feedstuff industry.

**Key words:** cellulose-decomposing microorganisms; screening; fermentation; enzyme activity

纤维素是植物细胞壁的主要成分, 是地球上最大的可再生性有机资源和最丰富的多糖物质<sup>[1~3]</sup>。我国每年有 10 亿 t 纤维素物质产生(包括秸秆、林业采伐剩余物等), 目前利用率还很低, 除一小部分用

于纺织、造纸、饲料和燃料加工外, 大部分作为废弃物被丢弃, 不但带来了严重的环境问题, 也浪费了宝贵的物质资源<sup>[4]</sup>。纤维素酶是使纤维素分解生成葡萄糖的一组酶的总称, 其最大的潜在用途是把纤维

类物质酶法水解成葡萄糖. 迄今为止, 已有很多关于纤维素酶生产菌株的研究报道, 其中主要以木霉属和曲霉属为主<sup>[3]</sup>. 李忠兴等<sup>[4]</sup>利用康宁木霉 T215 液体深层发酵生产纤维素酶的扩大实验获得了令人满意的结果. 黄秀梨等<sup>[7]</sup>分离出 1 株产纤维素酶较高的黑曲霉突变菌株 2281-C, 并对其产生的纤维素酶进行了研究. 本文报道从马粪中分离出 1 株纤维素分解能力较强的霉菌, 编号为 F<sub>10</sub>, 对其纤维素酶学性质进行了探讨, 并与绿色木霉 AS3. 3711 进行比较.

1 材料与方法

1.1 试验材料

土壤采自天津郊区麦田, 马粪、牛粪以及堆肥采自天津郊区牧场.

纤维素刚果红培养基<sup>[8]</sup>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0. 50 g, MgSO<sub>4</sub> 0. 25 g, 纤维素粉 1. 88 g, 刚果红 0. 20 g, 琼脂 14. 00 g, 明胶 2. 00 g, 土壤浸汁 100 mL, 水 900 mL, pH7. 0.

液体发酵培养基<sup>[9]</sup>: 蛋白胨 3. 0 g, 酵母膏 0. 5 g, 麸皮 5. 0 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2. 0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4. 0 g, CaCl<sub>2</sub> 0. 3 g, MgSO<sub>4</sub> 0. 3 g, Tween-80 0. 2 g, 蒸馏水 1 000 mL.

固体曲发酵培养基<sup>[9]</sup>: 麸皮 50. 0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0. 05 g, MgSO<sub>4</sub> 0. 03 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1. 0 g, 蒸馏水 100 mL.

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的筛选 将稀释倍数分别为 10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> 的样品溶液涂布到纤维素刚果红培养基上, 30 ℃培养 3 d, 选择四周有透明水解圈的菌株于纤维素刚果红培养基上划线分离, 得到纯培养. 将纯化后的菌株点种到纤维素刚果红培养基上, 30 ℃培养 4 d. 根据水解圈直径(*H*) 与菌落直径(*C*) 比值(*H*/*C*) 的大小进行初选<sup>[10]</sup>. 将初选纤维素分解菌株的孢子悬液 1 mL 分别接种到液体发酵培养基中, 30 ℃下振荡培养 3 d, 测定其酶活力, 进行复选.

1.2.2 粗酶液的制备 50 mL 液体培养基中接种 1 mL 孢子悬液(孢子数为 1×10<sup>9</sup> 个), 30 ℃、160 r/min 条件下恒温振荡培养 3 d. 液体发酵液在 3 000 r/min 条件下离心分离 15 min, 上清液即为粗酶液.

1.2.3 酶活力的检测方法 DNS 比色法测定酶活力<sup>[11]</sup>. 一个酶活力单位(U)定义为: 每分钟由底物生成 1 μmol 葡萄糖所需要的酶量.

1.3 菌落的形态特征观察及菌株的初步分类鉴定

1.3.1 菌落形态特征 将所选产酶效果最好的菌株接种在 PDA 培养基上, 28 ℃培养 3 d, 测定菌落直径; 观察菌落的颜色、表面、边缘及菌落质地等.

1.3.2 菌丝和孢子形态观察 将在 PDA 培养基上生长的菌落挑取少许菌丝制片, 显微镜下观察菌丝的形态、孢子梗的形态、孢子梗的排列与孢子的形态

和孢子的着生情况.

1.4 对比试验

对比试验用菌株为绿色木霉 *Trichoderma* sp. AS3. 3711, 由中国科学院微生物菌种保藏中心提供.

2 结果与分析

2.1 菌种筛选

从动物粪便及土壤中筛选到纤维素分解菌 35 株, 通过纤维素刚果红培养基鉴定培养, 得到 4 株纤维素分解能力较强的菌株, 经液体发酵试验测定酶活力, 结果见表 1.

表 1 不同菌株对纤维素分解能力的比较

Tab. 1 Comparison of cellulose decomposing abilities by different strains

| 菌株号             | 滤纸酶活力                                             | <i>H</i> / <i>C</i> |
|-----------------|---------------------------------------------------|---------------------|
| strains no.     | filter paper enzyme activity/(U·g <sup>-1</sup> ) |                     |
| F <sub>7</sub>  | 4. 12                                             | 2. 4                |
| F <sub>10</sub> | 9. 08                                             | 3. 5                |
| F <sub>12</sub> | 4. 45                                             | 2. 0                |
| F <sub>15</sub> | 2. 70                                             | 1. 3                |

滤纸酶活力代表了各种酶活力协同作用后的总酶活力, 由表 1 可知, F<sub>10</sub> 菌株的酶活力比其他菌株要高, 而且经纤维素刚果红培养基鉴别, F<sub>10</sub> 菌株的 *H*/*C* 值较大. 说明 F<sub>10</sub> 菌株分解纤维素的能力比其他几株要强, 故选出 F<sub>10</sub> 菌株作为目的菌株.

2.2 菌落的形态特征观察及初步分类鉴定

F<sub>10</sub> 在 PDA 培养基上生长速度很快, 48 h 菌落直径 3. 9 mm, 72 h 菌落直径达 35 mm. F<sub>10</sub> 在 PDA 培养基上开始形成白色的菌丝体, 菌落表面呈同心圆排列, 菌落呈绿色, 扁平, 边缘白色, 整齐. 菌丝透明, 有隔, 分枝繁茂, 壁光滑, 菌丝的短侧枝经二、三级分枝后形成松柏式分枝. 分生孢子呈椭圆形, 浅绿色, 孢子壁粗糙, 孢子在分生孢子梗上聚成分生孢子头.

2.3 对 F<sub>10</sub> 产酶条件的研究

2.3.1 不同碳源对 F<sub>10</sub> 产酶的影响 液体发酵培养基的氮源不变, 碳源用表 2 中的 5 种物质代替, 在 pH 5. 5 下, 30 ℃培养 3 d, 进行酶活力测定, 结果见表 2.

由表 2 可以看出, 以麸皮和羧甲基纤维素(CMC) 为碳源时, F<sub>10</sub> 的滤纸酶活力最高, 以滤纸为碳源时次之, 以葡萄糖和蔗糖为碳源时最低. 说明麸皮、CMC、滤纸等纤维素类物质对 F<sub>10</sub> 产纤维素酶具有较好的诱导作用. 而葡萄糖、蔗糖尽管能为 F<sub>10</sub> 提供良好的营养物质, 但是不利于诱导其产生纤维素酶. 另外, 麸皮和 CMC 等碳源物质对 CMC 酶活力和棉花酶活力的影响规律与它们对滤纸酶活力的影响规律基本一致.

表 2 不同碳源情况下 F<sub>10</sub> 的产酶效果

| Tab. 2 Effects of different carbon sources on the cellulase productivity of F <sub>10</sub> |                              |                     |                        | U · g <sup>-1</sup> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
| 碳源                                                                                          | 滤纸酶活力                        | CMC 酶活力             | 棉花酶活力                  |                     |
| carbon sources                                                                              | filter paper enzyme activity | CMC enzyme activity | cotton enzyme activity |                     |
| 麸皮 bran                                                                                     | 7.20                         | 48.52               | 0.35                   |                     |
| 滤纸 filter paper                                                                             | 6.87                         | 46.42               | 0.30                   |                     |
| 葡萄糖 glucose                                                                                 | 2.11                         | 14.05               | 0.15                   |                     |
| 蔗糖 accharose                                                                                | 2.42                         | 5.56                | 0.03                   |                     |
| CMC                                                                                         | 7.18                         | 58.38               | 0.37                   |                     |

2.3.2 不同氮源对 F<sub>10</sub> 产酶的影响 液体发酵培养基中以麸皮为碳源, 加入不同氮源, 30 ℃ 培养 3 d, 测定酶活力, 结果见表 3. F<sub>10</sub> 在以蛋白胨和硝酸铵为氮源时具有较高的滤纸酶活力, 其他氮源较低. 以硝酸铵为氮源时 CMC 酶活力较高, 是蛋白胨的 2 倍以上. 这说明在 F<sub>10</sub> 将无定性纤维素水解成纤维素寡糖的过程中, 加入硝酸铵具有明显的促进作用.

表 3 不同氮源情况下 F<sub>10</sub> 的产酶效果

| Tab. 3 Effects of different nitrogen sources on the cellulase productivity of F <sub>10</sub> |                              |                     |                        | U · g <sup>-1</sup> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
| 氮源                                                                                            | 滤纸酶活力                        | CMC 酶活力             | 棉花酶活力                  |                     |
| nitrogen sources                                                                              | filter paper enzyme activity | CMC enzyme activity | cotton enzyme activity |                     |
| 蛋白胨 peptone                                                                                   | 7.85                         | 19.17               | 0.28                   |                     |
| 硫酸铵 ammonium sulfate                                                                          | 3.97                         | 13.08               | 0.10                   |                     |
| 草酸铵 ammonium oxalate                                                                          | 4.33                         | 13.33               | 0.13                   |                     |
| 硝酸铵 ammonium nitrate                                                                          | 7.90                         | 40.22               | 0.33                   |                     |
| 柠檬酸铵 ammonium citraconate                                                                     | 3.60                         | 6.30                | 0.11                   |                     |

2.3.3 培养时间对 F<sub>10</sub> 产酶的影响 液体发酵培养基以麸皮为碳源、蛋白胨为氮源, 其他成分不变, 在最佳条件下接种 F<sub>10</sub> 培养 5 d, 每隔 12 h 采样 1 次并测定酶活力, 以时间作出相对酶活力曲线(图 1).

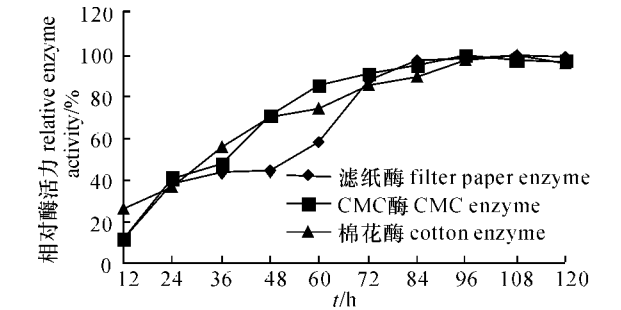


图 1 F<sub>10</sub> 菌株产酶曲线

Fig. 1 Cellulase production curve by strain F<sub>10</sub>

由图 1 可见, 在培养过程中, 前 12 h 3 种酶活力均较低, 这可能是因为 F<sub>10</sub> 被接种到液体培养基后有一段适应期, 在此时期内, F<sub>10</sub> 的产酶能力较

弱. 12 h 后 3 种酶活力均上升很快. 在 36 ~ 84 h 内 CMC 酶活力和棉花酶活力上升趋势非常明显, 而总的滤纸酶活力在 48 ~ 84 h 内也表现出急剧增强的趋势. 当培养时间超过 96 h 后, 酶活力基本保持恒定, 说明 F<sub>10</sub> 菌株的产酶能力迅速下降. 这可能与底物浓度以及代谢产物的抑制作用有关.

2.4 对 F<sub>10</sub> 酶促反应条件的研究

2.4.1 温度对 F<sub>10</sub> 酶促反应的影响 酶液在 pH 5.0、不同温度下测定酶活力, 以温度作出相对酶活力曲线(图 2). 由图 2 可见, 棉花酶活力在 30 ~ 40 ℃ 逐渐升高, 当温度大于 40 ℃ 时, 棉花酶活力逐渐降低, 且 40 ~ 60 ℃ 的下降速率高于 60 ~ 80 ℃ 的下降速率; CMC 酶活力在 30 ~ 60 ℃ 逐渐升高, 当温度超过 60 ℃, 酶活力迅速下降; 滤纸酶活力在温度大于 30 ℃ 时上升速率很大, 直至 50 ℃ 达到最大滤纸酶活力, 从曲线变化趋势可以看出, 滤纸酶活力在 40 ~ 70 ℃ 内基本保持不变, 当温度大于 70 ℃, 酶活力迅速降低.

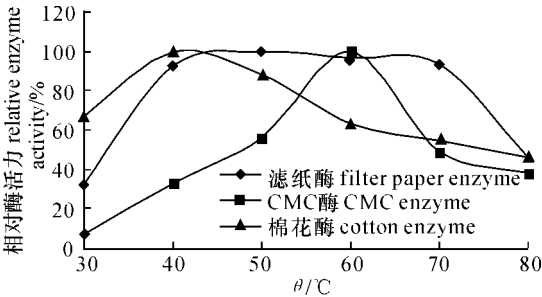


图 2 温度对 F<sub>10</sub> 酶促反应的影响

Fig. 2 Effects of temperature on F<sub>10</sub> enzyme catalyzed reaction

2.4.2 pH 对 F<sub>10</sub> 酶促反应的影响 酶液在 50 ℃、不同 pH 下测定酶活力, 以 pH 作出相对酶活力曲线(图 3). 从图 3 可见, CMC 酶活力在 pH 4.0 ~ 4.6 和 4.6 ~ 5.6 区间内先升后降, 变化较大, 在 pH 5.6 ~ 6.0 时酶活力变化趋于平缓; 而滤纸酶活力在 pH 4.0 ~ 4.6 时基本不变, 到 pH 为 5.0 时达到最大, 当 pH 大于 5.0 时, 酶活力下降趋势较大; 棉花酶活力当 pH 大于 4.0 时缓慢上升, 至 pH 为 5.0 时最大, 当 pH 大于 5.0 时, 酶活力缓慢下降. 分析 3 种酶活力曲线可知, 滤纸酶活力和棉花酶活力均在 pH 为 5.0 时达到最大值, 变化趋势比较相似, 而 CMC 酶活力的最高点出现在 pH 为 4.6 时, 与前两者不一致.

2.4.3 F<sub>10</sub> 的酶液热稳定性 将 F<sub>10</sub> 的粗酶液在 pH 5.5、不同温度条件下, 分别保温 5 h, 然后测定残余酶活力, 以相对酶活力作出热稳定性曲线(图 4).

F<sub>10</sub> 的粗酶液在 50 ~ 80 ℃ 保温 5 h 后发现: 溶液

颜色均变深, 并出现少量沉淀, 温度越高, 沉淀量越多. 由图 4 可以看出, 酶活力在 50 ~ 60 ℃之间保持了较高的酶活性, 而 60 ~ 80 ℃之间酶活力急剧下降. 说明 F<sub>10</sub> 纤维素酶热变温度在 60 ~ 80 ℃之间.

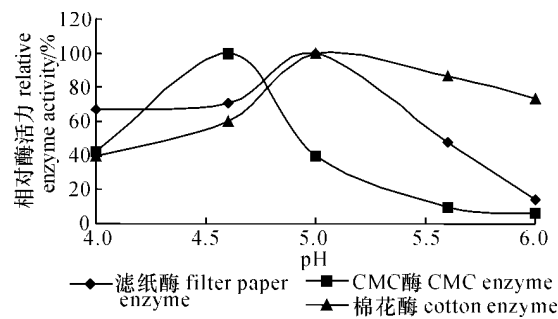


图 3 pH 对 F<sub>10</sub> 酶促反应的影响

Fig. 3 Effects of pH on F<sub>10</sub> enzyme catalyzed reaction

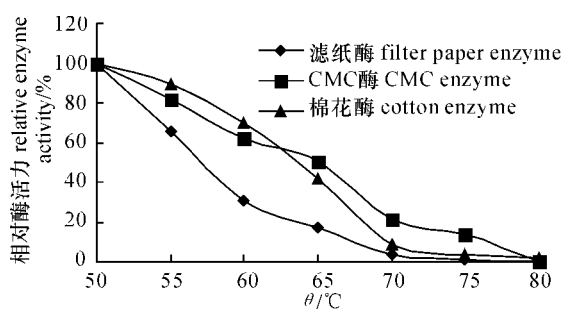


图 4 F<sub>10</sub> 纤维素酶热稳定性曲线

Fig. 4 Thermal stability curve of F<sub>10</sub> crude enzyme

2.5 与绿色木霉 AS3.3711 的比较

为了验证 F<sub>10</sub> 分解纤维素的能力, 将 F<sub>10</sub> 与绿色木霉 AS3.3711 同时进行固、液发酵, 然后比较它们酶活力的大小, 结果见表 4.

表 4 F<sub>10</sub> 与绿色木霉 AS3.3711 酶活力的比较

Tab. 4 Comparison of enzyme activity between F<sub>10</sub> and AS3.3711

| 菌株号<br>strains<br>no. | 固体曲发酵                    |               |                  | 液体发酵                   |               |                  |
|-----------------------|--------------------------|---------------|------------------|------------------------|---------------|------------------|
|                       | solid-state fermentation |               |                  | liquid fermentation    |               |                  |
|                       | 滤纸酶                      | CMC 酶         | 棉花酶              | 滤纸酶                    | CMC 酶         | 棉花酶              |
|                       | filter paper<br>enzyme   | CMC<br>enzyme | cotton<br>enzyme | filter paper<br>enzyme | CMC<br>enzyme | cotton<br>enzyme |
| F <sub>10</sub>       | 7.75                     | 71.72         | 0.60             | 9.08                   | 71.93         | 1.15             |
| AS3.3711              | 7.90                     | 74.13         | 0.53             | 4.30                   | 52.97         | 1.28             |

由表 4 可以看出, 在固体曲发酵酶活力方面, F<sub>10</sub> 的滤纸酶活力、CMC 酶活力和棉花酶活力与 AS3.3711 都比较接近. 而在液体发酵酶活力方面 F<sub>10</sub> 的滤纸酶活力和 CMC 酶活力较 AS3.3711 要高, 棉花酶活力相差不多, 这说明 F<sub>10</sub> 与 AS3.3711 相比具有较高的酶活力, 有一定的分解纤维素残渣的能力.

3 结论

F<sub>10</sub> 菌丝密集, 菌落生长快, 分生孢子梗从菌丝侧枝上长出, 直立, 分枝, 上有分生孢子聚集成孢子头, 孢子壁粗糙, 孢子呈浅绿色. 这些性质与木霉属的菌株相符, 说明 F<sub>10</sub> 是一株嗜中温型的木霉. 其液体发酵酶活力较绿色木霉 AS3.3711 要高.

F<sub>10</sub> 最适宜的产酶条件: 碳源为麸皮、CMC 等纤维素类物质; 氮源为蛋白胨和硝酸铵; 在本试验条件下的适宜产酶时间为 36 ~ 84 h.

F<sub>10</sub> 最适宜的酶促反应条件: 40 ~ 60 ℃; pH4.0 ~ 5.0; 酶热变温度在 60 ~ 80 ℃之间.

参考文献:

[ 1 ] 肖春玲, 徐常新. 微生物纤维素酶的应用研究 [ J ]. 微生物学杂志, 2002, 22(2): 33—35.

[ 2 ] PETER M, ZARNEA G, ADRIAN P, et al. Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolymerized hydrogels [ J ]. Resources, Conservation and Recycling, 1999, 27(5): 309—332.

[ 3 ] LEWIS S M, MONTGOMERY L, GARLEB K A, et al. Effects of alkaline hydrogen peroxide treatment on *in vitro* degradation of cellulosic substrates by mixed ruminal microorganisms and bacteroides succinogenes S85 [ J ]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54: 1163—1169.

[ 4 ] LJUNGDAHL L G, ERIKSSON K E. Ecology of microbial cellulose degradation [ J ]. Adv Microb Ecol, 1985, (5): 237—299.

[ 5 ] 王 沁, 赵学慧. 黑曲霉( *Aspergillus niger* ) 纤维素酶系中内切  $\beta$ -葡聚糖酶性质的研究 [ J ]. 微生物学报, 1993, 33(6): 439—445.

[ 6 ] 李忠兴, 焦旭东, 郝志军. 康宁木霉液体深层发酵生产纤维素酶 [ J ]. 微生物学通报, 1999, 26(6): 403—405.

[ 7 ] 洪 洞, 黄秀梨. 黑曲霉变种 2281—C 纤维素酶的纯化和性质 [ J ]. 北京师范大学学报(自然科学版), 1998, 34(3): 403—408.

[ 8 ] 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基 [ J ]. 微生物学通报, 1997, 24(4): 251—252.

[ 9 ] 王晓芳, 徐旭士, 吴 敏, 等. 一株纤维素分解菌的分离与筛选 [ J ]. 生物技术, 2001, 11(2): 27—30.

[ 10 ] 邱向阳, 陆文静, 王洪涛, 等. 蔬菜—花卉秸秆混和堆肥性状表征及纤维素分解菌群选育研究 [ J ]. 北京大学学报(自然科学版), 2003, 39(2): 254—261.

[ 11 ] 赵亚华. 生物化学实验技术教程 [ M ]. 广州: 华南理工大学出版社, 2000. 149—151.

【责任编辑 李晓卉】