

# 碱性纤维素酶革兰氏阴性菌株筛选及酶学性质研究\*

刘森林<sup>1,2</sup> 邢苗<sup>1\*\*</sup> 刘刚<sup>1</sup> 余少文<sup>1</sup>

(深圳大学生命科学学院深圳市微生物基因工程重点实验室 深圳 518060)<sup>1</sup>

(东北师范大学生命科学学院 长春 130024)<sup>2</sup>

**摘要:** 用 CMC 平板筛选方法, 从造纸厂碱性淤泥中获得透明圈直径大于 30mm 的产碱性纤维素酶革兰氏阴性菌 H8005。液体摇瓶培养产生碱性 CMC 酶活力高达 4.2 IU/mL。酶学性质初步研究显示, H8005 产生的 CMC 酶反应的 pH 值以 8.0 左右为适; 在碱性条件下具有较高的酶活和一定的稳定性; 反应温度以 55℃ 左右为宜; 且具有较好的温度稳定性。 $Mn^{2+}$  与  $Fe^{3+}$  对酶反应有促进作用,  $Cu^{2+}$  和  $Pb^{2+}$  对酶反应有抑制作用。该菌产生的纤维素酶在棉织品的水洗整理及洗涤剂工业中具有非常良好的应用前景。

**关键词:** 碱性纤维素酶, 革兰氏阴性菌, 筛选

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2005) 04-0091-04

## Screening of Gram Negative Strain Producing Alkali Cellulase and Characterization of the Enzymatic Reactions\*

LIU Sen-Lin<sup>1,2</sup> XING Miao<sup>1\*\*</sup> LIU Gang<sup>1</sup> YU Shao-Wen<sup>1</sup>

(College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen Key Laboratory for Microbial Gene Engineering, Shenzhen 518060)<sup>1</sup>

(College of Life Science, Northeast Normal University, Changchun 130024)<sup>2</sup>

**Abstract:** The Gram negative strain H8005 was isolated from alkali silt on the site of paper mill. Under optimum conditions, the alkali cellulase activity (CMCase) of shaking flask culture of H8005 was 4.2 IU/mL. The optimal conditions for the enzymatic reaction were about 55℃ and pH 8.0. At pH 7.0 ~ 9.0, the enzyme showed high activity and good stability.  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  were the activators and  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  were the inhibitors of the enzyme. The novel cellulase produced by H8005 showed great potential in the textile biofinishing and detergent industry.

**Key words:** Alkali cellulase, Gram negative strain, Screening

纤维素酶产生菌的筛选、酶反应特性、催化机理和纤维素酶的生产及应用研究已成为近 30 年来生物技术领域的研究热点<sup>[1~3]</sup>。目前的研究集中于以木霉 (*Trichoderma*)、曲霉 (*Aspergillus*) 属等真菌产生的酸性纤维素酶。酸性纤维素酶在碱性条件下酶活性较低或根本没有活性、稳定性较差、pH 值适应范围窄等, 这极大限制了纤维素酶在洗涤剂、纺织等工业中的应用。碱性纤维素酶多由革兰氏阳性的芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 产生, 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, 在洗涤剂、纺织等方面应用前景广阔<sup>[4]</sup>。碱性纤维素酶可添加于洗涤剂中提高洗涤效果, 并能使棉纤维织物柔软、复色, 有着独特的去污效果<sup>[5]</sup>。

\* 深圳市科技资助项目 (No. 200325)

深圳市科技重点项目

\*\* 通讯作者 E-mail: xingmiao@szu.edu.cn

收稿日期: 2004-10-15, 修回日期: 2004-12-18

80 年代日本学者 Horikoshi 在嗜碱性芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 中首次发现并分离到碱性纤维素酶<sup>[6]</sup>。目前, 已经分离到的产碱性纤维素酶细菌在分类上多属革兰氏阳性的芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)<sup>[7]</sup>, 对产碱性纤维素酶革兰氏阴性菌株的研究尚未见报道。我们首次筛选到产碱性纤维素酶活力高的革兰氏阴性杆菌 H8005。本文在培养条件优化的基础上, 初步研究了该菌产生的碱性纤维素酶的酶学性质。

## 1 材料与方法

### 1.1 土样来源

取自广东省惠来、东莞和湖北省咸宁等地造纸厂的碱性淤泥。

### 1.2 培养基

1.2.1 筛选培养基: 蛋白胨 10g, 酵母膏 10g, NaCl 5g, CMC-Na 2g, 蒸馏水 100mL, 用 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 或 NaOH 调不同 pH 值, 琼脂 1.5g。

1.2.2 H8005 液体培养基: 蛋白胨 0.25g, 酵母粉 2g, 麸皮 4g, 葡萄糖 3g, CMC-Na 1.5g, NaCl 1g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, 蒸馏水 100mL, pH7.0。

### 1.3 菌种分离方法

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透明圈, 圈的大小在一定程度上反映了产酶能力的强弱。为了能判断准确, 必要时用刚果红染色后用 NaCl 稀溶液冲洗平板, 被酶分解出现的透明圈将变得更为清晰。

### 1.4 摇瓶产酶试验

将筛选到的菌种由斜面接至 30mL (250mL 三角瓶) 液体培养基中, 于 32℃、150r/min 下培养 8h, 制成种子液。然后按 1% 的接种量将种子液加到 50mL (250mL 三角瓶) 相应液体培养基中, 于 32℃、150r/min 条件下进行产酶试验, 定时取样离心后测定发酵液中的酶活力。

### 1.5 纤维素酶活力的测定<sup>[8]</sup>

用 pH8.05 的甘氨酸-NaOH 缓冲液 (0.05mol/L) 制备 1% 的 CMC-Na 溶液, 加入经适当稀释的酶液, 在特定条件下反应 30min, 终止反应后, 用 DNS 法于 540nm 测定还原糖, 并扣除空白试验测定值。将上述条件下每分钟由底物产生 1μmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力国际单位, 用 IU/mL 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种筛选

2.1.1 菌种的初筛、分离纯化和复筛: 从取自造纸厂碱性淤泥的 18 份土样中经稀释涂布平板分离到能在 pH9.0 的 CMC 平板上生长的透明圈直径较大的细菌 12 株。为了筛选到耐碱性强的优良菌株, 分别在 pH9.0、pH10.0、pH11.0 和 pH12.0 的平板上进行复筛, 结果如表 1 所示。由表 1 可见, H8005 菌株产酶所形成的透明圈相对较大, 且在 pH12.0 的平板上具有一定的产酶能力, 表明该菌具有较高的产酶能力和较强的耐碱性。H8005 的菌落呈白色, 圆形, 无菌丝, 与深圳市南山区卫生防疫站合作, 经形态观察和生理生化反应检测, 初步确定 H8005 属革兰氏阴性杆菌。本文主要对菌种

H8005 进行研究。

表 1 不同 pH 条件下平板培养

菌株	pH9.0	pH10.0	pH11.0	pH12.0
	水解圈 (mm)	水解圈 (mm)	水解圈 (mm)	水解圈 (mm)
C3001	26	25	21	0
C3002	30	26	24	18
C3004	34	28	27	17
C4001	28	24	20	17
C4002	27	15	8	0
C4003	28	26	20	15
H1004	24	20	18	15
H1005	22	22	21	16
H2004	21	17	17	16
H3005	24	20	20	17
H7006	28	24	27	18
H8005	34	34	28	16

2.1.2 摇瓶液体培养：在培养基优化的基础上，将 H8005 在摇瓶条件下进行液体培养试验。由图 1 可见，H8005 菌在接种 6h 后生长旺盛，到 48h 生长缓慢，此时培养液中的 CMC 酶活力逐渐趋向稳定，培养 48h 酶活力达到 4.2IU/mL。

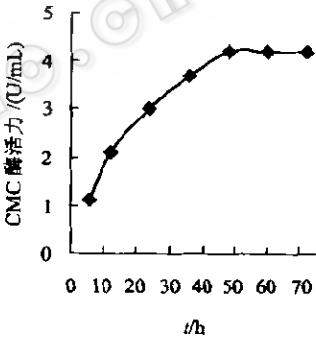


图 1 H8005 液体培养过程

2.2 酶学性质的初步研究

2.2.1 酶反应的最适 pH 值：将 H8005 的 CMC 酶液分别置于不同 pH 条件下测定 CMC 酶活力。结果表明（图 2），酶反应的最适 pH 为 8.0 左右，且在 pH9.0 左右也具有较高的酶活性。说明 H8005 所产生的酶制剂在棉织品生物整理及洗涤剂工业中具有良好的应用前景。

2.2.2 酶反应的 pH 稳定性：将 H8005 的 CMC 酶液分别置于不同 pH 环境中，于 50℃ 保温 60min 后，按常规方法测定酶活力（如图 3）。结果显示，H8005 酶液在 pH7.0 ~ 9.0 范围内，酶活性可保持 80% 以上。可见，该菌产生的纤维素酶在中碱性条件下具较强的稳定性。

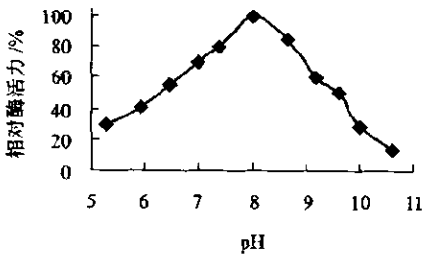


图 2 pH 值对 CMC 酶活力的影响

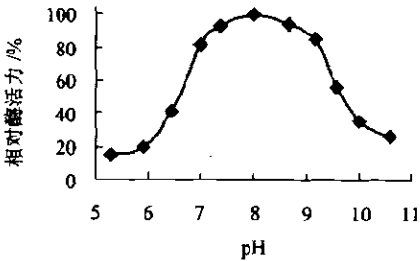


图 3 不同 pH 值条件下 CMC 酶的稳定性

**2.2.3 酶反应的最适温度:** 将 H8005 的酶液分别置于不同温度下, 于 pH8.05 条件下保温 60min 后, 按常规方法测定 CMC 酶活 (如图 4)。由图 4 可见, H8005 的 CMC 酶反应的温度以 55℃ 左右为适。

**2.2.4 酶反应的温度稳定性:** 将 8005 的酶液分别置于不同温度下保温 60min 后, 按常规方法测定 CMC 酶活力, 结果如图 5 所示。由图 5 可见, H8005 酶液在 35℃ ~ 55℃ 范围内, 酶活性可保持 85% 以上, 可见, 该菌产生的纤维素酶在 55℃ 以下具有较强的温度稳定性。

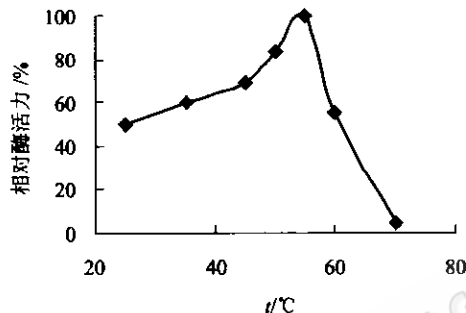


图 4 温度对 CMC 酶反应的影响

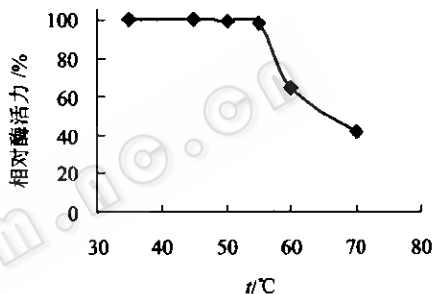


图 5 不同温度条件下 CMC 酶的稳定性

**2.2.5 金属离子对酶活性的影响:** 在酶反应体系中加入不同的金属离子 (0.01mol/L), 测定 CMC 酶活力, 结果如表 2 所示。结果显示,  $Mn^{2+}$  与  $Fe^{3+}$  对酶反应有促进作用,  $Cu^{2+}$  和  $Pb^{2+}$  对酶反应有抑制作用。

表 2 金属离子对酶活性的影响

金属离子	对照	$Cu^{2+}$	$Mg^{2+}$	$Ca^{2+}$	$Mn^{2+}$	$Fe^{3+}$	$Zn^{2+}$	$Pb^{2+}$
相对酶活力/%	100	53	98	99	162	125	82	67

## 参考文献

- [1] Ito S. *Extremophiles*, 1997, 1: 61 ~ 66.
- [2] Damude H G, Gilkes N R, Kilburn D G, *et al.* *Gene*, 1993, 123: 105 ~ 107.
- [3] Cereghino J L, Cregg J M. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24: 45 ~ 66.
- [4] Horikoshi K. *Microbiol Molec Biol Rev*, 1999, 63: 735 ~ 750.
- [5] 宋桂经. *微生物学通报*, 1997, 6: 364 ~ 367.
- [6] Fukumori F, Kudo T, Horikoshi. *J Gen Microbiol*, 1985, 131: 3339 ~ 3345.
- [7] 徐樟卿, 高红亮, 黄 静, 等. *微生物学通报*, 2002, 6: 92 ~ 96.
- [8] 宋桂经, 王 冬, 孙彩云, 等. *微生物学报*, 1995, 1: 1. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>