

几株真菌对白酒丢糟纤维素水解能力的研究*

明春艳^{1,2**}, 王颜颜^{1,2}, 曹煜³, 邱婷婷^{1,2}, 夏茂宁^{1,2}, 牛雪可^{1,2}, 邱文^{1,2}, 万会燕^{1,2}, 康颖倩^{1,2***}

(1. 贵州省普通高等学校病原生物学特色重点实验室暨环境污染与疾病监控省部共建教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学微生物学教研室, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学附院 皮肤科性病科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 筛选对丢糟中纤维素水解能力强的真菌菌株。方法: 选择7株具有水解纤维素酶的真菌, 以羧甲基纤维素钠(CMC_{Na})为唯一碳源的培养基进行初筛、以丢糟为唯一营养物质的酸性固体或液体培养基培养, 观察培养24 h时培养基上水解圈及真菌直径, 测定液体培养基中丢糟的减重率及纤维素的水解率, 筛选高效水解丢糟中纤维素的真菌。结果: 从7株真菌中筛选出G-7 *Trichoderma reese*, G-1 *Phanerochaete chrysosporium*, G-2 *Trichoderma longibrachiatum*, G-3 *Trichoderma longibrachiatum* 4株高效水解丢糟中纤维素的真菌, 在CMC_{Na}-刚果红培养基上培养6 d的水解圈直径D/菌饼直径d(D/d)为6.0:7.5、1.7:2.7、5.2:7.5、5.0:7.5; 在丢糟酸性固体培养基上G-7、G-1、G-2、G-3生长良好, 对丢糟的降解能力依次是65.73%、61.90%、61.22%、59.62%, 对丢糟中纤维素的水解大小依次是57.62%、54.22%、49.41%、44.21%。结论: G-1、G-2、G-3、G-7为高效水解菌株; 利用CMC_{Na}-刚果红培养基判断菌株对纤维素的水解能力具有一定的参考价值; 利用丝状真菌处理丢糟, 有利于丢糟的转化利用。

[关键词] 真菌; 丢糟; 纤维素酶; 水解; 培养基; 酒糟

[中图分类号] Q547 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)11-1274-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.11.008

The Study on Hydrolysis Ability of Several Fungi to Cellulose in Waste Distiller's Grains

MING Chunyan^{1,2}, Wang Yanyan^{1,2}, CAO Yu³, QIU Tingting^{1,2}, XIA Maoning^{1,2}, NIU Xueke^{1,2}, QIU Wen^{1,2}, WAN Huiyan^{1,2}, KANG Yingqian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Pathogenic Biology of Guizhou High Education Institution & Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control of Ministry of Education, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Department of Microbiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. Department of Dermatology and Venereal Disease, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To study on screening of fungal strains in the lost cellulose hydrolysis ability.

Method: 7 strains of fungi with cellulase hydrolysis were bought from Westerdijk Fungal Biodiversity institute of CBS. The medium with sodium carboxymethyl cellulose (CMC_{Na}) as the sole carbon source was screened, and the acidic solid and liquid medium with distiller's grains as the sole nutrient were screened. At the same time, the weight loss rate and hydrolysis rate of cellulose in liquid medium were determined. **Results:** G-7 *Trichoderma reese*, G-1 *Phanerochaete chrysosporium*, G-2 *Trichoderma longibrachiatum* and G-3 *Trichoderma longibrachiatum* were screened from 7 strains of fungi to hy-

*[基金项目] 贵阳国家高新技术产业开发区管理委员会高层次人才创新创业项目(2016); 贵州省国际科技合作项目[黔科合外G字(2014)7006]; 贵阳市人民政府-贵州医科大学科学技术联合基金“贵阳市科技局创新团队”项目(GY2015-18); 贵阳市科学技术局科技开发计划项目[筑科合同(20151001)社18号]; 贵阳市科技计划项目[筑科合同(20161001)005号]

** 贵州医科大学2015级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: joycekanokyo@qq.com

网络出版时间: 2017-11-15 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20171115.2215.025.html>

drolyze cellulose fungi in the lees. After Cultivating for 6 days, the hydrolytic circles of tested strains were respectively 6.0:7.5, 1.7:2.7, 5.2:7.5 and 5.0:7.5 on sodium carboxymethyl cellulose-Congo red medium. G-7, G-1, G-2 and G-3 grew well on the acid solid medium. The degradation ability of grains were 65.73%, 61.90%, 61.22% and 59.62%, and the cellulose hydrolysis rate of distiller's grains were 57.62%, 54.22%, 49.41% and 44.21%. **Conclusion:** In this study, we not only determine some efficient fungal strain on cellulose hydrolysis of waste distiller's grains, but also build the comprehensive method on fungal selection for degradation of waste distiller's grains.

[**Key words**] fungi; waste distiller's grains; cellulose; hydrolysis; medium; lees

酒糟是以农作物等为原料经过固态发酵、蒸馏提取酒精后的残留物,每生产 1 吨白酒可产生鲜酒糟 2~4 吨,据统计,我国年产各种酒糟高达 2 700 多万吨。酒糟中含丰富的蛋白质、纤维素、半纤维素、木质素、脂肪、维生素、氨基酸和多种微量元素等^[1-3]。但目前国内外对酒糟的资源转化可用于生产乙醇、饲料、堆肥、提取纤维素、食用菌栽培等^[2,4-7]。丢糟是酒糟中的一种,是谷物等经过反复发酵及蒸馏提取酒精后营养贫瘠的谷物外壳及残留渣体,水分、纤维素含量高,但粗蛋白、粗脂肪等含量较酒糟低^[8],由于丢糟的纤维素、半纤维、木质素这 3 种大分子物质构成致密结构—木质纤维素,组成了抗水解屏障,并且纤维素被半纤维素及木质素包裹,使得纤维素难以被水解^[9,22],以往研究表明纤维素主要由成千上万个 D-吡喃型葡萄糖残基经 β -1,4 糖苷键联结而成的大分子链状聚合物^[10],从而使丢糟的转化受到极大的限制。且丢糟酸度大,水分含量较高,极易腐败变质造成环境污染^[11-12]。丢糟中纤维素本身是极具开发潜力的物质,经水解后可转化为葡萄糖单糖^[13]。据报道,青霉属、木霉属等真菌具有很好的水解纤维素的能力^[14],本研究以丢糟为唯一营养物质来筛选高效水解菌,从 Westerdijk Fungal Biodiversity institute 筛选木霉属、青霉属等真菌共 7 株,从中发现 4 株高效水解丢糟的真菌,该 4 株高效水解丢糟菌株 1 个月对纯丢糟液的水解量达到 59.62% 以上,该体系还将被进一步用于前期实验室筛选菌株的验证,从而准确有效地确定自然水解能力最优化的菌株。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 丢糟 丢糟来源于贵州省茅台镇一酒厂(丢糟用于测定纤维素、木质素及半纤维的含量及

添加到以丢糟为唯一营养物质的液体培养基中),烘干后粉碎过 50 目筛,备用。

1.1.2 菌株 7 株真菌均购买于 Westerdijk Fungal Biodiversity institute 研究中心(因知识产权保护需要,此处未提供菌株保藏号),有 G-1 *Phanerochaete chrysosporium*、G-2 *Trichoderma longibrachiatum*、G-3 *Trichoderma longibrachiatum*、G-4 *Oidiodendron echinulatum*、G-5 *Penicillium simplicissimum*、G-6 *Doratomyces purpureofuscus* 及 G-7 *Trichoderma reese*,菌株在 YPD 培养基上复苏后保存在于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,备用。

1.1.3 培养基 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(YPD)固体培养基,CMC_{Na}-刚果红平板改良配方参照文献[17-19]: KH_2PO_4 0.5 g, MgSO_4 0.25 g, CMC_{Na} 10 g,琼脂 15 g,刚果红 0.2 g,明胶 2 g,蒸馏水 1 L(pH 6.8~7.2);丢糟液培养基(丢糟粉 1 g,蒸馏水 50 mL);丢糟酸性固体培养基(丢糟粉 2%,琼脂 2%),种子培养基见参考文献^[20]。

1.1.4 试剂与仪器 CMC_{Na}、刚果红均购于贵阳超研试剂公司。恒温摇床(上海跃进,HPY-91型)、紫外分光光度计(美国,DU640型)、pH 测试仪(上海,PHS-25型)等。

1.2 方法

1.2.1 纤维素水解能力初步筛选 将 7 株真菌在 YPD 琼脂培养基上培养生长良好后,以直径为 8 mm 的打孔器打孔制成菌饼,将菌饼接种在 CMC_{Na}-刚果红培养基上,每日测量透明圈直径(D)与菌落直径(d)的比值(D/d)初步判断纤维素分解菌酶活力的大小^[19],每个菌株重复 3 次求平均值,以不接种菌的培养基作为阴性对照。

1.2.2 菌株在丢糟酸性固体培养基上的生长能力 用 pH 测试仪测得丢糟酸性固体培养基 pH 为 3.4,将待测菌株在 YPD 琼脂培养基上培养生长良好后接种在种子培养基中,21 $^{\circ}\text{C}$,120 r/min 恒温

摇床孵育 72 h。利用血球计数板计数,并以无菌蒸馏水适当稀释菌液后配置成为 10^6 CFu/mL 的菌悬液^[21],实验组均匀涂布 0.1 mL 菌悬液,对照组不接种菌,28 °C 恒温培养 48 ~ 72 h 后观察菌株生长情况。

1.2.3 水解丢糟能力 按 1.2.2 项准备菌悬液,将 7 株真菌,按 3% (V/V) 的量接种在丢糟液体培养基中,21 °C,恒温孵育 1 月进行丢糟实际水解能力测试,每个菌株重复 3 次,以不接种菌的丢糟液体培养基为阴性对照。实验结束后将丢糟取出烘干至恒重,称量丢糟重量,计算丢糟减重率及纤维素降解率。丢糟中纤维素、木质素含量按熊素敏^[22]报道的实验方法测量,丢糟中半纤维素按照安玉民^[23]的方法测量。丢糟水解减重率 = $(M_0 - M_2)/M_0 \times 100\%$,纤维素水解率 = $(m_0 - m_2)/m_0 \times 100\%$; M_1, m_1 代表丢糟水解前的重量及纤维素含量, M_2, m_2 为丢糟水解后的重量及纤维素含量, M_0 及 m_0 代表同等条件下阴性对照组培养 30 d 后

的丢糟重量及纤维素含量,利用阴性对照组 (M_0, m_0) 而不是接种真菌前的丢糟重量和纤维素含量 (M_1, m_1) 计算丢糟及纤维素水解率是为了除去因实验过程中丢糟粉放置在丢糟液中的自然流失量,确保实验的严谨性。

2 结果

2.1 菌株在 CMC_{Na} - 刚果红培养基上筛选结果

7 株真菌在接种 24 h 出现了大小不同的水解圈,G-4、G-5、G-6 在平板上生长较慢,水解圈也较其他菌株较小;G-1 菌株在培养基上生长速度快,而水解圈增长较慢,水解圈到第 12 天时直径为 6.1 cm 达到最大值,菌直径则到达平板直径 7.5 cm (与 G-6 作为对照,G-1 在培养 12 d 时的水解圈见图 1),G-2、G-3、G-7 也能迅速生长,产生的水解圈在第 6 天达到最大值。7 株真菌培养 1 ~ 6 d 的 D/d 比值见表 1。

表 1 7 株真菌在 CMC_{Na} - 刚果红培养基上培养 1 ~ 6 d 时的 D/d 比值

Tab. 1 Data of Hydrolysis Circle Diameter D/Colony diameter on Sodium carboxymethyl cellulose -Congo red medium

菌株编号	D/d 比值					
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
G-1	1.2:1.1	1.2:1.2	1.3:1.8	1.4:2.1	1.5:2.3	1.7:2.7
G-2	1.3:1.2	2.8:2.5	3.7:4.9	4.5:7.5	4.8:7.5	5.2:7.5
G-3	2.0:0.8	2.3:1.8	3.5:3.4	4.2:5.0	4.5:6.1	5.0:7.5
G-4	1.0:0.8	1.3:0.8	1.3:0.8	1.3:0.8	1.4:0.9	1.4:0.9
G-5	0.9:0.9	1.3:1.2	1.8:1.7	2.0:1.9	2.3:2.2	2.7:2.7
G-6	1.0:0.8	1.0:0.9	1.1:0.9	1.1:1.0	1.2:1.1	1.3:1.2
G-7	1.8:0.8	2.5:1.3	2.6:2.2	3.4:3.1	5.4:5.4	6.0:7.5

2.2 菌株在丢糟酸性培养基中的生长情况

7 个待测菌株在丢糟酸性培养基中培养 72 h 时,G-1、G-2、G-3 及 G-7 菌株生长良好,白腐真菌 G-1 生长情况最佳(图 2);G-4、G-5 及 G-6 在 72 h 内无明显生长现象。

2.3 丢糟中纤维素、半纤维素、木质素含量

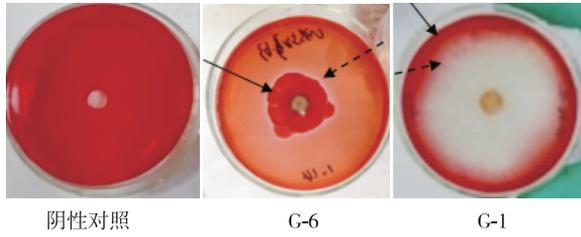
本次实验所采用的丢糟纤维素含量为 26.70%,半纤维素为 10.98%,木质素为 17.89%,pH 为 3.4。将 7 个实验菌株在丢糟液中培养 1 个月后,丢糟的减重率、丢糟中纤维素水解率结果显示,G-1、G-2、G-3、G-7 的丢糟减重率及纤维素水解率均较高,其中 G-7 的减重、水解率在 7 株菌中最高,所有的菌株的丢糟减重率大于其纤维素水解率。见表 2。

表 2 各菌株丢糟水解率的比较

Tab. 2 Comparison of the hydrolysis rate of different strains (1g of the initial distiller's grains)

菌种编号	丢糟减重率 (%)	纤维素水解率 (%)
G-1	61.90	54.22
G-2	61.22	49.41
G-3	59.62	44.21
G-4	45.74	33.81
G-5	43.87	18.21
G-6	37.33	12.60
G-7	65.73	57.62
阴性对照	2.00	-

注:初始丢糟值为 1 g



注:实线箭头所指为菌苔,虚线箭头所指为水解圈

图1 G-6、G-1 菌株在 CMC_{Na}-刚果红培养基上培养 12 d 时的水解能力

Fig.1 Observation of hydrolysis capability of strains G-6 and G-1 cultured on Sodium carboxymethyl cellulose-Congo red medium



图2 G-1 在丢糟酸性固体培养基上培养 72 h 的生长能力

Fig.2 Growing ability of strains G-1 and G-7 cultured on acid solid waste distiller's grains medium

3 讨论

7 株菌在 CMC_{Na}-刚果红培养基上的初筛,G-1 菌株也出现了水解圈,以往报道 G-1 *Phanerochaete chrysosporium* 为全面水解木质纤维素的真菌,对木质素的水解能力尤强^[24-25],本实验验证了 G-1 能水解纤维素,能力也较强。实验利用 CMC_{Na}-刚果红培养基与丢糟液测试水解率的结果有所差异。如 G-4 的水解圈与菌饼直径比为 7 株菌中最佳,但对丢糟液的水解率却较低,可能因为丢糟的酸性环境不适应 G-4 菌株生长或对丢糟中其他物质的降解率较低,因为丢糟是由纤维素、木质素、半纤维素等组成的高分子聚合物。故利用 CMC_{Na}-刚果红培养基判断菌株对纤维素的水解能力具有一定的参考价值,但菌株的实际水解能力还需要在实际底物中进行测试和验证^[16]。故本实验设计了利用 CMC_{Na}-刚果红培养基、丢糟为唯一营养物质的酸性固体及液体培养基筛选高效水解丢糟的真菌。在利用丢糟为唯一营养物质的液体培养基筛选实验中,7 株真菌的丢糟减重率大于其纤维素

水解率,是由于某些菌株除具备水解纤维素的能力外还有水解丢糟中其他组分的能力,如 *Phanerochaete chrysosporium* 具有水解木质素的能力,*Trichoderma longibrachiatum* 具有水解半纤维素的能力^[15]。综合 CMC_{Na}-刚果红培养基、丢糟液水解率、丢糟中纤维素水解率的测定,确定 G-1, G-2, G-3, G-7 为高效水解菌株。接下来我们将全面分析各菌株对木质纤维素的水解能力,以期发现全面水解丢糟中木质纤维素的真菌,或建立全面水解丢糟中木质纤维素的真菌复合菌组。

近年来,利用微生物处理生物废料成为热点,物理及化学处理方式需要昂贵的设备及试剂,而生物处理是在温和的条件下利用微生物固体发酵水解木质纤维素,设备要求无特殊,且非病原性水解木质纤维素的微生物在环境中广泛存在,具有廉价、易获得、环保等优点。利用微生物处理生物废料如丢糟,可以将丢糟进行水解转化,使其中很难被转化利用的大分子物质被水解成为小分子化合物,从而改善其利用程度低、酸度大、污染环境的缺点。

总之,本研究通过筛选高效水解丢糟的真菌,利用这些菌株进行纤维素酶的生产或构建水解丢糟的工程菌,从而解决丢糟存放空间大、难转化利用、污染环境的现状。研究除了利用以往文献报道的以 CMC_{Na}为唯一碳源进行筛选外,还利用了以丢糟为唯一营养物质的固体及液体培养基对真菌水解能力进行测试,使筛选出来的真菌可以有效利用于丢糟的直接降解工作,既可以作为丢糟有效处理的直接工具,又可以作为进一步提取相关水解酶制品的良好底物,为生物废料处理的产业化工作提供了具有意义的借鉴方案。随着利用微生物处理生物废料方面的研究逐渐深入,相信我国一定会将生物废料最大效益化利用,真正实现绿色无污染的、可持续的农业、工业化生产。

4 参考文献

- [1] 马文鹏,裴芳霞,任海伟,等. 双酶复合水解酒糟制备可发酵糖的工艺研究[J]. 酿酒科技, 2016(4):89-92.
- [2] 王晓力,孙尚琛,王永刚,等. 饲料原料白酒糟基本成分测定及评价[J]. 粮油加工:电子版, 2015(5):62-65.
- [3] Awoyale W, Maziya-Dixon B, Sanni L O, et al. Effect of water yam (*Dioscoreaalata*) flour fortified with distiller's spent grain on nutritional, chemical, and functional properties[J]. Food Science & Nutrition, 2016(1):24-33.
- [4] Liu Y H, Wu Z Y, Yang J, et al. Step enzymatic hydroly-

- sis of sodium hydroxide-pretreated Chinese liquor distillers' grains for ethanol production[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2014(5):464-479.
- [5] Xie H D, Bu L J, Zhong Z Z, et al. Effects of sorghum distillers dried grains with solubles on the carcass characteristics and muscle quality of China Micro Duck drakes aged from 4 to 8 weeks [J]. *Poultry Science*, 2016(166):2633-2639.
- [6] Holman D B, Hao X, Edward T, et al. Effect of Co-Composting cattle manure with construction and demolition waste on the archaeal, bacterial, and fungal microbiota, and on antimicrobial resistance determinants [J]. *Plos One*, 2016(6):e0157539.
- [7] Velásquez-Riaño M, Lombana-Sánchez N, Villa-Restrepo A F, et al. Cellulose production by *Gluconacetobacter kiaiacetii* GM5 in two batch process using vinasse as culture media[J]. *Water Science and Technology*, 2013(5):1079-1084.
- [8] 刘跃红, 张文学, 谭力, 等. 浓硫酸水解白酒丢糟制备水解糖液的条件研究[J]. *中国酿造*, 2011(1):82-85.
- [9] Cácer M, Faneli L, Malovrh Š, et al. Biogas production from brewery spent grain enhanced by bioaugmentation with hydrolytic anaerobic bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2015(186):261-269.
- [10] Qin W. Recent developments in using advanced sequencing technologies for the genomic studies of lignin and cellulose degrading microorganisms [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2016(2):156-171.
- [11] Awoyale W, Maziya-Dixon B, Sanni L O, et al. Effect of water yam (*Dioscorea alata*) flour fortified with distiller's spent grain on nutritional, chemical, and functional properties[J]. *Food Science & Nutrition*, 2016(1):24-33.
- [12] 王冲, 连宾, 潘牧, 等. 酱香型白酒丢糟代屑栽培平菇试验[J]. *贵州农业科学*, 2013(9):146-149.
- [13] Taha M, Foda M, Shahsavari E, et al. Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016(38):190-197.
- [14] 熊冬梅, 周红丽. 纤维素水解菌群的研究进展[J]. *酿酒科技*, 2011(5):94-97.
- [15] Markov A V, Gusakov A V, Dzedziulia E I, et al. Properties of hemicellulases of the enzyme complex from *Trichoderma longibrachiatum* [J]. *Applied Biochemistry & Microbiology*, 2006,42(6):573-583.
- [16] 程驰, 刘小俊, 杨欣怡, 等. 高效丢糟纤维素分解复合菌系的构建与效果研究[J]. *安徽农业科学*, 2012,40(17):9459-9460.
- [17] Fen L, Xuwei Z, Nanyi L, et al. Screening of lignocellulose-degrading superior mushroom strains and determination of their CMCase and laccase activity[J]. *The Scientific World Journal*, 2014(10):935-937.
- [18] Gupta P, Samant K, Sahu A. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential[J]. *International Journal of Microbiology*, 2012(8):639-643.
- [19] 吴翔, 甘炳成, 黄忠乾, 等. 纤维素水解细菌 DBJ 的筛选鉴定及其特性研究[J]. *西南农业学报*, 2016(1):81-84.
- [20] 张庆芳, 马菁玲, 孔秀琴, 等. 半纤维素酶高产菌株的筛选、鉴定及产酶条件的研究[J]. *中国沼气*, 2015(5):11-15.
- [21] 张丽影, 汪寒寒, 潘婷, 等. 产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件优化[J]. *纤维素科学与技术*, 2015(2):1-7.
- [22] 熊素敏, 左秀凤, 朱永义. 稻壳中纤维素, 半纤维素和木质素的测定[J]. *粮食与饲料工业*, 2005(2):40-41.
- [23] 安玉民, 王菊葵, 黄焯, 等. 马铃薯秸秆中纤维素与半纤维素含量的测定[J]. *现代农业科技*, 2016(17):159-160.
- [24] 杜甫佑, 张晓昱, 王宏勋, 等. 白腐菌降解木质纤维素顺序规律的研究[J]. *纤维素科学与技术*, 2005(1):17-25.
- [25] 张晓昱, 杜甫佑, 王宏勋, 等. 不同木质纤维素基上白腐菌降解特性的研究[J]. *微生物学杂志*, 2004(1):4-7.

(2017-08-23 收稿, 2017-10-23 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 乐萍