

产中性纤维素酶细菌的筛选及培养基优化

乐文民, 李江华*, 刘龙, 李坤, 堵国成

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 从土壤中筛选到一株产中性纤维素酶的细菌, 初步鉴定为芽孢杆菌属。以其为出发菌株, 利用单因素及析因试验、爬坡实验、中心组合实验, 建立其发酵产酶过程的响应面(RSM)模型, 通过对 RSM 模型分析, 得到最优培养基碳氮源组成: 麦芽糖质量浓度 1.97 g/dL、酵母粉-蛋白胨混合氮源(1:4)2.03 g/dL。验证发现, 优化后酶活从 130.40 U/mL 提高到 194.23 U/mL。

关键词: 芽孢杆菌; 中性纤维素酶; 部分因子实验; 响应面法

中图分类号: TQ 92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)02—0183—06

Screening and Medium Optimization of Bacterium Producing Neutral Cellulase

LE Wenmin, LI Jianghua*, LIU Long, LI Kun, DU Guocheng

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A neutral cellulase-producing bacterium was screened from soil, and this strain was identified as *Bacillus* through 16S rDNA sequence analysis. With it as a starting strain, we constructed a response surface methodology (RSM) model by single factor and factorial test, ascent experiment and central composite experiments. By this RSM model, we obtained the optimal medium containing 1.97% maltose, 2.03% yeast extract-tryptone (1:4, m/m) mixed nitrogen. The enzyme activity increased from 130.40 U/mL to 194.23 U/mL under the optimal conditions.

Keywords: *Bacillus* sp., neutral cellulase, fractional factorial experiment, response surface methodology

纤维素酶是一类可以降解纤维素并最终生成葡萄糖的酶的总称, 在牛仔布水洗、棉织物生物抛光等方面具有重要应用价值^[1-2]。目前应用在纺织工业的纤维素酶主要是酸性纤维素酶, 然而由于其最适 pH 值为 3~4, 在应用中容易发生返沾色的现象, 处理的 pH 也不适合纺织物, 不能满足高档棉织物

的要求。中性纤维素酶很好地克服了酸性纤维素酶的缺点, 而且其多来源于细菌^[3-4], 较来源真菌的酸性纤维素酶, 酶的组分也较单一, 主要是内切酶, 对棉织物和牛仔裤的纤维素结晶区活力很小, 不会对织物强度产生明显影响, 非常适合纺织工业中的生物抛光和生物打磨。目前国内外关于中性纤维素酶

收稿日期: 2013-12-30

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA022202)。

* 通信作者: 李江华(1966—), 男, 江西九江人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶技术、发酵过程优化与控制方面的研究。

E-mail: lijiahua@jiangnan.edu.cn

的文献报道,主要集中在新的菌株筛选及产酶优化^[5-7]、菌株的诱变育种^[8-9]、基因工程菌的构建^[10-11]、酶应用的工艺优化^[12-14]等方面。

作者从土壤中筛选出一株产组成型中性纤维素酶的芽孢杆菌,并依次通过单因素实验、爬坡实验、中心组合实验对其产酶培养基进行优化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 土样来源 取自校园、森林和菜地等地土壤。

1.1.2 培养基

1)富集培养基:蛋白胨 1 g/dL,酵母粉 0.2 g/dL, NaCl 0.5 g/dL, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.1 g/dL, 羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 1 g/dL,制霉菌素 50 $\mu\text{g/mL}$ (灭菌后冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右加入便于筛选细菌)。

2)分离培养基:酵母粉 0.1 g/dL, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/dL, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/dL, KNO_3 0.1%, $CaCl_2$ 0.03 g/dL, CMC-Na 1 g/dL, 琼脂粉 2 g/dL, 制霉菌素 50 $\mu\text{g/mL}$ (灭菌后冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右加入便于筛选细菌)。

3)复筛平板:羧甲基纤维素钠(CMC-Na)1 g/dL, 琼脂粉 2 g/dL;用不同 pH 的磷酸盐缓冲液作溶剂。

4)种子培养基:蛋白胨 0.2 g/dL,酵母粉 0.2 g/dL, NaCl 0.5 g/dL, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, 羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 1 g/dL。

5)发酵培养基:麦芽糖、蛋白胨及酵母粉浓度按实验设计值, NaCl 0.5 g/dL, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04 g/dL。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株筛选与初步鉴定 将土样悬浮,用富集培养基过夜培养,梯度稀释至合适浓度,涂布于分离培养基平板,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养约 30 h。挑取菌落在分离培养基平板上进行多次划线分离,得到纯培养菌株。挑纯化后的菌落点种于两组分离培养基平板上,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养约 36 h,然后取其中一组平板,用 1 mg/mL 刚果红染色,再用 1 mol/L 氯化钠清洗,观察水解圈,并在另一组平板上挑选对应水解圈大的菌落接种至种子培养基,培养 24 h,离心取上清液于复筛平板上的牛津杯中,38 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中正置培养约 18 h,用刚果红处理,观察水解圈。挑选水解圈在 pH 6.0~8.0 平板上最大的几株菌株,再次接种于种子培养基中培养 24 h,在 pH 6.0、6.5 下测其粗酶液

酶活,挑选酶活最大菌株,验证其产酶是否符合中性要求,并保存之。观察目的菌株菌落形态、镜检、进行革兰氏染色实验,提取其 16S rDNA 并测序,然后进行 BLAST 比对。

1.2.2 培养方法 取-20 $^{\circ}\text{C}$ 保藏的目的菌株甘油管,以体积分数 1%的接种量接种到装有 25 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,200 r/min、30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养约 15 h,然后以体积分数 0.4%接种到装有 25 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,200 r/min、30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养 2 d,每种培养条件做 3 个平行样,取平均值。

1.2.3 粗酶液制备 取发酵结束的培养液,8 000 r/min 离心 8 min,所得上清液即为粗酶液。

1.2.4 纤维素酶活力测定 配制含 0.5 g/dL CMC-Na 的 pH 7.0 的磷酸盐(0.1 mol/L)缓冲液,取 2.5 mL 该缓冲液,加入 0.5 mL 经过适当稀释的粗酶液,摇匀后 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,用 DNS 法^[15]在 540 nm 测 OD 值,除去对照值,以每分钟每毫升酶液在上述条件下水解羧甲基纤维素钠生成 1 μg 还原糖(以葡萄糖计)定义为 1 个酶活力单位(U/mL)。本实验中的酶活均指 CMC 酶活。

1.2.5 培养基优化 在单因素实验确定最优碳氮源,通过部分因子实验找出对发酵产酶有显著影响的因素,挑选具有显著效应的因素进行爬坡实验,然后通过爬坡实验确定中心组合实验的中心点,最后进行中心组合实验。使用 Minitab 16 软件对实验结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选与初步鉴定

2.1.1 菌株筛选 土样经过富集、分离培养基刚果红染色法初筛,见图 1。复筛平板复筛挑选到 6 株符合要求的菌株,比较它们的粗酶活,见图 2。可知菌株 JN-D2 酶活最高,然后观察其粗酶液在不同 pH 下的变化情况,见图 3。得知其酶活的 pH 适应范围很大,最适 pH 值在 5.0~9.0,符合中性要求,故确定 JN-D2 为目的菌株。

2.1.2 菌株初步鉴定 JN-D2 菌株菌落呈白色,不透明,边缘呈不规则,中间隆起,革兰氏阳性,通过 16S rDNA 测序和 BLAST 比对,发现与其高度同源的基本是芽孢杆菌属,见图 4。故判断其为芽孢杆菌属。

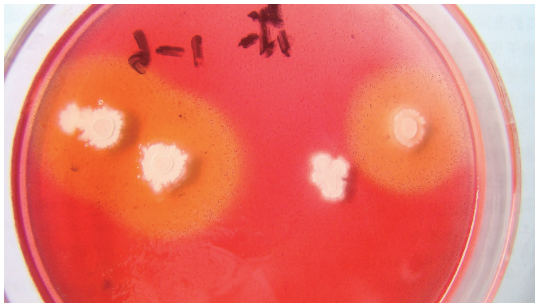


图 1 初筛时的水解圈

Fig. 1 Hydrolytic haloes of initial screening

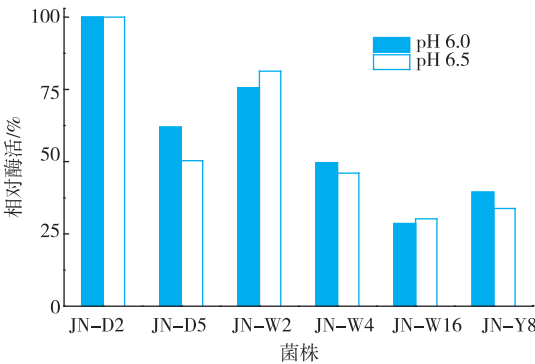


图 2 6 株菌的相对酶活

Fig. 2 Relative activity of six strains

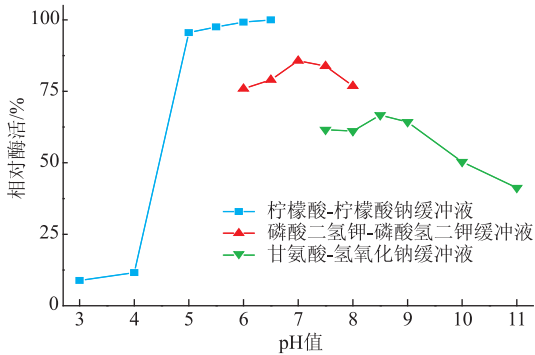


图 3 pH 值对 JN-D2 菌株酶活的影响

Fig. 3 Effect of pH on enzyme activity of JN-D2

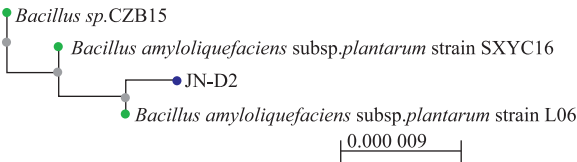


图 4 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree

2.2 单因素实验

在去除碳源的种子培养基中,加入不同的碳源

(添加量 1 g/dL),考察不同碳源对产酶的影响,见表 1。在此基础上,用不同氮源取代培养基的原始氮源,探究不同氮源对产酶的影响,见表 2(预备实验发现该菌株在无机氮源上不生长)。找到最优碳源、氮源分别为麦芽糖、酵母粉-蛋白胨混合氮源(质量比 1:4)。

表 1 碳源对产酶的影响

Table 1 Effects of different carbon sources on enzyme activity

碳源	酶活/(U/mL)
蔗糖	36.44
果糖	27.94
麸皮	25.79
CMC-Na	23.89
麦芽糖	50.97
葡萄糖	33.50
可溶性淀粉	35.91
水稻秸秆粉	21.90
玉米秸秆粉	20.86

表 2 氮源对产酶的影响

Table 2 Effects of different nitrogen sources on enzyme activity

氮源	用量/(g/dL)	酶活/(U/mL)
酵母粉	1.0	86.65
蛋白胨	1.0	27.21
牛肉膏	1.0	26.74
酵母粉+牛肉膏	0.5+0.5	64.80
蛋白胨+牛肉膏	0.5+0.5	89.60
酵母粉+蛋白胨	0.8+0.2	107.25
	0.5+0.5	120.20
	0.2+0.8	126.34

2.3 部分因子实验

在种子培养基的基础上,以最优碳氮源和 4 种无机盐进行部分析因实验,试验设计及结果见表 3、4。由表 5 的显著性分析可知,碳氮源对发酵产酶具有显著正效应,4 种无机盐效应不明显。

2.4 爬坡实验

根据部分因子实验结果,为确定中心组合实验的中心点,进行爬坡实验,实验设计和结果见表 6。

表 3 部分因子实验因素编码与实际水平

Table 3 Code and the real content of fractional factorial experiment

代码	因素	水平/%		
		-1	0	+1
X_1	混合氮源	0.50	1.00	1.50
X_2	麦芽糖	0.50	1.00	1.50
X_3	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02	0.04	0.06
X_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02	0.05	0.10
X_5	CaCl_2	0.01	0.03	0.05
X_6	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.05	0.10	0.15

表 4 部分因子实验设计与结果

Table 4 Design and results of fractional factorial experiment

编号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	酶活/(U/mL)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	81.87
2	+1	-1	-1	-1	+1	-1	101.52
3	-1	+1	-1	-1	+1	+1	86.14
4	+1	+1	-1	-1	-1	+1	164.57
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	77.56
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	112.90
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1	55.73
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	161.58
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	86.63
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1	108.32
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	89.55
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	171.71
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1	73.26
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	107.80
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1	57.11
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	163.32
17	0	0	0	0	0	0	129.52
18	0	0	0	0	0	0	125.66
19	0	0	0	0	0	0	128.07
20	0	0	0	0	0	0	127.84

表 5 部分因子实验显著性分析

Table 5 Significance analysis of fractional factorial experiment

代码	因素	T	P
X_1	混合氮源	5.91	0.000
X_2	麦芽糖	2.44	0.031
X_3	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-0.99	0.342
X_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.19	0.850
X_5	CaCl_2	0.28	0.784
X_6	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.17	0.872

表 6 爬坡实验设计及结果

Table 6 Design and results of ascent experiment

实验组	混合氮源/(g/dL)	麦芽糖/(g/dL)	酶活/(U/mL)
原点	1.0	1.0	130.40
原点+2e $\Delta_j b_j$	1.4	1.4	159.54
原点+3e $\Delta_j b_j$	1.6	1.6	174.55
原点+4e $\Delta_j b_j$	1.8	1.8	187.67
原点+5e $\Delta_j b_j$	2.0	2.0	192.44
原点+6e $\Delta_j b_j$	2.2	2.2	186.71
原点+7e $\Delta_j b_j$	2.4	2.4	184.23
原点+8e $\Delta_j b_j$	2.6	2.6	163.57
原点+9e $\Delta_j b_j$	2.8	2.8	143.52
原点+10e $\Delta_j b_j$	3.0	3.0	108.17

由表 6 可知,从原点开始按照设定步长,沿着浓度增大的方向,酶活先逐渐升高再逐渐降低,实验结果表明,产酶最优点在(原点+4e $\Delta_j b_j$)~(原点+7e $\Delta_j b_j$)之间,故选择 2.0 g/dL 作为两因素在中心组合实验中心点处实际添加量。

2.5 响应面优化

2.5.1 中心组合实验 按照二元二次中心组合实验设计,以混合氮源、麦芽糖为自变量,发酵粗酶液酶活(Y)为响应值,设计含 4 个轴向点、5 个中心点的可旋转组合实验,按表 7 进行因素编码。

表 7 中心组合实验因素编码与实际质量浓度

Table 7 Code and real value of central composite experiment

编码	X_1 混合氮源/(g/dL)	X_2 麦芽糖/(g/dL)
+1.414	2.9	2.9
+1	2.6	2.6
0	2.0	2.0
-1	1.4	1.4
-1.414	1.1	1.1

根据表 8 数据利用 Minitab 软件进行多元回归分析,拟合得到二元二次回归方程:

$$Y = -127.16 + 184.86X_1 + 133.03X_2 - 50.56X_1^2 - 39.07X_2^2 + 10.54X_1X_2$$

表 8 中心组合实验设计与结果

Table 8 Design and results of central composite experiment

实验号	X_1	X_2	$Y(U/mL)$
1	-1	-1	159.62
2	+1	-1	156.92
3	-1	+1	148.16
4	+1	+1	160.63
5	-1.414	0	151.50
6	+1.414	0	157.50
7	0	-1.414	164.93
8	0	+1.414	162.70
9	0	0	188.22
10	0	0	192.25
11	0	0	194.27
12	0	0	196.28
13	0	0	191.75

由表 9 中的方差分析显示,回归模型极显著 ($P<0.01$),表明粗酶活与两自变量存在显著的回归关系,但其中两自变量的交互作用对酶活的影响不显著 ($P>0.05$)。拟合方程的决定系数 $R-Sq$ 为 96.62%,说明模型能很好的解释分析中的方差,回归方程拟合程度较好,但仅仅关注 $R-Sq$ 容易忽视过度拟合现象,预测决定系数 $R-Sq$ (预测)可以较好的阻止过度拟合模型,在评价模型优劣时更有用,本实验的 $R-Sq$ (预测)为 81.02%,表明回归方程对模型范围外新实验值的预测能力较强。

2.5.2 响应面分析 通过 Minitab 软件对回归模型进行全变量规范分析,得响应面立体图,见图 5。并计算模型的稳定点即最大值点, $Y(U/mL)$ 的最大值为 192.32,此时培养基碳氮源配方为:麦芽糖 1.97 g/dL、混合氮源 2.03 g/dL。在此条件下进行实验,发现实际酶活为 194.23 U/mL,理论值与实际值相对误差在 2%以内,通过优化酶活从 130.40 U/mL 提高到 194.23 U/mL,提高约 49.0%。

参考文献:

[1] 周爱晖. 纤维素酶在纺织品返旧整理中的应用[J]. 印染助剂, 2011, 28(2): 10-13.
ZHOU Aihui. Application of celluloses in textile faded effect finish[J]. *Textile Auxiliaries*, 2011, 28(2): 10-13. (in Chinese)
[2] 许爱国, 阎春娟, 徐升运, 等. 中性纤维素酶在棉织物整理中的应用[J]. 印染, 2006, 32(21): 11-12.
XU Aiguo, YAN Chunjuan, XU Shengyun, et al. Neutral cellulase treatment of cotton fabric [J]. *Dyeing and Finishing*, 2006, 32(21): 11-12. (in Chinese)
[3] 阎伯旭, 曲音波, 高培基, 等. 真菌和细菌纤维素酶的差别及内、外切葡聚糖苷酶的底物专一性[J]. 生命科学, 1999, 11(A01):

表 9 方差分析

Table 9 Variance analysis of central composite experiment

来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
回归	5	3 849.31	3 849.31	769.86	40.00	0.000
线性	2	55.85	1 621.31	810.66	42.12	0.000
平方	2	3 735.91	3 735.91	1 867.95	97.05	0.000
交互作用	1	57.56	57.56	57.56	2.99	0.127
残差误差	7	134.73	134.73	19.25		
失拟	3	98.36	98.36	32.79	3.61	0.124
纯误差	4	36.37	36.37	9.09		
合计	12	3 984.04				

$R-Sq=96.62\%$; $R-Sq$ (预测)=81.02%; $R-Sq$ (调整)=94.20%

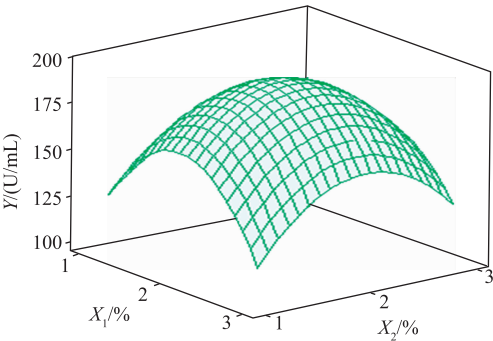


图 5 中心组合实验响应面图

Fig. 5 Response surface of central composite experiment

3 结 语

作者首先从土壤中筛选到一株产中性纤维素酶的细菌 JN-D2, 经初步鉴定判断其为芽孢杆菌, 再通过单因素实验、爬坡实验确定麦芽糖、酵母粉-蛋白胨混合氮源的合适浓度范围, 然后利用二元二次中心组合实验设计和 RSM 分析对目标菌株进行培养基优化, 优化后酶活提高约 49.0%。

- 61-64.
- YAN Boxu, QU Yinbo, GAO Peiji. Fungal and bacterial cellulases differences and endo and exo glucanase substrate specificity [J]. **Chinese Bulletin of Life Sciences**, 1999, 11(A01):61-64. (in Chinese)
- [4] 陈燕勤, 毛培宏, 曾宪贤. 细菌纤维素酶结构和功能的研究[J]. 化学与生物工程, 2004, 21(6):4-6.
- CHEN Yanqin, MAO Peihong, ZENG Xianxian. Studies on structures and functions of the cellulase from bacteria[J]. **Chemistry & Bioengineering**, 2004, 21(6):4-6. (in Chinese)
- [5] 刘森林, 陈伟钊, 邢苗. 产中性纤维素酶耐碱芽孢杆菌的筛选及酶学性质研究[J]. 工业微生物, 2010, 40(6):55-58.
- LIU Senlin, CHEN Weizhao, XING Miao. Screening of *Bacillus* strain producing neutral cellulase and characterization of enzymatic reactions[J]. **Industrial Microbiology**, 2010, 40(6):55-58. (in Chinese)
- [6] 许婧, 欧阳嘉, 何冰芳. 组成型纤维素酶高产菌的筛选及产酶条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(4):86-90.
- XU Jing, OU Yangjia, HE Bingfang. Screening of an efficient constitutive producing strain and fermentation optimization for cellulase production[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(4):86-90. (in Chinese)
- [7] Kume S, Fujio Y. Purification of neutral cellulase from a mixture of thermophilic bacilli [J]. **J Fat Agr, Kyushu Univ**, 1991, 36:37-44.
- [8] Ohmiya K, Hayashi K, Sakka K. Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation [M]. Tokyo:Uni Publishers, 1998:154-163.
- [9] 韩铭海. 中性纤维素酶高产菌选育和培养条件的研究[D]. 无锡:江南大学, 2004.
- [10] Hara T, Kume S, Fujio Y, et al. Molecular cloning of nucleotide sequence of a neutral cellulase gene of thermophilic *Clostridium* sp. F-3[J]. **J Fat Agr, Kyushu Univ**, 1991, 36:13-22.
- [11] 孙毅, 金湘, 毛培宏. 细菌纤维素酶的结构和功能及菌种改良研究[J]. 生物技术, 2005, 15(3):87-89.
- SUN Yi, JIN Xiang, MAO Peihong. Studies on the structures and functions of the cellulase from bacteria and the strain improvement[J]. **Biotechnology**, 2005, 15(3):87-89. (in Chinese)
- [12] Dixit S, Jahan S. Optimization of the pre-treatment process with neutral cellulase enzyme to improve physical properties of handloom cotton fabric[J]. **Journal of ARAHE**, 2012, 19:49-54.
- [13] 张鹏, 张莹. 牛仔水洗条件与靛蓝沾色的关系[J]. 印染, 2006, 12:27-29.
- ZHANG Peng, ZHANG Ying. Relationship between washing condition and indigo back staining of denim [J]. **Dyeing and Finishing**, 2006, 12:27-29. (in Chinese)
- [14] LIAO C, LAN B. Uncertainty evaluation for determining of neutral cellulase activity by reducing sugar method [J]. **Academic Periodical of Farm Products Processing**, 2012, 4:37.

科 技 信 息

加拿大拟批准纤维素酶等三种酶用于啤酒麦芽浆

据世贸组织(WTO)消息, 2014年12月加拿大卫生部发布 G/SPS/N/CAN/904 号通报, 修订食品酶允许列表, 拟允许三种酶用于啤酒麦芽浆。

这三种酶取自踝节菌属埃默森蓝状菌(*Rasamsonia emersonii*), 分别为纤维素酶(Cellulase)、葡聚糖酶(β -glucanase)和木聚糖酶(Xylanase)。

[信息来源]食品伙伴网. 加拿大拟批准纤维素酶等三种酶用于啤酒麦芽浆 [EB/OL]. (2014-12-30). <http://news.foodmate.net/2014/12/290253.html>.