

文章编号: 1674-5566(2012)02-0252-05

宁波海域产纤维素酶海洋细菌的筛选

曲均革¹, 姚晓敏¹, 朱 鹏², 严小军²

(1. 浙江医药高等专科学校 生物与食品系, 浙江 宁波 315100; 2. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 通过两种途径筛选来自宁波海域的具有纤维素酶活性的海洋细菌。在实验室原有的 365 株海洋细菌资源库中, 通过刚果红染色法筛选到 27 株纤维素酶活性菌株, 活性比例为 7.40%; 在以羧甲基纤维素钠为唯一碳源的分离培养基中, 共分离到 70 株海洋细菌, 经过刚果红染色筛选到 68 株活性菌, 活性比例为 97.14%。在分析透明圈直径与菌落直径大小的比值(Hc)时发现, 两种途径筛选到的活性菌株在产酶能力上存在着显著差异。以羧甲基纤维素钠作为唯一碳源的分离培养基中, 虽然活性菌株的比例高, 但酶活力相对较小, Hc 值大于 2 的菌株数为 0; 而从菌株资源库筛选活性菌株时, 虽然活性比例小, 但酶活力相对较高, 其中有 25.93% 的菌株 Hc 值大于 2, 并且有两株 Hc 值高达 5 的菌株。

研究亮点: 近年来微生物来源的纤维素酶研究在国内外一直是研究热点, 但宁波海域乃至浙江海域内却尚未开展相关研究工作。本实验从宁波海域采集海洋样品, 比较了两种不同途径筛选海洋细菌来源的纤维素酶的研究结果, 为海洋微生物的有效筛选提供了一定的参考价值。同时, 实验中获得了 7 株活性较高的纤维素酶活性菌株, 为今后的深入研究奠定了基础。

关键词: 宁波海域; 纤维素酶; 海洋细菌; 分离; 筛选

中图分类号: Q 938

文献标志码: A

纤维素类物质是地球上最丰富的可再生资源, 如农村大量的农作物秸秆、工农业生产过程中的纤维性废渣等, 这些物质目前还未得到充分的开发和利用, 纤维素的利用与转化具有重要意义。自从 1906 年 SEILLIERE 从蜗牛消化液中发现纤维素酶以来, 国内外学者对纤维素酶做了大量研究, 纤维素的微生物降解是其中最活跃的领域之一。产纤维素酶的微生物主要是真菌和细菌, 目前的研究以真菌研究居多, 集中在里氏木霉、康氏木霉、黑曲霉和白腐菌等几个菌株上^[1-3]。真菌产生的纤维素酶一般在酸性或中性偏酸性条件下水解纤维素底物, 而细菌纤维素酶一般在中性或碱性范围起作用^[4]。近年来随着中性纤维素酶和碱性纤维素酶在洗涤、纺织等方面的应用需求, 对细菌纤维素酶的研究呈上升的趋势, 而对产纤维素酶的海洋细菌的研究也开始

受到关注^[5-10]。国内对海洋细菌产纤维素酶的研究相对较少, 宁波乃至浙江海域的海洋细菌纤维素酶资源尚未被开发。本实验从宁波海域采集样品, 对纤维素酶活性菌株的两种不同筛选途径分别进行了研究, 获得了 7 株活性较高的纤维素酶活性菌株, 为今后活性菌株的高效筛选及进一步深入研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 已有菌株资源库中纤维素酶活性菌株筛选

1.1.1 菌株来源

该部分筛选的菌株来自实验室已有的海洋细菌菌株资源库, 共计 365 株, 样品采集于宁波海洋沙山和梅山岛海域, 应用 2216E 培养基, 通过平板稀释法结合平板划线法分离纯化获得。

收稿日期: 2011-09-14 修回日期: 2011-10-25

基金项目: 浙江省教育厅科研项目(Y201019046); 宁波市自然科学基金(2011A610028); 浙江医药高等专科学校校科研项目(ZPCSR2009007)

作者简介: 曲均革(1977—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为海洋生物技术。E-mail: qujg@mail.zjpc.net.cn

1.1.2 筛选培养基

2216E 培养基中添加 0.5% 羧甲基纤维素钠,具体组成如下:羧甲基纤维素钠(CMC-Na)5 g/L,蛋白胨 5 g/L,酵母膏 1 g/L,磷酸高铁 0.01 g/L,琼脂 18 g/L,陈海水定容,pH 7.6~7.8。

1.1.3 纤维素酶活性菌株筛选方法

在羧甲基纤维素钠琼脂培养板上接种细菌,放入 28 °C 恒温培养箱中培养 72 h,记录菌落直径大小。然后将菌落从培养板上刮下,用 0.1% 的刚果红溶液染色 30 min,然后用 1 mol/L NaCl 洗脱液洗脱两次,每次浸泡 20 min。对光观察是否产生透明水解圈,产生透明水解圈者是产纤维素酶菌株。记录透明水解圈的大小,以透明圈直径与菌落直径的比值(Hc)表示酶活大小,Hc 值越大,表明酶活越强。

1.2 唯一碳源培养基纤维素酶活性菌株分离筛选

1.2.1 样品采集

从宁波洋沙山海域采集海水和海泥(沙)样品。

1.2.2 培养基

富集培养基为滤纸 10 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.5 mg/L,陈海水定容,pH 自然。分离培养基设计为羧甲基纤维素钠作为唯一碳源的培养基,具体组成如下:CMC-Na 5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.5 mg/L,琼脂 18 g/L,陈海水定容,pH 自然。筛选培养基为 2216E 培养基中添加 0.5% 羧甲基纤维素钠(同 1.1.2)。

1.2.3 细菌富集培养

取 5 mL 海水样品加至用 250 mL 三角瓶分装的 50 mL 富集培养基中,28 °C 150 r/min 培养 5 d。取 10 g 海泥(沙),加入放玻璃珠的 90 mL 无菌海水中充分震荡 30 min,然后取 5 mL 加至 50 mL 富集培养基中,28 °C 150 r/min 培养 5 d。

1.2.4 菌株分离

富集培养 5 d 后,将富集培养液进行连续梯度稀释,稀释成 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 浓度。将各稀释度分别取 200 μL 涂布在以羧甲基纤维素钠为唯一碳源的分离培养基平板上,28 °C 恒温培养箱中培养,挑取平板上单个菌落接种

到 2216E 斜面上。

1.2.5 纤维素酶活性菌株筛选

同 1.1.3。

2 结果

2.1 菌株资源库中纤维素酶活性菌株筛选

对实验室已有的海洋细菌资源库中的 365 株菌进行纤维素酶活性筛选,经刚果红染色后,发现其中 27 株具有纤维素酶活性,活性比例为 7.40%,图 1 为纤维素酶活性菌株 MB117 刚果红染色结果。

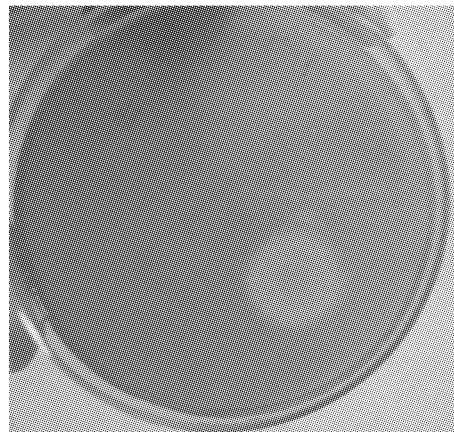


图 1 MB117 菌株在筛选平板上形成的透明圈
Fig. 1 The clear zone on the screening plate formed by strain MB117

在筛选到的 27 株活性菌中,Hc 值大于 1 的有 13 株,占总活性菌比例的 48.15%,其中 Hc 值大于 3 的有 5 株,占总活性菌比例的 18.52%,见图 2。表 1 中列举了 Hc 值大于 2 的 7 株菌进行纤维素酶活性筛选时的菌落直径和透明圈直径等信息,如菌株 MB391 菌落直径为 4 mm,透明圈直径为 20 mm,其 Hc 值高达 5。

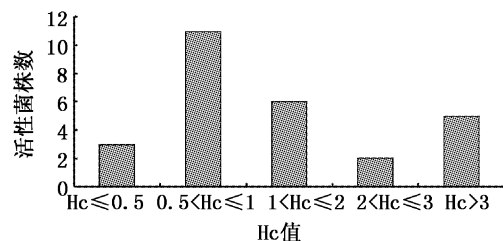


图 2 菌株资源库中筛选到的活性菌株纤维素酶活情况

Fig. 2 Enzyme activity of cellulase-producing strains screening from source library

表 1 刚果红染色筛选的 7 株活性菌的结果
Tab. 1 Results of screening the cellulase-producing strains by the CMC/Congo Red method

菌株编号	菌落直径 D ₁ /mm	透明圈直径 D ₂ /mm	Hc (D ₂ /D ₁)
MB018	4	15	3.75
MB072	3	7	2.33
MB075	2	6	3.00
MB117	6	22	3.67
MB119	7	26	3.71
MB302	2	10	5.00
MB391	4	20	5.00

2.2 唯一碳源培养基纤维素酶活性菌株分离结果

在利用羧甲基纤维素钠作为唯一碳源的分离培养基中,共分离得到 70 株海洋细菌,经过刚果红染色进行产酶筛选后,发现其中 68 株具有产酶活性,活性比例为 97.14%,图 3 为其中 4 株菌进行刚果红染色后在筛选平板上形成的透明圈情况。



图 3 MB372-375 菌株在筛选平板上形成的透明圈
Fig. 3 The clear zones on the screening plate formed by strains MB372-375

图 4 中统计了以 CMC 为唯一碳源的分离培养基中筛选到的 68 株活性菌 Hc 值的分布情况,该途径筛选到的活性菌株纤维素酶活普遍偏低,其中 Hc 值小于 1 的比例为 63.24%,Hc 值大于 2 的菌株数为 0。

2.3 两种筛选方法的比较

通过两种不同的筛选途径获得的纤维素酶活性菌株中,在以广谱培养基为分离培养基建立的 365 株海洋细菌资源库中,经过刚果红染色法筛选到 27 株纤维素酶活性菌株,活性比例为

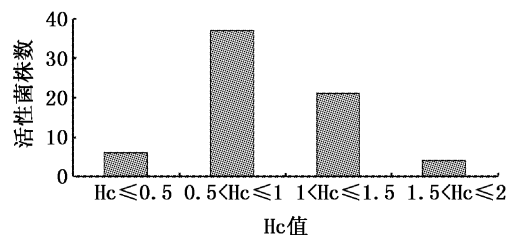


图 4 CMC 唯一碳源培养基中筛选到的活性菌株纤维素酶活情况

Fig. 4 Enzyme activity of cellulase-producing strains screening from medium with CMC-Na as the one and only carbon source

7.40%;以羧甲基纤维素钠作为唯一碳源有针对性的设计分离纤维素酶的培养基时,共分离到 70 株海洋细菌,经过刚果红染色发现 68 株有活性,活性比例高达 97.14% (表 2)。同时,在分析透明圈直径与菌落直径大小的比值时发现,两种途径筛选到的活性菌株在产酶能力上存在着显著差异。虽然后者筛选到的活性菌株比例远远高于前者,但在酶活力上却不尽人意。以羧甲基纤维素钠作为唯一碳源的分离培养基中,虽然活性菌株的比例高达 97.14%,但酶活力相对较小,没有筛到 Hc 值大于 2 的菌株;而从菌株资源库筛选活性菌株时,虽然活性比例只有 7.40%,但酶活力相对较高,其中有 25.93% 的菌株 Hc 值大于 2,并且有 Hc 值高达 5 的菌株(表 2)。

表 2 两种筛选途径的结果比较

Tab. 2 Comparison of cellulase-producing strains from two different screening methods

筛选途径	菌株总数	活性菌株数目	活性比例	Hc > 2 的比例
菌株资源库	365	27	7.40%	25.93%
唯一碳源培养基	70	68	97.14%	0

3 讨论

海洋生态环境十分独特,本身为弱碱性,有利于获得理想的碱性纤维素酶及其产生菌;而且海洋微生物酶具有耐碱、耐盐、耐冷,以及最适 pH 和反应温度适中及随反应温度的降低酶活性下降缓慢等特点,有着不同于陆源微生物酶的独特应用前景。因此,筛选和研究生产纤维素酶的海洋细菌具有重要意义。本实验首次从宁波洋沙山及梅山岛海域采集海洋样品,共筛选到 95

株纤维素酶活性菌株,其中从实验室原有菌株资源库中筛选到 27 株纤维素酶活性菌株,活性比例为 7.40%,活性菌株中有 25.93% 的菌株 Hc 值大于 2,并且有两株 Hc 值高达 5 的菌株;在以羧甲基纤维素钠为唯一碳源的分离培养基中,筛选到 68 株活性菌,活性比例为 97.14%,其中 Hc 值大于 2 的菌株数为 0。比较两种不同途径筛选产纤维素酶海洋细菌的结果可见,以羧甲基纤维素钠为唯一碳源的培养基分离到的菌株,筛选到的具有纤维素酶活性菌株的几率更高,但是酶活性却远远不如从菌株资源库里筛选的菌株。产生这个现象原因可能是某些高活性的菌株在以上分离培养基中,产纤维素酶基因并未表达,故在分离阶段首先即被淘汰。所以在海洋微生物的活性筛选过程中,为了保证筛选质量,不能盲目的追求数量。

国内对海洋细菌产纤维素酶的研究相对较少,只有几篇文献报道,如臧路平从烟台近海处采集样品,筛选到一株产纤维素酶的革兰氏阴性芽孢杆菌^[11]。徐庆强等从青岛近海海域海水中分离出一株产碱性纤维素酶的海洋细菌,经鉴定该菌株为 *Cytophaga fucicola*^[12]。目前国内对海洋细菌纤维素酶的研究主要集中在山东一带,而宁波海域乃至浙江海域内却尚未开展相关工作。本研究中从宁波海域筛选获得了 7 株活性较高的纤维素酶活性菌株,为今后活性菌株的高效筛选及进一步深入研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] MADHU K M, BEENA P S, CHANDRASEKARAN M. Extracellular β -glucosidase Production by a Marine *Aspergillus sydowii* BTMFS 55 under Solid State Fermentation Using Statistical Experimental Design [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2009, 14(4): 457-466.
- [2] JORGENSEN H, MORKERBERG A, KROGH K B R, et al. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36(1): 42-48.
- [3] ZHANG C, LI D, YU H, et al. Purification and characterization of piceid- β -D-glucosidase from *Aspergillus oryzae* [J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42(1): 83-88.
- [4] 陈春岚,李楠. 细菌纤维素酶研究进展[J]. *广西轻工业*, 2007, 1(1): 18-20.
- [5] KIM D, BAIK K S, PARK S C, et al. Cellulase production from *Pseudoalteromonas* sp. NO₃ isolated from the sea squirt *Halocynthia roretzi* [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, 36(11): 1375-1382.
- [6] SHANMUGHAPRIYA S, KIRAN G S, SELVIN J, et al. Optimization, production, and partial characterization of an alkalophilic amylase produced by sponge associated marine bacterium *Halobacterium salinarum* MMD047 [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2009, 14(1): 67-75.
- [7] GUO B, CHEN X L, SUN C Y, et al. Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo- β -1,4-xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(6): 1107-1115.
- [8] ZENG R Z, XIONG P J, WEN J J. Characterization and gene cloning of a cold-active cellulase from a deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. DY3 [J]. *Extremophiles*, 2006, 10, 79-82.
- [9] ISNANSETYO A, KAMEI Y. *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov., a novel marine bacterium that produces phenolic antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* substances [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(2): 583-588.
- [10] NAM Y D, CHANG H W, PARK J R, et al. *Pseudoalteromonas marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flats of the Yellow Sea, and reclassification of *Pseudoalteromonas sagamiensis* as *Algicola sagamiensis* comb. nov. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(1): 12-18.
- [11] 臧路平. 产纤维素酶海洋菌株的分离及培养条件研究 [J]. *现代食品科技*, 2009, 25(10): 1170-1173.
- [12] 徐庆强,张志明,王延明,等. 产碱性纤维素酶海洋细菌的筛选、鉴定及酶学性质研究 [J]. *海洋科学*, 2009, 33(7): 1-5.

Screening of cellulase-producing marine bacteria from Ningbo sea area

QU Jun-ge¹, YAO Xiao-min¹, ZHU Peng², YAN Xiao-jun²

(1. Department of Biotechnology and Food Science, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, Zhejiang, China; 2. Key Lab of Applied Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China)

Abstract: The cellulase-producing strains have been isolated from Ningbo sea area by two ways. The first way is from the resource library of marine bacteria in our lab, and the second is from medium with CMC-Na as the one and only carbon source. In the first way, 27 cellulase-producing strains have been obtained from all the 365 marine bacteria by the CMC/Congo Red method. The proportion of cellulase-producing strains is 7.40%. In the second way, 70 strains have been isolated and 68 strains can produce cellulase. The proportion of cellulase-producing strains is 97.14%. The proportion of cellulase-producing strains in the second way is much higher than that in the first way, but the enzyme activities are reverse. The proportion of cellulase-producing strains with Hc greater than 2 is 25.93% in the first way and 0 in the second way.

Key words: Ningbo sea area; cellulase; marine bacteria; isolation; screening