

一组纤维素分解菌复合系 NSC-7 的酶活表达特性

刘长莉^{1,2} 王小芬² 牛俊玲³ 吕育财² 沈海龙¹ 崔宗均^{2*}

(1. 东北林业大学生命科学院/林学院 哈尔滨 150040)

(2. 中国农业大学农学与生物技术学院/中国农业大学生物质工程中心 北京 100094)

(3. 郑州航空工业管理学院 郑州 450015)

摘要: 为了揭示一组具有降解纤维素和林丹双重功能的细菌复合系 NSC-7 的降解活性, 本文对该菌系的分解能力、纤维素酶活性和半纤维素酶活性进行测定。结果表明, NSC-7 在 14 d 内, 可降解稻秆干重的 73.6%, 其中降解纤维素 82.1%, 半纤维素 58.2%, 木质素 5.4%。用广泛采用的酶活测定方法测定了 4 种纤维素酶和半纤维素酶活性, 在培养的第 8 天, 内切酶、总纤维素酶、外切酶和 β -糖苷酶活性都达到最大值, 分别为 4.48 U/mL、7.51 U/mL、15.83 U/mL 和 25.78 U/mL。在培养的第 5 天, 半纤维素酶活性达到最高值为 280.9 U/mL, 其平均值比纤维素酶活性高 43.71 倍。

关键词: 水稻秸秆, 细菌复合系 NSC-7, 纤维素酶活性, 半纤维素酶活性

Expression Characteristics of Enzyme Activity of a Multi-functional Bacterial Community NSC-7

LIU Chang-Li^{1,2} WANG Xiao-Fen² NIU Jun-Ling³ LV Yu-Cai¹
SHEN Hai-Long¹ CUI Zong-Jun^{2*}

(1. College of Life Science/School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

(2. College of Agronomy and Biotechnology, Center of Biomass Engineering, China Agricultural University, Beijing 100094)

(3. Zhengzhou Institute of Aeronautical Industry Management, Zhengzhou 450015)

Abstract: In order to determine the degradation activity of the microbial community NSC-7, which had efficient cellulose and lindan degrading ability, degrading ability and four kinds of cellulase activity and hemicellulase activity were detected during degradation progress. The results showed that NSC-7 could degrade 73.6% of rice straw in weight, including 82.1% of cellulose, 58.2% of hemicellulase, and 5.4% of lignin within fourteen days. Endoglucanases, exoglucanases, β -glucosidases and the total cellulase activities reached to maximum at the eighth day, and they were 4.48 U/mL, 15.83 U/mL, 25.78 U/mL and 7.51 U/mL, respectively. The maximum of hemicellulase activity was 280.6 U/mL at the fifth day, and the average of hemicellulase activity was 43.71 times higher than cellulase activity.

Keywords: Rice straw, Bacteria community NSC-7, Cellulase activity, Hemicellulase activity

研究表明, 纤维素分子的连接键在 25 半衰期是 5~8 百万年, 自然状态下极难分解^[1]。在我国仍有约 30% 的剩余作物秸秆不能有效处理和利用^[2], 不仅浪费宝贵的资源, 还严重污染环境。因此突破秸秆木质纤维素的人工快速分解不仅对减轻环境污染, 而且对开发纤维素资源转化技术也具有重大现实意义。纤维素分解微生物和酶的研究很多, 但大部分研究集中在依靠传统的“酶活”筛选菌株, 研究其性质, 制取的酶广泛应用于洗涤、印染和食品加工等行业^[3], 一直未能解决天然木质纤维素的快速分解。笔者等利用微生物间协同关系, 经过长时间的优化组合成功筛选到高效分解天然木质纤维素的细菌复合系, 实现了人工培养的微生物对木质纤维素的高效分解^[4,5], 并研究了复合系组成微生物之间的协同关系^[6]。有关纤维素实际分解能力与国际上常用的“酶活”之间是否有必然的关系还未见报道。

因此, 本研究采用国际理论和应用化学联合会(IUPAC)推荐的 4 种纤维素酶活测定方法^[7]、半纤维素酶活测定方法和底物成分的实际减少量, 对一组具有双重(纤维素和农药林丹)分解功能的复合系 NSC-7 进行比较研究, 为探明国际上普遍采用的“酶活”衡量方法和 NSC-7 复合系的实际分解能力的关系, 进一步研究该类复合系木质纤维素分解机理提供依据和基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌种: 本研究室筛选的具有降解纤维素和林丹双重功能的复合系 NSC-7^[5]。

1.1.2 木质纤维素材料: 河北省万全县郭垒庄乡 2006 年收获的水稻秸秆, 用 1% NaOH 浸泡水稻秸秆 24 h 后, 流水冲洗至中性, 105 烘至恒重。

1.1.3 培养条件: 采用 PCS 培养基(0.5% 蛋白胨, 0.5% NaCl, 0.2% CaCO₃, 1% 酵母粉, 0.5% 稻秆)^[4], 500 mL 培养瓶内添加 400 mL 培养基和 2.2 g 处理后的稻秆, 将预培养 3 d 的培养液按 0.5% 体积比接种后, 50 静止培养, 在第 0 d、1 d、3 d、5 d、8 d、11 d 和 14 d 分别取样。设相同培养基和秸秆量而不接菌的对照 1, 用于消除培养条件对秸秆重量变化的影响; 设添加 0.2% 蔗糖的培养基中接种而不添加稻秆的对照 2, 用于消除培养基和菌体对秸秆重量的影响。每次取 3 个重复, 测定后续项目。

1.2 秸秆分解过程中总重量及各成分的变化

将第 0 d、1 d、3 d、5 d、8 d、11 d 和 14 d 的培养物于 8000 r/min 离心 10 min, 去掉上清液, 将沉淀在 105 烘至恒重; 再刮取全部干物质于 F57 专用袋中, 在 ANKOM²²⁰ 纤维分析仪(USA)上, 用改良的范氏洗涤法测定可溶物质、半纤维素、纤维素、木质素及灰分含量^[8]。

1.3 纤维素分解酶的活性测定

1.3.1 纤维素酶活的测定: 培养物经 0.22 μm 滤膜过滤作为粗酶液, 采用 IUPAC 推荐纤维素酶活性的测定方法^[7], 分别以 2% 羧甲基纤维素钠、1% (W/V) 微晶纤维素粉末(Avicel, Merck Germany)、15.0 mmol/L 纤维二糖(国药集团)、50 mg 滤纸(Whatman No.1, England)为底物, 测定内切酶、外切酶、β-糖苷酶和总纤维素酶活性, 用柠檬酸钾钠缓冲液稀释酶液, 于 50 反应 30 min~120 min, 加 3.0 mL DNS, 煮沸 5 min 用于显色, 用 CARY 100 Bio 型紫外分光光度计(Varian 公司)540 nm 波长下比色。以 1 min 内产生 1 μmol 葡萄糖量所需要的还原能力作为 1 个酶单位(U)。

1.3.2 半纤维素酶活性的测定: 1.5 mL 离心管中取 200 μL 粗酶液(以 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH6.5 适当稀释 5~10 倍, 加含 1% (W/V) Xylan(sigma X0627 型)的 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液溶液(pH6.5), 振荡混匀后, 50 的水浴 60 min~120 min, 加 600 μL DNS, 振荡混匀后, 100 加热 15 min 后, 立即放入冰水中, 600 nm 测吸光度。设 50 不反应的处理作为对照, 计算产生的还原糖的量。

2 结果与讨论

2.1 NSC-7 对水稻秸秆的分解能力

分解过程在外观上, 2 d 后培养液相当浑浊, 3 d 后大部分秸秆软化, 5 d 后基本崩解, 无秸秆的形状。接种处理在接种初期稻秆总重是 2.0 g, 培养到第 5 d 剩余 1.106 g, 总重量减少 44.7%, 第 14 d 稻秆的总干重减少到 0.528 g, 减重率为 73.6%。说明分解主要发生前 5 d。定期检测分解剩余物的成分变化, 发现稻秆中主要成分变化也集中在前 5 d。在培养的第 5 d, 纤维素减少 65.4%, 半纤维素减少 43.9%, 灰分减少 59.9%, 木质素减少 2.59%。到第 14 d 培养结束, 纤维素降解了 82.1%, 半纤维素降解 58.2%, 木质素降解 5.4%(表 1)。不接菌的对照在高温灭菌

环节由 2.2 g 减少到 2.0 g, 培养 14 d 中无重量变化。从图 1 稻秆中纤维素成分变化可见, 稻秆中的各种成分降解率都较高, 只有木质素的降解率很低, 14 d 内, 仅降解木质素总量的 5.4%, 这证明了木质素的确实降解。

减少率 Reduce ratio	纤维素 Cellulose (%)	半纤维素 Hemicellulose (%)	木质素 Lignin (%)	灰分 Ash (%)	秸秆总重 Weight reduction (%)
时间 Time(d)					
5	65.4	43.9	2.59	59.9	55.2
14	82.1	58.2	5.4	77.0	73.6

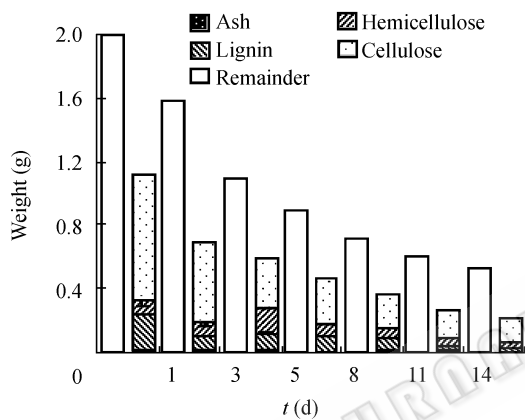


图 1 水稻秸秆各成分分解动态
Fig. 1 Changes of rice straw weight and components in degradation progress

2.2 NSC-7 的 4 种纤维素分解酶活性

菌系 NSC-7 在培养过程中的 4 种纤维素分解酶活变化趋势基本相同, 均呈一单峰曲线(图 2), 并且 4 种纤维素分解酶活都在培养的第 8 d 达到最高值, 而后逐渐下降。从曲线的变化形状上看, 内切酶、外切酶和 β -糖苷酶在前 6 d 缓缓上升, 然后迅速上升, 在第 8 d 达到高峰后又迅速下降, 峰图比较尖; 总纤维素酶在开始培养后酶活直线上升, 第 6 天的值与第 8 d 的峰值差异不大, 峰图形状较钝, 相对较高值保持时间比其它 3 种酶活长。从酶活大小上, 最初的 1d 内切酶、外切酶和总酶活不到 3 U/mL, β -糖苷酶为 5 U/mL, 随后各酶活上升幅度不同, 第 8 d 达到峰高时, 内切酶、外切酶、 β -糖苷酶和总纤维素酶的酶活值分别为 4.48 U/mL、15.83 U/mL、

25.78 U/mL 和 7.51 U/mL。 β -糖苷酶酶活最高, 外切酶次之, 内切酶最小。总酶活与其它酶活相比最低值是 1.47 U/mL, 最高值是 7.51 U/mL, 平均值是 4.41 U/mL, 而 3 种单酶平均最低值是 1.86 U/mL, 最高值是 13.39 U/mL, 总平均值是 6.43 U/mL。由此可见, 总酶活的活性并不是其它 3 种酶活的简单叠加。这也证明总纤维素酶是内切酶、外切酶和 β -糖苷酶 3 种酶协同降解纤维素的综合体现^[3]。

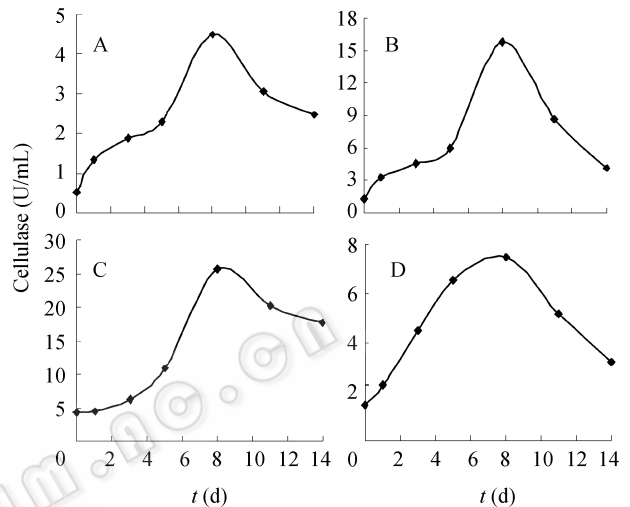


图 2 培养过程中四种纤维素酶活性的动态
Fig. 2 The dynamic of 4 kinds of cellulase in degradation progress
A: 内切酶; B: 总纤维素酶; C: 外切酶; D: β -糖苷酶
A: Endoglucanase; B: Exoglucanase; C: Total cellulase; D: β -glucosidase

研究表明, β -糖苷酶对短链纤维素类物质具有很强的水解能力, 而内切酶对聚合度高的长链纤维素水解能力强^[9,10]。在 NSC-7 的复合酶系中, β -糖苷酶的活性值最高, 内切酶活性最低, 这难以说明 NSC-7 对没有粉碎的天然水稻秸秆具有强烈的分解能力。

另有报道, 纤维二糖是纤维素分解的中间产物, 纤维二糖过多积累对纤维素水解起到阻遏或抑制作用^[11]。 β -糖苷酶又称“纤维二糖酶”, 具有高效的水解纤维二糖的能力, 尤其在纤维二糖转化为葡萄糖上起重要作用^[12]。实验证明, 添加 β -糖苷酶到木霉的纤维素分解体系中, 可有效避免纤维二糖对内切酶和外切酶的抑制, 对纤维素的继续分解起到了促进作用^[13]。根据上述证据, 可以认为在 NSC-7 的酶系中, β -糖苷酶的活性最高, 可有效的促进纤维

二糖的分解, 消除产物阻遏效应的发生, 使得纤维素持续高效的水解。其各酶活之间的关系与实际分解能力的机理待进一步细致的研究。

2.3 半纤维素酶活性

以木聚糖为底物测定的半纤维素酶活性如图 3 所示。半纤维素酶活的变化也是单峰曲线变化, 但酶活上升较快, 培养第 5 天达到峰高, 并且其最高值达到 280.9 U/mL, 远高于纤维素酶活性。木聚糖酶活性广泛存在于各种降解半纤维素酶的微生物中, 对于降解天然的半纤维素资源起重要作用。已有报道从黑曲霉、海藻曲霉、乳白耙菌(*Irpex lacteus*)等真菌及芽孢杆菌, 非芽孢杆菌中提纯了木聚糖酶^[14]。

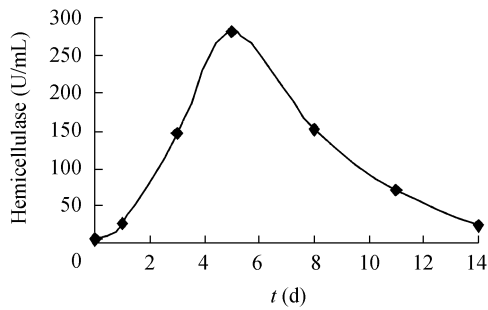


图 3 半纤维素酶活动态变化

Fig. 3 The dynamic emicellulase in degradation

2.4 纤维素和半纤维素酶活性的比较

采用 IUPAC 推荐的测定纤维素酶活性的标准方法, 测得 NSC-7 纤维素内切酶、外切酶、 β -糖苷酶和总纤维素酶的最大值分别为 4.48 U/mL、15.83 U/mL、25.78 U/mL 和 7.51 U/mL。多数文献中以纤维素酶的内切酶活性来表示纤维素酶活性。NSC-7 的内切酶活性最高值为 4.48 U/mL。以木聚糖为底物测定的半纤维素酶活性远高于纤维素酶活性, 最高值是 280 U/mL, 是纤维素内切酶活性的 63.7 倍。纤维素内切酶活性平均值是 2.3 U/mL, 半纤维素酶活性的平均值是 100.35 U/mL, 其平均值比纤维素酶活性高 43.71 倍。由此可见, 半纤维素酶活高是 NSC-7 快速崩解水稻秸秆的一个重要依据。

2.5 NSC-7 复合系的实际分解能力与酶活性

NSC-7 能够在 5 d 内分解天然稻秆 55.2% 重量, 14 d 内分解 73.6%。除了同一研究组筛选的 MC1 在 12 d 内能够分解稻草重量的 81%^[4, 15]以外, 目前未见培养的微生物比 NSC-7 更强分解能力的报道。

Desvaux 等利用一株梭菌, 通过多次接种的方法使得该菌在 18 d 内, 降解纤维素 45%^[16], 尽管采用多次接种, 单一菌株能够达到如此高效的降解能力已经是罕见的。Wang 等将 3 株高效降解菌株人为组合, 在培养的前 6 d 能够降解纤维素总干重的 37.9%, 但随后降解能力急剧下降^[17]。由此可见, NSC-7 在不作任何调节的情况下的实际分解能力很少见。纤维素的微生物分解多数研究在真菌上, 并且 CMC 的糖化活力测定法是采用最广泛的分解能力衡量标准。但尚未见有将纤维素酶活性与分解能力直接联系的相关报道。M Mandel 等报道的 *Trichoderma reesei* QM 9414^[18]和 S Takao 等分离的 *Penicillium purpurogenam* P-26^[19]对微晶纤维素、CMC 等的糖化活性号称世界最强, 达到 700 U/mL~800 U/mL, 但未见报道能够分解稻草等天然纤维素。

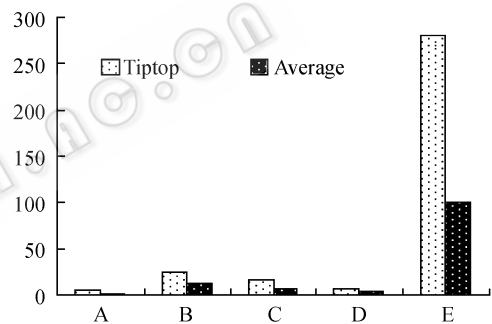


图 4 4 种纤维素酶活及半纤维素酶活的最大值和平均值比较

Fig. 4 Compare the tiptop and average of 4 kinds of cellulase and hemicellulase

A: 内切酶活性; B: 外切酶酶活; C: 内切酶总酶活; D: β -糖苷酶酶活; E: 木聚糖酶活性

A: Endoglucanase; B: Exoglucanase; C: Total cellulase; D: β -glucosidase; E: Hemicellulase)

通常认为细菌产胞内酶, 酶活较低, 但夏黎明等对芽孢杆菌 *Bacillus* sp. ZU-04 产纤维素酶的工艺参数进行优化, 使得该菌的 CMC 酶活达 257.6 U/mL^[20], 祝小等^[21]对枯草芽孢杆菌产纤维素酶能力条件优化, 使得枯草芽孢杆菌 Pab02 的 CMC 酶活性达 358.75 U/mL。所有这些纤维素酶活都远高于 NSC-7, 内切酶活分别是 NSC-7 的 57.6 和 80 倍, 但实际分解能力又远不及 NSC-7。这就证明传统的纤维素酶活性指标不能客观地反映 NSC-7 等细菌复合系的实际能力, 对此有待开发新的更适合反应复合系实际分解能力的衡量方法。

参 考 文 献

- [1] Wolfenden R, Snider MJ. The depth of chemical time and the powder of enzyme as catalysts. *Acc Chem Res*, 2001, **34**(12): 938–945.
- [2] 高祥照, 马文奇, 马常宝. 中国作物秸秆资源利用现状分析. *华中农业大学学报*, 2002, **21**(3): 242–247.
- [3] Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 2006, **24**(5): 452–481.
- [4] 崔宗均, 李美丹, 朴哲, 等. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能. *环境科学*, 2002, **23**(3): 36–39.
- [5] 牛俊玲, 李国学, 崔宗均, 等. 堆肥中高效降解纤维素林丹复合菌系的构建及功能. *环境科学*, 2005, **26**(4): 186–190.
- [6] Souichiro K, Shin H, Cui ZJ, *et al.* Stable Coexistence of Five Bacterial Strains as a Cellulose-Degrading Community. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, **54**: 2043–2047.
- [7] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem*, 1987, **59**(2): 257–268.
- [8] Guo P, Wang XF, Zhu WB, *et al.* Degradation of corn stalk by the composite microbial system of MC1. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, **20**(1): 1–6.
- [9] Zhang YHP, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **88**(7): 797–824.
- [10] Zhang YHP, Lynd LR. Determination of the number-average degree of polymerization of cellodextrins and cellulose with application to enzymatic hydrolysis. *Biomacromolecules*, 2005, **6**(3): 1510–1515.
- [11] Atif H A, Yasmeen MI. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 2004, **94**(3): 311–319.
- [12] McCarthy JK, Uzelac A, Davis DF, *et al.* Improved catalytic efficiency and active site modification of 1,4-beta-D-glucan glucohydrolase A from *Thermotoga neapolitana* by directed evolution. *J Biol Chem*, 2004, **279**(12): 11495–11502.
- [13] Brumbauer A, Reczey K. Beta -glucosidase production of two different *Aspergillus* strains. *Acta Alimentaria*, 1999, **28**(4): 361–370.
- [14] 陈凤莲, 方桂珍, 许世玉. 木聚糖酶合成菌株的筛选及其产酶条件的研究. *四川食品与发酵*, 2007, **43**(138): 24–27.
- [15] 王伟东, 崔宗均, 王小芬, 等. 快速纤维素分解菌复合系 MC1 对秸秆的分解能力及稳定性. *环境科学*, 2005, **26**(5): 156–160.
- [16] Desvaux M, Guedon E, Petitdemange H. Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(6): 2461–2470.
- [17] Wang LL, Yan XZ, Zhou MF, *et al.* A study on degradation of straw fibre by multienzyme from admixture strains. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*. 2005, **27**(4): 521–524.
- [18] Mandel M, Sternberg U. Recent advances in cellulose technology. *J Ferment Technol*, 1976, **54**(4): 267–286.
- [19] Takao S, Kamagata Y, Sasaki H. Cellulase production by *penirillum purpurogenam*. *J Ferment Technol*, 1985, **63**(2): 127–134.
- [20] 夏黎明, 沈雪亮. 芽孢杆菌产纤维素酶的研究. *林产化学与工业*, 2002, **22**(3): 54–58.
- [21] 祝小, 耿秀蓉, 潘康成, 等. 枯草芽孢杆菌 Pab02 产纤维素酶活性的研究. *饲料研究*, 2007, **1**: 61–63.

新辟栏目介绍

显 微 世 界

“显微世界”栏目将刊出一些精美清晰的显微照片, 带您走进显微镜下的微生物世界, 希望在阅读期刊相关科学新进展的同时, 给您带来一种愉悦的科学艺术视觉享受。同时欢迎广大作者、读者朋友积极为我们推荐或提供高质量、高清晰的显微照片(提供者保证该图片无任何知识产权问题)。