

纤维素降解菌 N32 产酶条件优化及其酶学性质

唐玉佳¹, 陈欣¹, 夏萍¹, 吴成伟¹, 冯定胜², 王一丁^{1*}

(1. 四川师范大学生命科学学院, 成都 610101; 2. 四川洁沃生物科技有限公司, 成都 610094)

摘要:本试验筛选出一株高纤维素酶活性菌株—弗村假单胞菌 N32。通过单因素及正交设计试验优化发酵条件, 再利用发酵罐扩大培养, 最后对 N32 酶学性质进行研究。结果表明, 单因素试验显示最佳产酶条件为: 培养时间 3 d, 碳源淀粉, 氮源酵母粉, 初始 pH 5.0, 装液量 100 mL, 培养温度 30 °C, 接种量 2.0%, 摇床速度 160 r/min; 最佳组合为 A₃B₂C₂D₂E₁F₃G₃, 与单因素不同条件 pH 6.0, 摇床速度 140 r/min, 培养温度 35 °C, 装液量 125 mL; 酶学性质研究表明最适温度为 30 °C, 最适 pH 为 4.0, Na⁺、Cl⁻、NO₃⁻、CH₃COO⁻对 CMC 酶活均有一定的激活作用, 而 K⁺、Mg²⁺对 CMC 酶活均产生抑制作用, 尿素、EDTA、SDS 对 CMC 酶活均产生抑制作用, 其中 EDTA 的抑制作用最强。

关键词:纤维素降解菌; 优化; 酶学性质

中图分类号: Q936; TQ925

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)02-0062-04

Optimization of Enzyme Production Condition for Cellulose-degrading Strain N32 and Enzymatic Characterization

TANG Yujia¹, CHEN Xin¹, XIA Ping¹, WU Chengwei¹, FENG Dingsheng², WANG Yiding^{1*}

(1. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101; 2. Sichuan Jie Wo Biotechnology Co., Ltd., Chengdu 610094, China)

Abstract: In this study, a high cellulase activity strain, *Pseudomonas fuchunensis* N32, was screened. The fermentation conditions were optimized by single factor and orthogonal design, and then the fermentation tank was used to expand the culture. Finally, the enzymatic properties of N32 were studied. Finally, the enzymatic properties of N32 were obtained. The results showed that the optimum conditions of enzyme production were as follows: culture time was 3 days, carbon source was starch, nitrogen source was yeast powder, initial pH was 5.0, liquid volume was 100 mL, the culture temperature was 30 °C, inoculum amount was of 2.0%, the speed of shaking table was 160 r/min. The optimal combination was A₃B₂C₂D₂E₁F₃G₃, i.e., initial pH was 6.0, the speed of shaking table was 140 r/min, the culture temperature was 35 °C, liquid volume was 125 mL. The study of enzymatic properties showed that the optimum temperature was 30 °C, and the optimum pH was 4.0%, Na⁺、Cl⁻、NO₃⁻、CH₃COO⁻ had a activation effect on CMC, while K⁺、Mg²⁺ had inhibition effect on CMC activity. Urea, EDTA, SDS had inhibition effect on CMC activity, and EDTA had the strongest inhibition effect.

Key words: Cellulose-degrading bacteria; Optimization; Enzymatic property

纤维素是自然界最为丰富的可再生资源之一, 但纤维素难以降解导致其利用率具有一定的局限性^[1]。近年来纤维素降解方面的研究已有不少报道, 而最经济、环保的方法是微生物等产生的纤维素酶来催化降解纤维素^[2]。

本实验前期从汶川县卧龙自然保护区的森林

土壤中筛选出数株纤维素降解菌株, 复筛选出最佳菌株弗村假单胞菌 N32, 进行产酶条件优化及酶学性质研究, 以期得到 N32 菌株发挥最大效应的产酶条件, 为进一步开发菌剂提供理论基础与菌种资源。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂

羧甲基纤维素钠、蔗糖、硫酸铵等购于成都欣亿维生物科技有限公司。

1.2 培养基

收稿日期: 2019-02-26

基金项目: 四川省高校重点实验室开发项目(SCYZ201408)

作者简介: 唐玉佳(1993-), 女, 在读硕士, 从事环境微生物等研究。

通讯作者: 王一丁, 男, 博士, 教授, E-mail: 410728313@qq.com

培养基参照文献[3-4]。产酶发酵培养基: CMC-Na 10 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KH_2PO_4 2 g, $(NH_4)_2SO_4$ 4 g, 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 5 g, 蒸馏水 1 000 mL。无碳基础培养基: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KH_2PO_4 2 g, $(NH_4)_2SO_4$ 4 g, 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 5 g, 蒸馏水 1 000 mL。无氮基础培养基: CMC-Na 10 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, KH_2PO_4 1 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.3 粗酶液的制备

发酵液 4 °C, 4 000 r/min 离心 20 min, 上清液即粗酶液。按刘爽^[5]方法进行 CMC 酶活测定。

1.4 产酶条件优化

依次改变发酵时间、碳源、氮源、初始 pH、装液量、温度、接种量及摇床速度中的某一因素, 保持其他发酵条件不变, 测定 CMCCase 活性, 研究各因素对产酶的影响^[6-7]。

1.5 正交优化试验

分别设计发酵培养基成分 3 因素 3 水平正交试验和培养条件的 4 因素 3 水平正交试验, 以确

定 N32 最佳发酵培养基成分和培养条件^[8-10]。

1.6 发酵罐优化试验

通过发酵罐和三角瓶液体发酵产酶^[11], 测定菌培养液的 CMC 酶活, 比较两者产酶的情况。

1.7 酶学性质研究

依次改变反应体系的温度和 pH。在最佳温度、pH 条件下配制终浓度为 10^{-3} mol/L 的 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , NO_3^- , CH_3COO^- 的反应体系溶液以及配制加有尿素、EDTA、SDS 蛋白质抑制剂的反应体系溶液。通过测定 CMCCase 活性, 研究各因素对酶活力的影响^[12]。

2 结果与分析

2.1 产酶条件优化

由表 1 可知, 最适产酶条件为: 培养时间 3 d, 碳源淀粉, 氮源酵母粉, 初始 pH 值 5.0, 装液量 100 mL, 培养温度 30 °C, 接种量 2.0%, 摇床速度 160 r/min。

表 1 发酵条件对菌株 N32 产酶的影响

培养时间(d)	1	2	3	4	5
酶活(U/mL)	97.68	145.18	447.94	306.69	234.27
碳源	CMC-Na	Starch	MCC	-	-
酶活(U/mL)	300.95	398.82	247.89	-	-
氮源	蛋白胨	酵母粉	牛肉膏	$(NH_4)_2SO_4$	$NaNO_3$
酶活(U/mL)	198.77	349.71	255.42	41.39	19.34
pH	4	5	6	7	8
酶活(U/mL)	81.54	275.67	170.81	159.52	180.13
装液量(mL)	25	50	75	100	125
酶活(U/mL)	261.16	299.34	243.41	439.69	290.19
培养温度(°C)	20	25	30	35	40
酶活(U/mL)	351.5	374.8	508.53	414.42	283.2
接种量(%)	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
酶活(U/mL)	463.35	488.81	509.24	449.73	400.08
摇床速度(r/min)	120	140	160	180	200
酶活(U/mL)	198.24	263.31	512.11	491.32	313.68

2.2 正交优化试验

2.2.1 培养基成分的正交优化试验

以初始 pH、碳源和氮源作为 N32 培养基成分的优化因素, 设计 3 因素 3 水平正交试验。各因素及水平设计见表 2, 正交试验结果见表 3。

表 2 正交试验设计因素及其水平

水平	pH(A)	碳源(B)	氮源(C)
1	4	CMC-Na	蛋白胨
2	5	Starch	酵母粉
3	6	MCC	牛肉膏

从表 2 和表 3 可见, CMCCase 的最佳组合为 $A_3B_2C_2$, 通过极差分析, 主次因素: $B > C > A$ 。最优培养基成分: 培养基初始 pH 6.0, 碳源为淀粉, 氮源为酵母粉。

2.2.2 培养条件的正交优化试验

以发酵时间、摇床转速、培养温度和装液量作为 N32 培养条件的优化因素, 设计 4 因素 3 水平正交试验, 研究 4 种因素间的最佳组合。各因素及水平设计见表 4, 正交试验设计及结果见表 5。

由表 4 和表 5 可见, CMCCase 的最佳组合为

表3 正交试验结果分析

水平	因素			结果 (CMCase)
	A	B	C	
1	1	1	1	34.62
2	1	2	2	236.55
3	1	3	3	37.58
4	2	1	2	120.53
5	2	2	3	185.06
6	2	3	1	50.76
7	3	1	3	84.90
8	3	2	1	217.87
9	3	3	2	140.83
K ₁	308.76	240.06	303.24	
K ₂	356.35	639.48	497.91	主次因素: B>C>A
K ₃	443.60	229.17	307.55	最优水平: A ₃ B ₂ C ₂
R	134.84	410.31	194.67	

表4 正交试验设计因素及其水平

水平	培养时间 (D)(d)	摇床速度 (E)(r/min)	培养温度 (F)(°C)	装液量 (G)(mL)
1	2	140	25	75
2	3	160	30	100
3	4	180	35	125

表5 正交试验结果分析

水平	因素				结果 (CMCase)
	D	E	F	G	
1	1	1	1	1	307.65
2	1	2	2	2	191.32
3	1	3	3	3	602.67
4	2	1	2	3	643.54
5	2	2	3	1	356.81
6	2	3	1	2	131.99
7	3	1	3	2	558.99
8	3	2	1	3	114.11
9	3	3	2	1	172.92
K ₁	1 101.64	1510.18	553.75	837.38	
K ₂	1 132.33	662.24	1 007.78	882.29	主次因素: F>E>G>D
K ₃	846.02	907.57	1 518.46	1 360.32	最优水平: D ₂ E ₁ F ₃ G ₃
R	286.31	847.97	954.71	532.94	

D₂E₁F₃G₃, 通过极差分析可知, 主次因素: F>E>G>D。最优培养条件: 培养时间 3 d, 摇床转速 140 r/min, 培养温度 35 °C, 装液量 125 mL。

2.2.3 优化条件的验证试验

2.2.3.1 培养基成分的验证试验

因正交试验得到的 N32 最佳发酵培养基成分

组合 A₃B₂C₂ 未在正交表中, 将此最优组合与正交试验表中酶活最高的组合 A₁B₂C₂ 进行验证试验, 结果见表 6。

通过验证试验、极差分析得到的最佳组合比

表6 验证试验结果

组合	酶活(U/mL)
A ₃ B ₂ C ₂	324.88
A ₁ B ₂ C ₂	236.55

正交试验表里最佳组合酶活高, 因此最终确定培养基成分最佳组合为 A₃B₂C₂。

2.2.3.2 培养条件的验证试验

因正交试验得到 N32 最佳发酵培养条件组合 D₂E₁F₃G₃ 未在正交表中, 故将此最优组合和正交试验表中酶活最高的组合 D₂E₁F₂G₃ 进行验证试验, 结果见表 7。

通过验证试验、极差分析得到的最佳组合比

表7 验证试验结果

组合	酶活(U/mL)
D ₂ E ₁ F ₃ G ₃	678.35
D ₂ E ₁ F ₂ G ₃	643.54

正交试验表里最佳组合酶活高, 因此最终确定培养条件最佳组合为 D₂E₁F₃G₃。

2.2.3.3 发酵工艺优化前后产酶比较

通过优化得到新的发酵工艺, 将这两种工艺做比较试验, 结果见表 8。比较试验显示优化后 CMC 酶活是优化前的 1.26 倍。

表8 优化前后发酵工艺及产酶结果比较

	优化前	优化后	酶活提高倍数
培养时间(d)	3	3	
碳源	CMC-Na	Starch	
	蛋白胨,		
氮源	牛肉膏,	酵母粉	
	(NH ₄) ₂ SO ₄		
发酵工艺			
初始 pH	Nature	6	
装液量(mL)	100	125	
培养温度(°C)	37	35	
接种量(%)	1.5	2.0	
摇床速度(r/min)	180	140	
酶活(U/mL)	246.19	309.11	1.26

2.2.4 发酵罐优化试验

在三角瓶培养的基础上, 采用 5 L 发酵罐完成小型发酵实验。比较两者产酶的情况。比较结

果见表9。通过酶活比较,发酵罐酶活力相对较低,可能是因为机械损伤较大等原因,其产酶比较结果与别人研究有所不同。因此,本试验还有待进一步研究。

表9 发酵罐与三角瓶发酵工艺及其产酶结果比较

类型	酶活 (U/mL)
发酵罐	221.99
三角瓶	309.11

2.3 酶学性质研究

随着反应体系温度的增加,CMC酶活呈现先上升再下降的趋势(图1)。当温度达30℃,CMC酶活性最大,为314.04 U/mL。随着温度再升高,CMC酶活性开始下降,温度为60℃时,CMC酶活性降到最低,其值为274.06 U/mL。究其原因可能是温度过低,酶活力相应降低;温度过高,导致酶失活从而影响酶活力值的大小。因此,最适酶促反应温度为30℃。

随着反应体系pH的增加,CMC酶活呈先直线上升然后下降再微微上升最后下降的趋势(图2)。当pH到达4.0时,CMC酶活性达到最高,为

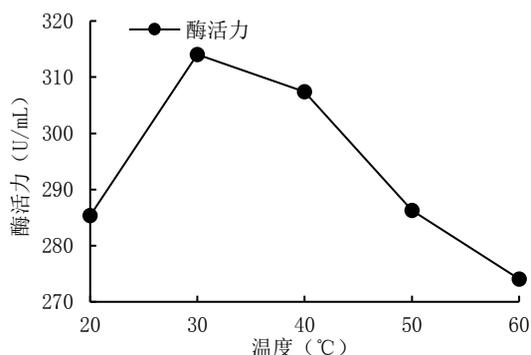


图1 温度对酶活力的影响

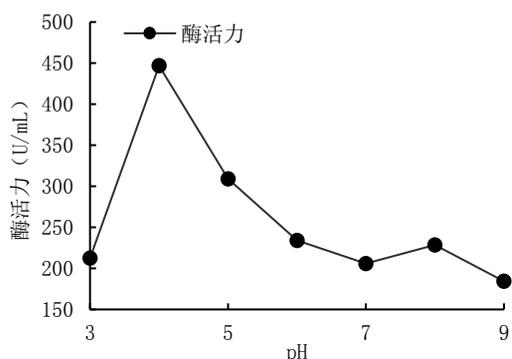


图2 pH对酶活力的影响

446.68 U/mL。随着反应液pH继续升高,CMC酶活性逐渐下降,pH为9时,酶活力最低。因为反应体系溶液过酸过碱均会导致酶失活。因此,最适酶促反应pH值为4.0。

如图3所示, Na^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- 、 CH_3COO^- 对CMC酶活均有一定的激活作用,而 K^+ 、 Mg^{2+} 对CMC酶活均产生了抑制作用。其中 Na^+ 、 Cl^- 的激活效果最佳,由此,在酶促反应中,可适当加入NaCl以提高酶活力。

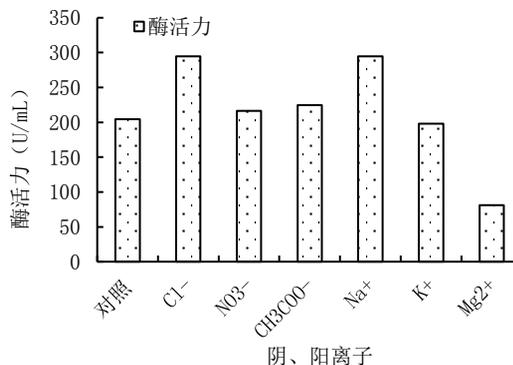


图3 阴、阳离子对酶活力的影响

如图4所示,蛋白酶抑制剂尿素、EDTA、SDS对CMC酶活均产生抑制作用,EDTA的抑制作用最强,酶活分为99.92 U/mL,较CK降低51.13%。

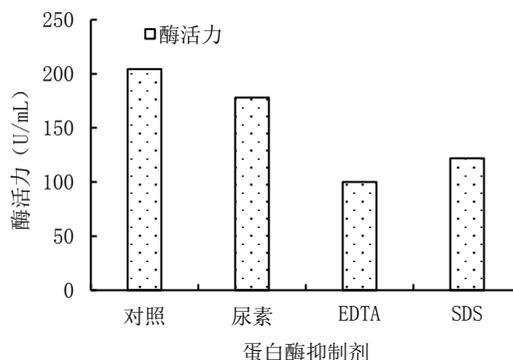


图4 蛋白酶抑制剂对酶活力的影响

3 结论与讨论

目前,大多数工业用的纤维素酶均来自真菌,对细菌和放线菌的研究相对较少^[13-14]。至今也有不少纤维素降解菌的研究报道,郑丽等^[15]从木薯生境中分离到了一株菌株,其糖化和酶活性最佳,经鉴定为解淀粉芽孢杆菌。张喜庆等^[16]从自然发酵的牛粪中分离获得高效纤维素分解菌,经鉴定为枯草芽孢杆菌。熊娟等^[17]对小麦秸秆、玉米秸秆及木材腐烂样品中真核生物的群落结构组成、核心种群以及多样性分析,结果显示,小麦秸秆中微生物最为丰富。迟畅等^[18]从常年堆放秸秆垛下面的新鲜土壤及腐烂秸秆中分离获得3株专性厌氧的纤维素分解菌,经初步鉴定为芽孢梭菌属,并研究出优化后的复合菌剂。

本实验筛选出一株高效降解纤维素菌株—弗村假单胞菌N32。通过单因素优化以(下转第81页)

- [17] 耿文娟, 廖康, 刁永强, 等. 野生欧洲李不同居群亲缘关系的SSR分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(增刊): 2602.
- [18] 耿文娟, 冯贝贝, 梅轩, 等. 野生欧洲李种子萌发特性[J]. 经济林研究, 2017, 35(1): 20-25.
- [19] 乔峰, 李虎, 朱翔, 等. 新疆野生樱桃李扦插繁殖不定根的形成及生长调节剂对扦插成活率的影响[J]. 中国农业大学学报, 2014, 19(5): 73-79.
- [20] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 7-12.
- [21] 邱凤英, 温世钊, 章挺, 等. 不同基质对黄樟扦插繁殖的影响[J]. 经济林研究, 2017, 35(4): 43-48.
- [22] 戴菲, 董胜君, 单守田, 等. 不同基质及生长调节剂对山杏扦插生根的影响[J]. 北方园艺, 2012(13): 32-34.
- [23] 柯存祥. 不同处理对四季秋海棠扦插生根的影响研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(4): 331-334.
- [24] 张树振, 金樑, 周虹, 等. 生长调节剂和基质对紫花苜蓿扦插繁殖效率的影响[J]. 草业科学, 2013, 30(6): 874-879.
- [25] 魏书, 司静. 桃硬枝扦插繁殖技术研究进展[J]. 果树科学, 1994, 11(3): 186-189.
- [26] 马明呈, 雷建元, 杨海文, 等. 不同基质和不同浓度的生根剂对文冠果的扦插育苗的影响[J]. 园艺园林科学, 2006, 22(2): 310-313.
- [27] 邓文韬, 张日清, 袁德义, 等. 植物生长调节剂对非油果嫩枝扦插生根的影响[J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(3): 160-163.

(责任编辑:王昱)

(上接第65页)及正交试验分析得知,其最适产酶条件为:初始pH 6.0,碳源淀粉,氮源酵母粉,培养时间3 d,摇床转速140 r/min,培养温度35 ℃,装液量125 mL,接种量2.0%。比较试验显示优化后CMC酶活是优化前的1.26倍。三角瓶与发酵罐产酶结果显示,发酵罐的酶活相对较低,可能是因为机械损伤较大等原因,其产酶比较结果与别人研究有所不同^[19],因此还有待进一步研究。

对酶学性质的研究得出:酶活性最适温度为30 ℃,最适pH为4.0,Na⁺、Cl⁻、NO₃⁻、CH₃COO⁻对CMC酶活均有一定的激活作用,K⁺、Mg²⁺对CMC酶活均产生抑制作用。尿素、EDTA、SDS对CMC酶活均产生抑制作用,EDTA的抑制作用最强。

参考文献:

- [1] Hasunuma T, Okazaki F, Okai N. A review of enzymes and microbes for lignocellulose biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology[J]. Bioprocess Technology, 2013, 135: 513-522.
- [2] Nogawa M, Goto M, Okada H, et al. L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*[J]. Current Genetics, 2001, 38(6): 329-334.
- [3] Lin Y S, Lie P Y. Separate and screen fungus which can biodegrade cellulose and assay its enzyme activity[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2004, 43: 82-85.
- [4] Yoon J J, Kim Y K. Degradation of crystalline cellulose by the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*[J]. Journal of Microbiology, 2005, 43(6): 487-492.
- [5] 刘爽. 中低温秸秆降解菌的筛选及其秸秆降解效果研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [6] 魏艳红, 熊鹰, 袁永泽, 等. 纤维素酶产生菌HS-F9的筛选鉴定和产酶条件优化[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(2): 274-278.
- [7] 余婷婷, 葛骁, 李买军, 等. 秸秆污泥堆肥产纤维素酶细菌的筛选及产酶条件优化[J]. 生态与农村环境学报, 2013, 29(6): 768-772.
- [8] 王影. 纤维素降解菌的分离筛选、酶学性质及其液体发酵条件的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
- [9] 范艳丽. 纤维素降解菌的筛选及特性研究[D]. 武汉: 武汉科技大学, 2004.
- [10] 刘建国, 韩梅. 一株低温产纤维素酶细菌的筛选及其发酵产酶条件的优化[J]. 食品与发酵科技, 2014(1): 38-41.
- [11] 陈朋, 韩跃武, 胡先望. α-葡萄糖苷酶菌株的选育及发酵条件的研究[J]. 工业微生物, 2007, 37(6): 49-52.
- [12] 黄春凯, 左小明, 王红蕾, 等. 一株产纤维素酶菌株的分离、鉴定及产酶特性[J]. 微生物学通报, 2015, 42(4): 646-653.
- [13] Nagendran S, Hallen-Adams H E, Paper J M, et al. Reduced genomic potential for secreted plant cell-wall-degrading enzymes in the ectomycorrhizal fungus *Amanita bisporigera*, based on the secretome of *Trichoderma reesei*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2009, 46(5): 427-435.
- [14] 杨艳. 纤维素降解菌的筛选、鉴定及发酵产酶特性研究[D]. 南充: 西华师范大学, 2016.
- [15] 郑丽, 张海鹏, 宋艳培, 等. 纤维素降解菌的筛选、鉴定和糖化水平研究[J]. 广东农业科学, 2017, 44(2): 104-111.
- [16] 张喜庆, 勾长龙, 娄玉杰, 等. 高效纤维素分解菌的分离鉴定及堆肥效果研究[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(2): 380-386.
- [17] 熊娟, 龚玉杰, 程志强, 等. 三种不同天然木质纤维素材料降解过程中物种种类、组成和多样性的对比分析[J]. 东北农业科学, 2018, 43(5): 31-37.
- [18] 迟畅, 李洋, 沙洪林, 等. 纤维素厌氧降解菌的分离筛选及复合菌系构建研究[J]. 东北农业科学, 2014, 39(2): 87-92.
- [19] 康东亮, 吕世峰, 阎振丽, 等. 里氏木霉R3液体深层发酵产纤维素酶工艺优化研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2006, 27(5): 47-50.

(责任编辑:王昱)