

一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能

崔宗均¹, 李美丹¹, 朴哲¹, 黄志勇², Masaharu Ishii³, Yasuo Igarashi³ (1. 中国农业大学作物学院, 北京 100094; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080; 3. 东京大学农学部应用生命工学, 日本 东京 113)

摘要:从 4 种堆肥样品中分别筛选出纤维素分解能力较强的 4 组混合菌, 再以酸碱反应互补的原则重新优化组合并驯化成 1 组纤维素分解能力非常强而稳定的纤维素分解菌复合系 MC1. 100 mL 培养物在 50 ℃ 静止培养 72 h, 分别可分解 0.48 g 滤纸、0.49 g 脱脂棉、0.19 g 麦秆和 0.08 g 锯末. 分解滤纸时, 第 24 h CMC 糖化力最高, 为 122.3 U·mL⁻¹. 在初始 pH 4~10 的不同培养基上接种, 均能把 pH 调到中性, 最后稳定在 8.0~8.5 之间. 在连续投放滤纸情况下纤维素分解能力稳定保持 20 d 以上, 其发酵液的 pH 在有滤纸时稳定在 6.0~6.5 之间, 没有滤纸时稳定在 8.0~8.5 之间.

关键词:纤维素分解; 菌; 复合系; 功能; 稳定

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2002)03-04-0036

Selection of A Composite Microbial System MC1 with Efficient and Stability Cellulose Degradation Bacteria and Its Function

Cui Zongjun¹, Li Meidan¹, Piao Zhe¹, Huang Zhiyong², Masaharu Ishii³, Yasuo Igarashi³ (1. Dep. Agr., China Agr. Univ., Beijing 100094, China; 2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 3. Fac. Agr., The University of Tokyo, 113 Japan)

Abstract: Four groups of microbial mix culture with considerable capability of cellulose degradation were selected from four compost heaps, by combining the four groups, a composite microbial system MC1 with highly efficient cellulose degradation was obtained. It was found that 0.48 g of filter paper, 0.49 g of absorbent cotton, 0.19 g of wheat straw, or 0.08 g of wood residue can be degraded by 100 mL of MC1 at 50 ℃ with in 72 hours under static culture. The CMI saccharification activity was much higher at 24th hours when degrading filter paper that was 122.3 U·mL⁻¹. This capability of degradation maintained more than 20 days when the substrates were continually added. MC1 could be inoculated in a wide pH rang, from 4 to 10; however, the final pH would be changed to neutrality after incubation. The pH would be stability with filter paper between 6.0 and 6.5, and between 8.0 and 8.5 without the filter paper.

Keywords: cellulose degradation; microbe; composite microbial system; function; stability

随着人们生活水平的提高, 城乡有机废弃物日益增多, 其中量最大的就是纤维素类物质. 中国每年光作物秸秆一项就有 6 亿 t 之多^[1]. 但由于纤维素分解困难, 到目前为止仍没有很好地分解处理和利用. 因而, 纤维素分解的研究对减轻废弃物给环境的压力和纤维素资源的开发利用具有重要的意义.

至今, 已有很多关于纤维素分解菌的报道, 其大部分是以纯培养方法分离和筛选的^[2~4], 但纯培养物在保持纤维素分解能力上都存在一

些问题. 因此, 近年在环境中的纤维素分解研究上, 混合菌的作用逐渐得到重视^[6]. 笔者等摆脱传统的微生物纯培养分离方法, 在不破坏自然界中微生物之间协同关系的前提下, 将酸碱反应不同的菌群优化组合, 筛选和驯化了高效而稳定的纤维素分解菌复合系. 本文报告该复合系的筛选过程. 对不同纤维素材料的分解能力

基金项目: 国际合作项目, 日本学术振兴会“未来开拓”项目
作者简介: 崔宗均(1957~), 男, 博士后, 副教授, 主要研究方向为有机废弃物微生物处理.

收稿日期: 2000-12-15; 修订日期: 2001-09-12

及培养物的稳定性.

1 材料与方法

1.1 培养条件

培养基:蛋白胨纤维素培养液(PCS),其成分为 0.5 %蛋白胨,0.5 %纤维素(滤纸或麦秆粉),0.5 % NaCl,0.2 % CaCO₃,0.1 %酵母粉,在 50 ℃静止培养,使处于 DO 为 0.02 ~ 0.4 的微好氧.

1.2 高效稳定纤维素分解菌复合系 MCl 的筛选与驯化

分别用麦秆与鸡粪、麦秆与牛粪、甘蔗渣与鸡粪、麦秆与猪粪混合成 C/N 为 30,含水量为 60 %后堆积发酵.堆制一周,高温发酵高峰时,分别从各堆体取 1g 样接种于 5 ml PCS 中,在 50 ℃静止培养.等浸在培养液中的滤纸刚刚分解断裂时,转接于同样的新鲜培养液中.如此分别转接数代后,将 pH 反应偏酸的和偏碱的培养物混合接种,边传代边筛选出滤纸分解速度快而且 pH 保持稳定的混合体,以至驯化成高效而稳定的复合系 MCl.

1.3 纤维素分解活性的测定

(1) CMC 糖化力法 将培养液直接以 3000r/min 离心 15 min 后,按文献[5]的方法测定.测定时,酶促反应温度 60 ℃,反应时间为 5 min,DNS 显色反应时间 5 min,测定波长为 490nm.使用仪器为 Varian 公司的 CARY100Bio 型分光光度计.

(2) 失重法 将 0.5g 的滤纸(或其他纤维素物质)作为唯一碳源制作 100 mL PCS,接种 5 ml MCl 菌液,50 ℃静止培养 72h 后,5000r/min 离心,倒上清液,用盐酸和硝酸的混合液冲洗而消除菌体^[7],离心,清水洗,离心,105 ℃烘干后称重,计算失重量和失重率.

1.4 MCl 对不同纤维素材料的分解能力

分别取 0.5g 的滤纸、脱脂棉、未经处理的麦秆粉和锯沫作为唯一碳源制作 100 mL PCS,接种 5 mL MCl 菌液,50 ℃静止培养,72h 后,用失重法测定分解能力.

1.5 不同初始 pH 对 MCl 发酵液 pH 及滤纸分解能力的影响

将 5 mL MCl 菌液接种到 pH 分别调成 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的 100 mL PCS,50 ℃静止培养,用上海雷磁仪器厂生产的 pH S-25 型 pH 计每 12h 测定 1 次 pH 值,一直测定到所有处理的 pH 值稳定.在此实验中,以滤纸完全崩解来表示分解能力.

1.6 在连续培养条件下 MCl 发酵液的 pH 和纤维素分解能力的稳定性

在 2000 mL 三角瓶中装 1500 mL PCS,每瓶加 2.6g 滤纸,不调 pH 值.分 2 组,1 组不再供应新的滤纸,在 50 ℃下继续培养,每天测定 1 次培养液的 pH 值;另 1 组在第 1 次供应的滤纸将要全部崩解时(第 3d)开始每天追加 1.3g 滤纸,每天测定 1 次 pH 值,并观察滤纸崩解的情况.

2 结果与分析

2.1 MCl 的筛选与驯化

4 种堆肥样品中均得到有较强纤维素分解能力的培养物.其中,鸡粪麦秆样品培养物(编号为 A)的滤纸分解速度最快,经 72h 后相当于培养物 0.5 %的滤纸全部崩解掉,其后依次为牛粪麦秆(B)、甘蔗渣鸡粪(C)及猪粪麦秆的培养物(D)(表 1).但随着传代,它们的纤维素分解速度变慢,发酵液的 pH 值不稳定.在 4 种堆肥样品培养物中 A 和 C 发酵液逐渐趋于微酸性,B 和 D 发酵液逐渐趋于微碱性,最终停止反应.将 A、B、C、D 4 种发酵液互相混合接种结果,得到了 1 组滤纸(0.5 %)崩解速度 48h 的混合体.经 1 年多的传代、驯化,混合体在发酵过程中的 pH 已稳定在 6.5(有底物)和 8.5(无底物),并在 4L 的培养规模上连续投放滤纸的情况下分解活性保持 1 个月以上.此混合体为含

表 1 4 种堆肥样品培养物的滤纸分解速度
和 pH 随传代的变化¹⁾

样品	第 1 代		第 4 代	
	崩解速度/h	3 d 后 pH	崩解速度/h	3 d 后 pH
麦秆 + 鸡粪(A)	72	6.8	120	5.5
麦秆 + 牛粪(B)	84	7.5	168	8.5
甘蔗 + 鸡粪(C)	96	7.5	120	6.0
麦秆 + 猪粪(D)	108	7.5	240	8.5

¹⁾滤纸原重为 0.5g,反应体积为 100 mL.

多种纤维素分解菌的高效而稳定的纤维素分解菌复合系(编号为 MCl)。

2.2 MCl 的滤纸纤维素分解活性

含有 0.5g 滤纸的 100 mL PCS 中,接 MCl 菌 5 mL,50℃ 静止培养,第 24、48、72h 用 CMC 糖化力法分别测定纤维素酶活,结果酶活性分别为 122.3、117.6、93.9 U·mL⁻¹,第 24h 的活性最高。在实际观察时,第 24h 纸片彭松变软,第 48h 纸片大部分区域崩解,第 72h 已完全崩解,说明最高的酶活性出现在外观上纸片变软的初期。第 72h 用失重法测定结果,0.5g 滤纸失重 0.44g,分解率为 88%(表 2)。从以上结果,认为失重法比较直观而真实地反映该复合系的纤维分解能力。

表 2 MCl 的滤纸分解活性¹⁾

Table 2 Activity of filter paper degradation by MCl			
项目	24h	48h	72h
糖化力/ U·mL ⁻¹	122.3	117.6	93.9
失重/ g			0.44
分解率/ %			88

¹⁾ 滤纸原重为 0.5g,反应体积为 100 mL。

2.3 MCl 对不同纤维素材料的分解能力

用失重法测定滤纸、脱脂棉、麦秆粉及锯末的分解率结果,脱脂棉的分解率最高,在 72h 内 100 mL 培养液中 0.5g 脱脂棉几乎全部被分解,平均分解率为 98%,其次为滤纸 94%,麦秆和锯末的分解率分别为 38%和 16%(表 3)。可见 MCl 不仅对滤纸和脱脂棉等较纯的纤维素材料有强烈的分解能力,而且对麦秆、锯末等结构复杂的含纤维素材料也具有较强的分解能力。

表 3 MCl 对滤纸、脱脂棉、麦秆及锯末的分解能力¹⁾

Table 3 Degradation activity of filter paper, absorbent cotton, wheat straw, wood residue				
项目	滤纸	脱脂棉	麦秆粉	锯末
失重/ g	0.47	0.49	0.19	0.08
分解率/ %	94	98	38	16

¹⁾ 滤纸、脱脂棉、麦秆、锯末的原重为 0.5g,反应体积为 100 mL,反应时间为 72h。

2.4 不同初始 pH 对发酵液 pH 变化及滤纸分解能力的影响

在不同 pH 下接种后,发酵液的 pH 很快往中性方向变。第 24h,原 pH4~8 的处理均集中

到 7 左右,原 pH 9 和 10 的处理变化较慢。在 36h 时原 pH6、7、8 的处理的 pH 下降到 6.2 左右,这时滤纸正处于全面崩解阶段。48h 时全部崩解完。随后原 pH5 的处理在 60~72h、原 pH 为 9 的处理在 72~84h 后 pH 变为 6.3 左右并滤纸全部崩解。然后 pH 逐渐上升最后稳定到 8.0~8.5 之间。原 pH 为 10 和 4 的处理虽然稳定较慢,但分别在第 7 天和第 9 天 pH 下降到 6.4 和 6.3 并滤纸崩解后稳定到 8.0~8.5 之间(图 1)。由此可见,MCl 复合系对 pH 的调节能力非常强,总的规律是先将 pH 调到中性到微碱性,然后随着纤维素的分解下降至 6.0~6.5 之间,最后耗尽底物后稳定到 8.0~8.5 之间。从正在分解纤维素的发酵液发出一股酸味认为,pH 下降可能由纤维素分解产生的有机酸所致。而纤维素减少之后,已产生的有机酸被继续分解或转化,使 pH 重新回升,保持由多种微生物代谢所缓冲的 pH 值,对此机理待进一步研究。

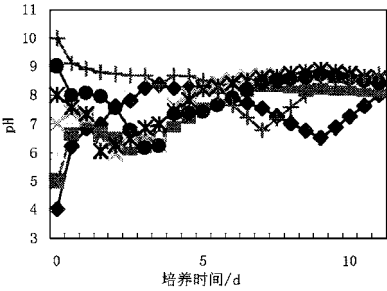
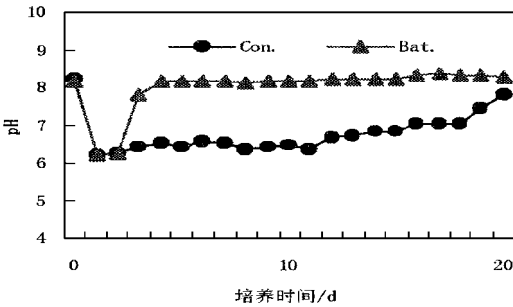


图 1 不同初始 pH 下接种后发酵液 pH 的变化
Fig.1 Change of pH on inoculated with different pH of culture media

2.5 在连续培养条件下 MCl 发酵液 pH 和纤维素分解能力的稳定性

未调 pH 的 2 瓶 PCS 培养液(A 和 B 瓶)灭菌后的 pH 为 8.15 和 8.2。接种 MCl 培养 24h 后两者的 pH 下降到 6.22 和 6.23,在 24~48h 之间维持同样 pH 并 2.6g 滤纸崩解完,其结果与上述 2.4 节一致,A 瓶的 pH 就上升,到第 4 天稳定到 8.15(图 2)。此水平能维持 1 个月,并且每 10d 以此发酵液接种,均证明具有纤维素分解能力。B 瓶在滤纸将要崩解完时(第 3 天)开始每天连续投放 1.3g 滤纸,结果前 20 天不

仅投放的滤纸全部分解,其 pH 一直稳定在 6.0 ~ 6.5 之间.说明 MCl 的生长和纤维素分解功能相当稳定.20d 以后滤纸分解逐渐变慢,pH 上升,22 天以后滤纸不再分解.此现象可能与连续供应过多的碳源,耗尽氮源,使 C/N 失调有关.或在连续过多供应碳源的情况下分解的中间产物来不及转化,积累过多,而抑制纤维素的继续分解.



con.最初加 2.6g 后每天追加 1.3g 滤纸
Bat.最初加 2.6g 滤纸后不在追加

图 2 连续培养时发酵液 pH 的变化

Fig. 2 Change of pH on continually culture

3 讨论

(1) 纤维素分解菌复合系 MCl 的纤维素分解能力 至今,关于纤维素酶生产菌的报道中,对纤维素分解作用较强的菌株多是真菌属的菌株,特别是 *Trichoderma virde* 及其近缘的菌株^[2],细菌较少.它们几乎是以纯培养手段分离得到的,对自然结构的纤维素分解能力很有限. M. Mandels 等报道的 *Trichoderma reesai* QM 9414^[2]和 S. Takao 等分离的 *Penicillium purpurogenam* P-26^[3]对微晶纤维素、CMC 等的糖化活性号称世界最强.但没有报道能够分解稻草等天然纤维素.史玉英等分离的纤维素分解菌群与前述的纯菌相比,对滤纸、膨化稻草等天然纤维素表现出较强的分解能力.但培养 4 天后由于 pH 失调而反应终止^[6].而 MCl 不仅滤纸分解率为史玉英等结果的约 2 倍,对各种天然纤维素材料具有强烈的分解能力,而且同一培养体系在连续投放滤纸情况下可保持 20d 以上的分解能力.

(2) 纤维素分解菌复合系 MCl 的稳定性 常用的纤维素分解菌的分离方法是从样品中纯

化出目的菌种^[3,8],但在使获得的纯种仍保持纤维素分解活性上都存在一些问题.已有研究表明纤维素分解菌之间协同作用明显,多种菌混合培养能够获得较高纤维素分解活性的菌群,但这些菌群往往因为培养体系的 pH 偏高或偏低而降低纤维素分解活性,生长恶化.因此,在纤维难素分解菌的发酵中 pH 的不稳定是降低或抑制纤维素分解活性的主要原因之一^[6,9],在较长时间发酵时,常常以添加酸或碱来调节发酵体系的 pH.并且这些纯培养菌的发酵需要严格的无菌操作,难应用于自然环境.本研究中,在保持自然群体中菌种间协同关系的前提下,将酸碱反应不同的纤维素分解菌群重新组合,获得了稳定而高效的纤维素分解菌复合系 MCl.该复合系可将不同 pH 的培养基缓冲到中性,并使发酵液 pH 稳定 1 个月以上;在连续投放滤纸的极端情况下 pH 和分解力能够保持 20d 以上的稳定;添加未灭菌的纤维素材料不影响发酵和稳定性.说明该复合系由多种处于协同关系的微生物组成.其反应产物互相利用和中和,形成了较稳定的自然循环系统.该系统一旦形成,不易被外界杂菌所破坏.因此,认为有目的地构建稳定的复合菌系将是环境微生物应用上的一条有效的途径.

参考文献:

- 1 王维云,朱金华,吴守一.纤维素科学及纤维素酶的研究进展.江苏理工大学学报,1998,19(13):20~28.
- 2 Mandels M, Sternberg D. Recent advances in cellulose technology. J. Ferment. Technol., 1976, 54(4):267~286.
- 3 Takao, S Kamagata, Y, Sasaki H. Cellulose production by penicillium purpurogenam. J. Ferment. Technol., 1985, 63(2):127~134.
- 4 Kiyofumi sakai, Tatsuo Ymauchi, Fumiko Nakasu et al. Biodegradation of cellulose acetate by neisseria sicca. Biosci. Biotech. Biochem., 1996, 60(10):1617~1622.
- 5 B.施特马赫著,钱嘉渊译.酶的测定方法.北京:中国轻工业出版社,1992.103~177.
- 6 史玉英,沈其荣,姜无忌等.纤维素分解菌群的分离和筛选.南京农业大学学报,1996,19(3):59~62.
- 7 Updegraff D M. Semimicro Determination of Cellulose in Biological Materials. Analytical Biochemistry, 1969, 32:420~424.
- 8 Han Y W, Srinivasan V R. Isolation and characterization of a cellulose-utilizing bacterium. Appl. Microbiol, 1968, 16:1140~1145.
- 9 单谷,罗廉,余世袁. pH 值对纤维素酶制备的影响.南京林业大学学报,1999,23(3):60~62.