

文章编号:1673-1689(2008)04-0085-06

组成型纤维素酶高产菌的筛选及产酶条件优化

许婧, 欧阳嘉, 何冰芳*

(南京工业大学 制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘要:从富含植物纤维素的土样中筛选得到一株组成型纤维素酶产生菌 LC-9, 结合 Biolog 微生物自动鉴定仪和 16S rDNA 序列分析, 该菌株鉴定为 *Bacillus subtilis*。通过发酵与产酶条件优化, 确定了菌株最佳培养条件。在优化条件下发酵 35 h 后, 内切纤维素酶活力可达 1 301.4 U/mL, 木聚糖酶活力可达 289.2 U/mL。该菌株产酶发酵周期短, 无需纤维素类物质的诱导, 推测为一株新型组成型多功能纤维素酶高产菌株。

关键词:内切纤维素酶; 木聚糖酶; 组成型高产菌; 筛选; 发酵条件优化

中图分类号:Q 920.1

文献标识码:A

Screening of an Efficient Constitutive-Producing Strain and Fermentation Optimization for Cellulase Production

XU Jing, OUYANG Jia, HE Bing-fang*

(College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: An efficient strain LC-9 secreting was newly isolated from the soil. On the basis of the result of taxonomic studies including the analysis of Biolog Identification System and 16S rDNA sequence analysis, LC-9 was identified as *Bacillus subtilis*. According to the effect of various substance on the cell growth and activity of cellulase, the components of optimized medium and fermentation conditions were confirmed. Under optimized conditions, 1 301.4 U/mL of CMCase and 289.2 U/mL of Xylanase in cultured supernatant were obtained after 35 h fermentation. Without cellulose or xylan inducers were used during cellulase production.

Key words: CMCase; xylanase; efficient constitutive strain; screening; optimized fermentation conditions

纤维素占植物干重的 35%~50%, 是地球上分布最广、含量最丰富的碳水化合物, 因此纤维素的降解和利用等关键问题的研究得到了高度重视。

目前对于纤维素的生物降解研究主要集中在真菌和部分细菌。真菌所产纤维素酶多为胞外酶, 产酶效率高、酶系结构完整、都是复合酶, 且常为诱导

收稿日期: 2007-11-23.

基金项目: 国家 973 计划项目 (2003CB716000).

作者简介: 许婧 (1982-), 女, 江苏南京人, 应用微生物硕士研究生.

* 通讯作者: 何冰芳 (1962-), 女, 浙江黄岩人, 理学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物菌种筛选与开发研究. Email: bingfanghe@njut.edu.cn

酶^[1-4]。细菌所产纤维素酶多为胞内酶或吸附在菌壁上^[1,5],通常也为诱导酶^[6],野生菌株酶活普遍较低^[7-8],纤维素酶成分单一。通过对野生菌株进行诱变,可较大幅度地提高纤维素酶活力^[9]。细菌所产纤维素酶也多属诱导酶。90年代日本花王公司报道了一株组成型纤维素高产野生菌株 *Alkalophilic bacillus* KSM-635,该菌株在木聚糖的诱导下酶活较高。国内近几年所报道的高产纤维素酶菌株都需要添加纤维素类诱导物,如嗜碱菌株 ZU-04^[11],在 CMC 诱导后酶活可达 5.37 IU/mL。纤维素及纤维素酶的广泛应用需要开发更有效的纤维素酶产生菌,尤其是多功能纤维素酶、组成型纤维素酶及高产纤维素酶产生菌株的研究和开发具有较高的理论和实际应用价值。

作者从富含植物纤维素的土样中筛选到一株组成型纤维素酶产生菌,该菌株产内切葡聚糖酶(又称内切纤维素酶,或 CMCase; endo-1,4-glucanase, EC 3.2.1.4)和木聚糖酶(Xylanase, EC 3.2.1.8)。优化了菌株的生长和产酶条件。研究表明,该菌具有高效分泌组成型纤维素酶的能力,发酵周期短,具有较大的开发潜力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 土样采集 富含植物纤维素的土样 136 份。

1.1.2 培养基

1) 羧甲基纤维素培养基(g/L): KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NH_4Cl 1.0, 酵母膏 0.5, 玉米浆 1.0 mL/L, 羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 5.0; NaOH 调节 pH 值至 7.0。

2) 发酵基础培养基(g/L): KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 酵母膏(国产) 5.0, 蛋白胨(国产) 10.0, NaOH 调节 pH 至 7.0。固体培养基中添加 2 g/dL 琼脂粉。

3) 诱导培养基: 发酵基础培养基中添加 5.0 g/L 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)。

1.1.3 主要试剂 木聚糖 Xylan (from Birch Wood) 为 sigma 公司产品; 羧甲基纤维素钠 CMC-Na(粘度 600~800 mPa·s) 和 3,5-二硝基水杨酸(DNS)为上海国药集团产品,其他试剂为市售国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 纤维素酶产生菌的富集培养与分离 将各

种富含植物纤维素的土壤加入到羧甲基纤维素培养基中进行富集培养(30℃, 180 r/min), 3~5 d 后转接, 在相同的培养基中共转接 3 次, 对富集培养后的菌液进行梯度稀释($10^5 \sim 10^7$ 倍)。取 100 μL 稀释液涂平板, 培养后进行单菌落分离和验证。

1.2.2 刚果红平板快速筛选法 用自制打孔器(直径约 7 mm)在固体平板上打孔, 加入等量候选菌株的培养液, 以 1 mg/mL 饲料级纤维素酶作阳性对照。30℃培养箱中静置约 2~3 h, 用 0.1 g/dL 的刚果红溶液染色 1 h, 再用 1 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱, 具有一定纤维素酶活力的将出现明显的透明圈^[12]。

1.2.3 纤维素酶及木聚糖酶活力测定

1) 内切纤维素酶(CMCase)活力的测定^[13]: 取 1 g/dL 的羧甲基纤维素钠 1.0 mL 作为底物, 加入 0.5 mL 适当稀释的纤维素酶溶液, 在特定条件下反应 30 min, 用 DNS 法^[14]测定还原糖, 以每分钟产生 1 μg 的葡萄糖所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

2) 木聚糖酶(Xylanase)活力的测定^[15]: 采用 1 g/dL 桦树木聚糖作为底物, 具体操作方法及酶活计算方法同内切纤维素酶。

1.2.4 菌体生物量 以 640 nm 波长处的吸光值表示生物量。

1.2.5 菌株 LC-9 的种属鉴定

1) Biolog 菌种鉴定: 根据革兰氏染色结果及简单生理生化性质, 选定相应的 Biolog 鉴定板, 根据菌株对 95 种有机物的代谢情况进行分析鉴定, 具体操作见文献^[16]。

2) 16S rDNA 序列测定和分析: 采用细菌 16S rDNA 的通用引物 F(27f)和 R(1492r), 扩增候选菌株的 16S rDNA 并连接到 T 载体上, 由上海英俊生物技术公司测序。候选菌 16S rDNA 序列登录 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 应用 BLAST 程序进行同源性分析。

1.2.6 培养条件 经预实验初步确定菌株 LC-9 对数生长期为 8~16 h, 发酵 24~50 h 为产酶高峰期并且酶活稳定, 因此实验中采用 35℃培养 12 h 作为种子液, 接种体积分数为 2%, 35℃振荡培养 36 h, 取样测定菌体的生长与产酶情况。

2 结果与讨论

2.1 组成型纤维素酶高产菌的筛选及初步验证

以羧甲基纤维素钠为主要碳源, 从富含纤维素的土样中分离得到 42 株菌。将每株菌分别接种于

发酵基础培养基和诱导培养基中培养 36 h 后,取发酵液进行刚果红平板的快速筛选,得到一株在两种培养基中培养均能产生明显透明圈的菌株,将其命名为 LC-9。菌株 LC-9 在添加诱导剂和未添加诱导剂的培养液中都有较强的纤维素酶活力,内切纤维素酶活力分别为 25.02 U/mL 和 22.32 U/mL,并且都体现一定的木聚糖酶活力。将菌株 LC-9 的发酵液、发酵上清液、菌泥悬浊液分别进行酶反应,结果表明该菌株所产纤维素酶为分泌型胞外酶。

2.2 菌株 LC-9 的鉴定

菌株 LC-9 在固体培养基上菌落呈白色,产芽孢,革兰氏阳性,为好氧菌。经 Biolog 微生物鉴定系统分析,菌株 LC-9 为 *Bacillus subtilis*,分析结果 SIM 值为 0.95,具有较高的可信度。通过菌株 LC-9 的 16S rDNA 序列测定并递交 GeneBank(登录号:EU022584),采用 BLAST 分析,表明该菌的 16S rDNA 与 GenBank 中 *Bacillus subtilis* 的序列同源性高达 99.7%,与 Biolog 的生理生化性能鉴定结果一致,因此将该菌株命名为 *Bacillus subtilis* LC-9。

2.3 菌株 LC-9 生长与产酶条件优化

2.3.1 培养温度及培养基初始 pH 值对菌株生长及产酶的影响 考察温度(见图 1)及培养基初始 pH 值(图 2)对菌株 LC-9 生长与产酶的影响。该菌株最适生长和产酶温度均为 35℃;最佳培养基初始 pH 为 5~5.5。35 h 发酵培养后 CMCase 活力可达 107.5 U/mL, Xylanase 活力可达 23.9 U/mL。

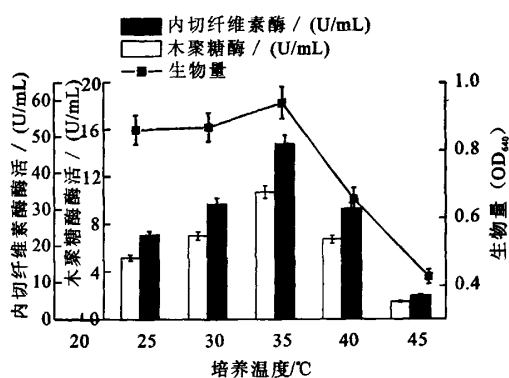


图 1 培养温度对菌株 LC-9 生长和产酶的影响

Fig. 1 The effect of temperature on the growth and enzyme activity of the strain LC-9

2.3.2 碳源及纤维素类诱导剂对产酶的影响 通常碳源特别是一些纤维素类或木聚糖类的碳源对微生物产酶有显著的诱导作用^[17-18]。作者在发酵

基础培养基中添加 5 g/L 不同的单糖、纤维素类聚糖及天然纤维素等碳源,考察对菌株产酶的影响。

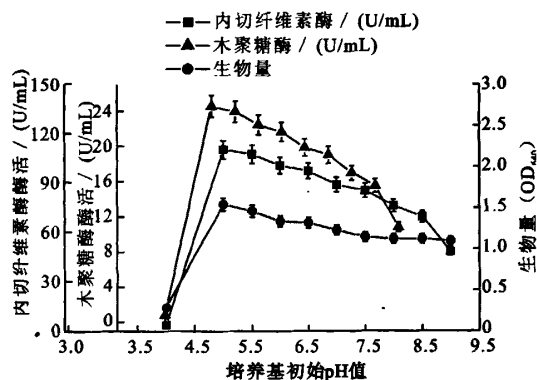


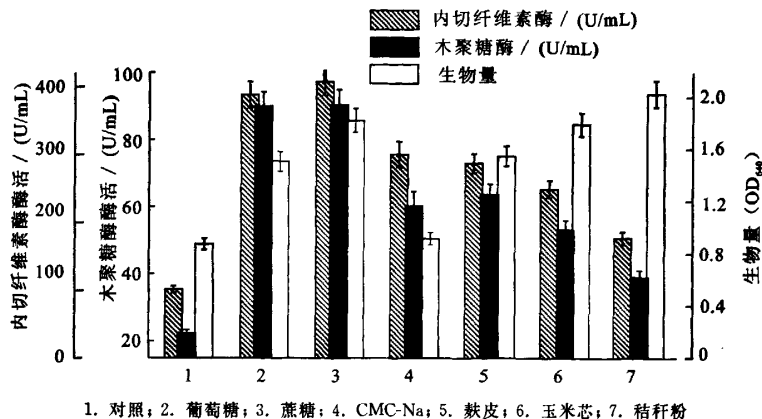
图 2 培养基起始 pH 值对菌株 LC-9 生长和产酶的影响

Fig. 2 The effect of initial pH of medium on the growth and enzyme activity of the strain LC-9

图 3 表明,可溶性单糖在很大程度上促进菌株生长和产酶,葡萄糖和蔗糖显著促进菌体生长,其中蔗糖为最佳碳源,CMCase 活力可达到 407.55 U/mL, Xylanase 活力达 90.57 U/mL,均比对照提高了 4 倍左右。该菌株在各种碳源的诱导作用下,内切纤维素酶和木聚糖酶变化趋势基本一致,推测所产酶可能是多功能酶。实验中纤维素类或木聚糖类碳源的添加并未显著提高酶活,表明该菌株产纤维素酶无需诱导,为组成型纤维素酶生产菌。

2.3.3 氮源对菌株 LC-9 生长与产酶的影响 去除发酵培养基中的氮源并添加 5 g/L 蔗糖为碳源的培养基为对照,进一步考察氮源对菌株产纤维素酶的影响(见图 4)。玉米浆明显地促进了菌体的生长,同时显著提高了酶活,35 h 发酵后 CMCase 活力可达 559.2 U/mL, Xylanase 活力可达 124.3 U/mL;蛋白胨对产酶也有显著的促进作用而对生长影响较小,因此选用玉米浆和蛋白胨进行复合氮源优化。木聚糖酶酶活与内切纤维素酶趋势一致,为减少检测次数,在正交实验中只考察 CMCase 活力的变化。

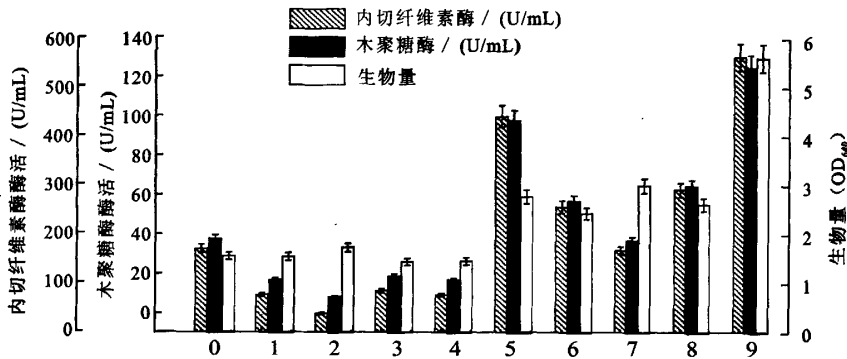
玉米浆与蛋白胨的两因素三水平正交结果见表 1,统计分析的最佳方案和实验测定结果一致,30 mL/L 玉米浆和 15 g/L 蛋白胨为最佳优化配方,可以明显促进菌株生长和产酶,CMCase 酶活力达到 763.2 U/mL,同时 Xylanase 酶活力达到 172.6 U/mL。



1. 对照; 2. 葡萄糖; 3. 蔗糖; 4. CMC-Na; 5. 麸皮; 6. 玉米芯; 7. 秸秆粉
注: 麸皮、玉米芯、秸秆粉颗粒物对菌体生物量测定有一定影响

图 3 碳源对菌株 LC-9 生长和产酶的影响

Fig. 3 Effect of carbon sources on the growth and enzyme activity of the strain LC-9



0. 对照; 1. 3 g/L (NH₄)₂SO₄; 2. 3 g/L NH₄Cl; 3. 3 g/L NH₄NO₃; 4. 3 g/L (NH₂)₂CO₃; 5. 15 g/L 蛋白胨; 6. 15 g/L 酵母浸膏; 7. 15 g/L 牛肉浸膏; 8. 45 ml/L 玉米浆; 9. 15 g/L 棉酚蛋白

注: 0~4 无机氮源(考虑到无机氮源营养条件差可能会影响菌体生长因此加入少量酵母浸膏)

图 4 不同氮源对菌株 LC-9 生长和产酶的影响

Fig. 4 Effect of nitrogen sources on the growth and enzyme activity of the strain LC-9

表 1 氮源正交结果

Tab. 1 Result of orthogonal nitrogen design

序号		A 玉米浆 体积分数/(mL/L)	B 蛋白胨 质量浓度/(g/L)	CMCase 酶活/(U/mL)	生物量 (OD _{640nm})
1		15	5	451.8	2.61
2		15	10	450	4.46
3		15	15	604.8	5.57
4		30	5	637.2	4.99
5		30	10	547.2	5.65
6		30	15	763.2	4.91
7		45	5	630	6.49
8		45	10	586.8	4.62
9		45	15	626.4	3.92
CMC 酶活	K ₁	1 506.6	1 719		
	K ₂	1 947.6	1 584		
	K ₃	1 843.2	1 994.4		
生物量	K ₁	12.64	14.09		
	K ₂	15.55	14.73		
	K ₃	15.03	14.40		

2.4 菌株 LC-9 摇瓶发酵过程及产酶曲线

根据上述实验结果,对无机盐等发酵条件进行微调,确定优化培养基成分为(g/L): KH_2PO_4 3.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, 蔗糖 5.0, 蛋白胨 15.0; 玉米浆 30 mL/L, 初始 pH 5~5.5; 250 mL 摇瓶装液量为 50 mL, 转速为 200 r/min。在优化培养条件下,

菌株生长和产酶曲线见图 5。与优化前相比,菌体生长对数期延长,最佳产酶时间为 35 h,酶活比优化前提高了 40 多倍,CMCase 活力可达 1 301.4 U/mL, Xylanase 活力可达 289.2 U/mL。该菌株生长和产酶曲线呈现相同趋势,体现了组成型纤维素酶产生菌的特征。

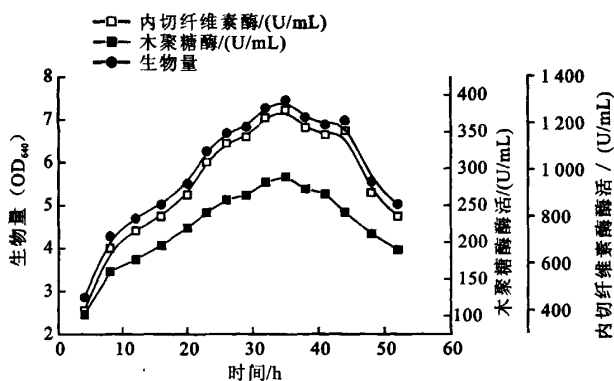


图 5 优化后菌株 LC-9 生长及产酶曲线

Fig. 5 Growth curve and enzyme production of the strain LC-9 cultured in the optimized conditions

从发酵产酶周期来看,霉菌产纤维素酶、CMCase 活力在 3~4 d 才能达到峰值^[19],细菌最高产酶一般出现在 48~72 h^[7,20],该野生高产菌 LC-9 发酵周期仅需 30 h,大大缩短了发酵周期。

与国内外细菌类纤维素酶生产菌相比,日本伊藤进^[10]报道的 *Alkalophilic bacillus* KSM-635 在无诱导剂存在时,发酵液中碱性纤维素酶活力为 2.202 IU/mL (相当于本研究的 396.4 U/mL),在木聚糖诱导发酵 48 h 后,CMCase 活力达 6.2 IU/mL (相当于本研究的 1 116 U/mL);韩学易等^[21]报道的枯草芽孢杆菌 C-36 在 1 g/dL CMC 诱导发酵 36 h 后,CMCase 活力达 196.33 U/mL,所得的菌株 LC-9 在无诱导剂的培养基中内切纤维素酶活力可达 1 301.4 U/mL,木聚糖酶活力可达 289.2 U/mL,显现了较突出的优势。

3 结 语

从富含植物纤维素的土样中,经过富集培养与

改进的刚果红杯碟平板筛选法快速筛选得到了一株纤维素酶高产野生菌株 LC-9,经鉴定为枯草芽孢杆菌,命名为 *Bacillus subtilis* LC-9。菌株 LC-9 最佳生长和产酶温度为 35 ℃,培养基最适初始 pH 值为 5~5.5。优化后发酵培养基最佳成分为(g/L): KH_2PO_4 3.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, 蔗糖 5.0, 蛋白胨 15.0; 30 mL/L 玉米浆; 250 mL 摇瓶装液量为 50 mL, 转速为 200 r/min。上述条件下培养 35 h 后,内切葡聚糖酶酶活可达 1 301.4 U/mL,木聚糖酶活力可达 289.2 U/mL,比优化前提高了 40 多倍。菌株 LC-9 产胞外纤维素酶,产酶过程无需诱导,各种培养条件下两种纤维素酶产酶趋势基本一致,推测为新型的组成型多功能纤维素酶高产菌,具有进一步的开发潜力。

参考文献(References):

- [1] 高凤菊,李春香. 真菌与细菌纤维素酶研究进展[J]. 唐山师范学院学报, 2005, 27(2): 7-10.
GAO Feng-ju, LI Chun-xiang. Studies on cellulase from eubacterium and bacterium[J]. Journal of Tangshan Teachers College, 2005, 27(2): 7-10. (in Chinese)

- [2] Rajoka I M, Malik A K. Cellulose production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates[J]. **Bioresource Technology**, 1997, 59: 21—27.
- [3] Reczey K, Szengyel Z S, Eklund R. cellulose production by *T. reesei*[J]. **Bioresource Technology**, 1996, 57: 25—30.
- [4] Kvesitadze E, Adeishvili E, Gomarteli M, et al. Cellulase end xylanase activity of fungi in a collection isolated from the southern *Caucasus*[J]. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 1999, 43: 189—196.
- [5] Pierre B. Bacterial cellulase[J]. **Biochemical Society Transaction**, 1992, 20: 42—46.
- [6] 罗颖, 许婧, 欧阳嘉, 等. 耐热纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. **食品与生物技术学报**, 2007, 26(1): 84—85.
- LUO Ying, XU Jing, OUYANG Jia, et al. Screening and identification of a thermostable cellulase-secreting bacteria and its optimization for cellulase production[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(1): 84—85. (in Chinese)
- [7] Ponpium P, Ratanakhanokchai K, Kyu K L. Isolation and properties of a cellulosome-type multienzyme complex of the thermophilic *Bacteroides* sp. strain P-1[J]. **Enzyme Microb Technol**, 2000, 26(5): 459—465.
- [8] Chundakkadu K. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes[J]. **Bioresource Technology**, 1999, 69: 231—239.
- [9] 黎海彬, 李琳, 黄日波, 等. 纤维素酶产生菌的筛选及产酶条件[J]. **华南理工大学学报: 自然科学版**, 2003, 31(3): 45—48.
- LI Hai-bin, LI Lin, HUANG Ri-bo, et al. Screening of cellulase-producing strains and growth conditions of enzyme[J]. **Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition**, 2003, 31(3): 45—48. (in Chinese)
- [10] 伊藤进. 碱性纤维素酶的生产方法: 日本 112981[P], 1998-06-20.
- [11] 沈雪亮, 夏黎明. 产纤维素酶细菌的筛选及酶学特性研究[J]. **林产化学与工业**, 2002, 22(1): 47—51.
- SHEN Xue-liang, XIA Li-ming. Student on screening of cellulase producing bacterial and enzymatic characteristics thereof[J]. **Chemistry and Industry of Forest Products**, 2002, 22(1): 47—51. (in Chinese)
- [12] 韩学易, 陈惠, 吴琦. 产纤维素酶枯草芽孢杆菌 C-36 的产酶条件研究[J]. **四川农业大学学报**, 2006, 24(2): 178—121.
- HAN Xue-yi, CHEN Hui, WU Qi. Optization of conditions for submerged fermentation of cellulase from *Bacillus subtilis* C-36[J]. **Journal of Sichuan Agricultural University**, 2006, 24(2): 178—121. (in Chinese)
- [13] 赵玉萍, 杨娟. 四种纤维素酶活力测定方法的比较[J]. **食品研究与开发**, 2006, 27(3): 116—118.
- ZHAO Yu-ping, YANG Juan. Comparison of four cellulose activity measurement methods[J]. **Food Study and Development**, 2006, 27(3): 116—118. (in Chinese)
- [14] Ghose T K. Measurement of cellulose activity[J]. **Pure and Appl Chem**, 1987, 95(2): 257.
- [15] 邹敏辰, 符丹丹, 朱劭, 等. 宇佐美曲霉木聚糖酶的纯化和性质[J]. **食品与生物技术学报**, 2005, 24(6): 29—33.
- WU Min-chen, FU Dan-dan, ZHU Jie, et al. Purification and some properties of two xylanases from *Aspergillus usamii* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(6): 29—33. (in Chinese)
- [16] Robin S. Microlog system release 4.2 user guide[M]. CA USA: Hayward, 2004.
- [17] 张婕, 黄镇亚. 培养基成分对木霉菌合成木聚糖酶的影响[J]. **北京林业大学学报**, 2003, 25(6): 68—70.
- ZHANG Jie, HUANG Zhen-ya. The influence of substrate ingredient on the synthesis of xylanase from *Trichoderma*[J]. **Journal of Beijing Forestry University**, 2003, 25(6): 68—70. (in Chinese)
- [18] 田亚平, 全文海. 嗜碱性芽孢杆菌碱性纤维素酶系的研究[J]. **食品与发酵工业**, 1997, 24(3): 1—6.
- TIAN Ya-ping, QUAN Wen-hai. Studies on the enzymes system of alkaline cellulase from *Alkalophilic bacillus* sp. V-5 [J]. **Food and Fermentation Industries**, 1997, 24(3): 1—6. (in Chinese)
- [19] 张沙艳, 高成华. 绿色木霉纤维素酶酶活力的研究[J]. **辽宁师专学报**, 2006, 8(2): 96—98.
- ZHANG Sha-yan, GAO Cheng-hua. The study of the cellulase activity from *Trichoderma viride*[J]. **Journal of Liaoning Teachers College**, 2006, 8(2): 96—98. (in Chinese)
- [20] Weber J, Agblevor F A. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production[J]. **Process Biochemistry**, 2005, 40: 669—676.

(责任编辑: 李春丽)