

高温纤维素分解菌的分离、筛选及鉴定

马怀良¹, 龚振杰¹, 陈欢¹, 郭文学²

(1. 牡丹江师范学院生物系, 黑龙江牡丹江 157012; 2. 牡丹江市绿珠果蔬公司, 黑龙江牡丹江 157000)

摘要 [目的] 为研制堆肥高温菌剂和生高温纤维素酶奠定基础。[方法] 从牛粪自然堆肥中分离出高温纤维素分解纤维素菌, 并测定其外切纤维素酶活(C₁酶)、羧甲基纤维素酶活(CMCase)、FPA酶活(FPase)。[结果] 从5种高温纤维素分解菌中, 筛选出分解纤维素较强的高温细菌HB4和高温霉菌HM。[结论] 高温细菌HB4的C₁酶、CMCase最高, 分别为0.016 1 U/ml、0.923 8 U/ml; 高温霉菌HM的FPA酶活最高, 为1.053 5 U/ml。经初步鉴定HB4为热酸菌属(*Acidothemus*), HM为链孢霉属(*Neurospora*)。

关键词 高温纤维素分解菌; 纤维素酶; 热酸菌属; 链孢霉属

中图分类号 S216.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)29-13987-02

Isolation, Screening and Identification of High-temperature Cellulolytic Microbes

MA Hua-liang et al (Department of Biology, Mudanjiang Normal College, Mudanjiang, Heilongjiang 157012)

Abstract [Objective] The research aimed to lay the foundation for high-temperature inoculant for composting and high-temperature cellulose production. [Method] High-temperature cellulolytic microbes were isolated from cow dung unartificial compost and were determined the enzyme activity of C₁, CMCCase and FPase. [Result] Strain HB4 and strain HM that decomposing cellulose was comparatively strong were screened from five strains of high-temperature cellulolytic microbes. [Conclusion] C₁ and CMCCase enzyme activity of strain HB4 were maximal among the five strains and were 0.016 1 U/ml and 0.923 8 U/ml respectively. The FPase enzyme activity of strain HM was maximal among the five strains and was 1.053 5 U/ml. The strain HB4 was identified as *Acidothemus* and the strain HM was identified as *Neurospora*.

Key words High-temperature cellulolytic microbes; Cellulase; *Acidothemus*; *Neurospora*

我国的纤维素资源非常丰富, 仅农作物秸秆一项, 每年可达6~10亿吨, 但由于天然纤维素复杂和难降解, 人们对它的开发和利用十分有限^[1]。因此利用微生物降解纤维素, 对纤维素的充分利用具有战略意义^[2]。另外, 由高温微生物产生的纤维素酶具有热稳定性, 对工业化应用和酶的基础研究有着重要的意义。

该研究从牛粪堆肥中分离出数株分解纤维素的高温微生物, 并对其酶活力进行了测定, 现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 滤纸处理。滤纸(巧生牌定量滤纸)用1%醋酸浸泡24 h, 用碘液检查确定无淀粉后, 再用2%苏打水冲洗至中性, 晾干, 将处理后的滤纸剪成1 cm × 6 cm小条待用。

1.1.2 样品采集。牛粪自然堆肥。取堆肥25 cm处样品装入预先灭过菌的锥形瓶中, 包扎好后取回待用。

1.2 培养基 Hutchison液体培养基^[3]: KH₂PO₄ 1 g, FeCl₃ 0.01 g, (MgSO₄ · 7H₂O) 0.3 g, NaNO₃ 2.5 g, CaCl₂ 0.1 g, NaCl 0.1 g, H₂O 1 000 ml, pH 7.2~7.4。将培养基分装于150 ml三角瓶内, 每瓶50 ml, 然后加入10张滤纸条, 高压灭菌30 min后备用。

羧甲基纤维素培养基(CMC)^[4]: CMC-Na 15 g, NH₄NO₃ 1 g, 酵母膏 1 g, (MgSO₄ · 7H₂O) 0.5 g, KH₂PO₄ 1 g, 琼脂 20 g, H₂O 1 000 ml, pH自然。

1.3 菌种富集、分离和纯化 将10 g样品置于250 ml装有小玻璃珠的三角瓶中, 加入100 ml无菌水120 r/min振荡10 min, 取1 ml悬液加入到盛有Hutchison液体培养基的三角瓶中, 55℃静置培养。待滤纸崩解以后, 120 r/min振荡10

min, 再转接到新鲜的培养液中, 接种量为10%, 如此转接数代, 淘汰失去分解能力和不稳定的培养物^[5]。观察滤纸条断裂情况, 在滤纸条断裂处挑取培养物在羧甲基纤维素培养基平板上划线分离, 55℃培养获得单菌落。将单菌落反复划线纯化, 结合显微镜镜检查, 直至纯化得到纯菌株。

1.4 菌株发酵产酶试验 将筛选的高温菌种在羧甲基纤维素培养基试管斜面上, 55℃活化3 d, 将5 ml无菌水滴加到试管斜面中, 振荡, 制备成菌悬液。吸取菌悬液1 ml接入盛有Hutchison液体培养基的三角瓶中, 55℃, 150 r/min的恒温水浴振荡器培养7 d。

1.5 纤维素酶活的测定

1.5.1 粗酶液的制备。取培养7 d的发酵液, 于4℃, 3 000 r/min离心15 min, 取上清液即为粗酶液^[6]。

1.5.2 标准曲线的绘制。采用3, 5-二硝基水杨酸比色法(DNS)测定酶解液中还原糖含量, 取8支洗净、烘干的20 ml刻度试管, 加入标准葡萄糖溶液和蒸馏水, 配制成一系列不同浓度的葡萄糖溶液。

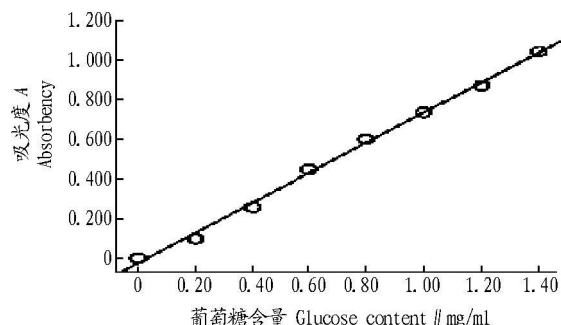


图1 葡萄糖标准曲线

Fig 1 The standard curve of glucose

将溶液摇匀后, 向各试管中加入1.5 ml 3, 5-二硝基水杨酸, 摇匀后在沸水浴中加热5 min, 取出冷却后用蒸馏水定容至刻度, 充分摇匀。在波长540 nm处以1号试管溶液作为

基金项目 国家“十一五”科技支撑计划(2007BAD89B05-13)。
作者简介 马怀良(1976-), 男, 黑龙江牡丹江人, 硕士, 讲师, 从事微生物的教学与科研工作。
收稿日期 2009-06-08

空白对照,调零点,测出其他各试管溶液的吸光度并记录结果。以葡萄糖含量为横坐标、对应的吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

1.5.3 外切纤维素酶活(C₁酶)、羧甲基纤维素酶活(CM-Case)、FPA酶活(FPase)测定见文献[7]。

在上述条件下,以国际单位为依据,定义1 min催化纤维素水解生成1 μmol葡萄糖的酶量为一个酶活力单位(U),其计算公式为^[8]:

$$\text{酶活力 (U/ml)} = \frac{\text{葡萄糖含量 (mg)} \times \text{稀释倍数} \times 56}{\text{反应液中酶液加入量 (ml)} \times \text{时间 (min)}}$$

1.6 数据处理 试验数据以 $\bar{x} \pm s$ (平均值 ± 标准差) 表示,

采用 SPSS13.0 软件中的 Compare Means One Way ANOVA 进行方差分析,用 LSD 法进行显著性测验。

1.7 菌种鉴定 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[9]、《真菌分类鉴定手册》^[10]进行。

2 结果与分析

2.1 高温纤维素分解菌的分离纯化结果 从牛粪堆肥中分离出高温细菌4株,分别命名 HB1、HB2、HB3、HB4;高温霉菌1株,命名为 HM。

2.2 酶活测定 5种高温纤维素分离的酶活测定结果见表2。由表2可见,高温细菌 HB4 的 C₁ 酶活、CMC 酶活最高,

表1 酶活测定结果及显著性分析

Table 1 Results of enzyme activity and significance analysis

U/ml

菌株	C ₁ 酶活	菌株	CMC酶活	菌株	FPA酶活
Strains	C ₁ enzyme activity	Strains	CMCase activity	Strains	FPase activity
HB4	0.016 1 ± 0.000 4 Aa	HB4	0.923 8 ± 0.029 8 Aa	HM	1.053 5 ± 0.050 0 Aa
HM	0.012 4 ± 0.000 6 Bb	HM	0.793 8 ± 0.039 0 Bb	HB4	0.676 5 ± 0.014 9 Bb
HB3	0.011 7 ± 0.000 4 BCb	HB1	0.715 8 ± 0.019 5 Cc	HB1	0.491 2 ± 0.045 0 Cc
HB2	0.010 8 ± 0.000 5 Cc	HB3	0.709 3 ± 0.022 5 Cc	HB2	0.474 9 ± 0.029 3 Cc
HB1	0.010 5 ± 0.000 2 Cc	HB2	0.702 8 ± 0.011 3 Cc	HB3	0.445 7 ± 0.009 8 Cc

注:同一列中,不同的小写字母表示差异达到0.05显著水平,不同的大写字母表示差异达到0.01显著水平,相同字母表示差异不显著。

Note: Different small letters in the same column mean significant difference at 0.05 level; Different capital letters in the same column mean significant difference at 0.01 level; The same letters in the same column mean no difference

分别为0.016 1 U/ml、0.923 8 U/ml,与其他菌株差异极显著($P < 0.01$);高温霉菌 HM 的 FPA 酶活最高,为1.053 5 U/ml,与其他菌株差异极显著($P < 0.01$)。

2.3 菌种鉴定

2.3.1 HB4鉴定。菌落特征:菌落较大、呈淡黄色,表面湿润、不透明、隆起,边缘不整齐,培养基颜色不改变。形态特征:细胞单个、直立,0.6 × 1.7 μm,革兰氏阴性,无芽孢。生长特性:HB4能在65 °C、pH 4.5,以葡萄糖为唯一碳源的培养基中生长。根据高温细菌 HB4 以上特征,参照《常见细菌系统鉴定手册》,将其归为热酸菌属(*Acidothemas*)。

2.3.2 HM鉴定。菌落特征:菌落为白色粉粒状,以后菌丝向四周蔓延,慢慢松散呈绒毛状,气生菌丝呈砖红色,表面干燥、密集,培养背面黑褐色,培养颜色不改变。形态特征:高温霉菌 HM 具有疏松网状的长菌丝,菌丝有隔膜、分枝、多核。分生孢子着生在分生孢子梗上,分生孢子椭圆形,呈红色。根据高温霉菌 HM 的以上特征,参照《真菌分类鉴定手册》,将其归为链孢霉属(*Neurospora*)。

3 讨论

高温堆肥技术是纤维类物质进行无害化、资源化的重要途径之一。在自然情况下,以牛粪为堆料的 C/N 在 25 ~ 50 之间,并辅以适当的通风,堆体的温度在短时间内高于 55 °C,成功地进行高温好氧堆肥化^[11]。但也存在着发酵周期长、纤维素分解不充分等缺点,因此接入外源高活性的高温纤维素分解菌,对缩短堆肥发酵周期、提高堆肥质量有重要的意义。近年来,以牛粪高温堆肥为原料筛选高温纤维素分

解菌的报道较多,齐云等^[6]筛选出耐高温单孢菌和芽孢杆菌,张辉^[12]等筛选出 CMC 酶和 FPA 酶耐高温的曲霉 WQ、郑惠华^[8]等筛选出产酶活性较高的高温放线菌 JSU-5。

此次从牛粪堆肥中分离出 5 种分解纤维素的高温菌,筛选出产酶活性较高的热酸菌 HB4 和链孢霉 HM,为研制堆肥高温菌剂和生高温纤维素酶奠定了基础。特别是在目前已筛选的高温纤维素分解菌中,热酸菌鲜见报道。

参考文献

- [1] 蔡燕飞,李华兴,彭桂香,等. 纤维素分解菌的筛选及鉴定[J]. 林产化学与工业, 2005, 25(2): 67 - 70
- [2] 欧江. 高活性纤维素降解菌的分离鉴定[J]. 四川食品与发酵, 2007, 43(4): 57 - 59
- [3] 陈香,蒋立建,韩刚,等. 紫外线诱变提高细菌产纤维素酶活力的研究[J]. 化学与生物工程, 2008, 25(2): 45 - 47
- [4] 张建强,李亚澜,李勇. 纤维素降解菌的分离鉴定及固态发酵条件[J]. 西南交通大学学报, 2006, 41(4): 442 - 446
- [5] 孙宝魁,王东伟. 高效稳定纤维素分解混合菌群的筛选及分解特性研究[J]. 环境科学与管理, 2008, 33(9): 116 - 119
- [6] 齐云,袁月祥,陈飞,等. 一组纤维素分解菌的分离、筛选及其产酶条件的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(6): 510 - 512
- [7] 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
- [8] 郑惠华,陈惠,张志才. 高温纤维素分解菌筛选及 JSU - 产纤维素酶特性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(7): 3040 - 3042, 3048
- [9] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社, 2001: 128 - 133
- [10] 魏景超. 真菌分类鉴定手册[M]. 上海:上海科技出版社, 1974: 487 - 533
- [11] 杨毓峰,薛澄泽,唐新保. 畜禽废弃物好氧堆肥化条件研究[J]. 陕西农业科学, 1998(6): 10 - 11
- [12] 张辉,杨启银,戴传超,等. 牛粪堆肥中好氧纤维素降解菌群及产酶条件研究[J]. 江苏农业科学, 2004(7): 146 - 150