

文章编号:1673-1689(2009)03-0352-04

从白蚁中分离筛选纤维素分解菌及其产酶性质

何刚强^{1,2}, 堵国成², 刘立明², 霍光华^{*1}

(1. 江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要:以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为唯一碳源对白蚁悬液进行富集培养,并从中分离菌株 32 株,通过纤维素刚果红初筛平板获得透明圈较大的 8 株菌,在此基础上进行摇瓶复筛,得到 1 株酶活较高的菌株(B3)。同时对其酶促反应温度、稳定性及其酶作用底物进行了测定。结果表明:CMCase 的最适酶促反应温度为 50 ℃,且在该温度下有较强的稳定性,保温 30 min 酶活基本保持不变,60 min 酶活损失约 14%,菌株 B3 所产纤维素酶对玉米秸秆纤维素粉有较强的水解能力,同时对滤纸和脱脂棉也有一定的降解能力。

关键词:白蚁;纤维素分解菌;酶活;酶学性质

中图分类号:Q 539.3; Q 552

文献标识码:A

Screening and Crude Enzyme Property of a Cellulose-Decomposing Strain

HE Gang-qiang^{1,2}, DU Guo-Cheng², LIU Li-ming², HUO Guang-Hua^{*1}

(1. College of Biological Sciences and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract:Thirty-two strains were isolated from termite suspension with CMC-Na as the sole carbon source. We got eight colonies surrounded by some big transparent zone in cellulose-congo red agar medium. A strain (B3) of cellulose-decomposing strain was isolated by shake flask for the second screening. The optimal reacting temperature of cellulase secreted by strain B3 was 50 ℃. The specific enzyme activity was similar when temperature was kept at 50 ℃ for 30 min. However, for the case of 60 min, the enzyme activity lost about 14%. Under the same conditions, the straw enzyme activity was very high, and relative high FTA and absorbent cotton enzyme activity was observed.

Key words:termite; cellulose-decomposing microorganism; cellulase activity; enzyme property

纤维素酶(cellulase)是把纤维素降解成葡萄糖的一组酶的总称。纤维素酶根据酶的作用方式分为 C1 酶、CX 酶和纤维二糖酶等类型^[1]。目前,纤维素酶已在医药、日用化工、废水处理、动物饲料的加工、谷物乙醇发酵、果汁制取、造纸及纺织工业等

各个领域得到应用,其前景十分广阔^[2-3]。但至今纤维素酶在工业上的应用还非常有限,菌株产酶量低及较高的生产成本是主要限制因素^[4]。因此,筛选酶活高的野生菌株,对纤维素酶的工业化生产及纤维素类资源的开发利用都具有重要意义。

收稿日期:2008-01-16

基金项目:国家 973 计划项目(2007CB714306)。

* 通讯作者:霍光华(1963-),男,安徽当涂人,工学博士,教授,硕士生导师。Email: hgh3813899@sohu.com

迄今为止,已有关于筛选纤维素酶生产菌株的报道大多是从牛粪、瘤胃、堆肥等分离得到,其中以木霉属和曲霉属为主,但很少有从白蚁肠道内分离高产纤维素酶菌株的报道。白蚁通过分解食入的木材纤维,将木聚合物转化为糖类,从而获得营养。寄生于白蚁后肠的单细胞原生动物的^[5-6]、真菌、细菌^[7-8]和白蚁肠道上皮细胞^[9]都能分泌纤维素酶。作者从白蚁体内成功分离出一株高产纤维素酶的菌株,并对其酶学性质进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

白蚁,采集于江西农业大学标本园。

1.2 培养基

1.2.1 选择培养基(g/L) CMC-Na 20,蛋白胨 3,酵母膏 0.5, KH_2PO_4 1.5, Na_2HPO_4 2.5,琼脂 20; pH 7.0, 121 °C 灭菌 15 min。

1.2.2 纤维素刚果红培养基(g/L) CMC-Na 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, NaCl 0.5, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5,刚果红 0.4,琼脂 20; pH 自然, 121 °C 灭菌 15 min^[10-11]。

1.2.3 斜面及种子培养基(g/L) PDA 培养基为土豆 200,蔗糖 20,琼脂 20; pH 自然, 121 °C 灭菌 15 min。

1.2.4 发酵培养基(g/L) CMC-Na 7.5,蛋白胨 3,酵母膏 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, KH_2PO_4 2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3; pH 7.0, 121 °C 灭菌 15 min。

1.3 培养方法

1.3.1 平板及斜面培养 将灭菌后的平板和斜面 30 °C 下过夜培养,检查灭菌是否彻底,接种后 30 °C 下培养 48 h。

1.3.2 种子培养 将冷藏的斜面菌种在 30 °C 培养 5 h,然后接入种子培养基,250 mL 三角瓶装液量 50 mL, 30 °C 下 200 r/min 振荡培养 22~24 h。

1.3.3 发酵培养 250 mL 三角瓶装液量 80 mL,接种体积分数 10%,在 30 °C 和 200 r/min 条件下培养 144 h,每个样品做 3 个平行。

1.4 白蚁悬液的制备

将收集到的白蚁用 75% 的乙醇消毒 3~4 min,无菌水冲洗 3 次(无菌操作),然后切去头胸部,腹部置于已灭菌的培养皿中,将腹部撕破,转入装有玻璃珠和 20 mL 生理盐水的 250 mL 三角瓶中,充分振荡,即为白蚁菌悬液。将消毒过的白蚁腹部在 PDA 平板上滚动擦拭,检验白蚁表面消毒是否彻底^[12]。

万方数据

1.5 秸秆纤维素的制备

将玉米秸秆剪成 2~3 cm 小段,烘干后粉碎,过 60 目筛,加入 2 g/dL 的氢氧化钠溶液至固液质量比为 1:5, 85 °C 水浴处理 1 h,水洗至 pH 为中性,烘干备用。

1.6 滤纸的预处理

取新华 1 号滤纸若干,用 1 g/dL 的醋酸溶液浸泡 24 h(除去淀粉,碘液检验),再用 2 g/dL 的 NaHCO_3 洗至中性,60 °C 下烘干备用。

1.7 酶活测定方法

发酵液 5 000 r/min 离心 10 min,上清液即为粗酶液。采用 DNS 法测定还原糖质量浓度。由公式(1)计算酶活力(以每分钟产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酶活力单位, IU/mL 或 U/mL)^[13-14]:

$$\text{酶活力(IU/mL)} = \frac{(m_1 - m_2) \times 1\,000}{180 \times t \times v} \quad (1)$$

式中: m_1 为酶解液中还原糖的量(mg); m_2 为酶液中还原糖的量(mg); 180 为葡萄糖相对分子质量; t 为水解时间(min); v 为粗酶液体积(mL)。

1.7.1 CMC-Na 酶活力 取 1 g/dL CMC-Na 溶液 1.5 mL 于试管中,加 0.5 mL 粗酶液,混匀后,于 50 °C 下水浴 30 min。

1.7.2 滤纸酶活(FPA) 取 0.5 mL 粗酶液、1.5 mL 柠檬酸缓冲液(pH 4.85, 0.1 mol/L)和碱处理过的滤纸一张(1×6 cm)于带塞试管中,50 °C 水浴 1 h。

1.7.3 脱脂棉酶活力 取 0.5 mL 粗酶液加入到装有 50 mg 脱脂棉、1.5 mL 柠檬酸缓冲液(pH 4.85, 0.1 mol/L)的带塞试管中,再加 1 滴甲苯,50 °C 下水浴 24 h。

1.7.4 玉米秸秆纤维素粉酶活 方法同脱脂棉酶活力。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

2.1.1 富集培养 取 2 mL 白蚁悬液于选择培养基中,在 30 °C、200 r/min 条件下培养 48 h,经梯度稀释后涂布于 PDA 平板培养基,30 °C 下培养 48 h,根据菌落形态挑选出 32 个菌株。

2.1.2 纤维素—刚果红培养基初筛 初筛培养基以 CMC-Na 为惟一碳源,在培养基中加入刚果红,以在平板上的水解圈直径大小及水解圈出现的时间为基准对 2.1.1 所得到的 32 株菌进行筛选。结果共获得 8 株水解圈明显、出现早且直径较大的菌株,编号分别为 B1、B2、B3、B9、B20、B28、B29、B30,

其中 B3 水解圈直径最大,为 1.78 cm,选用 B10 作为阴性对照菌株(无水解圈)。

表 1 不同菌株在纤维素刚果红培养基上的水解圈直径
Tab.1 The hydrolyzed circle diameter in cellulose-congo red agar medium

菌株	水解圈直径/cm
B1	1.07±0.06
B2	0.69±0.05
B3	1.77±0.07
B9	0.78±0.05
B10	0
B20	1.12±0.07
B28	0.61±0.05
B29	0.42±0.04
B30	0.81±0.06

2.1.3 摇瓶复筛 以酶活为指标对 2.1.2 复筛所得 9 株菌进行摇瓶复筛,酶活高且发酵时间短的菌株为目标菌株,结果见图 1。发酵初期酶活增长缓慢,直到第 48 h 酶活才开始快速增加,不同菌株产酶能力有很大差异,其中菌株 B3 酶活力最高,发酵 144 h 酶活最大,为 0.216 U/mL,虽然该菌株发酵时间稍长,但产酶能力明显高于其它菌株,因此 B3 为所选菌株。B3 在琼脂平板上形成圆形凸起、边缘整齐、表面光滑、乳白色的菌落,且有细胞球形,排列成葡萄状,革兰氏染色呈阳性,经初步鉴定为葡萄球菌属。

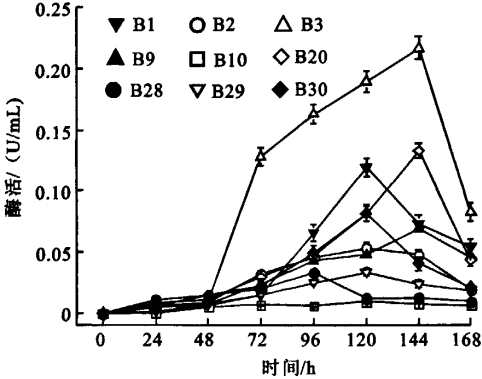


图 1 摇瓶复筛酶活曲线
Fig.1 Cellulase activity by the second screening

2.1.4 刚果红培养基上水解圈直径与相应菌株产酶能力的比较 为进一步验证纤维素刚果红培养基在纤维素分解菌筛选过程中的可靠性,选用摇瓶复筛所得 9 株菌的最大酶活与其水解圈直径对比见图 2。在刚果红培养基上水解圈直径较大的菌株其相应的酶活力也较大,反之水解圈直径小的菌株其产酶能力也较弱,无水解圈时,虽然有少量酶活,但明显低于其它菌株,表明纤维素刚果红培养基是万方数据

一种筛选纤维素分解菌的简便、快捷、高效的方法。

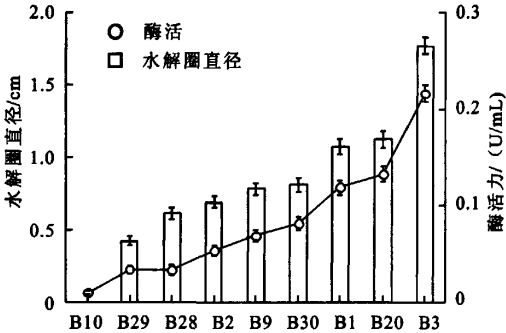


图 2 菌株水解圈直径与酶活力对比图
Fig.2 Comparison cellulase activity and their hydrolyzed circle diameter of the nine strains

2.2 菌株 B3 所产纤维素酶的粗酶学特性

2.2.1 酶促反应温度对酶活力的影响 酶促反应温度对酶活的影响见图 3。随着反应温度的升高($t \leq 50\text{ }^{\circ}\text{C}$),酶活逐渐提高,当反应温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,酶活达到最大值,为 0.221 U/mL ,进一步提高反应温度,酶活下降,所以 B3 所产纤维素酶的最适酶促反应温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

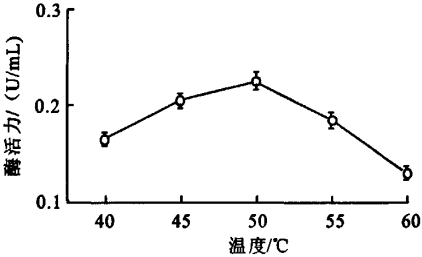


图 3 酶促反应温度对酶活的影响
Fig.3 Effect of temperature on cellulase activity

2.2.2 最适酶促反应温度下酶活力的稳定性 耐热性及稳定性是酶在实际应用中的重要参数。在最适反应温度下,B3 所产纤维素酶稳定性见图 4。

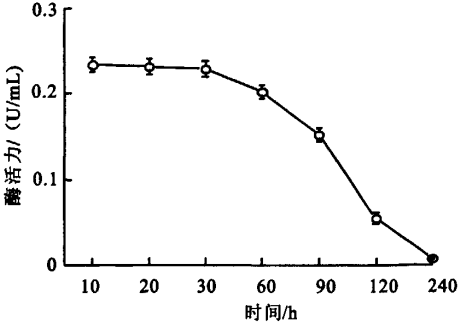


图 4 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下酶活力的稳定性
Fig.4 Stability of the cellulase at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$

结果表明,在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保温时间小于 30 min 时,酶活呈现很好的稳定性,当保温 60 min 时,酶活损失 14%,保温 90 min 时损失 35%;保温时间达到

240 min 时还有少量酶活存在,说明该酶在 50 ℃ 下具有较好的热稳定性。

2.2.3 纤维素酶对不同底物的作用特性 表 2 为纤维素酶粗酶液对不同底物的作用结果。该酶对 CMC-Na 具有良好的水解能力,并且对玉米秸秆纤维素粉也表现出较强的降解能力,同时对滤纸和脱脂棉也有一定的水解能力。

表 2 酶对不同底物的作用

Tab. 2 Function of the cellulase on different substrates

底物	酶活/(U/mL)
脱脂棉	0.044±0.008
纤维素粉	0.185±0.012
FPA	0.099±0.009
CMC-Na	0.225±0.015

秸秆纤维木质化程度较高,是比较难利用的纤维素类资源,大多文献报道的菌株所产纤维素酶对 CMC-Na 有较强的水解能力,但对结晶纤维素的降解能力都很低,而 B3 所产纤维素酶对玉米秸秆

纤维素粉有较强的水解能力,因此对木质纤维素的开发利用有很大潜力。

3 结 语

白蚁作为重要的昆虫资源,体内纤维素酶异常富庶,后肠是消化系统中微生物栖息的主要场所。纤维素刚果红平板透明圈筛选法,不仅可准确识别产纤维素酶的菌株,还可初步判定其产酶能力,透明圈越大产酶越多,透明圈出现越早产酶越快。因此纤维素刚果红培养基是一种筛选纤维素分解菌的简便、快捷、高效的方法。

经过反复筛选,得到一株酶活较高的葡萄球菌属菌株 B3。B3 所产纤维素酶的最适反应温度为 50 ℃,并且在该温度下保温 30 min 后酶活基本保持不变,该酶不仅对 CMC-Na 有良好的水解能力,而且对玉米秸秆纤维素粉也表现出较强的降解能力,同时对滤纸和脱脂棉等纤维素类资源也有一定的水解能力。

参考文献(References):

- [1] 高培基. 纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能研究进展[J]. 自然科学进展, 2003, 13(1): 21—29.
GAO Pei-ji. Research development of degradation mechanism of cellulase and its molecular structure and function[J]. *Progress in Nature Science*, 2003, 13(1): 21—29. (in Chinese)
- [2] 李西波, 刘胜利, 王耀民, 等. 高产纤维素酶菌株的诱变选育和筛选[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(6): 107—110.
LI Xi-bo, LIU Sheng-li, WANG Yao-min, et al. Screening of mutant strains with high cellulose activity[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(6): 107—110. (in Chinese)
- [3] Ogel Z B, Yarangumeli K, Dundar H, et al. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production[J]. *Enz Microb Technol*, 2001, 28: 689—695.
- [4] Kang S W, Park Y S, Lee J S, et al. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technol*, 2004, 91: 153—156.
- [5] Breznak J A, Brune A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites[J]. *Annu Rev Entomol*, 1994, 39: 453—487.
- [6] Terra W R, Ferreira C. Insect digestive enzymes: Properties, compartmentalization and function [J]. *Camp Biochem Physiol*, 1994, 109B(1): 1—62.
- [7] Ji R, Brune A. Transformation and mineralization of ¹⁴C-labeled cellulose, peptidoglycan, and protein by the soil-feeding termite *Gubitermes orthognathus*[J]. *Biol Fertil Soils*, 2001, 33: 166—174.
- [8] Thayer D W. Carboxymethylcellulase produced by facultative bacteria from the hindgut of the termite *Reticulitermes hesperus*[J]. *J Gen Microbiol*, 1978, 106: 13—18.
- [9] Anklin-Muhlemann R, Bignell D E, Veivers P C, et al. Morphological, microbiological and biochemical studies of the gut flora in the fungus-growing termite *Macrotermes subhyalinus*[J]. *J Physiol*, 1995, 41(11): 929—940.
- [10] 张宇昊, 王颢, 张伟, 等. 一种改进的纤维素分解菌鉴别培养基[J]. 纤维素科学与技术, 2004, 12(1): 33—35.
ZHANG Yu-hao, WANG Jie, ZHANG Wei, et al. An improved differential medium for cellulose decomposing microorganisms[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2004, 12(1): 33—35. (in Chinese)
- [11] Teather R M, Wood P J. Use of congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 38: 148—158.
- [12] 梅建凤, 吕琴, 闵航, 等. 白蚁及其肠道细菌的固氮作用研究[J]. 浙江大学学报, 2002, 28(6): 625—628.
MEI, Jia-feng, LU Qin, MIN Hang, et al. Nitrogen fixation of termite and bacteria isolated from its hindgut [J]. *Journal of Zhejiang University*, 2002, 28(6): 625—628. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)