

玉米秸秆纤维素降解菌系的筛选及培养基碳氮源优化

张书敏¹, 徐凤花^{1*}, 张蕴琦¹, 吴优¹, 代欢²

(1. 东北农业大学资源与环境学院, 黑龙江哈尔滨 150010; 2. 华中师范大学海南附属中学, 海南海口 570100)

摘要 [目的]为加速玉米秸秆的降解,减轻对环境的压力,筛选玉米秸秆纤维素降解菌系,并使其大量扩繁,为玉米秸秆纤维素降解提供菌种资源。[方法]将富集培养的18组菌系以玉米秸秆为限制性因素,在30℃摇床驯化至18代酶活稳定,筛选出4组酶活较高的菌系,对优良菌系进行培养基碳氮源单因素试验,利用响应面法对其进行产酶培养基碳氮源优化。[结果]18代时,菌系3、6、12、16的羧甲基纤维素酶(CMC)酶活力分别为56.35、50.44、49.99、82.40 U/mL,菌系16的响应面优化培养基碳源、氮源最佳比例为秸秆12.21 g/L、麸皮14.53 g/L、豆粕12.97 g/L时,酶活力最大为229.68 U/mL,各因素对CMC酶活力的影响作用从大到小依次为豆粕、秸秆、麸皮,且秸秆与麸皮交互项对CMC酶活力的影响最为显著。[结论]筛选出的菌系16能加速玉米秸秆的降解,在优化的产酶培养基中酶活力较高。

关键词 纤维素;菌系;酶活;培养基;响应面**中图分类号** S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)34-0082-03**Screening of Corn Straw Cellulose Degradation Strains and Optimization of Medium Carbon and Nitrogen Source**ZHANG Shu-min, XU Feng-hua^{*}, ZHANG Yun-qi et al (College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150010)

Abstract [Objective] To accelerate the degradation of corn straw, to reduce the pressure on the environment, to screen the corn straw cellulose degradation strains, to provide the strain resources for corn straw cellulose degradation. [Method] The 18 groups of strains cultured in the laboratory were used as the restrictive factors of corn straw. They were domesticated to 18 generation at 30℃ until the CMCase was reach stable. Four groups with relatively high CMCcase activity were screened. Single factor test on medium carbon and nitrogen source was carried out for fine strains. Response surface method was used to optimize the carbon and nitrogen source. [Result] At 18 generation, the CMCcase of strains 3, 6, 12 and 16 were 56.35, 50.44, 49.99 and 82.4 U/mL, respectively. The response surface optimization of strains 16 confirmed carbon and nitrogen optimum ratio of medium were 12.21 g/L straw, 14.53 g/L bran, 12.97 g/L soybean meal, and the maximum of CMCcase was 229.678 U/mL. Factors influencing the CMCcase activity was in the order of soybean meal, straw, bran. And bran and straw interaction had the most significant impact on the CMCcase. [Conclusion] The strains 16 screened can accelerate the degradation of corn straw, and enhance the CMCcase activity in optimized culture medium.

Key words Cellulose; Strains; CMCcase activity; Culture medium; Response surface

我国玉米秸秆资源丰富,2013年全国玉米秸秆总量为2.4亿余t,居全国各类农作物秸秆量之首^[1]。黑龙江省是我国重要的商品粮基地,农作物种植面积0.140亿hm²,其中玉米种植面积0.073亿hm²,秸秆达3600余万t^[2]。玉米秸秆纤维素含量高,难降解,大量秸秆资源被废弃或焚烧,造成了严重的资源浪费和环境污染。纤维素可被某些产纤维素酶的微生物水解生成纤维素二糖或葡萄糖^[3]。单菌株酶系单一,酶活力不高,因此筛选高效纤维素降解菌系是解决这一问题的有效途径。笔者以羧甲基纤维素酶(CMC)活力为评价指标,筛选出一组高效纤维素降解菌系,确定其最佳碳氮源配比,以为菌系大量富集提供理论基础。

1 材料与方

1.1 试验材料 秸秆:取自东北农业大学实验实习基地。复合菌系:取自东北农业大学资源与环境学院应用微生物研究室。蛋白胨玉米秸秆纤维素培养基:蛋白胨14.0g,氯化钠14.0g,碳酸钙5.6g,酵母粉2.8g,蒸馏水2800mL。于121℃灭菌30min。将培养基分装18个三角瓶,每瓶装150

mL,每个三角瓶中加入3g秸秆(秸秆分为粗、中、细3种,先称总重量54g,之后将粗、中、细各分为18份,加入培养基内),再于121℃灭菌30min。仪器设备:恒温振荡器,哈尔滨东联电子技术开发有限公司;离心机,上海安亭科学仪器厂;分光光度计,四平电子技术研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 纤维素降解菌系的驯化与筛选。将东北农业大学资源与环境学院应用微生物研究室富集培养的18组菌系采用蛋白胨玉米秸秆纤维素培养基进行定向驯化培养,于第4天测定各代次CMC酶活力,通过比较CMC酶活力确定最优菌系。

1.2.2 菌系产酶培养基碳氮源的优化。

1.2.2.1 诱导碳源的优化。配置玉米秸秆粉含量为4、8、12、16、20g/L的培养基,接入复合菌系发酵,测定CMC酶活力,优化适宜用量。

1.2.2.2 辅助碳源的优化。在确定玉米秸秆粉用量的基础上,以麸皮为辅助碳源,配置麸皮含量为5、10、15、20、25g/L的培养基,发酵产酶,测定CMC酶活力,优化适宜用量。

1.2.2.3 氮源的优化。培养基豆粕粉用量为4、8、12、16、20g/L,测定CMC酶活力,优化适宜用量。

1.2.2.4 培养基响应面的优化。为研究碳氮源最适用量及交互组合的最佳配比,利用Design-Expert 8.0.6软件进行碳氮源响应面优化。在单因素试验的基础上,利用Design-

基金项目 “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD14B06);哈尔滨市科技成果转化项目(2014DBD3BN307)。

作者简介 张书敏(1992-),女,河南商丘人,硕士研究生,研究方向:农业废弃物无害化处理与肥料化利用。*通讯作者,教授,硕士,硕士生导师,从事农业微生物研究。

收稿日期 2016-09-15

Expert 8.0.6 软件中的 Box - Behnken design(BBD) 模型设计 3 因素 3 水平试验,以秸秆(A)、麸皮(B)、豆粕(C)为自变量,以 CMC 酶活力为唯一响应值,试验设计见表 1。

表 1 响应面因素水平

Table 1 The level of factors of response surface g/L			
水平 Level	秸秆(A) Straw	麸皮(B) Bran	豆粕(C) Soybean meal
低水平 Low level (-1)	9.6	12.0	9.6
中水平 Middle level(0)	12.0	14.4	12.0
高水平 High level (1)	14.4	16.8	14.4

1.2.3 CMC 酶活力测定。

1.2.3.1 CMC 酶活力计算公式。CMC 酶活力 = 葡萄糖用量 × 稀释倍数 × 5.56 / (酶液量 × 反应时间)

1.2.3.2 葡萄糖标准曲线的绘制。取 8 支试管(20 mL),编号后加入标准葡萄糖溶液和蒸馏水,配制成一一系列不同浓度的葡萄糖溶液(表 2)。

表 2 葡萄糖溶液的配制

Table 2 Preparation of glucose solution			
管号 Pipe number	葡萄糖 Glucose mL	蒸馏水 Distilled water//mL	葡萄糖含量 Glucose cotnent//mg
1	0	2.0	0
2	0.2	1.8	0.2
3	0.4	1.6	0.4
4	0.6	1.4	0.6
5	0.8	1.2	0.8
6	1.0	1.0	1.0
7	1.2	0.8	1.2
8	1.4	0.6	1.4

将溶液摇匀后,向各试管加入 1 mL NaOH 和 2 mL 3,5 - 二硝基水杨酸,摇匀后,沸水浴 5 min,取出冷却后用蒸馏水定容,在波长 540 nm 处,以 1 号试管溶液调 0,测定其他试管溶液的吸光度。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。

1.2.3.3 DNS 显色法测定 CMC 酶活力。取 20 mL 试管,3 次重复,做好标记。于 5 000 r/min 离心 25 min,取 1 mL 到试管中,加入 4 mL CMC 溶液,于 45 °C 水浴保温 15 min,然后加入 1 mL NaOH 和 2 mL DNS。取 1 个试管(不加酶液)作为空白对照,按照上述步骤进行。所有试管沸水浴 5 min,冷却后用蒸馏水定容,于 540 nm 处测定吸光度。

2 结果与分析

2.1 菌系的驯化与选育 经过蛋白胨玉米秸秆纤维素培养基 18 代继代培养获得菌系 3、菌系 6、菌系 12、菌系 16(图 1)。从图 1 可见,4 组菌系的 CMC 酶活力均随着驯化次数的增加而升高,10 代以上的 CMC 酶活力趋于稳定,18 代时菌系 3、6、12、16 的 CMC 酶活力分别为 56.35、50.44、49.99、82.40 U/mL,较第 1 代分别提高了 39%、30%、28%、64%。由此可知,菌系 16 为最优菌系。

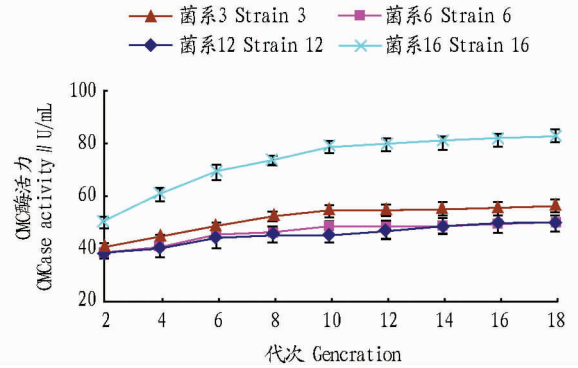


图 1 不同代次菌系的 CMC 酶活力

Fig. 1 The CMCase activity of strains at different generations

2.2 菌系产酶培养基碳氮源优化

2.2.1 诱导碳源玉米秸秆粉对 CMC 酶活力的影响。从图 2 可见,随着玉米秸秆粉用量的增加,CMC 酶活力呈先增大后减小趋势。当玉米秸秆粉为 12 g/L 时,CMC 酶活力最高,达到 150.89 U/mL;当玉米秸秆粉用量大于 12 g/L 时,CMC 酶活力反而逐渐降低。这可能是由于玉米秸秆粉用量的增加,培养基固形物浓度增大,导致发酵底物黏度提高,影响溶氧浓度、营养物质传递和代谢物的扩散,不利于微生物生长,从而使 CMC 酶活力降低。还可能是因为玉米秸秆粉用量的增加,导致碳氮比值增大,影响微生物的生长,以致酶活力降低。

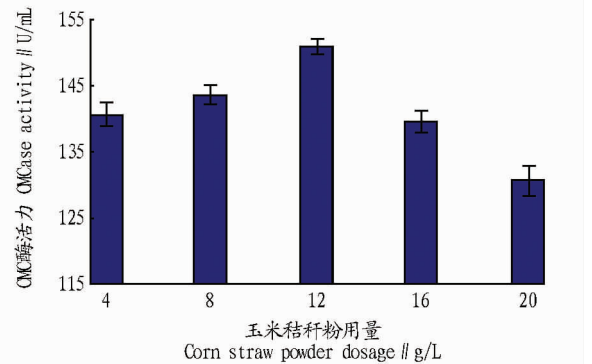


图 2 玉米秸秆粉对菌系 16 CMC 酶活力的影响

Fig. 2 Effects of corn straw powder dosage on the CMCase activity of 16 strains

2.2.2 辅助碳源麸皮对 CMC 酶活力的影响。从图 3 可见,随着麸皮用量的增加,CMC 酶活力呈先增大后减小的趋势。当麸皮用量为 15 g/L 时,CMC 酶活力最高,达 161.91 U/mL;当麸皮用量大于 15 g/L 时,CMC 酶活力反而降低。这与徐海等^[4]的研究结果一致。这是由于麸皮主要成分是淀粉,用量增加,水解产生的还原糖量也相应增加,当麸皮用量过大会对纤维素酶的形成产生抑制。

2.2.3 氮源豆粕对 CMC 酶活力的影响。从图 4 可见,随着豆粕用量的增加,CMC 酶活力呈先增大后减小的趋势。当豆粕用量为 12 g/L 时,CMC 酶活力最高,达 190.96 U/mL;当豆粕用量大于 12 g/L 时,CMC 酶活力反而降低。

2.2.4 产酶培养基碳氮源优化。试验包括 12 个析因试验和 3 个中心试验,试验结果见表 3。

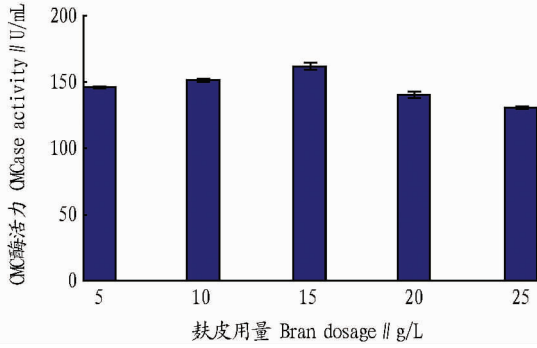


图3 麸皮对菌系16CMCase酶活力的影响

Fig.3 Effects of bran dosage on the CMCase activity of 16 strains

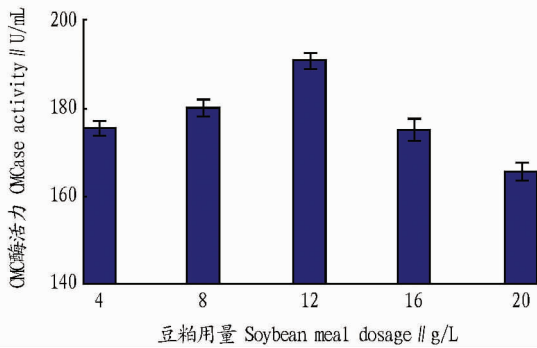


图4 豆粕对菌系16CMCase酶活力的影响

Fig.4 Effects of soybean meal dosage on the CMCase activity of 16 strains

对表3中的试验结果进行多元回归拟合,建立二次多项式回归模型方程: $R_1 = +211.1703 + 17.7438A + 9.5959B + 33.0916C + 19.9548AB - 6.6718AC - 4.5155BC - 33.4427A^2 - 36.4794B^2 - 16.0379C^2$ 。

表3 Box- Behnken 试验设计及结果

Table 3 The experimental design and results of Box- Behnken

试验号 Test No.	因素 Factors			R
	A	B	C	
1	-1	-1	0	132.24
2	1	-1	0	120.981
3	-1	1	0	121.606
4	1	1	0	190.166
5	-1	0	-1	109.097
6	1	0	-1	164.765
7	-1	0	1	171.958
8	1	0	1	200.939
9	0	-1	-1	108.159
10	0	1	-1	126.298
11	0	-1	1	200.039
12	0	1	1	200.116
13	0	0	0	210.904
14	0	0	0	205.966
15	0	0	0	216.641

回归分析显示, $F_{模型} = 13.88, P_{模型} = 0.0049; F_A = 13.85, P_A = 0.0137; F_B = 4.05, P_B = 0.1003; F_C = 48.16, P_C = 0.0010; F_{AB} = 8.76, P_{AB} = 0.0315; F_{AC} = 0.98, P_{AC} = 0.3679; F_{BC} =$

$0.45, P_{BC} = 0.5328; F_{A^2} = 22.70, P_{A^2} = 0.0050; F_{B^2} = 27.01, P_{B^2} = 0.0035; F_{C^2} = 5.22, P_{C^2} = 0.0711; F_{失定} = 9.95, P_{失拟} = 0.0927$ 。菌系16CMCase酶活力模型 $P = 0.0049, F = 13.8800, P_{失拟} = 0.0927, R^2 = 0.9615$,表明该模型与实际情况拟合良好,A、C、AB、 A^2 、 B^2 的 $P < 0.05$,说明这些独立项和交互项对菌系16的CMCase酶活力的影响显著。在独立项中,A、C的 $P < 0.05$,但C的F值最大,P值最小,说明在独立项中C对菌系16CMCase酶活力发挥作用最显著。在交互项中,AB组合P值最小,说明AB对菌系16的CMCase酶活力发挥作用显著。由此可知,在CMCase酶活力响应面分析试验中,各变量对CMCase酶活力影响作用由大到小依次为豆粕、秸秆、麸皮。

不同交互项对菌系16CMCase酶活力影响的响应面见图5~7。图5、6是秸秆、麸皮保持固定时,麸皮和豆粕及秸秆和豆粕交互作用对CMCase酶活力的影响,曲面坡度都较缓,且在回归分析中交互项的 $P > 0.05$,因此豆粕和麸皮及豆粕和秸秆的交互组合CMCase对酶活力的影响不显著。从图7可见,豆粕保持固定的情况下,CMCase酶活力随着秸秆与麸皮用量的增加而不断提高,当到达极值之后随着秸秆与麸皮含量的增加而下降,在回归分析中,交互项的 $P < 0.05$,表明秸秆与麸皮交互组合对CMCase酶活力的影响显著。

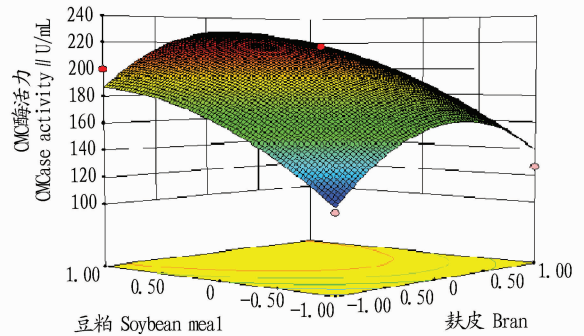


图5 豆粕与麸皮交互作用的响应面

Fig.5 Response surface of interaction between soybean meal and wheat bran

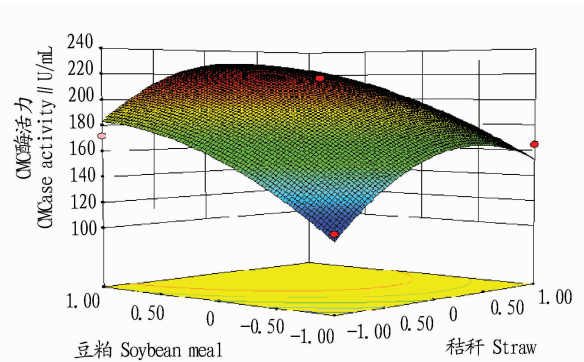


图6 豆粕和秸秆相互作用的响应面

Fig.6 Response surface of interaction between soybean meal and straw

利用 Design-Expert 8.0.6 软件计算得到最佳培养基的参数: 秸秆 12.21 g/L, 麸皮 14.53 g/L, 豆粕 12.97 g/L, CMCase (下转第 89 页)

组部挂职干部,韩国京畿道政府环境考察团,意大利环境、国土和海洋部可持续发展、环境损害欧盟和国际事务司司长一行,韩国 KBS 专题片栏目组等机构团体调研参观 63 批次,523 人次^[25-26]。研究注重环境保护宣传,提高了公民环保意识;获得广泛关注,取得了良好的社会效益和环境效益。

4 结论

(1)北京市环保监测中心集成数值、统计、判别预报技术,创新性建立空气质量预报预警体系,在全国率先开展新空气质量标准的业务预报和信息发布,提高了空气质量以及重污染过程的模拟性能,综合预报级别准确率超过了 80%。

(2)首次集成建立了包含会前方案可行性研判、会期综合预报预警、会后快速综合评价的重大活动空气质量保障技术。圆满完成各类重大活动保障,实现了“APEC 蓝”“田径蓝”和“阅兵蓝”,增强了全社会对于早日实现常态化“北京蓝”的信心。

(3)全方位多渠道发布空气质量预报信息,为公众规避重污染和健康出行提供服务,促进全社会环境保护意识的提升,取得了良好的社会效益和环境效益。

参考文献

- [1] CHAN C K, YAO X H. Air pollution in mega cities in China[J]. *Atmospheric environment*, 2008, 42(1): 1-42.
- [2] VINGARZAN R. A review of surface ozone background levels and trends[J]. *Atmospheric environment*, 2004, 38(21): 3431-3442.
- [3] 中华人民共和国环境保护部. 环境空气质量标准(试行)[S]. 北京:中国环境科学出版社, 2012.
- [4] 程念亮, 李云婷, 张大伟, 等. 2013 年 1 月北京市一次空气重污染成因分析[J]. *环境科学*, 2015, 36(4): 1154-1162.
- [5] 程念亮, 李云婷, 张大伟, 等. 2014 年 10 月北京市 4 次典型空气重污染过程成因分析[J]. *环境科学研究*, 2015, 28(2): 163-170.
- [6] 北京市环境保护监测中心. 2015 年两大活动期间空气质量保障效果综合评估报告[R]. 北京:北京市环境保护监测中心, 2015.
- [7] 北京市环境保护监测中心. APEC 空气质量保障环境空气质量改善效果评估报告[R]. 北京:北京市环境保护局, 2014.
- [8] 刘保献, 张大伟, 陈添, 等. 北京市 PM_{2.5} 主要化学组分浓度水平研究与

- 特征分析[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(12): 4053-4060.
- [9] 杨懂艳, 刘保献, 张大伟, 等. 2014 年 APEC 前后北京城区 PM_{2.5} 中水溶性离子特征分析[J]. *环境科学*, 2015, 36(12): 4325-4330.
- [10] ZHAO P S, ZHANG X L, XU X L, et al. Long-term visibility trends and characteristics in the region of Beijing, Tianjin, and Hebei, China [J]. *Atmospheric research*, 2011, 101(3): 711-718.
- [11] 程念亮, 李云婷, 孙峰, 等. 北京市空气重污染天气类型分析及预报方法简介[J]. *环境科学与技术*, 2015, 38(5): 189-194.
- [12] 程念亮, 张大伟, 陈添, 等. 2015 年北京市两次红色预警期间 PM_{2.5} 浓度特征[J]. *环境科学*, 2016, 37(7): 2409-2418.
- [13] 程念亮, 李云婷, 张大伟, 等. 2014 年 APEC 期间北京市空气质量改善分析[J]. *环境科学*, 2016, 37(1): 66-73.
- [14] 程念亮, 李军杰, 李云婷, 等. 基于 matlab 北京市 PM_{2.5} 动态分区统计预报模型的开发[J]. *环境工程学报*, 2015, 9(10): 4965-1970.
- [15] COGLIANI E. Air pollution forecast in cities by an air pollution index highly correlated with meteorological variables[J]. *Atmospheric environment*, 2001, 35(16): 2871-2877.
- [16] LEE B K, JUN N Y, LEE H K, et al. Analysis of impacts on urban air quality by restricting the operation of passenger vehicles during Asian Game events in Busan, Korea [J]. *Atmospheric environment*, 2005, 39(12): 2323-2338.
- [17] BEIG G, CHATE D M, GHUDE S D, et al. Quantifying the effect of air quality control measures during the 2010 Commonwealth Games at Delhi, India [J]. *Atmospheric environment*, 2013, 80: 455-463.
- [18] WANG T, XIE S D. Assessment of traffic-related air pollution in the urban streets before and during the 2008 Beijing Olympic Games traffic control period[J]. *Atmospheric environment*, 2009, 43(35): 5682-5690.
- [19] 国家环境保护部. APEC 会议空气质量保障方案(试行)[Z]. 北京:北京市环境科学出版社, 2014.
- [20] 国家环境保护部. 大阅兵空气质量保障方案(试行)[Z]. 北京:北京市环境科学出版社, 2015.
- [21] 程念亮, 张大伟, 李云婷, 等. 2000~2014 年北京市 SO₂ 时空分布及一次污染过程分析[J]. *环境科学*, 2015, 36(11): 3961-3970.
- [22] 李云婷, 程念亮, 张大伟, 等. 2013 年北京市不同方位 PM_{2.5} 背景浓度研究[J]. *环境科学*, 2015, 36(12): 4331-4340.
- [23] 程念亮, 李云婷, 张大伟, 等. 2013 年北京市细颗粒物时空分布特征研究[J]. *环境工程*, 2015, 33(10): 43-46.
- [24] 程念亮, 陈添, 张大伟, 等. 2015 年春节北京市空气质量分析[J]. *环境科学*, 2015, 36(9): 3150-3158.
- [25] 程念亮, 李云婷, 张大伟, 等. 2014 年北京市城区臭氧超标日浓度特征及与气象条件的关系[J]. *环境科学*, 2016, 37(6): 2041-2051.
- [26] 程念亮, 李云婷, 张大伟, 等. 2013~2014 年北京市 NO₂ 时空分布研究[J]. *中国环境科学*, 2016, 36(1): 18-26.

(上接第 84 页)

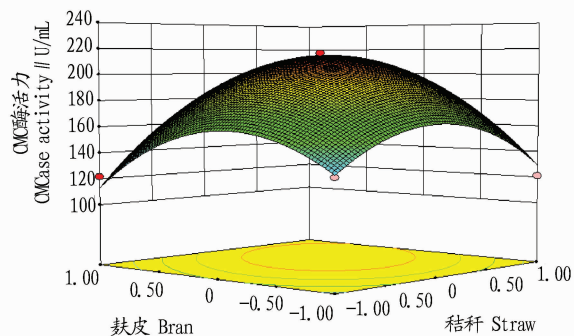


图7 秸秆和麸皮交互作用的响应面

Fig. 7 Response surface of interaction between straw and bran

酶活力的预测值为 229.68 U/mL。验证试验表明,CMC 酶活力为 229.14 U/mL,相对误差为 2.364%,表明利用该优化方法得到的产纤维素酶培养基配方可靠。

3 结论与讨论

(1)该试验富集培养的 18 组菌系以玉米秸秆为限制性

因素驯化至 18 代,筛选出 4 组 CMC 酶活力较高的菌系。结果表明,CMC 酶活力随着驯化代次的增加而逐渐提高,10 代以上趋于稳定,18 代时菌系 16 的 CMC 酶活力最高,达 82.40 U/mL。

(2)采用响应面优化结果确定最佳碳源、氮源配比为秸秆 12.21 g/L,麸皮 14.53 g/L,豆粕 12.97 g/L,酶活验证值为 229.14 U/mL,与预测值的相对误差为 2.364%,表明试验可靠。各因素对 CMC 酶活力的影响从大到小依次为豆粕、秸秆、麸皮,且秸秆与麸皮交互项对 CMC 酶活力的影响最为显著。

参考文献

- [1] 左旭,王红彦,王亚静,等. 中国玉米秸秆资源量估算及其自然适宜性评价[J]. *中国农业资源与区划*, 2015, 36(6): 5-10, 29.
- [2] 迟德龙,刘波. 谈黑龙江玉米秸秆综合利用[J]. *农机使用与维修*, 2015(7): 27-28.
- [3] 周俊强,邱忠平,韩云平,等. 纤维素降解菌的筛选及其产酶特性[J]. *环境工程学报*, 2010, 4(3): 705-708.
- [4] 徐海,钱卫,朱明田,等. 酸水解麸皮对斜卧青霉菌产纤维素酶的影响[J]. *食品与发酵工业*, 1997(1): 15-17.