

产木聚糖酶厌氧真菌菌株筛选及产酶培养条件研究*

朱崇森 毛胜勇 孙云章 朱伟云**

(南京农业大学动物科技学院消化道微生物研究室 南京 210095)

摘要: 从 12 株分离自反刍动物瘤胃及粪样的厌氧真菌中筛选到一株木聚糖酶高产菌, 编号为 A4, 初步鉴定为 *Neocallimastix* 属菌。以稻草秸、玉米秸、花生秸、滤纸片段为发酵底物, 经 39℃ 厌氧培养, A4 菌产生的木聚糖酶活分别为 14.31 U/mL、11.39 U/mL、6.99 U/mL 和 13.38 U/mL。对 A4 菌产生木聚糖酶的条件进行优化, 结果发现, 培养基中无细胞瘤胃液浓度对 A4 菌产生的木聚糖酶活无显著影响; 但酵母膏浓度从 1.0 g/L 降至 0.5 g/L 后, A4 菌产生的木聚糖酶活显著下降 ($P < 0.05$)。

关键词: 厌氧真菌, 木聚糖酶, 筛选

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0011-05

Screening of Anaerobic Fungi and their Medium Modification for Xylanase Production

ZHU Chong-Miao MAO Sheng-Yong SUN Yun-Zhang ZHU Wei-Yun

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Twelve anaerobic fungal strains isolated from rumen and faeces of ruminants were screened for xylanase production. Isolate A4 strain identified as *Neocallimastix* had the highest xylanase activity among all isolates. With rice straw, corn straw, peanut straw and filter paper as fermentation substrates, the activities of xylanase by A4 were 14.31 U/mL, 11.39 U/mL, 6.99 U/mL, 13.38 U/mL, respectively. The effect of cell-free rumen fluid and yeast extract on xylanase production was tested. The results showed that the concentration level of cell-free rumen fluid had no significant effect on xylanase production. However as yeast extract concentration decreased from 1.0 g/L to 0.5 g/L, the enzyme activity decreased significantly ($P < 0.05$).

Key words: Anaerobic fungi, Xylanase, Screening

木聚糖酶 (Xylanase, EC 3.2.1.8) 能特异性地降解木聚糖, 其产物主要为木寡糖、木糖及阿拉伯糖等, 该酶具有广泛的应用价值。木聚糖酶可由多种微生物产生, 目前多集中于木霉菌和曲霉菌木聚糖酶的研究^[1]。近年来, 许多研究表明, 草食动物消化道及其粪样中的厌氧真菌能产生一系列高活性纤维素酶、半纤维素酶 (包括木聚糖酶) 及酯酶等多种酶, 这些酶在植物纤维降解中起着重要作用^[2]。与目前许多常用酶制剂只能作用于经处理过的非晶体状的底物相比, 厌氧真菌产生的酶能降解晶体状的、结构复杂的植物组织, 甚至坚固的植物厚壁组织和维管束组织^[3], 厌氧真菌的这种特点目前已引起了包括酶制剂研究领域在内的研究人员的极大兴趣。在国内有关厌氧真菌

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39870578),

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39870578)

江苏省农业攻关项目 (No. BE2001375)

江苏省农业技术三项工程项目资助

** 联系人 E-mail: ZHUWEIYUNNSAU @ hotmail.com

收稿日期: 2003-04-07, 修回日期: 2003-07-22

的研究报道较少,且已有研究也多集中于厌氧真菌的分离及其营养特性研究^[4]。本实验室曾对分离自不同国家不同动物的30多株厌氧真菌就降解秸秆能力进行筛选,发现分离自我国动物的菌株具有较强的降解能力^[5]。本文从分离自黑白花种公牛粪样、南京本地水牛粪样、山羊粪样及山羊瘤胃内容物的12株厌氧真菌中,通过体外发酵,筛选出了一株具有较高产木聚糖酶性能的菌株,并对其产酶条件进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:本研究采用的12株厌氧真菌菌株,分别分离自黑白花种公牛的粪样(A1~A4)、南京本地水牛的粪样(B1和B2)、南京本地山羊的瘤胃内容物(R1~R4)和粪样(C1和C2)。

1.1.2 培养基:种子培养基为每1 L含 NaHCO_3 5 g,葡萄糖1 g,酵母膏1 g,蛋白胨1 g, L-半胱氨酸盐酸盐1.5 g,刃天青1 mL(0.1%, w/v),无细胞瘤胃液170 mL,缓冲液A(每100 mL含 KH_2PO_4 0.3 g, NaCl 0.6 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06 g)、缓冲液B(每100 mL含 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g)各165 mL。产酶培养基除不含葡萄糖外,其它成分与种子培养基相同。种子培养基和产酶培养基的底物均为稻草片段(小于3 mm),其干物质含量为8 g/L。所有培养基均在厌氧条件下制备和分装,每瓶90 mL,加盖丁基塑胶塞,并以铝盖密封后, 1×10^5 Pa灭菌15 min。

1.2 方法

1.2.1 培养方法:根据Zhu等^[6]的方法,每瓶产酶培养基接种10 mL已生长3 d的菌种混合悬浮液,每3瓶为一处理,发酵时间分别为24 h、48 h、72 h、96 h、120 h,对照瓶注入10 mL无菌厌氧蒸馏水。所有处理与对照均在39℃下静置培养。

1.2.2 发酵液的收集及干物质测定:在各时间点发酵结束,迅速从各培养瓶中抽取适量发酵液上清, -20℃保存,备测酶活和蛋白质含量。发酵结束,将培养瓶中发酵液经坩埚(坩埚已称重)真空过滤,底物残留及黏附着的菌体在坩埚中于105℃烘至恒重,以对照作校正,计算底物的干物质消失率。

1.2.3 酶活力测定:木聚糖酶活力和羧甲基纤维素酶活力的测定均参照文献[2]。蛋白浓度测定采用Bradford考马斯亮兰比色法^[7]。

2 结果与分析

2.1 木聚糖酶高活性菌株的筛选

图1显示,各菌24 h即开始产木聚糖酶,B2、C2、C3经培养48 h达到产酶高峰,其余8株菌在24~72 h之间酶活快速增加,96 h后趋于稳定。12株厌氧真菌在120 h培养过程中的最大木聚糖酶活及羧甲基纤维素酶活如表1所示,其中A4菌的木聚糖酶活及比活力均最高,分别为13.10 U/mL和26.22 U/mg,显著高于其它菌株($P < 0.05$)。根据对编号为A4菌株的显微观察,发现其生活史中具有多鞭毛游动孢子和单中心营养体阶段,将该菌初步鉴定为*Neocallimastix*属菌。以下实验均以该菌株进行。

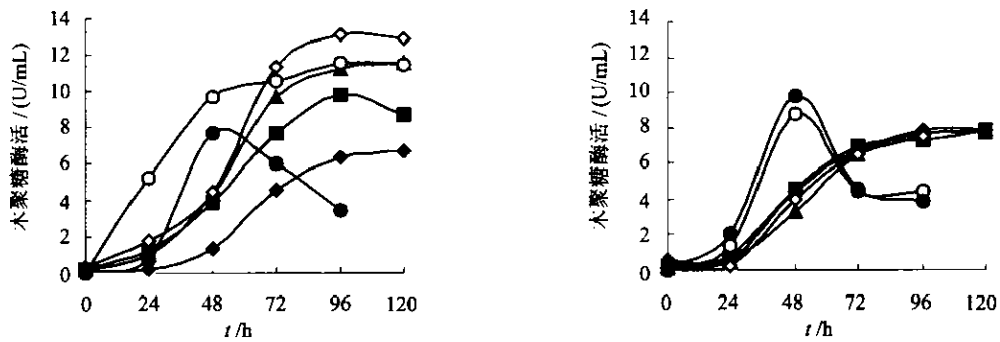


图 1 厌氧真菌产木聚糖酶的时间进程

◆ A1, ■ A2, ▲ A3, ◆ R1, ■ R2, ▲ R3,
◇ A4, ○ B1, ● B2, ◇ R4, ○ C1, ● C2

表 1 最大酶活及其比活力

菌株	木聚糖酶		羧甲基纤维素酶	
	酶活 (U/mL)	比活力 (U/mg)	酶活 (U/mL)	比活力 (U/mg)
A1	6.66 ± 0.03 ^s	7.51 ± 0.12 ^{de}	0.05 ± 0.001 ^f	0.06 ± 0.001 ^e
A2	9.83 ± 0.38 ^c	16.41 ± 1.05 ^c	0.10 ± 0.01 ^e	0.17 ± 0.03 ^d
A3	11.50 ± 0.17 ^b	19.92 ± 0.39 ^b	0.11 ± 0.006 ^e	0.16 ± 0.002 ^d
A4	13.10 ± 0.13 ^a	26.22 ± 0.96 ^a	0.25 ± 0.003 ^a	0.50 ± 0.01 ^a
B1	11.54 ± 0.17 ^b	19.09 ± 0.20 ^b	0.26 ± 0.003 ^a	0.42 ± 0.04 ^b
B2	7.63 ± 0.32 ^{de}	9.20 ± 0.15 ^{de}	0.03 ± 0.009 ^g	0.04 ± 0.00 ^e
R1	7.88 ± 0.14 ^e	6.41 ± 0.38 ^g	0.18 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.01 ^d
R2	7.89 ± 0.12 ^e	6.55 ± 0.13 ^g	0.17 ± 0.002 ^{bc}	0.14 ± 0.004 ^d
R3	7.71 ± 0.02 ^{de}	8.22 ± 0.67 ^{de}	0.16 ± 0.01 ^c	0.17 ± 0.03 ^d
R4	7.47 ± 0.08 ^{de}	9.31 ± 1.08 ^{de}	0.14 ± 0.009 ^d	0.23 ± 0.03 ^c
C2	8.81 ± 0.20 ^d	7.03 ± 0.89 ^g	0.03 ± 0.005 ^g	0.03 ± 0.001 ^e
C3	9.80 ± 0.07 ^c	8.79 ± 1.15 ^{de}	0.03 ± 0.009 ^g	0.03 ± 0.001 ^e

注：同列数字肩部字母不同者差异显著 ($P < 0.05$)

2.2 碳源对产酶的影响

A4 菌在分别以稻草秸、玉米秸、花生秸、滤纸作为碳源时，均可产生较高活力的木聚糖酶（表 2），其酶活分别为 14.31 U/mL、11.39 U/mL、6.99 U/mL 和 13.37 U/mL，比活力分别为 26.96 U/mg、15.95 U/mg、22.29 U/mg 和 25.12U/mg。羧甲基纤维素酶活测定结果表明，以稻草秸和滤纸为碳源时，两者培养液中羧甲基纤维素酶活力无显著性差异 ($P > 0.05$)，但均显著高于以玉米秸和花生秸为碳源时 ($P < 0.05$)。许多研究表明^[2,3]，厌氧真菌木聚糖酶部分为组成型，部分由底物诱导产生。在本实验中，不同碳源底物成分不一，对 A4 菌产酶影响差异较大，有可能是不同底物中所含诱导物的差异所致。此外，发酵结束后，底物干物质消失率测定结果表明，A4 菌对 4 种碳源底物的降解率均较高，尤其滤纸降解率高达 82.82%，这说明 A4 菌具有很强的降解纯纤维素的能力。

表 2 不同碳源对 A4 菌产酶和底物干物质消失率的影响

底物	木聚糖酶		羧甲基纤维素酶		干物质消失率 (%)
	酶活 (U/mL)	比活力 (U/mg)	酶活 (U/mL)	比活力 (U/mg)	
稻草秸	14.31 ± 0.41 ^a	26.96 ± 2.23 ^a	0.25 ± 0.04 ^a	0.47 ± 0.03 ^a	48.28 ± 2.59
玉米秸	11.39 ± 0.26 ^c	15.95 ± 1.57 ^c	0.15 ± 0.03 ^b	0.21 ± 0.02 ^c	9.07 ± 3.45
花生秸	6.99 ± 0.14 ^d	22.29 ± 0.90 ^b	0.13 ± 0.02 ^b	0.37 ± 0.01 ^b	3.88 ± 4.26
滤纸	13.37 ± 0.08 ^b	25.12 ± 1.19 ^{ab}	0.27 ± 0.04 ^a	0.49 ± 0.06 ^a	82.82 ± 2.32

注：同列数字肩字母不同者差异显著 ($P < 0.05$)

2.3 无细胞瘤胃液对产酶的影响

在产酶培养基中分别添加不同浓度的无细胞瘤胃液，以无细胞瘤胃液含量为 170 mL/L 的基础产酶培养基为对照，进行发酵实验。结果表明 (表 3)，无细胞瘤胃液浓度分别为 0、50 mL/L、100 mL/L 的三处理组与对照组之间木聚糖酶活及比活力均无显著差异 ($P > 0.05$)，三处理组间也无显著差异 ($P > 0.05$)，该结果表明，不含无细胞瘤胃液的培养基可作为 A4 菌产木聚糖酶的培养基。羧甲基纤维素酶测定结果表明，三处理组酶活及比活力均低于对照组，但三处理组间无显著差异 ($P > 0.05$)。该结果说明必须较高浓度的无细胞瘤胃液才可促进 A4 菌羧甲基纤维素酶的产生。

表 3 无细胞瘤胃液对 A4 菌产酶的影响

无细胞瘤胃液浓度 (mL/L)	木聚糖酶		羧甲基纤维素酶	
	酶活 (U/mL)	比活力 (U/mg)	酶活 (U/mL)	比活力 (U/mg)
0	12.90 ± 0.63 ^a	25.52 ± 2.99 ^a	0.21 ± 0.03 ^{ab}	0.38 ± 0.05 ^b
50	12.93 ± 0.45 ^a	25.47 ± 0.35 ^a	0.18 ± 0.02 ^b	0.37 ± 0.01 ^b
100	12.90 ± 0.53 ^a	25.60 ± 2.64 ^a	0.19 ± 0.01 ^b	0.37 ± 0.01 ^b
170 (对照)	12.81 ± 0.67 ^a	25.23 ± 0.38 ^a	0.23 ± 0.01 ^a	0.45 ± 0.03 ^a

注：同列数字肩字母不同者差异显著 ($P < 0.05$)

2.4 酵母膏对产酶的影响

在 2.3 实验基础上，将不含无细胞瘤胃液的培养基中添加不同浓度的酵母膏，以酵母膏含量为 1.0 g/L (基础产酶培养基中酵母膏的含量) 的培养基为对照，进行发酵实验。结果表明，酵母膏浓度为 0、0.25 g/L、0.50 g/L 的三处理组所产生的木聚糖酶活及比活力均显著低于对照组 ($P < 0.05$)；酵母膏浓度为 0、0.25 g/L 两处理组的羧甲基纤维素酶活及比活力均显著低于 0.50 g/L 处理组和对照组 ($P < 0.05$) (表 4)。该结果说明，较高浓度的酵母膏可促进木聚糖酶和羧甲基纤维素酶的产生。

表 4 酵母膏对 A4 菌产酶的影响

酵母膏浓度 (g/L)	木聚糖酶		羧甲基纤维素酶	
	酶活 (U/mL)	比活力 (U/mg)	酶活 (U/mL)	比活力 (U/mg)
0	10.72 ± 0.10 ^b	23.24 ± 0.69 ^b	0.15 ± 0.01 ^b	0.33 ± 0.01 ^b
0.25	10.90 ± 0.14 ^b	22.99 ± 0.28 ^b	0.15 ± 0.007 ^b	0.31 ± 0.01 ^b
0.50	10.66 ± 0.20 ^b	22.68 ± 1.18 ^b	0.17 ± 0.006 ^a	0.36 ± 0.02 ^a
1.0 (对照)	13.11 ± 0.24 ^a	26.24 ± 0.37 ^a	0.18 ± 0.002 ^a	0.37 ± 0.01 ^a

注：同列数字肩字母不同者差异显著 ($P < 0.05$)

3 讨论

厌氧真菌是存在于草食动物消化道及其粪样中的一类微生物群, 最早是 Orpin 等^[8]于 1975 年发现的, 其后诸多研究表明, 厌氧真菌可分泌高活性纤维素酶、木聚糖酶和酯酶等多种酶, 并在植物纤维降解中起着重要作用^[2, 3]。朱伟云等^[5]报道, 厌氧真菌降解底物的能力与其来源动物、地区及动物采食的饲料种类等密切相关。本研究应用本实验室分离的 12 株厌氧真菌, 进行了木聚糖酶产生菌的筛选及产酶条件的研究。结果表明, 分离自不同菌源的厌氧真菌在产酶活力方面差异较大, 其中来自黑白花种公牛粪样的 A4 菌产生的木聚糖酶活性最高。同时底物干物质消失率测定结果(结果未列出)表明, 厌氧真菌降解底物的能力因菌株而异, 该方面结果也与上述报道一致。

实验结果表明, A4 菌以稻草为底物所产木聚糖酶活为 14.31 U/mL, 高于国内已报道的链霉菌 (*Streptomyces* sp. str z-6) 所产木聚糖酶活 (9.77 U/mL)^[9]。许多报道表明, 厌氧真菌是迄今所报道的产木聚糖酶和纤维素酶活较高的菌株之一, 其中 Lee 等报道, 瘤胃厌氧真菌 (*Neocallimastix frontalis*) 产生的羧甲基纤维素酶活为 7.435 U/mL·h⁻¹, 比目前工业用纤维素酶制剂生产菌米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 所产纤维素酶的酶活 (4.034 U/mL·h⁻¹) 高 1 倍^[10]。本实验结果和已有报道均显示, 厌氧真菌具有较高的产木聚糖酶和纤维素酶的能力, 因而可望在酶制剂生产领域中得以开发应用。本试验产酶条件研究表明, 无细胞瘤胃液对 A4 菌产木聚糖酶的能力无显著影响, 但酵母膏能促进木聚糖酶的产生, 这可能与酵母膏含有大量未知生长因子有关。此外, 本试验底物干物质消失率测定结果表明, A4 菌对滤纸和稻草的降解率分别高达 82.82% 和 48.28%, 这说明 A4 菌具有很强的降解晶体状植物纤维的能力。A4 菌具有可利用底物广泛、发酵速度快、产木聚糖酶酶活高等特点, 同时还是一株高效秸秆降解菌。因此, A4 菌在木聚糖酶制剂领域及秸秆降解方面均有较大的开发潜力, 目前, 有关该菌株的优化产酶条件及所产木聚糖酶的酶学性质正在进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 朱 静, 严自正. 生物工程学报, 1996, 12 (4): 375 ~ 378.
- [2] Lowe S E, Theodorou M K, Trinci A P J. Appl Environ Microbiol, 1987, 53: 1216 ~ 1223.
- [3] Akin D E, Rigsby L L. Appl Environ Microbiol, 1987, 53: 1987 ~ 1995.
- [4] 龚利敏, 孟庆翔. 畜牧兽医学报, 1997, 28 (6): 489 ~ 493.
- [5] 朱伟云, 毛胜勇, 王全军, 等. 南京农业大学学报, 2001, 24 (3): 44 ~ 48.
- [6] Zhu W Y, Theodorou M K, Longland A C, et al. Anaerobe, 1996, 2: 29 ~ 37.
- [7] Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72: 644 ~ 650.
- [8] Orpin C G. J Gen Microbiol, 1975, 91: 249 ~ 262.
- [9] 孙 迅, 朱 陶, 朱启忠, 等. 微生物学杂志, 1998, 18 (4): 29 ~ 32.
- [10] Lee S S, Shin K J, Kim W Y, et al. Asian-Aus J Ani Sci, 1999, 12 (6): 988 ~ 1001.