

产碱性纤维素酶兼性厌氧菌株的筛选和酶学性质的初步研究

李忠玲^{1,2*} 王卫卫² 任平¹ 赵文娟³ 张红艳¹ 陈卫锋¹

- (1. 陕西省科学院酶工程研究所 西安 710600)
- (2. 西北大学生命科学院 西安 710069)
- (3. 陕西省酶工程技术中心 西安 710600)

摘要: 用 CMC 平板筛选方法, 从造纸厂碱性土壤中获得产碱性纤维素酶兼性厌氧菌株 LZ-5, 革兰氏阴性, 经鉴定为弧菌属(*Vibrio* sp.) 中的一个种。液体摇瓶培养产生碱性纤维素酶活力高达 5.8 U/mL。酶学性质初步研究显示, LZ-5 产生的纤维素酶最适反应温度为 40℃, 最适反应 pH 值为 9.0, 在碱性条件下具有较高的酶活性和较好的稳定性。经传代培养证实该菌株遗传性能稳定。
关键词: 碱性纤维素酶, 兼性厌氧, 革兰氏阴性菌

Screening of Facultative Anaerobic Strain Producing Alkaline Cellulase and Study on Enzymatic Properties

LI Zhong-Ling^{1,2*} WANG Wei-Wei² REN Ping¹ ZHAO Wen-Juan³
ZHANG Hong-Yan¹ CHEN Wei-Feng¹

- (1. Institute of Enzyme Engineering, Shaanxi Province Academy of Sciences, Xi'an 710600)
- (2. School of Life Science Northwest University, Xi'an 710069)
- (3. Enzyme Engineering Technology Center of Shaanxi Province, Xi'an 710600)

Abstract: The Gram-negative, facultative anaerobic strain, LZ-5 producing alkaline cellulase had been screened and isolated from the alkaline soil of paper mill. The strain was identified to be a kind of genus *Vibrio*. The cellulase activity of culture liquid was 5.8 U/mL. The primary study on enzymatic properties showed: optimum temperature of 40°C, optimum pH of 9.0, with stable enzymatic activity under alkaline condition. The strain LZ-5 was tested by the experiments of subculture and the results showed that the strain LZ-5 had genetic stability.

Keywords: Alkaline cellulase, Facultative anaerobic, Gram-negative strain

纤维素酶是能将纤维素水解成还原糖的一类酶系的总称, 在生产生活中广泛应用于食品、酿酒、造纸、饲料、纺织等行业^[1]。洗涤剂中添加的纤维

素酶, 一方面可去除棉纤维上的污垢, 另一方面还能起到使棉织物颜色鲜明和柔软的效果。但早期研究的纤维素酶主要是由丝状真菌木霉、曲霉等产生

的, 该类真菌产生的纤维素酶通常为酸性酶, 最适 pH 值在 3~5 之间, 在碱性范围内无活性或活性很低。但洗涤剂水溶液通常为碱性环境, 酸性纤维素酶类在其中没有活性, 也就起不到去污等效果。因此寻找在碱性条件下具有纤维素酶活力的碱性纤维素酶成为一大研究热点, 碱性纤维素酶也因此成为世界各国普遍重视的一种新型酶制剂^[2]。

产生碱性纤维素酶的菌种有细菌、放线菌、霉菌等。由细菌所产生的纤维素酶一般最适 pH 在中性至偏碱性, 因为这类酶制剂对天然纤维素的水解作用较弱, 长期以来没有得到足够的重视^[3]。近几十年来, 随着中性纤维素酶和碱性纤维素酶在棉织品水洗整理工艺及洗涤剂工业中的成功应用, 细菌纤维素酶制剂已显示出良好的使用性能和潜在的经济价值^[4,5]。目前, 已经分离到的产碱性纤维素酶细菌在分类上多为好氧的革兰氏阳性的芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)^[6], 对兼性厌氧的革兰氏阴性菌株的研究未见报道。本文报道了 1 株产碱性纤维素酶兼性厌氧的革兰氏阴性菌 LZ-5 的筛选及其对该菌株产生的碱性纤维素酶的酶学性质的初步研究。

1 材料与方 法

1.1 土样来源

取自山西省文水、陕西省临潼等地造纸厂的碱性土壤。

1.2 培养基

1.2.1 筛选培养基: KH_2PO_4 2.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, MgSO_4 0.3 g, CaCl_2 0.3 g, FeSO_4 5.0 mg, MnSO_4 1.6 mg, ZnCl_2 1.7 mg, CoCl_2 2.0 mg, CMC 20 g, 琼脂 15 g, Na_2CO_3 10 g(分开灭菌), 蒸馏水 1000 mL, pH10。

1.2.2 菌种活化培养基: 牛肉膏-蛋白胨培养基。

1.2.3 种子培养基: 牛肉膏-蛋白胨培养基, pH 10。

1.2.4 发酵产酶培养基: 麦芽糖 2.0 g, CMC 1.0 g, 蛋白胨 1.0 g, NaCl 0.5 g, KH_2PO_4 0.1 g, Na_2CO_3 1.0 g(分开灭菌), 蒸馏水 100 mL, pH 10。

1.3 菌种分离方法

采用刚果红染色鉴定法^[7]: 在已培养 2 d~4 d 的筛选平板中加入适量 1 mg/mL 的刚果红溶液染色 1 h; 弃去染液, 加入适量 1 mol/L 的 NaCl 溶液, 洗涤 1 h。若细菌产生纤维素酶, 则在菌落的周围会出现清晰的水解圈, 依据水解圈的直径大小选择产酶菌株, 将所选菌株进行发酵复筛, 分离纯化。

1.4 生理生化试验方法

采用常规微生物鉴定方法, 并参照实验手册^[8]中提供的相关方法进行。

1.5 摇瓶产酶试验

将筛选到的菌种由斜面接到 100 mL(500 mL 三角瓶)液体培养基中, 于 37 、180 r/min 培养 24 h, 制成种子液。然后按 5% 的接种量将种子液加到 100 mL(500 mL 三角瓶)相应液体培养基中, 于 37 、180 r/min 条件下进行产酶试验, 定时取样, 4000 r/min 离心后测定发酵液中的酶活力。

1.6 缓冲液

磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 3.0~8.5), 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 8.0~11.0)。

1.7 DNS 试剂

配制方法见 QB2583-2003 附录 B。

1.8 纤维素酶活力的测定

用 pH9.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(0.05 mol/L)制备 1% 的 CMC-Na 溶液, 取该溶液 2.0 mL 于 25 mL 刻度试管中, 加入经适当稀释的酶液 0.5 mL, 在特定条件下反应 30 min, 加入 DNS 试剂 3.0 mL, 将试管放入沸水浴中加热 10 min, 取出后迅速冷却至室温, 用水定容至 25 mL, 于 540 nm 测定还原糖。空白先加 DNS 再加酶液, 其余步骤相同。将上述条件下每分钟由底物产生 1 μmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位, 用 U/mL 表示。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选

2.1.1 菌种的初筛: 从碱性土样中分离到能在 pH10.0 的 CMC 平板上生长的水解圈直径较大的细菌 8 株, 结果如表 1 所示。由表 1 可见, 5 号菌株产酶所形成的水解圈相对较大, 表明该菌具有较高的产酶并且酶活力较强; 该菌菌落直径(d)较大, 且水解圈直径(D)与菌落直径(d)的比值较大, 说明该菌具有较强的繁殖能力和分解 CMC 的能力。

2.1.2 菌种复筛: 将 D/d 比值在 4.0 以上的菌株进行划线分离至纯培养, 然后进行摇瓶复筛。将菌株接种在 100 mL (500 mL 三角瓶)产酶培养基, 在 37 、180 r/min 的条件下培养 48 h, 发酵液经离心获得菌株的粗酶液, 测定其 CMC 酶活力, 结果见表 2。结果显示 5 号菌株的粗酶液酶活力最高, 达 5.8 U/mL。选取该菌株进行生理生化性质初步研究及酶学性质研究。

表 1 产纤维素酶细菌的初筛结果
Table 1 Primary screening results of bacteria producing cellulase

菌株编号 Number	水解圈直径 D Hydrolysis diameter (mm)	菌落直径 d Colony diameter (mm)	D/d
1	10	2.5	4.0
2	11	2.5	4.4
3	9	2.3	3.9
4	8	2.6	3.1
5	20	3.0	6.7
6	10	2.5	4.0
7	9	2.0	4.5
8	13	2.7	4.8

表 2 产纤维素酶细菌的复筛结果
Table 2 Secondary screening results of bacteria producing cellulase

菌株编号 Number	2	5	7	8
纤维素酶活力 Cellulase activity (U/mL)	3.7	5.8	3.9	4.0

2.1.3 5号菌株生物学特征: 细胞呈杆状, 大小为 $(0.5\ \mu\text{m}\sim 0.7\ \mu\text{m})\times(2\ \mu\text{m}\sim 3\ \mu\text{m})$, 穿刺培养观察到该菌在表面及深处均有生长。经厌氧培养菌落也生长较好, 能产生透明圈, 故为兼性厌氧。鞭毛极生, 运动; 最适生长温度 $37\ ^\circ\text{C}$; 最适生长pH9.0; 根据生理生化实验(见表 3), 查伯杰细菌手册^[8], 初步鉴定该菌为弧菌科弧菌属, 暂定名为LZ-5。

2.1.4 液体培养的生长曲线: 将液体菌种按 6%的接种量接于适量牛肉膏-蛋白胨培养基培养基(100 mL/500 mL)中, $37\ ^\circ\text{C}$ 、180 r/min进行培养, 定时取样测定 OD_{600} 。绘制生长曲线(见图 1), 由生长曲线可知, 该菌株在 24 h生长达到对数期, 48 h达到稳定期, 所以应选择培养 24 h种子液进行接种。

2.1.5 产酶的时间进程: 将培养 24 h的种子液以 5%接种量接于 100 mL(500 mL 三角瓶)产酶培养基中, $37\ ^\circ\text{C}$ 、180 r/min 进行培养, 定期取样测定酶活力。由图 2 可知, 菌种产酶在 48 h 酶活力达到最高, 活力为 5.8 U/mL。

2.2 酶学性质初步研究

2.2.1 酶反应的最适温度和酶的热稳定性: 取振荡培养 2 d 的培养液, 4000 r/min 离心 5 min, 上清液作为粗酶液进行酶学性质研究。在 $20\ ^\circ\text{C}\sim 80\ ^\circ\text{C}$ 范围内, 以 $5\ ^\circ\text{C}$ 为间隔, 在不同温度条件下测定纤维素酶活力, 结果(见图 3)表明酶反应最适温度为 $40\ ^\circ\text{C}$ 。同理, 将粗酶液在 $20\ ^\circ\text{C}\sim 80\ ^\circ\text{C}$ 范围内, 以 $10\ ^\circ\text{C}$ 为间隔, 在不同温度下保温 60 min 后, 在 $40\ ^\circ\text{C}$ 条件下测定其剩

表 3 LZ-5 的生理生化性质
Table 3 Biochemical and physiological characteristics of the strain LZ-5

性质 Characteristics	结果 Results	性质 Characteristics	结果 Results
革兰氏染色	-	鞭毛染色	+
芽孢染色	-	氧化酶	+
过氧化氢酶	+	硝酸盐还原	+
淀粉水解	+	酪素水解	+
氯化钠抗性	$\leq 3.5\%$	最适生长温度	$37\ ^\circ\text{C}$
最适生长 pH	9.0	明胶水解	+
硫化氢生成	+	穿刺培养	兼性厌氧

注: +: 阳性; -: 阴性 Note: +: Positive; -: Negative

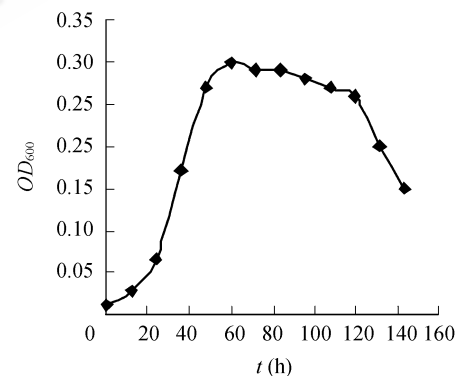


图 1 LZ-5 的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of the strain LZ-5

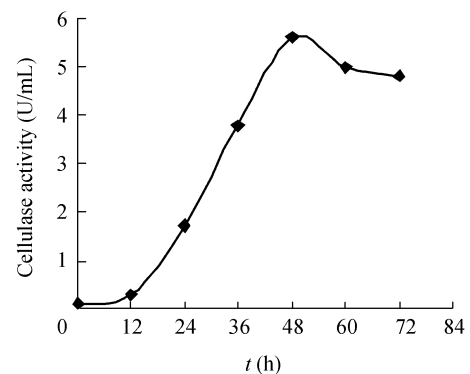


图 2 LZ-5 产酶的时间进程

Fig. 2 The time course of the strain LZ-5 producing cellulase

余酶活力(图 3)。实验表明, 酶液在 30 ~50 均能保持 60%以上的活性。温度超过 60 时酶活力下降很快, 说明该菌所产纤维素酶属于中温型的酶。

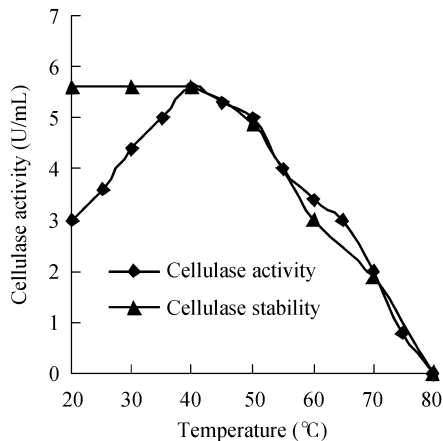


图 3 温度对纤维素酶活力和稳定性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on cellulase activity and stability

2.2.2 酶反应的最适 pH 和酶的最适 pH 稳定性: 将酶液置于不同 pH 值条件下测定纤维素酶活力, 结果(见图 4)表明酶反应最适 pH 值为 9.0, 并且在 pH 10.0 也具有较高的活性。该实验用了磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 3.0~8.5)和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 8.0~11.0), 在两缓冲液的交界部分有一定的 pH

值覆盖, 覆盖部分的结果一致, 说明这两种缓冲体系对酶活力影响不大。将酶液置于不同 pH 环境中, 于 50 保温 60 min, 然后测其剩余的酶活力(图 4)。实验表明, 该菌产酶在 pH 6~10 的范围内, 酶活力均可保持在 80%以上, 说明该菌株产生的碱性纤维素酶可在较宽的 pH 范围内保持其酶活力的稳定性。
2.3 遗传稳定性: 将菌株 LZ-5 连续传代 10 代, 液体摇瓶发酵测其每代的纤维素酶活力, 实验结果(见表 4)表明, 不同代菌株所产生的纤维素酶活力差别不大, 说明此菌株具有良好的遗传稳定性。

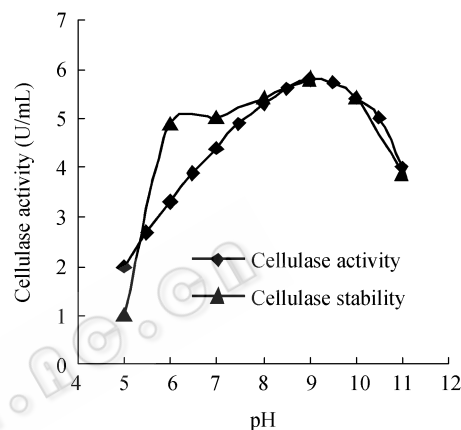


图 4 pH 值对纤维素酶活力和稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH value on cellulase activity and stability

表 4 LZ-5 的遗传稳定性试验

Table 4 The genetic stability tests of the strain LZ-5

代数 Inherited generation number	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
纤维素酶活力 Cellulase activity (U/mL)	5.8	5.8	5.6	5.7	5.6	5.6	5.6	5.5	5.5	5.5	5.4

3 结论

从碱性土壤中筛选到 1 株革兰氏阴性菌, 具有较强的产纤维素酶的能力。酶学性质研究表明, 该菌所产生的纤维素酶作用最适温度为 40, 最适作用 pH 值为 9.0。这一酶学特性显示该菌所产生的酶制剂在棉织品生物整理及洗涤剂工业中具有良好的应用前景。经传代培养表明, 该酶具有较好的遗传稳定性。

参考文献

- [1] Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 2000, **18**(5): 355-383.
- [2] 郭成柱, 崔堂兵, 郭勇. 嗜碱芽孢杆菌产碱性纤维素酶研究概况. *氨基酸和生物资源*, 2007, **29**(1): 35-38.

- [3] 沈雪亮, 夏黎明. 产纤维素酶细菌的筛选及酶学特性研究. *林产化学与工业*, 2002, **22**(1): 47-51.
- [4] Tolan JS, Foody B. Cellulase from submerged fermentation. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 1999, **65**: 41-67.
- [5] 赵新刚. 洗涤用碱性纤维素酶及其产生菌的分离方法. *微生物学通报*, 1999, **26**(1): 63-65.
- [6] 刘森林, 邢苗, 刘刚, 等. 碱性纤维素酶革兰氏阴性菌株筛选及酶学性质研究. *微生物学通报*, 2005, **32**(4): 91-94.
- [7] Cantwell BA, McConnell DJ. Molecular cloning and expression of a *Bacillus subtilis* β -glucanase gene in *Escherichia coli*. *Gene*, 1983, **23**(2): 211-219.
- [8] 杨文博. *微生物学实验*. 北京: 化学工业出版社, 2004, pp.21-27.
- [9] RE 布坎南, NE 吉本斯. *伯杰细菌鉴定手册*. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984, pp.474-482.