

文章编号: 1674-5566(2012)06-1053-05

## 产纤维素酶海洋细菌的筛选鉴定和产酶条件优化

曲均革<sup>1</sup>, 姚晓敏<sup>1</sup>, 朱 鹏<sup>2</sup>, 严小军<sup>2</sup>

(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:** 从宁波洋沙山海域采集样品, 通过刚果红染色法共筛选到 23 株具有纤维素分解能力的菌株。根据复筛结果, 选择其中一株高产碱性纤维素酶的海洋细菌 MB117 进行深入研究。经 16S rDNA 鉴定, MB117 为交替假单胞菌属 (*Pseudoalteromonas* sp.) 细菌。发酵条件研究结果表明, MB117 菌株培养的最适 pH 为 7.0, 1% 接种量和 10% 装液量最利于产酶, 低温有助于菌体生长和产酶。酶学性质研究结果表明, 酶反应的最适 pH 为 9.0, pH 7.0~10.0 范围内酶活力均可保持在 85% 以上; MB117 菌株 CMCase 不耐高温, 酶最适反应温度为 40 ℃。

**研究亮点:** 首次在浙江海域开展海洋细菌纤维素酶的相关研究工作。从宁波洋沙山海域采集样品, 分离到一株高产纤维素酶的海洋细菌, 通过分子生物学方法对其进行了鉴定, 并对其发酵条件和酶学性质进行了初步研究, 为今后对该菌株酶活的定向进化等深入研究奠定了基础。

**关键词:** 纤维素酶; 海洋细菌; 菌株筛选; 发酵条件; 酶学性质

**中图分类号:** Q 938

**文献标志码:** A

为了有效地利用纤维素资源, 国内外越来越多的学者开始关注纤维素酶, 期望能够通过纤维素酶将地球上最丰富、最廉价的可再生资源转化为高效的、可直接利用的能源和资源<sup>[1-3]</sup>。纤维素酶的生物来源主要有 3 个方面: 动物、植物和微生物, 其中利用微生物发酵是大规模制备纤维素酶的最有效途径。目前用来生产纤维素酶的微生物主要是真菌<sup>[4-7]</sup>, 而细菌来源的纤维素酶由于活性相对较低, 长期以来没有受到足够的重视。但从酶反应的酸碱环境来讲, 真菌来源的纤维素酶一般在酸性或中性偏酸性条件下起作用, 而细菌来源的纤维素酶一般在中性或碱性范围内起作用。随着近年来中性和碱性纤维素酶在纺织、工业洗涤等方面的成功应用, 细菌纤维素酶日益受到青睐<sup>[8-13]</sup>。同时, 细菌作为原核微生物, 基因一般不含内含子, 可直接从基因组 DNA 中克隆到目的基因用于工程菌的构建, 这进一步促进了对细菌纤维素酶的研究。本实验从宁波洋沙山海域分离到一株高产纤维素酶的海洋细

菌, 通过分子生物学方法对其进行了鉴定, 并对其发酵条件和酶学性质进行了研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

##### 1.1.1 样品

从宁波洋沙山海域采集海水和海泥(沙)样品。

##### 1.1.2 培养基

(1) 分离培养基: 2216E 琼脂培养基, 具体组成如下: 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 为 7.6~7.8。(2) 筛选培养基: 2216E 琼脂培养基中添加 0.5% 羧甲基纤维素钠, 具体组成如下: 羧甲基纤维素钠 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 为 7.6~7.8。(3) 液体发酵培养基: 羧甲基纤维素钠 5 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 酵母膏 1 g/L, 磷酸高铁 0.01 g/L, 陈海水定容, pH 为 7.6~7.8。

收稿日期: 2012-02-14 修回日期: 2012-03-26

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)

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

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 降解纤维素海洋细菌的筛选

将海水样品稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  3 个梯度, 并取 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, 然后进行连续梯度稀释, 分别稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  浓度。将各稀释度的样品分别取 200  $\mu$ L 涂布在分离培养基平板上, 28  $^{\circ}$ 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。然后在筛选平板上接种分离获得的细菌, 放入 28  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 72 h, 记录菌落直径大小。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 洗脱液进行洗脱, 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。

### 1.2.2 粗酶液的制备

将培养一定时间的菌悬液 4  $^{\circ}$ C 5 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。

### 1.2.3 酶活性及生物量测定

从 MB117 斜面上取一环菌接种至 2216E 液体培养基中, 28  $^{\circ}$ C 150 r/min 培养 24 h, 制成种子液。然后按一定的接种量将种子液接种于含羧甲基纤维素钠的液体发酵培养基中, 150 r/min 不同温度下培养, 定时取样, 600 nm 测生物量。CMCase(羧甲基纤维素酶)的测定方法: 取 0.5 mL 适当稀释的酶液, 加 1% CMC-Na 底物溶液 2 mL(用 pH 9.0 的缓冲液配制), 50  $^{\circ}$ C 保温酶解反应 30 min, 加 DNS 显色液 3 mL, 沸水浴 5 min 后, 流水冷却, 于 540 nm 测吸光度。其中生物量以空白培养基作对照, 酶活以 100  $^{\circ}$ C 灭活 5 min 的酶液作对照, 每次做 3 个平行。酶活单位定义为: 以 1% CMC-Na 溶液为底物, 1 mL 纤维素酶液 1 min 催化底物生成 1  $\mu$ g 葡萄糖为 1 个酶活单位(U)。

### 1.2.4 发酵条件研究

在 250 mL 三角瓶中进行液体发酵, 改变某一条件, 并保持其他发酵条件不变, 通过测定菌株生物量及 CMCase 活性, 研究发酵时间、接种量、培养基初始 pH、装液量和培养温度对细菌生长和产酶的影响。

### 1.2.5 酶学性质研究

(1) 酶反应的最适 pH 测定: 将酶液与 pH 为 3~10 的不同缓冲液配制的一系列底物在 50  $^{\circ}$ C 保温, 分别测定酶活力, 得到 pH 对酶活力的影响。(2) 酶的 pH 稳定性测定: 将酶液置于 pH 3~10 的不同缓冲液环境中, 于 50  $^{\circ}$ C 保温 60 min, 测定剩余酶活力。(3) 酶反应的最适温度测定: 在 20~90  $^{\circ}$ C 范围内, 以 10  $^{\circ}$ C 为间隔, 在不同温度条件下将酶液与底物在 pH 为 9.0 的缓冲液中进行酶促反应, 测酶活力。(4) 将酶液在不同温度下保温 60 min 后测剩余酶活力。相对酶活力以同一指标中最高的酶活值为 100%。

### 1.2.6 菌种鉴定

16S rDNA 扩增及序列测定: 使用 Takara 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Code No. D310) 进行 PCR 扩增目的片段。琼脂糖凝胶电泳后, 使用 Takara Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (Code No. DV805A) 切胶回收目的片段, 以 16S Forward 和 16S Reverse 为引物进行 DNA 测序。根据测序结果, 在 NCBI 中用 BLASTN 进行同源性比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 产纤维素酶海洋细菌的筛选结果

用刚果红染色法初筛共得到 23 株能够分解纤维素的菌株, 取其中 Hc 值较高的菌株进行液体摇瓶发酵, 测定粗酶液中酶活性, 最后选取酶活性最高的 MB117 进行深入研究。

### 2.2 菌株鉴定结果

将 PCR 产物测序、BLAST 结果发现, MB117 与交替假单胞菌属 (*Pseudoalteromonas* sp.) 的相似度达到 99% 以上, 初步确定 MB117 为交替假单胞菌属 (*Pseudoalteromonas* sp.) 细菌。

### 2.3 发酵条件研究

#### 2.3.1 发酵时间对菌株生长和产酶的影响

将种子液接种于 250 mL 三角瓶盛装的 50 mL 液体发酵培养基中, 28  $^{\circ}$ C 150 r/min 培养, 每隔 12 h 取样测生物量和纤维素酶活力。如图 1 所示, MB117 培养 24 h 后, 达到最大的生物量和 CMCase 产量, 其中 CMCase 为 17.67 U, 因此, MB117 的培养时间以 24 h 为宜。同时, CMCase 在培养后的 24~60 h 内表现出良好的稳定性, 培养后 60 h CMCase 为 24 h 的 81%。

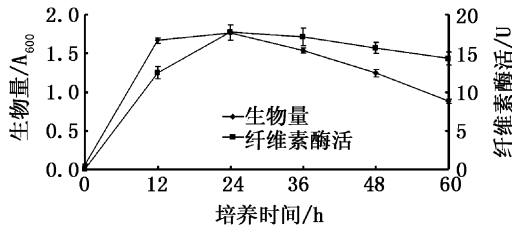


图1 发酵时间对菌株生长和产酶的影响  
Fig.1 Effects of culturing time on growth and CMCase production of strain MB117

### 2.3.2 接种量对菌株生长和产酶的影响

取培养 24 h 的种子液,分别按 0.5%、1%、1.5% 和 2% 的接种量接种于 250 mL 三角瓶盛装的 50 mL 液体发酵培养基中,28 °C 培养 24 h 后测生物量和酶活力。如图 2 所示,接种量虽然对生物量的影响不大,但对酶活力的影响较大。接种量为 0.5% 和 1% 时,酶活较强,而接种量增大则不利于产酶。综合生物量的结果,以 1% 接种量最佳。

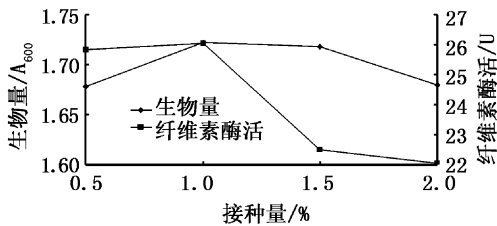


图2 接种量对菌株生长和产酶的影响  
Fig.2 Effects of inoculum on growth and CMCase production of strain MB117

### 2.3.3 培养基初始 pH 对菌株生长和产酶的影响

将液体发酵培养基的 pH 分别调至 3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12,取培养 24 h 的种子液,按 1% 的接种量接种于 250 mL 三角瓶盛装的 50 mL 培养基中,28 °C 培养 24 h 后测生物量和酶活力。如图 3 所示,过酸和过碱的环境均不利于 MB117 的生长和产酶。在 pH 为 5~10 的范围内,MB117 生长和产酶较稳定,其中以 pH 为 7 时最佳。

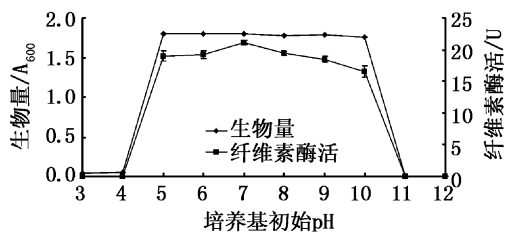


图3 培养基初始 pH 对菌株生长和产酶的影响  
Fig.3 Effects of initial pH of culture medium on growth and CMCase production of strain MB117

### 2.3.4 装液量对菌株生长和产酶的影响

250 mL 三角瓶中分别盛装 25 mL、50 mL、75 mL 和 100 mL 液体发酵培养基,即装液量分别为 10%、20%、30% 和 40%,然后按 1% 的接种量进行接种,28 °C 培养 24 h。如图 4 所示,20% 和 30% 的装液量最利于菌体生长,而 10% 的装液量最利于产酶。10% 装液量时 CMCase 为 25.30 U,20% 装液量时 CMCase 为 18.37 U,为 10% 装液量时酶活的 73%。

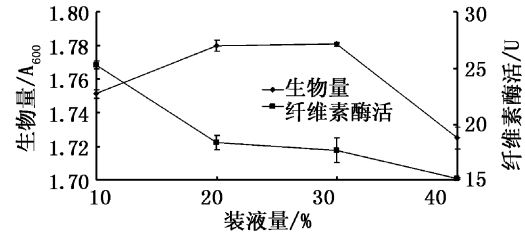


图4 装液量对菌株生长和产酶的影响  
Fig.4 Effects of broth content on growth and CMCase production of strain MB117

### 2.3.5 培养温度对菌株生长和产酶的影响

分别考察了 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C 和 40 °C 培养时 MB117 的生长和产酶情况,结果如图 5 所示。低温有助于菌体生长和产酶,20 °C 时 CMCase 为 36.01 U,25 °C 时 CMCase 为 26.16 U,30 °C 时 CMCase 为 16.20 U,40 °C 时菌体停止了生长和产酶。这与 MB117 来源于海洋环境有关,海洋微生物长期适应了海洋的低温环境,高温不利于其生长和产酶。

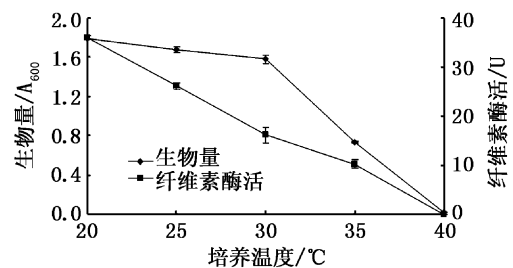


图5 培养温度对菌株生长和产酶的影响  
Fig.5 Effects of temperature on growth and CMCase production of strain MB117

## 2.4 酶学性质初步研究

### 2.4.1 酶反应最适 pH

将酶液与不同 pH 缓冲液配制的一系列底物在 50 °C 保温后,测得的酶活性结果表明:酶反应的最适 pH 为 9.0,CMCase 在 pH 为 7.0~9.0 具

有稳定的、较高的酶活力,能保持最适 pH 时的 90% 以上,pH 为 10.0 时,酶活力为最适 pH 时的 76%,而 pH 为 6.0 时,酶活力仅为最适 pH 时的 63%,说明 MB117 产生的为碱性纤维素酶(图 6)。

#### 2.4.2 酶的 pH 稳定性

将酶液置于不同 pH 环境中保温 60 min,测定剩余酶活力结果表明:该菌产酶在 pH 为 7.0 ~ 10.0 范围内,酶活力均可保持在 85% 以上(图 6),说明该菌株产生的碱性纤维素酶可在较宽的 pH 范围内保持酶活力的稳定性。

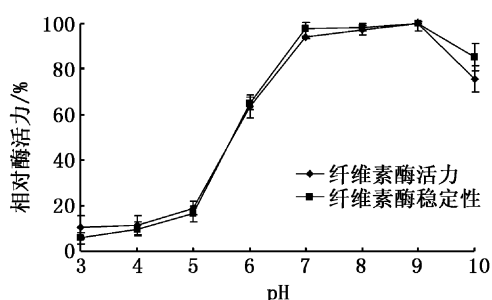


图 6 pH 对纤维素酶活力和稳定性的影响  
Fig. 6 Effects of pH value on CMCase activity and stability

#### 2.4.3 酶反应最适温度

不同温度条件下的酶促反应结果表明:CMCase 的最适反应温度为 40 °C,在 30 ~ 50 °C 范围内具有较高的酶活力,可保持在最适温度时的 85% 以上,而当温度升高至 60 °C 时,酶活力急剧下降至最适温度时的 42% (图 7)。

#### 2.4.4 酶的热稳定性

将酶液在不同温度下保温 60 min 后测剩余酶活力,发现温度超过 30 °C 以后,酶活力下降很快,30 °C 时酶活保持 88%,而 40 °C 时酶活力下降至 35% (图 7)。MB117 产酶不耐高温,与其来源于低温的海洋环境有关。

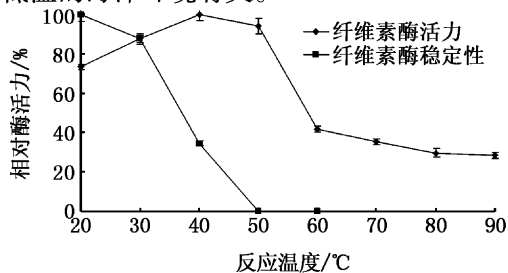


图 7 温度对纤维素酶活力和稳定性的影响  
Fig. 7 Effects of temperature on CMCase activity and stability

### 3 结论

国内只有个别文献报道了对海洋细菌纤维素酶的研究,相关研究主要集中在山东一带,如臧路平<sup>[14]</sup>和徐庆强等<sup>[15]</sup>分别从烟台和青岛等海域分离到具有纤维素酶活性的海洋细菌,而浙江海域内的相关研究除了我们近期的一篇报道外,尚未见其它研究和报道<sup>[16]</sup>。本实验成功从宁波洋沙山海域中筛选到 23 株能够分解纤维素的菌株,其中一株酶活较高的菌株 MB117 经 16S rDNA 鉴定为交替假单胞菌属 (*Pseudoalteromonas* sp.) 细菌。通过摇瓶发酵培养时的产酶条件考察,发现 MB117 菌株培养的最适 pH 为 7,1% 接种量和 10% 装液量最利于产酶,低温有助于菌体生长和产酶。酶学性质研究发现 MB117 产生的为碱性纤维素酶,酶反应的最适 pH 为 9.0,CMCase 在 pH 为 7.0 ~ 9.0 具有稳定的、较高的酶活力,能保持最适 pH 时的 90% 以上,pH 为 10.0 时,酶活力为最适 pH 时的 76%;同时,MB117 产生的碱性纤维素酶可在较宽的 pH 范围内保持酶活力的稳定性,pH 为 7.0 ~ 10.0 范围内酶活力均可保持在 85% 以上;MB117 菌株 CMCase 不耐高温,酶最适反应温度为 40 °C。本研究为今后对该菌株酶活的定向进化等深入研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 陈洪章,李佐虎. 纤维素原料微生物与生物量全利用 [J]. 化工科技市场, 2001(5): 17-20.
- [2] LUTZEN N W, NIELSEN M H, OXENBOELL K M, et al. Cellulase and their applications in the conversion of lignocelluloses to fermentable sugars [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society, 1983, 300: 283-291.
- [3] BHAT M K, BHAT S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications [J]. Biotechnology Advances, 1997, 15: 583-620.
- [4] BHAT M K. Cellulases and related enzymes in biotechnology [J]. Biotechnology Advances, 2000, 5: 355-383.
- [5] SUN Y, CHENG J Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review [J]. Biotechnology Advances, 2002, 83: 1-11.
- [6] MADHU K M, BEENA P S, CHANDRASEKARAN M. Extracellular  $\beta$ -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.

- [7] ZHANG C, LI D, YU H, et al. Purification and characterization of piceid- $\beta$ -D-glucosidase from *Aspergillus oryzae* [J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42(1): 83–88.
- [8] KIM D, BAIK K S, PARK S C, et al. Cellulase production from *Pseudoalteromonas* sp. NO<sub>3</sub> isolated from the sea squirt *Halocynthia roretzi* [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, 36(11): 1375–1382.
- [9] 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.
- [10] GUO B, CHEB X L, SUN C Y, et al. Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo- $\beta$ -1, 4-xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(6): 1107–1115.
- [11] ZENG R, XIONG P, WEN J. Characterization and gene cloning of a cold-active cellulase from a deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. DY3 [J]. *Extremophiles*, 2006, 10(1): 79–82.
- [12] 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.
- [13] NAM Y D, CHANG H W, PARK J R, et al. *Alteromonas 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: 12–18.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 曲均革, 姚晓敏, 朱鹏, 等. 宁波海域产纤维素酶海洋细菌的筛选 [J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(2): 252–256.

## Screening and identification of a cellulase-producing marine bacterium and optimization of its fermentation conditions

QU Jun-ge<sup>1</sup>, YAO Xiao-min<sup>1</sup>, ZHU Peng<sup>2</sup>, YAN Xiao-jun<sup>2</sup>

(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:** A total of 23 cellulase-producing marine bacteria had been isolated from Ningbo Sea area by the CMC/Congo Red method. Then the alkaline cellulase-producing strain MB117 had been made an intensive study of its production of cellulase. According to the 16S rDNA analysis, the strain belonged to the *Pseudoalteromonas* sp.. The optimum initial pH of culture medium for the cellulase production was 7.0. And with 1% -inoculum and 10% -broth content, the maximum production of cellulase can be obtained. Low temperature is good for the growth and cellulase-producing of MB117. The optimum pH for cellulase activity was 9.0, and the strain has a high enzyme activity and a good stability in the basic conditions. The optimum temperature for cellulase activity was 40 °C.

**Key words:** cellulase; marine bacterium; strain screening; fermentation conditions; properties of cellulase