

一株纤维素降解菌产酶活性研究与初步鉴定

于洪久¹, 郭 炜¹, 刘 杰¹, 王大蔚¹, 李玉梅², 于春生³

(1. 黑龙江省农业科学院 农村能源研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院 土壤肥料与资源环境研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 林口县农业技术推广中心, 黑龙江 牡丹江 157600)

摘要:为从环境中筛选高效纤维素降解菌, 并研究其产酶能力, 从农村堆肥粪堆的底部土壤中分离、纯化获得了1株纤维素降解菌 NY06, 进行了透明圈、滤纸崩解、CMC 酶和 FPA 酶活力的测定。结果表明: 与对照菌株相比, 菌株 NY06 处理的透明圈出现较早, 透明圈更大, 滤纸崩解效果更好; 菌株 NY06 的 CMC 酶和 FPA 酶活的最大 OD 值分别为 0.158 和 0.108, 均大于对照菌株; 经初步鉴定, 菌株 NY06 为枯草芽孢杆菌。

关键词:纤维素降解菌; 透明圈; CMC 酶; FPA 酶

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2016)02-0118-04 DOI: 10.11942/j.issn1002-2767.2016.02.0118

近年来, 黑龙江省奶业发展规模不断提高, 奶牛养殖小区、标准化养牛场迅速发展, 造成大量牛粪未经有效利用和处理直接排放到环境中, 养殖场周围又没有相应的土地对粪便进行消化, 造成环境问题日益严重, 已经影响到当地人民群众的生产、生活。好氧堆肥技术是一种为世界各国普遍采用的畜禽粪便处理方法, 经过堆肥化处理生产的有机肥是培肥地力、改良土壤的优质原料^[1-3]。牛粪中含有大量的纤维素和木质素, 而纤维素和木质素是进行固体有机废弃物资源化过程中(堆肥)微生物降解的主要目标, 纤维素可被某些微生物产生的胞外酶—纤维素酶作用水解生成纤维二糖或葡萄糖^[4]。因此, 从环境中筛选高效纤维素降解菌, 研究其产酶能力, 对牛粪资源化利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 菌株采自农村多年堆肥粪堆的底部土壤, 由本课题组分离、纯化获得的1株纤维素降解菌, 命名为 NY06, 对照菌株为市场购买的商品有机物料腐熟剂, 核心菌株为枯草芽孢杆菌。

1.1.2 培养基 培养基为: 牛肉膏蛋白胨培养基、PDA 培养基、羧甲基纤维素钠培养基、纤维素-刚果红培养基、滤纸液体培养基、羧甲基纤维素钠液体发酵培养基^[5], 培养基均在 121℃ 灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 透明圈的测定 取待测菌株, 分别点接至纤维素-刚果红培养基上, 每皿 2 点, 每个处理 3 次重复, 30℃ 条件下培养, 于 48、72、96、120 h 分别测定各处理的菌落直径(d)和其产生的透明圈直径(D)大小, 并计算透明圈直径和菌落直径的比值 D/d ^[6]。

1.2.2 滤纸条崩解试验 选取新华 1 号滤纸, 将其剪成同样大小和质量的滤纸条, 在无菌条件下, 将灭菌的滤纸条转移到 150 mL 滤纸液体培养基中, 分别接种 200 μ L 菌株 NY06 和对照菌株的菌液, 以不接菌只加滤纸条的培养基作为空白处理 CK。25℃、200 $r \cdot \min^{-1}$ 振荡培养 15 d, 观察滤纸条的溃烂和崩解情况, 根据滤纸条的降解情况来判断各处理降解纤维素能力的强弱: “+”滤纸边缘膨胀, “++”滤纸整齐膨胀并下弯, “+++”滤纸不定形, “++++”滤纸成糊状。

1.2.3 纤维素降解菌酶活力的测定 ①粗酶液制备: 将菌株 NY06 和对照菌株分别接入羧甲基纤维素钠液体发酵培养基, 在温度为 25℃, 转速为 200 $r \cdot \min^{-1}$ 条件下培养, 于 12、24、48、72 和 96 h 分别取上述菌株的发酵液 5.0 mL, 4 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液即粗酶液。

收稿日期: 2015-01-15

基金项目: 黑龙江省农业科学院创新工程重点资助项目(2012ZD016)

第一作者简介: 于洪久(1981-), 男, 吉林省长岭县人, 硕士, 助理研究员, 从事农业微生物资源与利用研究。E-mail: yuhj818@126.com。

通讯作者: 刘杰(1974-), 男, 黑龙江省延寿县人, 博士, 研究员, 硕士研究生导师, 从事农业微生物肥料及生物环境与能源工程等方面的研究。E-mail: liujie1677@126.com。

②CMC 酶活力测定:移取含有 0.5% CMC-Na 的醋酸缓冲液($0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH4.4)1.5 mL 于试管中,加入酶液 0.5 mL,50℃水浴锅准确作用 30 min,在每试管内加 1.5 mL DNS 试剂,沸水浴 5 min,立即冷却,定容至 25 mL(对照应先将酶液沸水浴 5 min,之后步骤相同),520 nm 处测定其 OD 值^[7]。

③滤纸酶活(FPA)的测定:将新华 1 号滤纸(1 cm×6 cm)卷成小卷,放进试管内,加入 1.5 mL HAc-NaAc 缓冲液(pH4.8),再加入 0.5 mL 酶液,轻轻摇匀,使滤纸完全浸泡在液体中,50℃保温 1 h 后,在每试管内加 1.5 mL DNS 试剂,沸水浴 5 min,立即冷却,定容至 25 mL(对照应先将酶液沸水浴 5 min,之后步骤相同),520 nm 处测定其 OD 值^[7]。

2 结果与分析

2.1 透明圈的测定

透明圈可粗略判断纤维素降解菌产酶情况,一般透明圈出现越早,酶类产生也越早,透明圈越清晰,说明纤维素降解越彻底,酶类也就越齐全^[8]。将菌株 NY06 和对照菌株分别点接至纤维素-刚果红培养基上,观察透明圈的出现,测定透明圈大小(见图 1)。王志超等^[9]认为透明圈直径与菌苔直径比值(D/d 值)超过 2.5 的菌株纤维素酶活性高。由表 1 可以看出,在接种 72 h 后,菌株 NY06 的 D/d 值为 2.98,对照菌株的 D/d 值为 2.43;在接种 120 h,对照菌株的透明圈直径(D)为 2.39 cm、菌苔直径(d)为 0.69 cm、D/d 值为 3.46,菌株 NY06 的透明圈直径(D)为 3.45 cm、菌苔直径(d)为 0.87 cm、D/d 值为 3.97,分别达到最大值,说明两株菌种均能在纤维素-刚果红培养基上产生清亮的透明圈,根据透明圈情况初步判断菌株 NY06 的产酶活性大于对照菌株。

2.2 滤纸崩解程度的测定

将菌株 NY06 和对照菌株分别接种于滤纸液体培养基中,观察滤纸条的崩解程度。结果表明,菌株 NY06 和对照菌株均能不同程度地分解滤纸,而空白处理 CK 的滤纸始终没有崩解。菌株 NY06 处理和对照菌株处理摇瓶中的滤纸第 3 天开始崩解,菌株 NY06 处理的滤纸崩解效果最好,在第 12 天时滤纸呈糊状,对照菌株处理在第

15 天时滤纸才呈糊状(见表 2)。

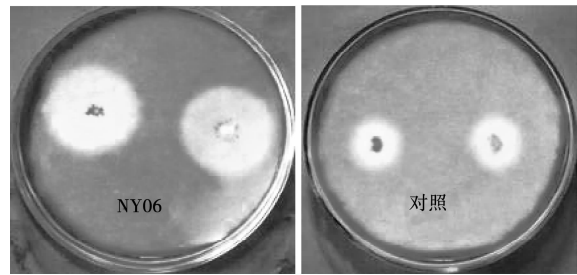


图 1 菌株 NY06 和对照菌株的刚果红染色结果
Fig.1 Staining results of strain NY06 and CK strains by Congo red

表 1 各处理的透明圈测定

Table 1 Determination of transparent circle of each treatments

接种时间 Inoculation time	处理 Treatments	透明圈直 径(D)/cm Transparent circle diameter	菌苔直 径(d)/cm Lawn diameter	D/d
48 h	NY06	0.63	0.34	1.85
	对照菌株	0.42	0.31	1.35
72 h	NY06	1.76	0.59	2.98
	对照菌株	1.24	0.51	2.43
96 h	NY06	2.46	0.74	3.32
	对照菌株	1.82	0.62	2.94
120 h	NY06	3.45	0.87	3.97
	对照菌株	2.39	0.69	3.46

表 2 滤纸条崩解测定

Table 2 Disintegration determination of filter paper

接种时间 Inoculation time	崩解程度 Disintegration degree		
	NY06	对照菌株	CK
第 1 天	-	-	-
第 3 天	+	+	-
第 5 天	++	+	-
第 7 天	++	++	-
第 10 天	+++	++	-
第 12 天	++++	+++	-
第 15 天	++++	++++	-

2.3 CMC 酶和 FPA 酶活力的测定

将菌株 NY06 和对照菌株分别接入羧甲基纤维素钠液体发酵培养基中,培养 96 h,对其进行

CMC 酶活性和 FPA 酶活性的测定,如图 2 和图 3 所示,经不同时间培养,菌株 NY06 在最初的 48 h 内酶活力增幅较大,在接种 48 h 时 CMC 酶和 FPA 酶的 OD 值达到最大值,分别为 0.158 和 0.108,在随后的 48 h 酶活力下降;对照菌株在最初的 24 h 内酶活力增幅较大,在接种 24 h 时 CMC 酶和 FPA 酶的 OD 值达到最大值,分别为 0.140 和 0.092,在随后的 72 h 酶活力下降。菌株 NY06 的 CMC 酶活和 FPA 酶活的最大值均大于对照菌株,说明菌株 NY06 较对照菌株对纤维素具有更好的降解效果。

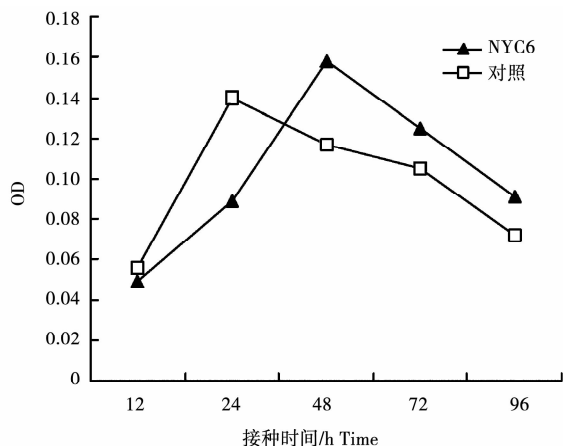


图2 菌株 NY06 和对照菌株产 CMC 酶情况

Fig. 2 CMC production of NY06 and CK strain

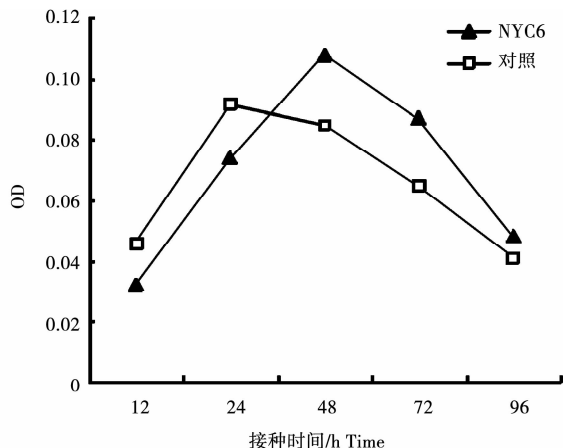


图3 菌株 NY06 和对照菌株产 FPA 酶情况

Fig. 3 FPA production of NY06 and CK strain

2.4 纤维素降解菌 NY06 的初步鉴定结果

根据《伯杰细菌鉴定手册》第八版^[10]对菌株 NY06 进行常规生理生化鉴定。

2.4.1 菌株的形态特征 菌落在牛肉膏蛋白胨

培养基上呈乳白色,圆形,不透明,边缘为波浪状,有褶皱,有黏度,不易挑取;挑取单个菌落涂片进行显微观察,革兰氏染色为阳性,短杆状细菌,常成对或链状排列,在营养条件贫乏或生长条件不利的情况下有芽孢生成。

2.4.2 菌株的生化特性 好氧菌,不能在厌氧环境中生长,生长最适温度为 25~30℃,在初始 pH8~9 的培养基中生长良好,利用葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露醇且产酸,能利用柠檬酸盐,不能利用丙酸盐,水解淀粉,可使明胶液化,产过氧化氢酶。根据以上试验结果,初步鉴定 NY06 为枯草芽孢杆菌。

3 结论

本试验从农村多年堆肥粪堆底部土壤中分离、纯化获得了 1 株具有很大纤维素降解潜力的菌株 NY06,经初步鉴定,为枯草芽孢杆菌。为检测其降解纤维素能力,进行了透明圈、滤纸崩解、CMC 酶活和 FPA 酶活的测定,试验结果表明,与对照菌株相比,菌株 NY06 能更早出现透明圈,且透明圈更大,滤纸崩解效果更好;菌株 NY06 的 CMC 酶活和 FPA 酶活,随接种时间呈先升高后降低的趋势,在接种 48 h 后达到最大 OD 值分别为 0.158 和 0.108,均大于对照菌株,但产酶高峰期延后 24 h。虽然,筛选出产纤维素酶活力较高的菌株 NY06,但还需要对其进行进一步研究,例如发酵条件的优化、产芽孢条件的优化、降解机制研究和分子生物学鉴定等。

参考文献:

- [1] 郭珺,庞金梅. 畜禽养殖废弃物污染防治与资源化循环利用[J]. 山西农业科学, 2011, 39(2): 149-151, 161.
- [2] 赵玉娇,贺萌,呼世斌,等. 牛粪和红薯秸秆静态高温堆肥研究[J]. 农机化研究, 2012, 34(12): 218-222.
- [3] 赵秀玲,朱新萍,罗艳丽,等. 温度与秸秆比例对牛粪好氧堆肥的影响[J]. 环境工程学报, 2014, 8(1): 334-340.
- [4] 张辉,朱奇,朱蓝英. 一株嗜热纤维素分解菌液体发酵条件初步研究[J]. 天津农业科学, 2016, 12(1): 14-17.
- [5] 李振高,骆永明,滕应. 土壤与环境研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [6] 牛明芬,武肖媛,于海娇,等. 牛粪纤维素降解菌的筛选与初步鉴定[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 393-395.
- [7] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 70-72.
- [8] 王宜磊,邓振旭. 透明圈法快速筛选半纤维素分解菌[J]. 生物技术, 2000, 10(1): 37-40.

[9] 王志超,陆文静,王洪涛. 好氧堆肥中高温纤维素分解菌的筛选及性状研究[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2006, 42(2):259-264.

[10] 布坎南(R. E. Buchanan). 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译. 北京: 科学出版社,1984.

Study on Identification and Cellulase-producing Activity
of A Cellulose-degrading Strain

YU Hong-jiu¹, GUO Wei¹, LIU Jie¹, WANG Da-wei¹, LI Yu-mei², YU Chun-sheng³

(1. Rural Energy Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Institute of Soil Fertilizer and Environment Resource, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 3. Agricultural Technology Extension Center of Linkou County, Mudanjiang, Heilongjiang 157600)

Abstract: In order to screen the efficient cellulose degradation bacteria from environment, and study the enzyme production ability, a cellulose degrading bacteria NY06 was isolated from soil at the bottom of the dunghill rural compost. By measurements using transparent ring, filter paper disintegration, CMC enzyme and FPA enzyme activities, NY06 was preliminarily identified as a member of the genus *Bacillus subtilis* sp. The results showed that treatment inoculated with stain NY06 showed early appearance of a transparent ring and also the transparent ring was larger, compared with the control bacteria, and results of the filter paper disintegration was better. The CMC enzyme and FPA enzyme activities of strain NY06 had the maximum OD values of 0.158 and 0.108, respectively, and they were higher than the control strain.

Keywords: cellulose degradation microbes; transparent zone; CMCase; FPase

(上接第 110 页)

[3] 蒋江虹,革丽亚,麦琦. 全自动凯氏定氮仪测定食品中蛋白质[J]. 光谱仪器与分析, 2006(z1): 258-260.

[4] FOSS Kjelttec8400 型全自动定氮仪用户使用指导[S].

[5] GB/T 5009.5-2010, 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S].

[6] GB/T 5511-2008, 谷物和豆类氮含量测定和粗蛋白质含量计算凯氏法[S].

Study on the Processing Conditions of Soybean Protein Sample
with Automatic Kjeldahl Nitrogen Determination Apparatus

XU Xin-juan, HUANG Zhong-wen, WANG Wei, HE Ya-fei

(College of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology/Collaborative Innovation Center of Modern Biological Breeding, Xinxiang, Henan, 453003)

Abstract: Using single factor and orthogonal test design, the effect on the protein content under different sample amount, catalyst proportion, sulfuric acid amount and digestion time was studied using automatic kjeldahl nitrogen determination apparatus. The results showed that there was no significant difference among the sample amount, but the catalyst proportion, sulfuric acid amount and digestion time significantly affect the protein content. The orthogonal experiment results showed that the best sample processing conditions was A₂B₂C₂, that was, when the sample amount was 0.5 g, the best catalyst proportion could be 6:0.2, the amount of sulfuric acid could be 9 mL and the digestion time for 70 min, then, it had the best results, and the highest protein content up to 43.11%.

Keywords: automatic kjeldahl nitrogen determination apparatus; protein content; the sample processing conditions