

嗜碱细菌复合碳源条件下对麦草木质素的降解

张甲耀¹, 龚利萍¹, 罗宇煊¹, 许威亚², 凌颀² (1. 武汉大学环境科学系, 武汉 430072; 2. 武汉大学分析测试中心)

摘要:在碱性液体培养条件下($pH \approx 10.5$), 研究复合碳源共代谢最佳综合条件下嗜碱性木质素降解细菌 6 号菌株产酶、降解能力及菌株的生长状况. 结果显示, 虫漆酶(Laccase)在培养的第 4 天酶活达到最高值 2915.37 U/L, 锰依赖过氧化物酶(MnP)在培养的第 8 天酶活达到最高值 1152.88 U/L, 培养 10d 麦草中木质素降解 49.84%. 同时通过扫描电镜分析探讨了 6 号菌株降解木质素的微观过程, 证明了 6 号菌株优先降解木质素的特性和降解方式.

关键词:嗜碱细菌; 复合碳源; 木质素生物降解; 扫描电镜

中图分类号: X793; X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2002)01-04-0070

Biodegradation of Lignin in Wheat Straw by Alkaliphilic Ligninolytic Bacteria with Compounded Carbons

Zhang Jiayao¹, Gong Liping¹, Luo Yuxuan¹, Xu Weiya², Ling Jie² (1. Department of Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Center of Analysis-Measurement, Wuhan University)

Abstract: The article researched enzymes production, the degradation rate of lignin and strain growth of alkaliphilic ligninolytic bacteria strain No.6 in alkaline liquid medium ($pH \approx 10.5$) with compounded carbons. The results showed that the highest activities of laccase and MnP were 2915.37 U/L (4th d) and 1152.88 U/L (8th d), respectively, and the strain degraded 49.84% lignin of wheat straw during ten days cultivation. The changes of ultrastructure of wheat straw caused by strain No.6 attack were investigated with SEM (scan electron microscopy).

Key words: alkaliphilic bacteria; compounded carbon; lignin biodegradation; SEM

自然界中存在着独特的酶系可以降解木质素. 国外研究较多的主要是由微生物产生的锰依赖过氧化物酶和虫漆酶. 目前已知的对木质素的降解作用效果好、产酶活性高的微生物主要是某些白腐真菌, 但在应用中还存在着处理时间过长等诸多矛盾. 因此尽快找到一种木质素降解效率高的、生长快速、产酶活性高、适于大规模应用的木质素降解菌, 是有关研究的首要任务. 由于细菌生长快易于工业化生产, 且碱性条件下具有木质素溶解性增强以及不易被杂菌污染等优势, 因此研究在极端碱性环境下利用细菌降解木质素的可能性具有很大应用价值. 本实验室在该项目研究初期从含木质素的碱性土壤和黑液中分离、诱变、筛选出了一株能优先降解木质素的嗜碱木质素降解菌 6 号菌株^[1]. 本文在复合碳源共代谢的条件及调控机理的研究基础上^[2], 研究了综合培养条件下菌

株的生长、产酶及降解能力, 并通过扫描电镜分析探讨了 6 号菌株降解木质素的微观过程, 以求证明 6 号菌株优先降解木质素的特性和降解方式.

1 材料与方法

1.1 菌种

由本实验室筛选的嗜碱木质素降解菌 6 号菌株.

1.2 原料

将麦草(湖北省农业科学院提供)剪成 2~4cm 的小段, 用 DWF-100 型电动植物粉碎机粉碎成麦草粉.

1.3 培养基和培养方法

基金项目: 国家自然科学基金资助课题(29677012)

作者简介: 张甲耀(1946~), 男, 教授, 主要研究方向为环境生物工程.

收稿日期: 2001-02-16; 修订日期: 2001-05-18

最佳综合培养条件:37℃静置培养10d,第一碳源(蔗糖)1g/L,氮源(硝酸铵)1.2g/L,培养基70ml/250ml锥形瓶,初始pH值10.6,添加0.3%的表面活性剂吐温80(Tween80,简称T-80)0.5mmol/L诱导物2,2'-连氮-3-乙苯-二噻唑-6-硫酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline)-6-sulfonic acid,简称ABTS].接种后第4天加入第二碳源(麦草粉20g/L),0.7g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、1mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、5mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、30mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和50mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

菌株接种于以上培养基(每瓶接种1%菌悬液)进行培养,每天取样测定菌液OD值和Laccase(漆酶)与MnP(锰依赖过氧化物酶)的活性及对麦草木质素的降解,从培养第5天起,每天取样做扫描电镜实验.

1.4 菌液OD值的测定

751紫外分光光度计,测定波长420nm.

1.5 酶活性测定

MnP^[3]:该酶活性根据37℃下NADH氧化成NAD的速率来测定.加入酶液起始反应,340nm下测定3min吸光值的变化.酶活性单位定义为1国际单位(1U)等于每1min氧化1μmol底物或生成1μmol产物的酶量.

Laccase^[4]:该酶活性根据25℃下ABTS的氧化速率来测定.加入酶液起始反应,420nm下测定3min吸光值的变化.酶活性单位定义同上.

木质素、纤维素和半纤维素含量的定量分析程序详见文献[5].

木质素降解率校正^[6]:在测定木质素降解率时,考虑有部分酸溶木质素溶于硫酸造成误差,分光光度计法进行校正.

扫描电镜:X-650型HITACHI扫描电子显微镜.

2 结果与分析

2.1 最佳综合培养条件下6号菌株的生长、产酶及降解能力

不同培养时间下菌液的OD值和Laccase与MnP的活性及对麦草中木质素的降解率测定结果见表1和图1.菌液OD表明,最佳综合条件下,该菌株的稳定期在3~6d,之后进入衰老期.而它所产生的木质素降解酶Laccase和MnP在培养液中的最佳酶活时间分别在第4天和第8天,基本上在衰老期和稳定期后期,这说明该菌株木质素降解酶的合成时间是在对数期和稳定期内,符合有关细菌木质素降解酶的合成发生在初生代谢阶段的理论^[7].

表 1 最佳综合培养条件下 6 号菌株的生长状况、酶活的变化

Table 1 Profile of strain No. 6 growth and enzymes activities on optimal comprehensive culture condition

培养天数/d	1	2	3	4	5	6	7
OD 值	0.107	0.243	0.315	0.350	0.327	0.311	0.279
MnP/ U·L ⁻¹	29.20	346.19	766.30	891.24	1003.61	1075.11	1113.48
Laccase/ U·L ⁻¹	517.89	991.57	2134.66	2915.37	2747.13	2680.91	2543.60
培养天数/d	8	9	10	11	12	13	14
OD 值	0.262	0.254	0.248	0.241	0.239	0.228	0.220
MnP/ U·L ⁻¹	1152.88	1036.83	902.54	812.06	733.80	667.25	672.64
Laccase/ U·L ⁻¹	2502.65	2422.57	2389.04	2346.53	2296.25	2235.41	2272.29
培养天数/d	15	16	17	18	19	20	
OD 值	0.213	0.204	0.200	0.192	0.185	0.168	
MnP/ U·L ⁻¹	679.97	664.18	651.46	655.35	642.26	637.50	
Laccase/ U·L ⁻¹	2224.37	2190.72	2110.26	2148.33	2097.85	2066.12	

6 号菌株木质素降解酶的合成和向细胞外分泌木质素降解酶主要是在对数期和稳定期,在进入衰老期后合成的酶量很少,而菌株培养液中的酶活却一直保持在较高的水平.6 号菌株产酶的这一特点十分有利于降解木质素,菌株对麦草木质素的降解第 10 天时是 49.84%,此后仍然缓慢增长,第 20 天时是 52.94%,虽然此时酶活仍保持较高的水平,但菌株已处于衰老期,菌浓度减少导致降解能力不足.

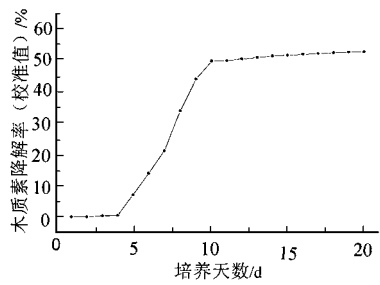


图 1 最佳综合培养条件(添加诱导物 ABTS)
下 6 号菌株的降解曲线
Fig.1 Degradation rate curve of wheat straw by strain
No.6 on optimal comprehensive culture condition
(adding inducer ABTS)

2.2 6号菌株降解麦草的微观过程

生物制浆最敏感的问题就是避免在脱木质素过程伴随出现的纤维素降解现象.白腐菌往往在降解木质素时,亦会造成纤维壁变薄,直至纤维破坏^[8].本实验室筛选出的能相对优先降解木质素的嗜碱性木质素降解菌 6 号菌株,其木质素降解能力强,纤维素和半纤维素降解能力较弱.但是否真正优先降解木质素则有待证实,我们拟通过扫描电镜观察该菌株降解麦草的微观过程来证实 6 号菌株的这一降解特点.

图 2A(麦草原样,放大倍数×250)是麦草组织内部结构的扫描电镜图像.图 2B(麦草原样,放大倍数×1300)是麦草组织内部结构横切面的扫描电镜图像.纤维分布于表皮下方和微管束的周围,其他部分为大量薄壁细胞所充填.在生物作用的初期,菌体侵入麦草内部,并在薄壁细胞以及纤维细胞的腔内繁殖、聚集(见图 2C,放大倍数×1500,此时为麦草粉加入后 1 d).从图 2D(放大倍数×1200,此时为麦草粉



图 2 6 号菌株降解麦草的微观过程
Fig.2 The changes of ultrastructure of wheat straw caused by
strain No. 6 attack

加入后 2d) 可以观察到,在生物作用初期,薄壁细胞就开始分解,以至完全被破坏(此时纤维几乎无变化),薄壁细胞的去除有利于草类制浆。纤维部分的生物降解从纤维的次生壁和胞间层之间的区域开始(见图 2E,放大倍数 $\times 500$,此时为麦草粉加入后 4d)。将该图放大到 1500 倍可以清楚地看到胞间层的分解(见图 2F,放大倍数 $\times 1500$,此时为麦草粉加入后 4d)。随后纤维细胞壁中木质素最集中的部位胞间层被逐渐分解,其结果纤维能保持完整地彼此分离(见图 2G,放大倍数 $\times 800$,此时为麦草粉加入后 5d)。再进一步降解,(见图 2H,放大倍数 $\times 1500$,此时为麦草粉加入后 5d),其分离的纤维表面出现裸露的微细纤维,说明纤维次生壁的木质素在生物作用下逐渐被除去,而且纤维素降解现象微弱。通过扫描电镜观察的结果可以说明,6 号菌株能选择性降解木质素,且伴随的纤维素降解是相对微弱的。

2.3 生物脱木质素的不同阶段

图 2(C~H) 显示在不同阶段时生物脱木质素的情况,可大致分为 3 个阶段。在生物作用的初期,木质素降解速率较低,微生物在这个阶段中仅限于菌体在植物组织内部的繁殖和蔓延(见图 2C)。在中期,菌体先是迅速破坏薄壁细胞(见图 2D),随后菌体主要降解含木质素浓度最高的纤维胞间层,木质素的降解有明显的增加(见图 2E 和 F),这是脱除木质素的主要阶段。在后期,木质素降解速率下降,脱木质素主要发生在纤维次生壁中(图 2G)。

3 结论

白腐真菌培养 14d 木质素降解率只有 43.9 %^[3],未经优化选择的培养条件下 6 号菌株 10d 降解麦草中木质素 40.78 %^[1],在最佳综合培养条件下该菌株的产酶及降解能力得到进

一步提高,10d 木质素降解率达 49.84 %,特别有利于缩短生物制浆中生物作用周期;6 号菌株能优先地降解纤维胞间层,使纤维能保护完整地彼此分离且仅伴随着微弱的纤维素降解,基本上不会影响纤维本身物理强度;6 号菌株生物脱木质素大致可分为 3 个阶段;6 号菌株是嗜碱性细菌,细菌生长快并易于遗传改造,且碱性条件有利于纤维素的稳定和阻止杂菌的污染,结合嗜碱性细菌有利于降解木质素的化学特性和生物特性,有进一步研究的意义。

这些特征和规律,对解决生物制浆 2 大关键性问题(降解能力和作用周期)有重要意义,也显示出它对造纸黑液处理、木质素资源的生物转化与利用等脱木质素工艺的潜在应用优势。

参考文献:

- 1 管筱武,张甲耀,罗宇煊等.嗜碱木质素降解菌降解能力的初步研究.中国造纸,1999,18(6):19~22.
- 2 罗宇煊,张甲耀,管筱武等.嗜碱细菌降解木质素的复合碳源共代谢研究 I——复合碳源组合方式及氮源的选择.城市环境与城市生态,2000,13(2):8~10.
- 3 Leontievsky A A, Myasoedova N M, Golovleva A. Production of Ligninolytic Enzymes of the White Rot Fungus *Panus Tigrinus*. J. Biotechnol., 1994, 32:299~307.
- 4 Brian P. Roy and Frederick Archibald, Effect of Kraft Pulp and Lignin on *Trametes Versicolor* Carbon Metabolism. Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59(6):1855~1863.
- 5 王玉万,徐文玉.木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木质素的定量分析程序.微生物学通报,1987,14(2):81~84.
- 6 屈维均,陈佩蓉,何福望编.制浆造纸实验.北京:中国轻工业出版社,1992.253~255.
- 7 管筱武,张甲耀,罗宇煊.木质素降解酶及其调控机理研究的进展.上海环境科学,1998,17(11):46~49.
- 8 Ramachandra M, D L Crawford, G Hertel. Characterization of an Extracellular Lignin Peroxidase of the Lignocellulolytic Actinomycete *Streptomyces viridosporus*. Appl. Environ. Microbiol., 1988, 54(12):3057~3063.