

1 株产碱性纤维素酶软化芽孢杆菌 IS-B4 的选育及产酶条件的研究

肖黎明, 王卫卫, 郭 燕

(西北大学, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西西安, 710069)

摘 要 用紫外线、硫酸二乙酯(DES)、He-Ne 激光诱变和 UV+DES 复合诱变, 对 1 株产碱性纤维素酶的软化芽孢杆菌 IS-B 进行诱变育种, 获得产酶能力是出发菌株 5 倍且产酶性能稳定的高产菌株 IS-B4。采用单因素分析和正交试验对其发酵培养基进行优化, 优化后培养基配方: 蔗糖 2%, 酵母膏 2%, NaCl 0.5%, KH_2PO_4 0.1%。在温度 36℃, pH 9.0, 接种量 5%, 250 mL 三角瓶装液量为 60 mL 的发酵条件下, 酶活力可达 56.0 U/mL。

关键词 软化芽孢杆菌, 碱性纤维素酶, 诱变育种, 条件优化

近年来碱性纤维素酶作为世界各国普遍重视的一种新型酶制剂, 研究发展很快^[1,2]。它对棉纤维的反应, 主要是与棉纤维中 10% 左右的非结晶区的纤维素分子起作用, 并不会明显降低棉纤维的牢固度。由于碱性纤维素酶具有耐碱性强, 热稳定性好, pH 适应范围广, 发酵周期短等优点, 使其在洗涤工业上得到了成功应用^[5-7]。就目前国内有关碱性纤维素酶的研究现状看, 制约其应用的最大障碍是酶活性低, 特别是缺乏耐高温、广适 pH 值的纤维素酶生产菌。本试验以 1 株软化芽孢杆菌 IS-B 为出发菌株, 对其进行紫外线、硫酸二乙酯(DES)、He-Ne 激光诱变和 UV+DES 复合诱变筛选到 1 株能稳定产碱性纤维素酶的菌株 IS-B4, 对其产酶条件进行了优化并进行了酶学性质的初步研究。

1 材料和方法

1.1 菌 株

嗜碱性软化芽孢杆菌(*Bacillus macerans*) IS-B, 由西安理工大学赠送, 本实验室保存。

1.2 培养基

种子培养基: 牛肉膏-蛋白胨培养基, pH 9.0。

发酵培养基(%): 蛋白胨 1.0, 酵母膏 1.0, CMC 1.0, NaCl 0.5, KH_2PO_4 0.1。另配 10% NaCO_3 分开灭菌后与上述培养基成分混合均匀。

1.3 菌种的诱变处理

紫外(UV)诱变^[7]: 用无菌生理盐水将培养 48h 斜面的菌苔洗下, 打散菌体后, 调节菌悬液浓度为

10^8 个/mL。开紫外灯(30 w)预热 20 min, 取 5 mL 至内有磁针的无菌培养皿(9 cm)中, 进行不同时间照射处理。

硫酸二乙酯诱变^[8]: 用 0.1 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液洗下菌苔, 采用同紫外诱变的预处理方法制成浓度为 10^8 个/mL 菌悬液, 取 5 mL 菌悬液加入 DES 0.1 mL, 振荡处理不同时间, 加入 0.5 mL, 25% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液终止反应。

He-Ne 激光诱变: 采用同紫外诱变的预处理方法制备菌悬液, 将 0.2 mL 菌悬液置于已灭菌的小试管中照射, He-Ne 激光($\lambda = 632.8$ nm)的输出功率为 15 mW(减掉玻璃的损耗), 扩束光斑直径 0.3 cm, 输出电流 11 mA, 激光通过玻璃的损耗为 5 mW, 照射距离 20 cm, 辐射不同时间, 立即放入冰水浴中 1~2 h, 适当稀释涂于筛选培养基平板。

UV+DES 复合诱变^[9]: 取紫外照射 50s 后的菌悬液, 接种到摇瓶培养基中, 30℃ 避光培养 48 h, 3000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 按上述 DES 诱变方法振荡处理不同时间。

将处理过的菌悬液适当稀释后涂布于筛选平板, 以未经诱变处理的菌液稀释涂平板作对照。待菌落长出后, 视菌落周围透明圈大小进行初筛, 挑取褪色圈与菌落直径之比较大的菌株接入斜面, 30℃ 培养 30 h 后转接于装有 50 mL 种子培养液的 250 mL 三角瓶中, 培养 24 h, 以 6% 接种量接于发酵培养基中发酵 48 h, 发酵液在 4℃, 5 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液适当稀释, 测定酶活进行复筛。

1.4 产酶条件的确定^[10]

为了确定突变株 IS-B4 的最佳产酶条件, 在摇瓶培养基基础上选用不同的碳源、氮源和金属离子, 对

第一作者: 硕士研究生(王卫卫为通讯作者)。

收稿日期: 2007-12-19

菌株的产酶能力组进行比较,并利用正交设计分析试验结果,确定突变株 IS-B4 产酶的最佳培养基配方。在此基础上利用正交设计对发酵条件(温度、pH 值、接种量、装液量)进行进一步优化,得到最佳发酵条件。

1.5 酶活测定

发酵液经 4 000 r/min 离心 10 min,上清液作粗酶液。酶液用 0.1mol/L Na_2CO_3 - Na_2HCO_3 缓冲溶液(pH9)适当稀释,取 1 mL 稀释液加入试管中,加入 0.5 mL 1%CMC-Na 底物溶液,50℃水浴保温 30 min,加入 DNS 试剂 1 mL,沸水浴 5 min,冷却后加入 4 mL 蒸馏水,振荡摇匀,在 535 nm 波长下,用 721 型分光光度计测值。等量失活酶液同样处理做对照以扣除酶液中还原糖。

在上述条件下,每分钟水解底物产生 1 μmol 还原糖(葡萄糖计)的酶量,定义为 1 个酶活单位(U)。

2 试验结果与分析

2.1 菌株选育

2.1.1 紫外线诱变

经 30、40、50、60、70、80、90 s 时间照射的菌悬液,其中 40 s 剂量最理想,平均致死率为 90%,平均正变率为 10%。从筛选平板上挑选褪色圈与菌落直径之比较大的菌落中筛选出 1 株酶活 28.6 U/mL 的菌株 IS-B1,较出发菌株产酶活力(10.6 U/mL)提高了 170%,连续传代 3 次,酶活力保持稳定,作为进一步诱变的出发菌株。

2.2 突变株产酶条件的研究

2.2.1 不同碳、氮源对突变株 IS-B4 产酶的影响

表 3 不同碳源对 IS-B4 产酶的影响

碳 源	酶活力/U · mL ⁻¹
葡萄糖	10.3
乳 糖	36.5
蔗 糖	54.8
果 糖	8.6
麦芽糖	13.5
淀 粉	15.6
羧甲基纤维素酶(CMC)	36.4
空 白	0.8

表 1 IS-B 菌株诱变谱系

处理方法	致死率 /%	正变率 /%	酶活力 /U · mL ⁻¹	酶活力提高率 /%
UV 照射	90.4	10.2	28.6	170
DES 处理	86.3	8.6	41.5	392
激光处理	83.6	6.5	46.5	439
UV+DES 复合诱变	85.5	26.3	52.3	493

2.1.2 硫酸二乙酯诱变

以紫外诱变所得的突变株 IS-B1 为出发菌株,用 DES 振荡处理。DES 诱变 10 min 时,致死率达 90%,正变率最高,诱变效果最好,从筛选平板上挑取单菌落,经过复筛获得了 IS-B2,该菌株产酶活力为 41.5 U/mL,较出发菌株提高了 392%,且连续传代 3 次酶活力稳定,作为进一步诱变的出发菌株。

2.1.3 He-Ne 激光诱变

经多次试验表明,激光辐射处理 20 min 为最佳激光诱变剂量,选出酶活为 46.5 U/mL 的突变株 IS-B3,连续传代 3 次,酶活力保持稳定。

2.1.4 UV+DES 复合诱变

以 IS-B3 为出发菌株进行 UV+DES 复合诱变。菌株经紫外照射 40 s,再用 DES 处理不同时间,结果得到酶活为 52.3 U/mL 的突变株 IS-B4。

2.1.5 突变株的产酶稳定性

为了验证筛选到的突变株生产碱性纤维素酶的稳定性,经过 10 代传代试验,测定其酶活,结果见表 2,可以看出该突变株的产酶稳定性。

表 2 突变株 IS-B4 的产酶稳定性

传代次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
酶活力/U · mL ⁻¹	51.2	50.8	49.5	51.3	49.4	52.3	52.0	50.4	51.5	52.1

表 4 不同氮源对 IS-B4 产酶的影响

氮 源	酶活力/U · mL ⁻¹
牛肉膏	31.4
蛋白胨	52.3
酵母膏	54.6
NH_4Cl	24.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10.7
NH_4NO_3	13.2
KNO_3	0.4
空 白	0.6

2.2.2 金属离子对 IS-B4 产 CMCase 的影响

在产酶培养基的基础上改用不同的金属离子,菌株产酶情况见表 5。

表 5 金属离子对产 CMCase 的影响

金属离子	酶活力/U·mL ⁻¹
Ca ²⁺	51.3
Mn ²⁺	23.1
Fe ²⁺	42.1
Na ⁺	52.6
Mg ²⁺	31.2
Zn ²⁺	25.3
Cu ²⁺	28.4
K ⁺	46.2

可见 Ca²⁺, Na⁺, Fe²⁺, K⁺ 有利于产酶, Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ 的存在对产酶有抑制作用, Na⁺ 对菌株产酶最有利。

2.2.3 发酵培养基的正交试验设计

以上单因素分析结果显示:蔗糖、酵母膏、NaCl、KH₂PO₄ 为突变株 IS-B4 最佳产酶培养基成分。

表 6 发酵培养基的正交试验 L₉(3⁴) 因素水平

水平	A 蔗糖/%	B 酵母膏/%	C NaCl/%	D KH ₂ PO ₄ /%
1	1.5	1.5	0.5	0.05
2	1.0	1.0	0.75	0.1
3	2.0	2.0	1.0	0.15

表 7 发酵培养基正交试验结果

试验号	蔗糖	酵母膏	NaCl	KH ₂ PO ₄	酶活/U·mL ⁻¹
1	1	1	1	1	37.2
2	1	2	2	2	46.5
3	1	3	3	3	41.2
4	2	1	2	3	31.2
5	2	2	3	1	42.3
6	2	3	1	2	51.3
7	3	1	3	2	46.8
8	3	2	1	3	52.1
9	3	3	2	1	50.6
T ₁	124.93	115.3	140.7	130.25	
T ₂	124.99	141.02	128.48	144.71	A ₃ B ₃ C ₁ D ₂
T ₃	149.66	143.26	130.4	124.62	
R	24.73	27.96	12.22	20.09	RB>RA>RD>RC

由表 7 可以看出,突变株 IS-B4 最佳产酶发酵培养基配比为:蔗糖 2%,酵母膏 2%,NaCl 0.5%,KH₂PO₄ 0.1%。按照此培养基配比进行发酵产酶试验,结果酶活力为 53.26 U/mL,高于正交试验中最大酶活(52.1 U/mL)。

由表 7 中极差 R 值分析可知,所选的 4 个因素中酵母膏是 CMCase 酶活力最主要的影响因子,其次是蔗糖和 KH₂PO₄。

2.3 突变株 IS-B4 产酶条件

2.3.1 种龄对产酶的影响

将不同菌龄的种子液接入最适发酵产酶培养基中进行发酵试验,种龄为 24 h 时,其产碱性纤维素酶效果最好。

2.3.2 培养温度对 IS-B4 产酶的影响

将培养 24 h 的种子液以 6% 的接种量分别接入 pH9 的最适产酶培养基中,在不同温度下进行摇瓶培养,研究培养温度对 IS-B4 产酶的影响,见图 1。

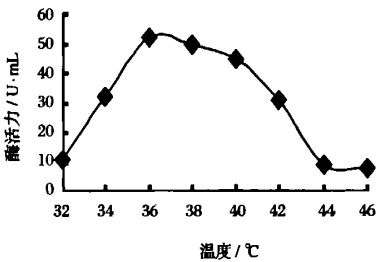


图 1 培养温度对 IS-B4 产酶的影响

试验表明,温度为 36℃ 时,菌株产碱性纤维素酶效果最佳,温度低于 35℃ 或高于 42℃,产酶活力都会显著下降,表明温度的变化对该菌产酶具有较大的影响。

2.3.3 初始 pH 对 IS-B4 产酶的影响

将培养 24 h 的 IS-B4 种子液以 5% 的接种量分别接入不同 pH 值的最适产酶培养基中进行摇瓶培养,研究初始 pH 对 IS-B4 产酶的影响。

由图 2 知,当初始 pH 维持在 9 到 10 时,有利于产酶,pH 为 9.0 时效果最好。pH 低于 8 或高于 10 酶活力显著降低。

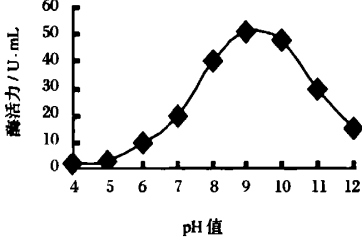


图 2 初始 pH 对 IS-B4 产酶的影响

2.3.4 不同接种量对 IS-B4 产酶的影响

将培养 24 h 的 IS-B4 种子液以不同接种量分别接入最适发酵产酶培养基中,进行摇瓶培养,研究接种量对产酶的影响。

由图 3 可知,对 IS-B4 而言,当接种量为 5% 时,菌株产碱性纤维素酶效果最好。

2.3.5 装液量对 IS-B4 产酶的影响

将发酵 24 h 的种子液以 5% 接种量接种于 pH

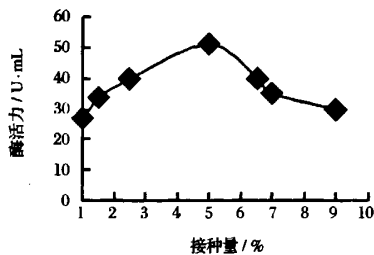


图3 不同接种量对 IS-B4 产酶的影响

为 9 的最适产酶培养基中,发酵培养采用 250 mL 三角瓶,分别装入不同体积的培养液,进行摇瓶培养。由图 4 可知,装液量为 60 mL 时产酶最高。

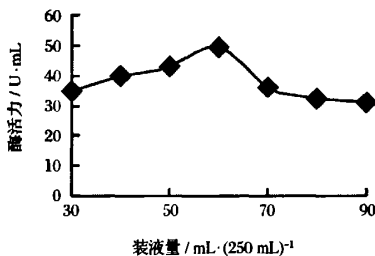


图4 不同装液量对 IS-B4 产酶的影响

3 讨论

国内外对产碱性纤维素酶的微生物菌株进行了较多的研究,目前国内文献记载碱性纤维素酶的酶活最高为 75U/mL 左右,已发现的产酶菌株主要是嗜碱性芽孢杆菌。我们以嗜碱性软化芽孢杆菌 IS-B 为出发菌株,采用紫外线、硫酸二乙酯、He-Ne 激光和 UV+DES 复合诱变,得到突变株 IS-B4,摇瓶产生碱性纤维素酶活力达 52.3U/ml,是出发菌株的 4.93 倍,且具有良好的传代稳定性。

Study on the Screening and Fermentation of Alkaline Cellulase Higher Production Strain *Bacillus macerans* IS-B4

Xiao Liming, Wang Weiwei, Guo Yan

(The Key Labortary of Resource Biology and Biotechnology in Western China(Northwest University), Ministry of Education, Xi'an 710069, China)

ABSTRACT The original strain *Bacillus macerans* IS-B was mutated by UV, DES, He-Ne laser and UV+DES and its enzyme productivity was 5 fold higher than that of parent strain. The continuous 10 generations test shows that the mutant IS-B4 is stable in the alkaline cellulase (CMCase) production. The optimal fermentation conditions for CMCase production were determined by a single-factorial experiment and orthogonal experiment. The results showed that the optimal conditions were as follows: saccharose 2%, yeast extract 2%, NaCl 0.5%, KH_2PO_4 0.1%. The incubation temperature 36°C, inoculum amount 5%, pH 9.0, the load of 250mL-flask was 60mL and the enzyme activity could reach to 56.0 U/mL.

Key words *Bacillus macerans*, Alkaline cellulase, strain breeding, fermentation conditions optimization

在原有培养基基础上选用不同的碳源、氮源和金属离子,对突变株 IS-B4 的产酶能力进行分析比较,并通过正交设计得到最适培养基配方为:蔗糖 2%,酵母膏 2%,NaCl 0.5%, KH_2PO_4 0.1%。在此最适培养基基础上,分析温度、pH 值、接种量、装液量等因素对产酶酶活力的影响。试验结果表明:温度为 36°C, pH 维持在 9 到 10,以发酵 24h 的种子液按 5%接种,装液量为 60 mL,酶活可达 56 U/mL,达到目前国内文献报道的较高水平,为实际生产打下良好基础。

参考文献

- 徐华卿,高红亮,黄静,等.洗涤剂用碱性纤维素酶的研究进展[J].微生物学通报,2002,9(6):90~94
- Charin T N, Naiyatat P N. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulose-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in plup bleaching bioprocesses: a review [J]. Process Biochemistry, 2003,38;1 327~1 340
- Koki H I. Alkaliphiles-from an industrial point of view[J]. Fems Microbiology Reviews,1996,18;259~270
- Rajesh K, Bund, Rekha S. An alkali stable cellulase by chemical modification using maleic anhydride[J]. Carbohydrate Polymers, 2002,47;137~141
- 周丽娜,苏昕,梁莉丽,等.产碱性纤维素嗜碱芽孢杆菌 AH-8 的研究[J].微生物学杂志,2006,26(3):35~39
- Fukumori F, Kudo T, Horikoshi. Purification and properties of acellulase from alkalophilic *Bacillus* sp. No. 1 139 [J]. J Gen Microbiol, 1985,131;3 339~3 345
- 施巧琴,吴刚.工业微生物育种学[M].福州:福建科技出版社,1991:45~59
- 汪世华,白文钊. L-谷氨酰胺高产菌株的诱变育种[J].食品科学,2002,23(3):64~67
- 王弋博,刘向阳.用紫外诱变及紫外+硫酸二乙酯复合诱变方法选育高产异淀粉酶菌株[J].青海大学学报,2003,21(4):7~10
- Hanan Moawia Ibrahim A, Wan Mohtar Wan Yusoff. Optimization of medium for the production of cyclodextrin glucanotransferase using central composite design (CCD)[J]. Process Biochemistry; 2005,40;753~758