

# 芽孢杆菌 E<sub>2</sub> 菌株纤维素酶形成条件的研究

官家发 李建黔 张发群

(中国科学院成都生物研究所, 成都 610015)

芽孢杆菌 E<sub>2</sub> 菌株 (*Bacillus* sp. strain E<sub>2</sub>) 能在 55℃ 下良好生长并在培养液中大量积累胞外纤维素酶 (190 mu/ml 培养液), 所产生的纤维素酶为单一的 CMCase。对芽孢杆菌 E<sub>2</sub> 菌株产酶条件进行了研究。该菌产酶的最适培养基装量为 200ml/500ml 三角瓶, 最适起始 pH 为 6.5, 最适产酶温度为 45℃, 产酶高峰在培养时间 8—12 小时。E<sub>2</sub> 菌株不能利用单一的无机氮源形成纤维素酶。酪蛋白是试验过的供 E<sub>2</sub> 菌株形成纤维素酶的最好氮源, 其用量为 3g/L。CMC-Na, 纤维二糖, 能作为碳源供芽孢杆菌 E<sub>2</sub> 菌株形成纤维素酶。高浓度的葡萄糖 (8g/L) 对芽孢杆菌 E<sub>2</sub> 菌株纤维素酶的形成有抑制作用。天然纤维素不能作为芽孢杆菌 E<sub>2</sub> 菌株形成纤维素酶的碳源。

**关键词** 芽孢杆菌 E<sub>2</sub> 菌株; CMCase

我们从堆肥等土样中筛选分离得到几株原核好氧纤维素酶产生菌, 包括好氧细菌和放线菌。其中一株好氧细菌能在 55℃ 良好生长, 并在培养液中大量积累胞外纤维素酶 (190mu/ml 培养液)。经分类学鉴定, 该菌属于芽孢杆菌属, 定名为芽孢杆菌 E<sub>2</sub> 菌株 (*Bacillus* sp. strain E<sub>2</sub>)。该菌纤维素酶酶学性质研究的结果指出, 这株菌所产生的纤维素酶为单一的 CMCase。该菌虽然能产生高活力的羧甲基纤维素酶 (CMCase), 但不能分解天然纤维素, 因此不属于真正的纤维素分解菌。这与 1985 年日本理化学研究所掘越教授分离获得的 *Bacillus* sp. strain 1139 的性质基本一致<sup>[1]</sup>, 所不同之处是后者属于中温菌, 能在高 pH 条件下生长并产生羧甲基纤维素酶 (CMCase)<sup>[2]</sup>。这类菌产生的纤维素酶组份单一 (CMCase), 除了便于纤维素酶的分离纯化外, 它还是纤维素酶基因克隆的理想供体菌。

本文报道芽孢杆菌 E<sub>2</sub> 菌株产酶条件的研究结果。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌株: 芽孢杆菌 E<sub>2</sub> 菌株

中国科学院成都生物研究所官家发等同志从堆肥中分离到。

### (二) 种子培养基组成

纤维素分解细菌选择培养基<sup>[3]</sup>:

CMC-Na 5g, NaNO<sub>3</sub> 1g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.18 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.9 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5g, KCl 0.5g, 酵母膏 0.5g, 酪蛋白 0.5g, 蒸馏水定容到 1000ml, pH6.8。

### (三) 发酵培养基组成

CMC-Na 5g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1g, KCl 0.5g, 酪蛋白 3g, 酵母膏 1g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5g,

本文于 1991 年 2 月 22 日收到。

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  [1%] 0.2ml,  $\text{CaCl}_2$  [10mg/ml] 1ml,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [0.1%] 0.1ml, 磷酸盐缓冲液 [1/15mol/L, pH6.8] 100ml, 蒸馏水定容至 1000ml。

#### (四) 酶活力分析法

参照文献[4]中 CMCase 活力测定法进行。一个酶活单位被定义为在 1 分钟内转化底物产生  $1\mu\text{mol}$  还原糖(按葡萄糖计)所需的酶量。

#### (五) 生物量测定

取发酵液 2ml, 加水 2ml 稀释, 在 721 分光光度计上, 0.5cm 光程测定 620nm 光吸收值。

#### (六) 液体种子的制备

接一环生长良好的芽孢杆菌  $E_2$  菌株斜面细胞到装有 50ml 种子培养基的 250ml 三角瓶中, 于美国 New Brunswick Scientific Co. INC G-250 恒温摇床上  $45^\circ\text{C}$  (150r/min) 培养过夜 (14 小时)。

## 结 果

### (一) 培养时间对芽孢杆菌 $E_2$ 菌株纤维素酶形成的影响

在 500ml 三角瓶中装入 200ml 发酵培养基, 按 2% 的接种量接种, 用恒温摇床培养。定时取样测定发酵液酶活力和生物量。结果(图 1)指出, 该菌在培养 4 至 8 小时期间大量产酶, 在 8 至 14 小时, 酶活力保持稳定, 延长培养时间酶活力出现下降趋势。

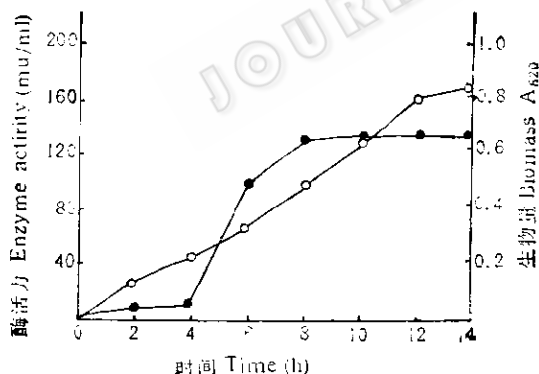


图 1 培养时间与产酶的关系

Fig. 1 Time course of enzyme formation

—●— 酶活力 Enzyme activity;  
—○— 生物量 Biomass

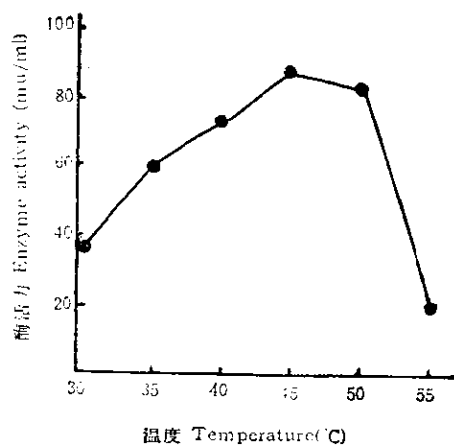


图 2 培养温度对产酶影响

Fig. 2 Effect of temperature on enzyme formation

### (二) 培养温度对芽孢杆菌 $E_2$ 菌株纤维素酶形成的影响

在 250ml 三角瓶中装入 50ml 发酵培养基, 在  $30-55^\circ\text{C}$  之间六个不同温度下培养 12 小时, 测定发酵液酶活力。结果(图 2)说明, 产酶的最适温度为  $45-50^\circ\text{C}$ , 温度高于

50℃ 后酶活力急剧下降。

### (三) 培养基的起始 pH 对芽孢杆菌 $E_2$ 菌株纤维素酶形成的影响

改变磷酸氢二钠和磷酸二氢钾的配比,调节发酵培养基不同的起始 pH,在 250ml 三角瓶中装入 50ml 不同起始 pH 的发酵培养基,于 45℃(150r/min) 摇床培养 12 小时,测定发酵液酶活力和生物量。结果(图 3)说明,培养基的最适起始 pH 为 6.5,在 pH5.0—7.0 范围内产酶基本稳定, pH 超过 7.0 时酶活力明显下降。

### (四) 培养基装量对芽孢杆菌 $E_2$ 菌株纤维素酶形成的影响

在 500ml 三角瓶中装入不同量的发酵培养基,于恒温摇床 45℃ (150r/min) 培养 12 小时,测定发酵液酶活力和生物量,结果(图 4)说明,培养基的最适装量为 200ml/500ml,超过此装量时,酶活力出现下降趋势。

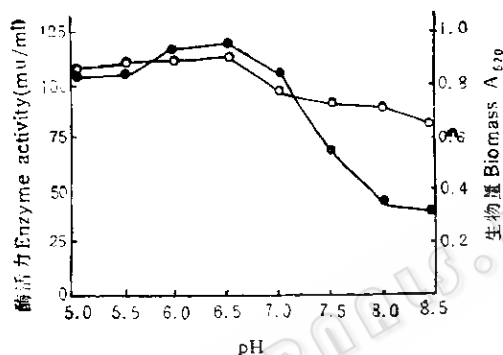


图 3 培养基起始 pH 对产酶影响

Fig. 3 Effect of initial pH on enzyme formation

—●— 酶活力 Enzyme activity;  
—○— 生物量 Biomass

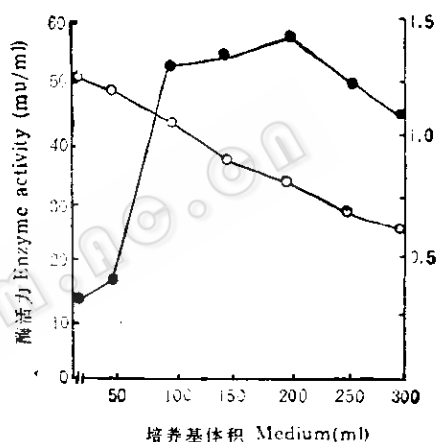


图 4 培养基装量对产酶影响

Fig. 4 Effect of medium volume on enzyme formation

—●— 酶活力 Enzyme activity;  
—○— 生物量 Biomass

5. 氮源对纤维素酶形成的影响: 除去氮源后的发酵培养基作为基础培养基, 加入不同氮源进行试验(表 1)。

有机氮如牛肉膏、胰蛋白胨、酵母膏等能作为氮源供芽孢杆菌  $E_2$  菌株生长和形成纤维素酶, 而酪蛋白是芽孢杆菌  $E_2$  菌株形成纤维素酶的较好氮源。单纯的无机氮不能作为氮源供芽孢杆菌  $E_2$  菌株生长和形成纤维素酶。

蛋白胨和酵母膏用量对芽孢杆菌  $E_2$  菌株纤维素酶形成的影响进一步进行了考查。

(1) 不同浓度胰蛋白胨对芽孢杆菌  $E_2$  菌株生长和纤维素酶形成的影响: 以除去氮源的发酵培养基为基础培养基, 加入不同浓度的胰蛋白胨进行试验, 结果见图 5。

产酶的最适胰蛋白浓度为 6g/L。

(2) 酵母膏用量对芽孢杆菌  $E_2$  菌株生长和纤维素酶形成的影响: 在除去氮源的发酵培养基中, 加入不同量的酵母膏进行试验。结果(图 6)说明, 含有丰富生长因子的酵母膏能供芽孢杆菌  $E_2$  菌株良好生长, 但不能供该菌大量形成纤维素酶。

表 1 氮源对产酶的影响

Table 1 Effect of various nitrogen sources on cell growth and enzyme production

氮 源* Nitrogen sources	浓度 Conc. (g/L)	生物量 Biomass A <sub>620</sub>	酶活力 Enzyme activity (mu/ml)
牛肉膏 Beef extract	3.0	0.560	38.7
酪蛋白 Casein	3.0	0.920	96.7
胰蛋白胨 Tryptone	3.0	0.490	90.8
酵母膏 Yeast extract	3.0	1.00	70.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.78	0.035	0
NaNO <sub>3</sub>	1.0	0.0285	0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.5	0.035	0
NH <sub>4</sub> Cl	0.64	0.031	0

\* 无机氮按等克原子 N 加入培养基中 Mineral salt was added in same concentration of nitrogen.

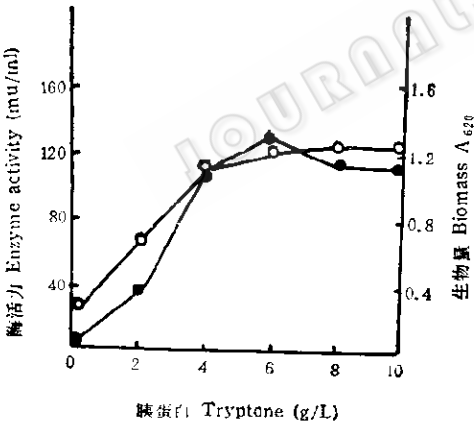


图 5 不同浓度胰蛋白对产酶的影响

Fig. 5 Effect of tryptone on enzyme formation

—●— 酶活力 Enzyme activity;  
—○— 生物量 Biomass

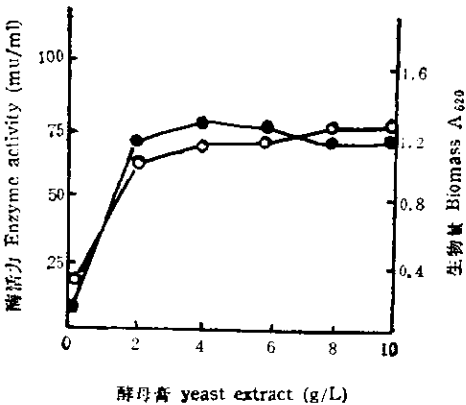


图 6 酵母膏用量对产酶的影响

Fig. 6 Effect of yeast extract on enzyme formation

—●— 酶活力 Enzyme activity;  
—○— 生物量 Biomass

6. 碳源对产酶的影响:

(1) CMC-Na 对芽孢杆菌 E<sub>2</sub> 菌株纤维素酶形成和生长的影响: 在发酵培养基中加入不同浓度的 CMC-Na 进行试验。结果(图 7) 说明产酶的最适 CMC-Na 的用量为 6g/L。

(2) 微晶纤维素对芽孢杆菌  $E_2$  菌株纤维素酶形成的影响: 在发酵培养基中以不同浓度的微晶纤维素 (Avicel) 代替 CMC-Na 进行试验。结果(图略)说明微晶纤维素不能作为碳源供芽孢杆菌  $E_2$  菌株形成纤维素酶。

(3) 棉花纤维对纤维素酶形成的影响: 在发酵培养基中以不同浓度的棉纤维素代替 CMC-Na 进行试验。结果(图略)说明棉纤维不能作为碳源供  $E_2$  菌株形成纤维素酶。

(4) 纤维二糖对  $E_2$  菌株生长和纤维素酶形成的影响: 在发酵培养基中以不同浓度的纤维二糖代替 CMC-Na 进行试验。结果(见图 8)指出, 芽孢杆菌  $E_2$  菌株纤维素酶形成所需纤维二糖最适浓度为 8g/L, 随纤维二糖浓度的增加, 其生物量增加。但是纤维二糖对纤维素酶形成的抑制作用未观察到。

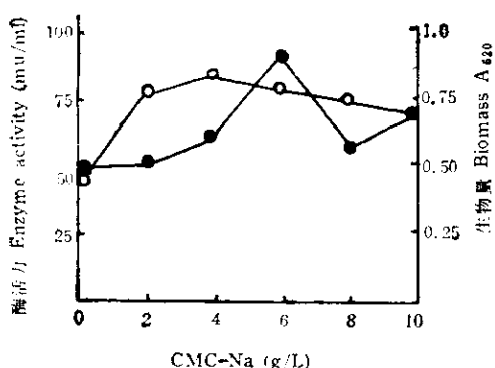


图 7 CMC-Na 对产酶的影响

Fig. 7 Effect of CMC-Na on enzyme formation

—●— 酶活力 Enzyme activity;  
—○— 生物量 Biomass

芽孢杆菌  $E_2$  菌株形成所需纤维二糖最适浓度为 8g/L, 随纤维二糖浓度的增加, 其生物量增加。但是纤维二糖对纤维素酶形成的抑制作用未观察到。

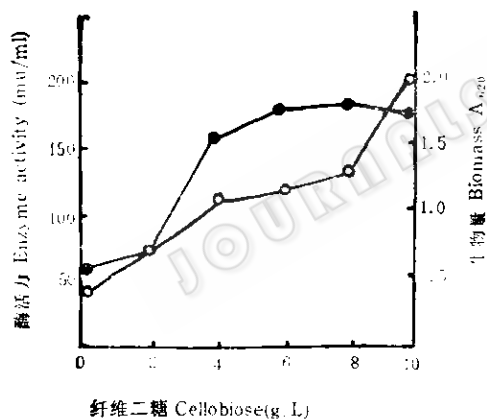


图 8 纤维二糖对产酶的影响

Fig. 8 Effect of cellobiose on enzyme formation

—●— 酶活力 Enzyme activity;  
—○— 生物量 Biomass

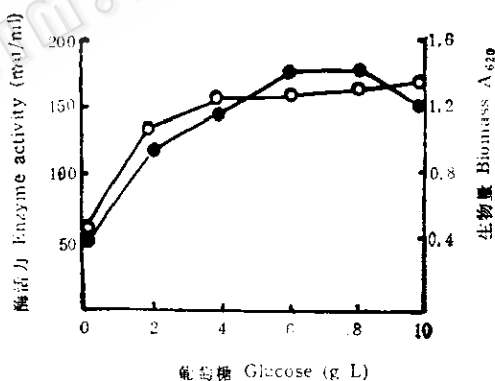


图 9 葡萄糖对产酶的影响

Fig. 9 Effect of glucose on enzyme formation

—●— 酶活力 Enzyme activity;  
—○— 生物量 Biomass

(5) 葡萄糖对芽孢杆菌  $E_2$  菌株纤维素酶形成的影响: 在发酵培养基中以不同浓度的葡萄糖代替 CMC-Na 进行试验。图 9 说明芽孢杆菌  $E_2$  菌株形成纤维素酶所需葡萄糖最适浓度为 6g/L。高浓度的葡萄糖 (10g/L) 对纤维素酶的形成显示抑制作用。

## 讨 论

参照有关报道<sup>[4]</sup>我们仅对部分影响芽孢杆菌  $E_2$  菌株纤维素酶形成的主要因素进行了试验, 而且是按单因子试验进行的, 没有考虑多因子之间的交互作用。包括最佳碳氮比

(C/N) 在内的影响芽孢杆菌 E<sub>2</sub> 菌株纤维素酶形成的条件, 优化试验有待进一步进行。

### 参 考 文 献

- [1] Fukumori F. et al.: *Journal of General Microbiology*, **131**: 3339--3345, 1985.
- [2] Fukumori F. et al.: *Journal of General Microbiology*, **132**: 2329--2335, 1986.
- [3] 程光胜: 微生物学实验法, 第 328 页, 科学出版社, 北京, 1981 年。
- [4] 齐义鹏: 纤维素酶及其应用, 第 210~212 页, 四川人民出版社, 成都, 1980 年。
- [5] 李 钦等: 微生物学报, **29**(1): 39-44, 1989。

## STUDIES ON CULTURE CONDITIONS OF CMCase FORMATION IN *BACILLUS* SP. STRAIN E<sub>2</sub>

Guan Jiafa Li Jianqian Zhang Faqun

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610015)

*Bacillus* sp. strain E<sub>2</sub>, a thermophilic bacterium, isolated from compost, was able to grow well at 55°C and accumulated large amount of extracellular cellulase (190mu/ml) in culture borth. *Bacillus* sp. strain E<sub>2</sub> produced only CMCase. The conditions for enzyme production were examined. The optimal temperature and pH for enzyme formation were 45°C and pH 6.5. Mineral N was not suitable nitrogen source for cell growth and enzyme formation. Casein was the best nitrogen source tested for cell growth and enzyme production. CMC-Na, cellobiose and glucose were suitable carbon sources for enzyme production. The enzyme formation was inhibited by glucose in high concentration(8g/L). Native celluloses, absorbent cotton, avicel were not able to induce the CMCase formation of *Bacillus* sp. strain E<sub>2</sub>.

**Key words** *Bacillus* sp. strain E<sub>2</sub>; CMCase