

芽孢杆菌 074 碱性纤维素酶的研究

I. 菌种的分离、筛选及发酵条件

宋桂经 王 冬 孙彩云 高培基

(山东大学微生物研究所 济南 250100)

摘 要 从碱性土样中,分离到产碱性纤维素酶的细菌 134 株。经摇瓶初筛、复筛后,得到一株芽孢杆菌 074,在 pH9 条件下能产生具有较高活性的纤维素酶。该菌株的最适生长 pH 为中性,最适生长温度为 32℃。NaCl 对酶的产生影响较大。羧甲基纤维素钠(CMC-Na)对酶的产生有一定促进作用,但不是唯一碳源。用最佳培养基和培养条件,48 小时酶活性最高可达 6u/ml。

关键词 碱性,纤维素酶,芽孢杆菌

纤维素酶的研究一直是以纤维素资源的有效利用为目标进行的。能产生纤维素酶的微生物很多,目前的研究一般以丝状真菌为主。但它们产生的纤维素酶水解纤维素底物时,一般均为酸性或中性偏酸性。碱性微生物及其酶的研究近来也逐渐受到重视。

近年来,纤维素酶成功地应用于洗涤剂工业,改变了传统的去污机理,在洗涤剂工业上得到很高的评价,被认为是洗涤剂工业上的一次革命^[1]。洗涤剂中添加的纤维素酶,能使棉纤维的非结晶区结构膨松,使被封闭在纤维间隙的污垢易被洗出,提高了洗涤效果。用含纤维素酶洗涤剂洗过的衣物,色泽鲜艳,柔软。

洗涤剂的水溶液通常 pH 为 9 左右。因此,洗涤剂用纤维素酶必须是在 pH9 左右具有较高活性的碱性纤维素酶。能产生碱性纤维素的微生物通常为嗜碱性或耐碱性微生物。本文报道从我国盐碱土壤中分离出碱性纤维素酶产生菌的研究结果。

1 材料和方法

1.1 土样来源

济南轻化厂碱性污泥,德州、曹县碱性土样,黑龙江大庆油田碱性土样,内蒙古哈苏海碱湖土样。

1.2 培养基

1.2.1 分离平板培养基(%): CMC-Na 2.0, 蛋白胨 0.25, 酵母膏 0.05, KH_2PO_4 0.15, Na_2HPO_4 0.25, pH8.0。

1.2.2 摇瓶发酵培养基(%): CMC-Na 0.5, 麸皮 5.0, 蛋白胨 0.25, 酵母膏 0.25, MgSO_4 0.05, KH_2PO_4 0.1, Na_2HPO_4 0.1, pH7.0。

本文于 1993 年 3 月 22 日收到。

1.3 菌种的分离方法

采用 CMC-Na 平板进行菌种分离,能产生纤维素酶的菌落周围出现凹陷圆圈,圈的大小反映了产酶能力的强弱。为了能使判断准确,用刚果红染色,再用 NaCl 稀溶液冲洗平板,被酶分解出现的圆圈部分会变成清晰的白色半透明圈。

1.4 菌种的初筛、复筛和发酵

用摇瓶机(山东大学教学仪器厂制 WMK-10 型)进行摇瓶发酵,测定发酵液酶活力,发酵温度 32℃,转速为 160r/min。

1.5 酶活力测定

用 0.05mol pH9 的甘氨酸-NaOH 缓冲液制备 10mg/ml 的 CMC-Na 溶液,加入经适当稀释的酶液,40℃反应 15 分钟,中止反应后,用 DNS 法测定 535nm 光吸收。用葡萄糖作标准液,以每分钟生成相当于 1 μ mol 的葡萄糖为一个酶活性单位。

2 结果和讨论

2.1 菌种的分离和初筛

从采集的 78 份碱性土样中,分离出能产生纤维素酶的细菌 134 株,放线菌 26 株。其中从山东境内土样中得到细菌 3 株,放线菌 9 株;从黑龙江大庆油田土样中分离到 5 株细菌和从内蒙古哈苏海碱湖土样中分离到细菌 13 株,纤维素酶活性均大于 1u/ml。这些菌株中有嗜碱性菌,也有耐碱菌。

2.2 菌株的复筛

初筛到的 21 株细菌,经摇瓶发酵进行复筛,得到酶活性大于 2u/ml (pH9.0) 的细菌 6 株(表 1)。

表 1 复筛的菌株在不同 pH 的酶活性 (u/ml)

Table 1 The CMCase activity of the strains after the second screening at different pH values

pH	菌株号 Strain No.					
	N28	N126	W81	074	W44	H129
7.4	—	2.04	—	3.62	3.88	—
8.0	1.78	2.33	2.68	3.68	3.03	2.54
9.0	2.13	2.59	2.33	3.40	2.25	2.60
10.0	2.22	1.78	2.18	2.82	1.33	1.78
10.6	1.33	0.36	1.12	1.27	0.60	0.36
12.0	0.74	0	0.126	0.703	0.360	0

6 株菌中芽孢杆菌 074 的酶活性较高, pH9 酶活性 3.4u/ml。而且在 pH12 时仍保持较高活性。

2.3 发酵条件的选择

2.3.1 菌龄和接种量对产酶的影响:将菌龄为 8、12、24 小时的种子,分别按 0.5—5.0%

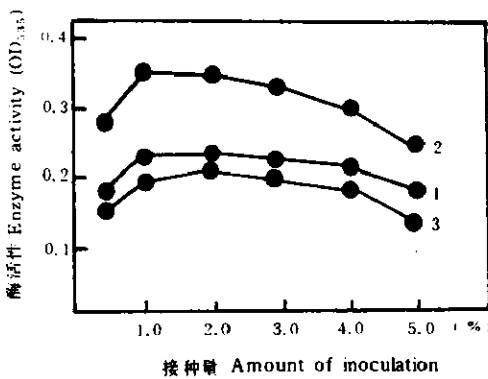


图1 菌龄和接种量对酶活性的影响

Fig. 1 Effect of the bacterial age and the amount of inoculation on the enzyme activity
1. 8h; 2. 12h; 3. 24h.

接种到摇瓶中，32℃培养48小时，测定酶活性。结果表明菌龄为12小时，接种量1—2%为宜（图1）。

2.3.2 培养温度（T）和转速（S）的选择：

将发酵摇瓶在下设4个水平：T（℃）：28，32，

36，40；S（r/min）：80，120，160，190，共组成16个组合，用多功能摇瓶机培养48小时，测定发酵液的酶活性（OD₅₃₅），结果如表2。

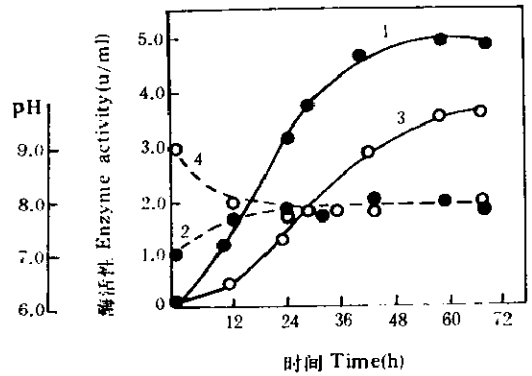


图2 培养基初始 pH 对产酶的影响

Fig. 2 Effect of initial pH of the medium of the enzyme activity

- 1. 酶活性（初始 pH7.0）；
- 2. pH 变化（初始 pH7.0）；
- 3. 酶活性（初始 pH9.0）；
- 4. pH 变化（初始 pH9.0）。
- 1. Enzyme activity (Initial pH 7.0)；
- 2. Change of pH (Initial pH 7.0)；
- 3. Enzyme activity (Initial pH 9.0)；
- 4. Change of pH (Initial pH 9.0)。

表2 发酵温度和转速对酶活性的影响

Table 2 Effect of the culture temperature and rotational speed of the fermentor on the enzyme activity

转速 Rotational speed (r/min)	温度 Temperature (℃)			
	28	32	36	40
80	0.174	0.387	0.226	0.150
120	0.305	0.529	0.253	0.425
160	0.371	0.626	0.593	0.532
190	0.363	0.557	0.455	0.178

由表2可见，发酵温度32℃、转速为160r/min发酵水平较高。

2.3.3 培养基初始 pH 对产酶的影响：由图2可见，培养基初始 pH7 比 pH9 产酶高峰提前24小时左右，而且酶活性也较高。从镜检看，初始 pH9 的菌体生长较慢。

2.3.4 NaCl 对产酶的影响：培养基中添加1—3%的 NaCl，32℃发酵48小时，酶活性如图3。添加0.5—1.0%的 NaCl，酶活性可提高近3倍。

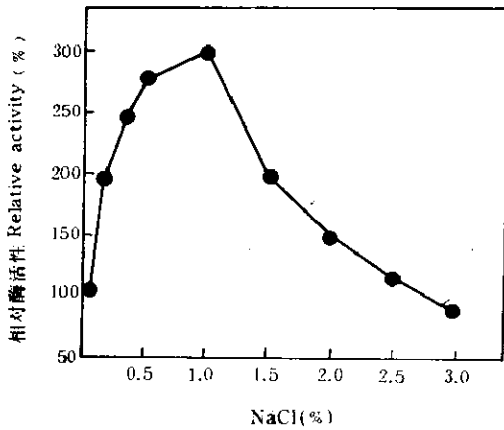


图3 NaCl 对酶活性的影响

Fig. 3 Effect of the NaCl on the enzyme activity

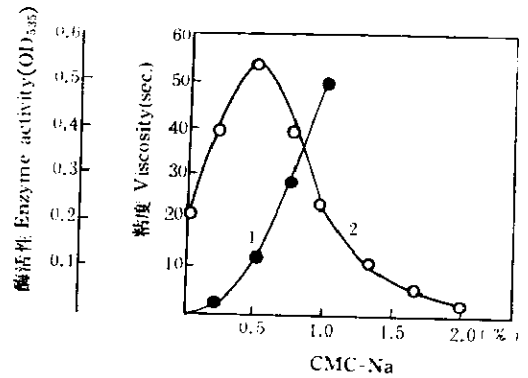


图4 CMC-Na 浓度对酶活性的影响

Fig. 4 Effect of the concentration of CMC-Na on the enzyme activity

1. 粘度 Viscosity; 2. 酶活性 Enzyme activity.

2.3.5 CMC-Na 浓度对酶活性的影响: 摇瓶发酵培养基中分别加 0.5—2.0% 的 CMC-Na, 32℃ 发酵 2 天后测活性。结果 (图 4) 表明, 培养基中加 0.5% CMC-Na, 可使酶活性提高 34%, 如果增加到 1.0% 时, 酶活性反而下降 10%。从图 4 的 CMC-Na 的粘度曲线可以看出, CMC-Na 的浓度超过 0.5% 时, 其粘度呈直线上升, 由于培养基粘度增加, 影响菌的正常生长、造成酶活性降低。同时也说明 CMC-Na 不是理想的碳源。

不同时间补加 CMC-Na 对酶活性的影响: 为了避免增加培养基的粘度, 采用分批补加 CMC-Na 的方法, 发酵一定时间后, 补加 0.5% 的 CMC-Na。实验结果表明, 发酵一开始就补加 0.5% CMC-Na 比始终不加的高 35%; 而发酵 12 小时后补加 0.5% CMC-Na, 比一开始就加的, 酶活性提高 3% 左右。说明 CMC-Na 对酶的生成有一定关系。

CMC-Na 对芽孢杆菌 074 的纤维素酶合成的诱导作用: 将用生理盐水洗涤过的菌体, 分别接种到三种不同培养基中, 32℃ 培养 48 小时。结果表明, 培养基中仅有 0.5% CMC-Na 而无任何其他营养源的 A 组, 几乎没测出酶活性; 含 0.5% CMC-Na 的摇瓶发酵培养基的 B 组, 比不含有 CMC-Na 的同样摇瓶发酵培养基的 C 组的酶活性高 32% (表 3)。进一步说明 CMC-Na 对 074 菌株的纤维素酶合成有一定促进作用, 但 CMC-Na 是否作为该菌纤维素酶合成的诱导剂, 尚需进一步探讨。

表3 CMC-Na 对酶生成的影响

Table 3 Effect of CMC-Na on the enzyme production

时间 Time (h)	编号 No.		
	A	B	C
24	0.002	0.330	0.255
48	0.000	0.350	0.260

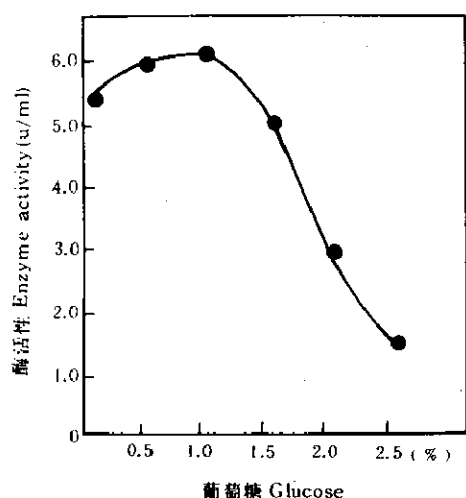


图5 葡萄糖对酶生成的影响

Fig. 5 Effect of glucose on the enzyme production

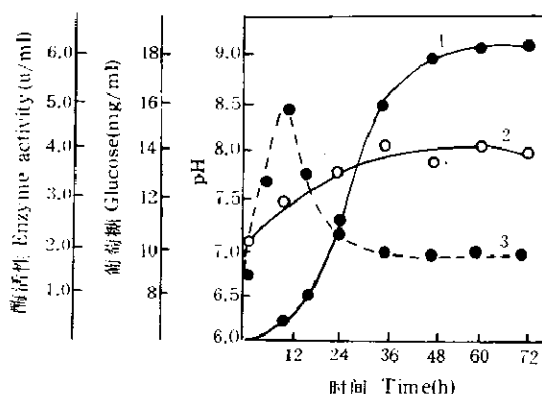


图6 074 菌株发酵过程分析

Fig. 6 Analysing the fermentation process of the *Bacillus* sp. 074

1. 酶活性 Enzyme activity;
2. pH; 3. 葡萄糖 Glucose.

2.3.6 葡萄糖对酶合成的影响: 074 菌株发酵 24 小时, 进入产酶高峰, 此时培养基中还还原糖浓度最低, 补加 0.5—2.5% 的葡萄糖继续发酵 24 小时, 测定酶活性。结果 (图 5) 表明, 培养基中补加 1.0% 以下的葡萄糖能提高酶活性, 但补加 1.5% 以上时, 酶活性大幅度下降。表明葡萄糖对酶合成有强烈的阻遏作用。

2.3.7 培养基碳氮源的选择: 碳源选用玉米粉、面粉、甘薯粉; 氮源选用蛋白胨、酵母膏、豆饼粉、 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、尿素。按表 4 配方, 其他成份相同。进行摇瓶发酵, 48 小时发酵终了后测定发酵液酶活性。结果表明, 5% 的麸皮加 2% 甘薯粉发酵终了酶活性最高, 而且发酵液中残糖浓度较低。还可以适当增加甘薯粉浓度, 酶活性有可能进一步提高。

培养基中氮源以酵母膏和蛋白胨同时使用酶活性最高; 用豆饼粉、尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作氮源酶活性很低; 用 KNO_3 作氮源时, 酶活性为以蛋白胨或酵母膏为氮源时的 50%。

2.3.8 074 菌株发酵过程分析: 采用 100ml 培养基中含麸皮 5.0g、甘薯粉 3.0g、酵母膏 0.3g、蛋白胨 0.2g、 NaCl 0.5g、 C MC-Na 0.5g、 Na_2HPO_4 0.1g、 NaH_2PO_4 0.1g、 MgSO_4 0.05g pH7.0 的培养基, 32°C 160r/min, 培养 3 天。发酵过程中定时取样分析发酵液 pH、残糖 (葡萄糖)、酶活性, 并镜检菌体生长。发酵 24 小时之内, 菌体生长很快, 发酵液中还原糖浓度在 12 小时最高, 其后迅速下降, 24 小时趋向稳定。发酵液 pH 上升到 8.0 左右, 酶活性迅速提高, 48 小时达到产酶最高峰。3 天后酶活性不再增加 (图 6)。

074 菌株属于在碱性条件下能生长的中性菌。产生的纤维素酶在碱性条件下 (pH9) 具有较高活性。这对发酵和后处理无疑是有利的, 便于生产管理。

表 4 碳氮源的选择

Table 4 Selection of the carbon and nitrogen source

碳氮源 (%) Carbon and nitrogen source	编号 No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
麸皮 Wheat bran	7	5	5	5	7	7	7	7	7	7
玉米粉 Indian corn powder	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—
麦粉 Wheat flour	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—
甘薯粉 Sweet potato powder	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—
蛋白胨 Peptone	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	—	—	—	—	—
酵母液汁 Yeast extract	0.25	0.25	0.25	0.25	—	0.5	—	—	—	—
豆饼粉 Bean cake powder	—	—	—	—	—	—	1.0	—	—	—
尿素 Urea	—	—	—	—	—	—	—	1.0	—	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0	—
KNO ₃	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0
残糖 (%) Surplus glucose	0.20	0.26	0.21	0.18						
酶活性 (u/ml) Enzyme activity	4.25	4.16	5.02	5.78	4.08	4.16	0.42	0.51	0.85	2.30

分离到的 134 株菌中,碱性纤维素酶活性超过 2u/ml 的有 6 株,占 4.5%;酶活性达到 3u/ml 以上的有一株,占 0.7%。经过培养基及培养条件的优化选择,最高酶活性达到 6.0u/ml。这些菌株的酶活性均高于文献^[2-5]报道的,这可能与我国碱性土样较丰富有关。

关于 074 菌株的鉴定、诱变育种及其纤维素酶的分离纯化和酶学性质,将另行报道。

参 考 文 献

- [1] 村田守康. 日化協月報, 1988, 6: 7.
- [2] 伊藤進. 特許公報, 1988, 63: 109771.
- [3] 押野一志. 特許公報, 1988, 63: 273474.
- [4] 川合修次. 特許公報, 1989, 64: 37285.
- [5] 川合修次. 特許公報, 1991, 平 3: 29387.

STUDIES ON THE ALKALINE CELLULASE OF THE *BACILLUS* SP. 074

1. ISOLATION SELECTION AND DETERMINATION OF THE FERMENT CONDITIONS OF THE STRAIN

Song Guijing Wang Dong Sun Caiyun Gao Peiji

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract A cellulolytic alkaline, *Bacillus* sp. 074, which can produce relative high alkaline carboxymethyl cellulase (CMCase) over pH 9.0, was isolated from soil. The optimum pH and temperature for growth of this strain were neutral and 32°C respectively. The existence of NaCl in the medium can affect the synthesis of the enzyme efficiently. However, the effect of carboxymethyl cellulose sodium on the enzyme was only a little, and it was not the only carbon source with which the strain can synthesize the enzyme. Under the optimization condition of culture, the enzyme activity can reach 6 unit/ml within 48 hours.

Key words Alkaline, Cellulase