

白酒酒醅中纤维素酶产生菌的产酶活力与其生理生化特性的研究

郭建华^{1,2}, 刘冀¹, 郭宏文¹, 刘晓兰¹, 杜国军¹, 贾士儒²

(1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006;

2. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300222)

摘要:以白酒酒醅中筛选出的产纤维素酶的细菌为研究对象,利用相关分析和通径分析研究了纤维素酶产生菌的生理生化特性与其产酶活力之间的关系。相关分析和通径分析结果表明:细胞长宽比和葡萄糖产酸指标与纤维素酶活力具有明显的负相关性;淀粉水解实验指标与纤维素酶活力具有明显的正相关性;细胞长宽比对细菌产纤维素酶的负向直接作用最大;葡萄糖产酸指标对纤维素酶活力有较强的负向直接作用;葡萄糖产气和酪蛋白实验指标对纤维素酶具有较强的正向直接作用;同时各个指标还通过其他指标对纤维素酶活力具有间接作用。

关键词:纤维素酶产生菌,生理生化特性,纤维素酶,相关分析,通径分析

Study on cellulase activity production and physiological and biochemical characteristics of cellulase producing bacteria isolated from wine fermented grains

GUO Jian-hua^{1,2}, LIU Ji¹, GUO Hong-wen¹, LIU Xiao-lan¹, DU Guo-jun¹, JIA Shi-ru²

(1. College of Food & Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China;

2. School of Biological Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: A correlation between the physiological and biochemical characteristics of cellulase producing bacteria isolated from wine fermented grains and cellulose enzyme activity was studied using correlation analysis and path analysis. Results of correlation analysis and path analysis showed that cell aspect ratio and acid production indicator using glucose had clear negative correlations with cellulase activity, while starch hydrolysis test indicator had positive correlation with cellulase activity. Cell aspect ratio had the largest negative direct effect on cellulase activity. Acid production indicator using glucose had strong negative direct effect on cellulase activity. Gas production indicator used glucose and casein test indicator had strong positive direct effects on cellulase activity, as well as individual indicators also had indirect effects on cellulase activity through other indicators.

Key words: cellulase producing bacteria; physiological and biochemical characteristics; cellulase; correlation analysis; path analysis

中图分类号: TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)05-0177-04

不同地域不同香型和风味的白酒在发酵过程中具有不同的复杂的微生物菌群^[1], 这为新菌种的发现和功能利用提供了巨大的发展空间。白酒发酵酒醅中含有多种纤维素酶产生菌, 它们产生的纤维素酶对白酒的生产质量起着重要的作用, 不仅能影响白酒中的醛、醇、有机酸、酯等风味物质的产量^[2-3], 而且可以提高白酒的出酒率^[4]。从发酵酒醅中筛选出能最大限度地降解木屑、农作物秸秆、废纸等工农业及生活纤维废弃物等产纤维素酶的微生物或酶制剂

组成复合功能菌群用于发酵生产工业中, 或者开发其在能源方面的应用等, 对环保及能源开发都具有重要的现实意义。微生物发酵生产是一个复杂的生理生化代谢过程, 不同的纤维素酶产生菌进行纤维素酶发酵必然受到微生物的生理生化特性的影响, 表现出不同的产酶活力。研究酒醅中纤维素酶产生菌的产酶及生理生化特点, 对明确它们在白酒发酵过程中的作用以及开发菌种的应用具有重要的意义。微生物细胞的产酶能力与其生理生化性状之间存在相关性, 如沈业寿等^[5]研究了竹荪菌株产纤维素酶活与培养性状之间的相关性, 发现供试竹荪菌产酶能力与菌体生长速率等性状之间存在正相关性; 翁海波等^[6]研究发现, 利用土曲霉 M11 液态发酵时菌丝球的形态与发酵产纤维素酶活力密切相关。迄今为止, 关于微生物生理生化特性与产酶之间的相

收稿日期: 2012-08-20

作者简介: 郭建华(1977-), 男, 在读博士, 讲师, 研究方向: 微生物发酵工程。

基金项目: 齐齐哈尔大学青年教师科学技术类科研启动支持计划项目(2011K-M35)。

关性研究集中于微生物形态与产量之间的关系^[7-10]。很多学者在进行纤维素酶产生菌的筛选时,都测定了菌株的生理生化特性^[11-13],但一般是用来对菌株进行初步的鉴定分类,而探讨微生物生理生化特性与产酶相关性的研究还少有报道。本文利用从某白酒厂酒醅中分离出的 20 株产纤维素酶的细菌为研究材料,测定了它们的部分生理生化特性和发酵产纤维素酶的能力,并利用相关分析和通径分析,研究了纤维素酶产生菌的生理生化特性与其产酶能力之间的相关性,并探讨了各种生理生化特性指标对细菌产纤维素酶活力的直接影响和间接影响。为更深入地研究微生物产纤维素酶的特点奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

20 株产纤维素酶的细菌 从某白酒厂堆积酒醅和出窖酒醅中分离得到。从堆积酒醅中筛选出 7 株纤维素酶产生菌,标号为 D-1~D-7,出窖酒醅中筛选出 13 株纤维素酶产生菌,标号为 C-1~C-13。

振荡培养箱 常州国华电器有限公司;生化培养箱 SPX-150II 天津泰斯特仪器有限公司;TU-1810 紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司。

1.2 发酵纤维素酶活力的测定

1.2.1 种子液的制备 将纤维素酶产生菌从试管斜面接到灭菌之后的肉汤培养基中,置于恒温培养箱中,在 37℃ 下以 120r/min 培养 12h,备用。

1.2.2 发酵液的制备 将种子液按照 10% 的接种比例接到灭菌之后的液体 CMC 培养基中,在 37℃ 下以 120r/min 培养 24h。

1.2.3 纤维素酶活力的测定 将培养好的发酵液,然后倒入离心管中,5000r/min 离心 10min,上清液即为发酵酶液。利用 DNS 法测定其纤维素酶活力,测定方法见参考资料[14]。

1.3 细菌生理生化特性的测定

1.3.1 革兰氏染色 实验方法见参考资料[15]。为了分析方便,如果结果呈阳性,用数字“1”表示;结果呈阴性,用数字“0”表示。

1.3.2 细菌细胞长宽比的测定 利用显微测微尺测定细菌细胞的长度和宽度^[6],两者数值相比为细胞长宽比。

1.3.3 糖发酵实验 分别测定细菌对葡萄糖和乳糖的发酵特性,测定方法见文献[15]。如果结果呈阳性,用数字“1”表示;结果呈阴性,用数字“0”表示。

1.3.4 淀粉水解实验和酪蛋白水解实验 淀粉水解实验方法见参考资料[16]。酪蛋白实验见参考资料[16]。如果实验结果呈阳性,利用游标卡尺分别测量透明圈和菌落平均直径,计算透明圈直径与菌落直径的比值;如果实验结果呈阴性,结果记为“0”。

1.3.5 过氧化氢酶实验 实验方法见参考资料[16]。如果结果呈阳性,用数字“1”表示;结果呈阴性,用数字“0”表示。

1.3.6 柠檬酸盐实验和硫化氢产生实验 实验方法见参考资料[15]。如果结果呈阳性,用数字“1”表

示;结果呈阴性,用数字“0”表示。

1.4 相关性分析和主成分分析

利用统计分析软件 SPASS 13.0 实现相关分析和通径分析^[17]。

2 结果与讨论

2.1 纤维素酶产生菌的生理生化特性指标与其产纤维素酶活力之间的相关系数

测定 20 株纤维素酶产生菌的部分生理生化特性和它们的发酵产纤维素酶的活力,结果如表 1 所示。

表 1 表明,20 株纤维素酶产生菌革兰氏染色均为阳性;硫化氢实验均为阴性;糖发酵实验表明,所有菌株都不能利用乳糖产气;而其他生理生化特性随着菌株的不同都有很大差别。微生物的生理生化指标在一定程度上反映了细胞产不同酶的能力大小,如淀粉水解实验中透明圈与菌落直径的比值代表了细菌产淀粉酶能力的大小。微生物细胞是一个有机整体,其各种生理生化特性与其产纤维素酶能力之间存在着不同程度的关联。利用相关分析计算 20 株细菌的发酵酶活大小与细胞的长宽比、淀粉水解实验指标、酪蛋白实验指标、糖发酵实验指标、柠檬酸盐实验指标及过氧化氢酶实验指标之间的相关系数,结果如表 2 所示。

从表 2 可知,20 株细菌的生理生化特性指标与产酶纤维素酶活力的相关度(相关系数的绝对值)大小顺序为:淀粉水解实验指标 > 细胞长宽比 > 葡萄糖产酸 > 乳糖产酸 > 柠檬酸盐实验指标 > 葡萄糖产气 > 过氧化氢酶实验指标 > 酪蛋白实验指标。其中细胞长宽比和葡萄糖产酸实验指标与菌株纤维素酶发酵酶活呈明显的负相关性,其相关系数分别为 -0.746 和 -0.734。

2.2 菌株的生理生化特性指标对产纤维素酶活力的通径分析

菌株的生理生化特性指标与产纤维素酶活力的相关系数的大小仅仅表示两者之间关系的密切程度,但是不能解释和分析这种关系的构成和来源。同时生理生化特性之间存在互相影响,要揭示生理生化特性指标与纤维素酶活力之间的真实关系,需要通过通径分析计算各个指标对纤维素酶活力的直接作用和间接作用。通径分析结果如表 3 所示。

从表 3 可以看出,各生理生化特性指标对菌株发酵产纤维素酶活力的直接作用(通径系数绝对值)大小顺序为:细胞长宽比 > 酪蛋白实验 > 葡萄糖产酸 > 葡萄糖产气 > 淀粉水解实验 > 柠檬酸盐实验 = 过氧化氢酶实验 > 乳糖产酸。

2.2.1 细胞长宽比与产纤维素酶活力的关系 根据表 3,细胞长宽比对细菌产纤维素酶活的直接作用最大,其作用为负向作用,即细胞长宽比越大,产酶活力越小。细胞长宽比还通过淀粉水解指标、葡萄糖产酸和葡萄糖产气指标的间接作用加强了对纤维素酶活力的负向作用;通过酪蛋白实验、乳糖产酸和柠檬酸盐实验指标的正向间接作用,削弱了细胞长宽比对纤维素酶活力的负向作用。其综合效果使细胞

表1 纤维素酶产生菌的生理生化特性指标及发酵产纤维素酶活力

Table 1 Indicators of physiological and biochemical characteristics and ferment cellulase activity of cellulase producing bacteria

菌株	细胞长宽比	革兰氏染色	糖发酵实验				淀粉水解实验	酪蛋白实验	过氧化氢酶实验	柠檬酸实验	H ₂ S实验	纤维素酶活力 (U/mL)
			葡萄糖发酵		乳糖发酵							
			产酸	产气	产酸	产气						
D-1	2.54	1	1	0	0	0	3.28	4.22	0	0	0	24.55
D-2	2.44	1	1	0	1	0	4.35	5.55	0	0	0	45.64
D-3	2.67	1	1	0	0	0	3.26	4.35	1	0	0	28.48
D-4	1.86	1	0	1	1	0	5.50	3.24	1	1	0	65.89
D-5	2.14	1	0	0	0	0	4.32	4.45	1	0	0	58.44
D-6	2.89	1	1	0	0	0	2.76	3.35	1	1	0	32.51
D-7	2.18	1	1	0	0	0	3.82	2.74	0	0	0	45.23
C-1	2.52	1	1	0	0	0	2.74	0	0	0	0	22.76
C-2	1.04	1	0	0	1	0	5.47	2.82	1	1	0	60.83
C-3	1.12	1	0	0	1	0	5.82	2.65	1	0	0	64.45
C-4	1.24	1	0	0	1	0	4.75	0	0	1	0	50.62
C-5	2.23	1	0	0	0	0	4.24	5.84	0	0	0	55.37
C-6	1.18	1	0	0	1	0	5.84	4.88	0	1	0	61.68
C-7	1.48	1	1	1	0	0	5.46	2.96	0	1	0	55.75
C-8	1.15	1	0	0	0	0	4.45	2.55	0	1	0	58.76
C-9	1.28	1	1	0	0	0	2.46	0	1	0	0	46.85
C-10	1.34	1	1	0	0	0	3.04	0	0	0	0	48.95
C-11	1.17	1	0	0	0	0	4.52	3.05	1	0	0	59.64
C-12	1.59	1	0	0	0	0	4.87	3.24	1	0	0	57.16
C-13	1.40	1	1	0	0	0	4.55	2.85	0	1	0	53.79

表2 生理生化特性与纤维素酶活力的相关系数

Table 2 Correlation coefficients of physiological and biochemical characteristics and ferment cellulase activity

	细胞长宽比	淀粉水解实验	葡萄糖产酸	葡萄糖产气	乳糖产酸	柠檬酸盐实验	酪蛋白实验	过氧化氢酶实验	纤维素酶活力
细胞长宽比	1								
淀粉水解实验	-0.560 *	1							
葡萄糖产酸	0.502 *	-0.676 **	1						
葡萄糖产气	-0.057	0.386	0.000	1					
乳糖产酸	-0.320	-0.638 **	-0.436	0.145	1				
柠檬酸盐实验	-0.331	0.450 *	-0.204	0.408	0.356	1			
酪蛋白实验	0.367	0.332	-0.193	0.031	0.096	-0.050	1		
过氧化氢酶实验	-0.033	0.049	-0.302	0.034	0.066	-0.123	0.042	1	
纤维素酶活力	-0.746 **	0.801 **	-0.734 **	0.284	0.424	0.325	0.135	0.199	1

注: * 显著性 0.05 水平; ** 显著性 0.01 水平。

表3 生理生化特性和纤维素酶活力的通径分析

Table 3 Path analysis of physiological and biochemical characteristics and cellulase activity

	直接作用	与纤维素酶活力相关	间接作用							
			细胞长宽比	淀粉水解实验	葡萄糖产酸	葡萄糖产气	乳糖产酸	柠檬酸盐实验	酪蛋白实验	过氧化氢酶实验
细胞长宽比	-0.681	-0.746		-0.034	-0.146	-0.013	0.001	0.020	0.109	-0.002
淀粉水解实验	0.061	0.801	0.381		0.196	0.090	0.002	-0.027	0.098	0.002
葡萄糖产酸	-0.290	-0.734	-0.342	-0.041		0	0.002	0.012	-0.057	-0.018
葡萄糖产气	0.235	0.284	0.039	0.024	0		-0.001	-0.024	0.009	0.002
乳糖产酸	-0.004	0.424	0.218	-0.039	0.126	0.034		0.021	0.028	0.004
柠檬酸盐实验	-0.059	0.325	0.225	0.027	0.059	0.096	-0.002		-0.015	-0.007
酪蛋白实验	0.296	0.135	-0.250	0.020	0.056	0.007	0	0.003		0.002
过氧化氢酶实验	0.059	0.199	0.022	0.003	0.088	0.008	0	0.007	0.012	

长宽比与纤维素酶活力的具有明显的负相关性(相关系数为-0.746),因此,在从酒醅中筛选具有纤维素酶产生能力的细菌时,细胞长宽比是一个重要的考虑指标。

2.2.2 淀粉水解实验指标与产纤维素酶活力的关系 淀粉水解实验指标对纤维素酶活力的直接作用很小,其直接通径系数只有 0.061,但是通过细胞长宽比、葡萄糖产酸、葡萄糖产气和酪蛋白实验指标对纤维素酶活力的正向间接作用很大,从而增加了淀粉水解实验指标与纤维素酶活力的相关度。在已测指标中,淀粉水解实验指标与纤维素酶活力的相关系数最大。这也说明纤维素酶产生菌产淀粉酶的能力和产纤维素酶的能力具有一致性。

2.2.3 葡萄糖产酸和葡萄糖产气指标与纤维素酶活力的关系 葡萄糖产酸指标对纤维素酶活力的直接作用表现为负向,其直接通径系数为-0.290,并且通过细胞长宽比、淀粉水解实验和酪蛋白实验指标的负向间接作用增加了其与纤维素酶活力的负相关性(相关系数为-0.734),说明菌株利用葡萄糖产酸抑制了纤维素酶的产生。葡萄糖产气指标对纤维素酶的活力的主要表现为直接正向作用,而间接作用很小。说明利用葡萄糖产气对菌株产纤维素酶的能力影响不大。

2.2.4 乳糖产酸指标和柠檬酸盐实验指标与纤维素酶活力的关系 乳糖产酸指标柠檬酸盐实验指标对纤维素酶活力都有很小的负向直接作用,但是通过细胞长宽比、葡萄糖产酸和葡萄糖产气的正向间接作用,使它们与纤维素酶活力之间具有一定的正相关性。因此,乳糖产酸和柠檬酸实验指标主要是通过间接作用对纤维素酶活力产生影响。

2.2.5 酪蛋白实验指标和过氧化氢酶实验指标与纤维素酶活力的关系 酪蛋白实验指标对纤维素酶活力的直接作用排第 2 位,但是通过细胞长宽比对纤维素酶活力产生了很大的负向间接作用,使得酪蛋白实验指标与纤维素酶活力的相关性下降。而过氧化氢酶实验指标对纤维素酶活力有较小的正向直接作用,而且通过细胞长宽比和葡萄糖产酸的正向间接作用,增加了与纤维素酶活力的相关性。这说明细菌分泌蛋白酶和过氧化氢酶与产纤维素酶之间的关系比较复杂,有待深入研究。

3 结论

根据相关性分析结果可知:酒醅中纤维素酶产生细菌的的生理生化特性指标与其发酵产纤维素酶之间具有不同程度的相关性。其中细胞长宽比和葡萄糖产酸指标与纤维素酶活力具有明显的负相关性,而淀粉水解实验指标与纤维素酶活力具有明显的正相关性。根据通径分析结果可知:细胞长宽比对细菌产纤维素酶的负向直接作用最大;葡萄糖产酸指标对纤维素酶活力有较强的负向直接作用;葡萄糖产气和酪蛋白实验指标对纤维素酶具有

较强的正向直接作用;同时各个指标还通过其他指标对纤维素酶活力产生间接影响。细菌在发酵产纤维素酶时,与其本身的生理生化特性间存在不同程度的相关性,明确生理生化指标对纤维素酶产生的影响,有助于更好地开发和利用纤维素酶产生菌。

参考文献

- [1]唐玉明,姚万春,任道群,等.酱香型白酒窖内发酵过程中糟醅的微生物分析[J].酿酒科技,2007(12):50-53.
- [2]李旭晖,吴生文,张志刚.纤维素酶对大曲酒风味物质影响的探讨[J].中国酿造,2011(6):80-83.
- [3]李旭晖,吴生文,张志刚,等.木聚糖酶在特型酒生产中的应用[J].酿酒科技,2011(5):65-68.
- [4]邢晓晰,温亚丽,王晓江.纤维素酶在白酒生产中的应用研究[J].酿酒科技,1998(5):32-33.
- [5]沈业寿,王光存,胡江林,等.竹荪菌株的纤维素酶活与培养性状的相关性研究[J].安徽大学学报:自然科学版,1993(3):83-91.
- [6]翁海波,王会敏,许卫华,等.土曲霉 M11 液体发酵时菌丝球形态与发酵产酶的关系[J].郑州大学学报:理学版,2010,42(4):100-105.
- [7]Papagianni M.Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes [J].Biotechnol Adv, 2004, 22(3):189-259.
- [8]Burla G, Garzillo A M, Luna M, et al. Effects of different growth conditions on enzyme production by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture [J].Bioresour Technol, 1992, 42(2):89-94.
- [9]Johansen C L, Coolen L, Hunik J H. Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations [J].Biotechnol Prog, 1998, 14(2):233-240.
- [10]Yang F C, Huang H C, Yang M J. The influence of environmental conditions on the mycelial growth of *Aspergillus niger* in submerged cultures [J].Enzyme Microb Technol, 2003, 33(4):395-402.
- [11]葛春辉,徐万里,邵华伟,等.一株产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及其纤维素酶的部分特性[J].生物技术,2009, 19(1):36-40.
- [12]张花美,龚志伟,潘熙萍,等.纤维素分解菌的分离鉴定及生物学特性研究[J].江苏农业科学,2010,(5):448-451.
- [13]赵菁,黄奋飞,林生,等.纤维素降解细菌的分离、鉴定及其系统发育分析[J].安徽农学通报,2010,17(17):47-48.
- [14]钱嘉渊.酶的测定方法[M].北京:中国轻工业出版社,1992:134-139.
- [15]沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].第三版.北京:高等教育出版社,1996:28,46-48,119-120,120-123.
- [16]杜连祥,路福平.微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2005:164,159,161.
- [17]李春喜,姜丽娜,邵云,等.生物统计学[M].第三版.北京:科学出版社,2007:263-269.