

产纤维素酶菌株 *B. subtilis* SD-76 产酶条件的优化

赵春雷¹,王金浩²,王应中²,陈丹²,李悦³,排玲玲³,金铁铃³,胡永金^{3*} (1. 云南创新生物产业孵化器管理有限公司,云南昆明 650117;2. 云南万芳生物技术有限公司,云南昆明 650117;3. 云南农业大学食品科学技术学院,云南昆明 650201)

摘要 [目的]探讨培养基起始pH、碳源、氮源和发酵温度对高产纤维素酶菌株*B. subtilis* SD-76产酶的影响。[方法]通过正交分析确定菌株*B. subtilis* SD-76产纤维素酶(CMCase)的最佳培养条件。[结果]菌株*B. subtilis* SD-76产酶的最佳培养条件:培养基初始pH 6.8;培养基稻草粉浓度3.0 g/L;硫酸铵浓度3.5 g/L,发酵温度32℃。在最佳培养条件下,该菌株的CMCase活力达到462.34 U。[结论]为提高*B. subtilis* SD-76产纤维素活力和该菌株的工业产酶生产提供一定的参数和应用依据。

关键词 纤维素酶;发酵条件;酶活性;正交试验
中图分类号 S188;FQ920.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)24-020-02

Optimization on Fermentation Conditions of High-Yield Cellulolytic Enzymes Strain *B. subtilis* SD-76
ZHAO Chun-lei¹, WANG Jin-hao², WANG Ying-zhong², HU Yong-jin^{3*} et al (1. Yunnan Innovative Biological Industry Incubator Management Co. LTD, Kunming, Yunnan 650117; 2. Yunan WONFINE Biological Technology Limited Company, Kunming, Yunnan 650117; 3. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

Abstract [Objective]The influence of the medium initial pH, carbon, nitrogen and fermentation temperature on high cellulase activity production of the strain *B. subtilis* SD-76 was discussed. [Method] The optimal culture conditions were studied by orthogonal analysis. [Result] The optimum fermentation conditions for producing enzyme was pH 6.8; temperature 32℃; straw powder concentration 3.0 g/L; (NH₄)₂SO₄ concentration 3.5 g/L. Under the optimum condition, the enzyme activity was up to 462.34 U. [Conclusion] The study provided a certain parameter and application basis for improving the activity of *B. subtilis* SD-76 producing cellulose and industrial enzyme production of the strain.
Key words Cellulase; Fermentation condition; Enzyme activity;Orthogonal experiment

纤维素是高等植物细胞壁的主要成分,是生物圈中最廉价、最大量永不枯竭的可再生性碳源资源。地球上植物体每年通过光合作用生成数千万吨有机资源,其中三分之一以上为纤维素资源。但这些储存的能量和碳,植物体自身并不重复利用,绝大部分纤维素资源如枯枝落叶等只能废弃到环境中,造成了资源的巨大浪费和环境的污染。有效地转化、开发和利用这一丰富天然资源,对于解决工农业原料来源、能源危机、环境污染等具有重要的现实意义^[1-4]。

目前,生物降解是纤维素降解方面研究最经济、环保的方法。但在生物降解应用过程中,除选育高产优良纤维素酶(CMCase)菌株外,产酶发酵条件同样非常重要。即使同一菌种,若培养基类型、实验设备及发酵条件不同,菌种产酶的能力也存在较大差异。对于不同菌种,则产酶差异更大。因此,笔者以大围山原始森林土壤中筛选出一株产纤维素酶活力高的菌株*B. subtilis* SD-76为出发菌,探讨培养基起始pH、碳源、氮源和发酵温度对高产纤维素酶菌株*B. subtilis* SD-76产酶的影响,并通过正交分析确定产纤维素酶的最佳培养条件,以期为提高*B. subtilis* SD-76产纤维素活力和该菌株的工业产酶生产提供一定的参数和应用依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 菌种:*B. subtilis* SD-76,分离自云南大围山原始森林土壤。

产酶发酵基础培养基:羧甲基纤维素钠 10 g,硫酸铵 4

g,磷酸二氢钾 2 g,七水合硫酸镁 0.5 g,蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g,加水至 1 000 ml。121℃,灭菌 30 min 后冷却备用。

其他原料:碳源:麸皮,玉米芯,羧甲基纤维素(CMC),玉米秸秆,稻草粉,豆渣。麸皮、玉米芯、玉米秸秆用小型粉碎机进行粉碎,过 20 目筛后备用。氮源:2.0 g/L 牛肉膏,2.0 g/L 蛋白胨,4.0 g/L 酵母粉,1.5 g/L 硫酸铵,2.5 g/L 硝酸钠,1.5 g/L 氯化铵。

1.2 试验方法

1.2.1 初始 pH 对 *B. subtilis* SD-76 产酶的影响。用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液将培养基初始 pH 分别调制成 2.8、3.8、4.8、5.8、6.8、7.8、8.8,接种后于 30℃恒温培养 72 h,测定其酶活力。每组 3 个平行。

1.2.2 温度对 *B. subtilis* SD-76 产酶的影响。将接种*B. subtilis*SD-76 后的产酶发酵培养基分别置于 24、26、28、30、32、34 和 36℃,恒温培养 72 h 后,测定其酶活力。每组 3 个平行。

1.2.3 碳源对 *B. subtilis* SD-76 产酶的影响。分别以麸皮、玉米芯、CMC、玉米秸秆、稻草粉、豆渣作为唯一碳源,培养基经 121℃高压灭菌,接种后于 30℃恒温培养 72 h,测定其酶活力。每组 3 个平行。

1.2.4 氮源对 *B. subtilis* SD-76 产酶的影响。分别将牛肉膏、蛋白胨、酵母粉、硫酸铵、硝酸钠、氯化铵溶解于 10 ml 水中,分别加入装有 10 g 稻草粉的 250 ml 三角瓶中,搅拌均匀,121℃灭菌接种后于 30℃恒温培养箱培养 72 h,测定其酶活力。每组 3 个平行。

1.2.5 发酵培养优化试验。在单因素发酵产酶的基础上,以初始 pH、发酵温度、稻草粉浓度、硫酸铵浓度 4 个因素作为影响菌株*B. subtilis* SD-76 发酵生产纤维素酶的主要因子。

基金项目 国家自然科学基金项目(30960308);云南省自然科学基金项目(2008ZC057M);云南科技计划项目公共科技服务平台(20120DA004)。
作者简介 赵春雷(1985-),男,黑龙江兰西人,硕士,从事食品酶学和生物技术研究。* 通讯作者,教授,博士,从事微生物与生物技术研究。
收稿日期 2015-06-17

设计 4 因素 3 水平正交试验,因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平 $L_9(3^4)$

水平	初始 pH	发酵温度//℃	稻草粉//g/L	硫酸铵//g/L
1	4.8	28	2.5	2.5
2	5.8	30	3.0	3.0
3	6.8	32	3.5	3.5

1.2.6 纤维素酶活性测定。CMCase 酶活的测定参照文献[5]。

1.3 数据分析 试验数据采用 SPASS 16.0 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 初始 pH 对 *B. subtilis* SD-76 产酶的影响 由图 1 可知,当培养基初始 pH 在 2.8~6.8 时,随着 pH 的升高,菌株 *B. subtilis* SD-76 产纤维素酶呈上升趋势,当初始 pH 6.8 时纤维素酶活力达到最大值 392.83 U。当培养基初始 pH 大于 6.8 后,随着 pH 的增加菌株 *B. subtilis* SD-76 产纤维素酶呈下降趋势。因此选择起始 pH 6.8。

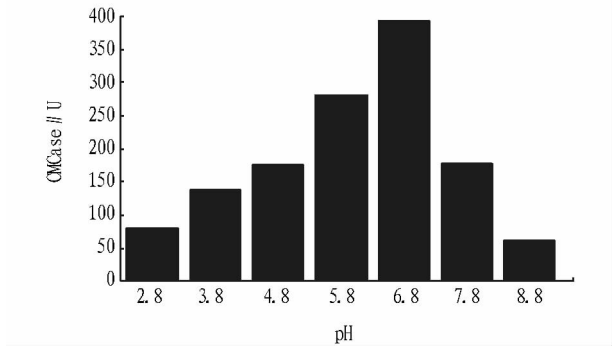


图 1 初始 pH 对 *B. subtilis* SD-76 产酶的影响

2.2 温度对 *B. subtilis* SD-76 产酶的影响 由图 2 可知,当温度在 20~30℃ 时,随着发酵温度增加,菌株 *B. subtilis* SD-76 产纤维素酶呈上升趋势,当发酵温度为 30℃ 时纤维素酶活力最高,可达 395.47 U。而纤维素酶活力达到最高值后,随发酵温度继续升高则产酶下降。可见发酵温度对产酶效果有明显影响,因此发酵温度选择 30℃。

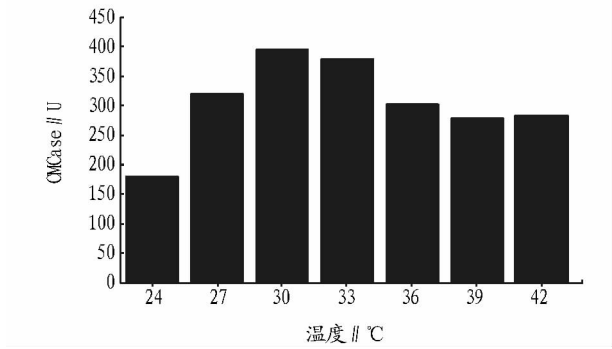


图 2 温度对 *B. subtilis* SD-76 产酶的影响

2.3 碳源对 *B. subtilis* SD-76 产酶的影响 由图 3 可知,所选的几种碳源都能使 *B. subtilis* SD-76 产酶,但不同的碳源,产酶量不同。产酶量最高的是稻草粉,其次为玉米芯、豆渣、CMC 和玉米秸秆,最低的是麸皮。

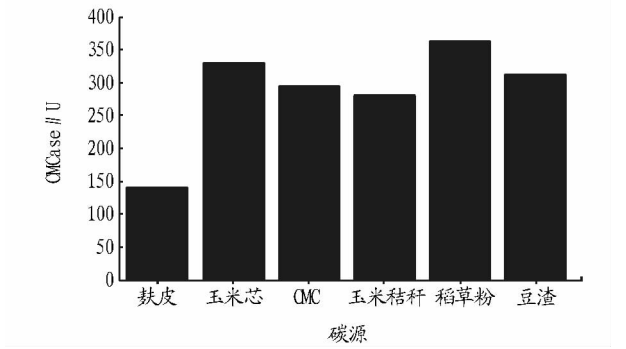


图 3 碳源对 *B. subtilis* SD-76 产酶的影响

2.4 氮源对 *B. subtilis* SD-76 产酶的影响 由图 4 可知,所选用的几种氮源都能使 *B. subtilis* SD-76 产酶,但不同的氮源,产酶量不同。其中硫酸铵为氮源能够有效提高产纤维素酶的能力,因此选择硫酸铵作为氮源。

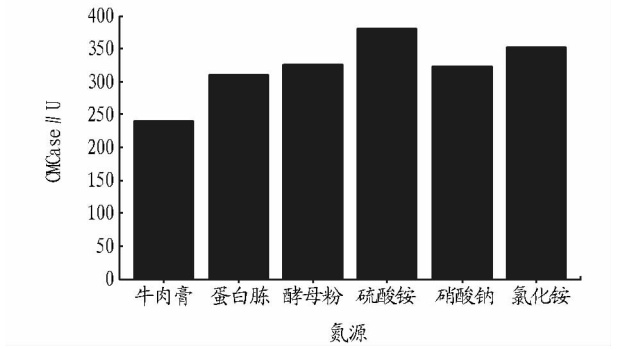


图 4 氮源对 *B. subtilis* SD-76 产酶的影响

2.5 菌株 *B. subtilis* SD-76 的最佳产酶条件 对正交试验各摇瓶编号的提取酶液,测定 CMCase 活性。结果见表 2。

表 2 发酵培养基正交试验结果

试验号	初始 pH	发酵温度	稻草粉	硫酸铵	CMCase
		℃	g/L	g/L	U
1	1(4.8)	1(28)	1(2.5)	1(2.5)	196.43
2	1	2(30)	2(3.0)	2(3.0)	332.68
3	1	3(32)	3(3.5)	3(3.5)	340.25
4	2(5.8)	1	2	3	348.60
5	2	2	3	1	338.18
6	2	3	1	2	346.85
7	3(6.8)	1	3	2	401.30
8	3	2	1	3	398.22
9	3	3	2	1	459.54
k_1	289.787	315.443	313.833	331.383	
k_2	344.543	356.360	380.273	360.277	
k_3	419.687	382.213	359.910	362.357	
R	129.900	66.770	66.440	30.974	

由表 2 可知,以 CMCase 活力为衡量指标时,初始 pH、发酵温度、稻草粉浓度、硫酸铵浓度 4 个因素对酶活力大小影响次序为 A、B、C、D,即影响 *B. subtilis* SD-76 产酶最大的是培养基初始 pH,其次为发酵温度、硫酸铵浓度和稻草粉浓

(下转第 23 页)

重。②外加氮素。向培养箱中加入 50 g 硝酸钠和 1.5 g 磷酸二氢钾。③氮素及螺旋藻浓度测定。1~2 min 后取 5 ml 藻液用真空泵抽滤,记时间为 0,将所得滤液稀释 10 倍后测其 OD_{210} ,并将此时的滤渣放入电热鼓风干燥器干燥 12 h 至恒重。每间隔一段时间重复试验。④抽滤后溶液的 OD 值测定。采用石英比色皿在 U-2000 型紫外可见分光光度计上测定,螺旋藻干重由电子天平称量(螺旋生长变化趋势情况采用称量干重来代表,N 浓度用所测得的 OD 值与标准曲线对比查找得到)。

2 结果与分析

反应器中原始的吸光值 $OD_{210}=2.715$,初始 5 ml 藻液螺旋藻干重为 0.003 4 g。

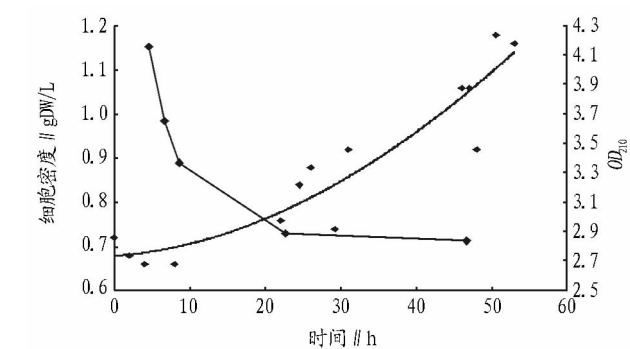


图1 螺旋藻生长和氮素含量随时间的变化

由图 1 可知,加入氮素营养后的前 20 h,氮素被急剧消耗。20 h 后,氮素消耗减慢,而螺旋藻细胞仍然快速生长,说明前 20 h 的氮素营养主要用于补偿细胞接种前的 N 素缺乏。当培养时间为 50 h 左右时细胞干重增长速率达到最大,故此时硝酸钠浓度为 0.8 g/L,所得细胞密度为 1.18 g/L,产量为 21.8 g/(m²·d)。

(上接第 21 页)

度。*B. subtilis* SD-76 产纤维素酶的最佳条件为 A₃B₃C₂D₃,即发酵最佳条件为 pH 6.8,温度 32 ℃,稻草粉浓度 3.0 g/L,硫酸铵浓度为 3.5 g/L,该菌株的酶活达到 462.34 U。

3 结论

(1) 适合该菌株 *B. subtilis* SD-76 液体摇瓶发酵的碳源为稻草粉;氮源为硫酸铵;培养基初始 pH 为 6.8;发酵温度为 30 ℃。在最适 pH 和最适温度下培养,该菌株的纤维素酶活力分别达到 392.83 和 395.47 U。

(2) 菌株 *B. subtilis* SD-76 的最佳产酶条件为:培养基初始 pH 为 6.8;发酵温度为 32 ℃;稻草粉浓度为 3.0 g/L;硫酸

3 讨论

在该试验培养条件中硝酸钠浓度 0.8 g/L,其他盐浓度同 Zarrouk 改良培养基,接种量为 1/10,培养温度为 10~20 ℃,光照强度为 10 000~20 000 lx,50 L,所得细胞密度为 1.18 g/L,产量为 21.8 g/(m²·d)。而目前大面积养殖采用的开放池得到细胞密度为 0.5 g/L,产量 10 g/(m²·d),即该试验条件下培养螺旋藻比开放池培养具有更高的产量。

参考文献

- [1] 刘娟妮,王雪青,魏丹,等.螺旋藻多糖的积累与抗肿瘤作用的研究[J].海洋通报,2009(6):41-45.
- [2] 陈新美,王晓华.螺旋藻藻蓝蛋白的稳定性及抗癌活性研究[J].氨基酸和生物资源,2006(1):59-62.
- [3] 杨磊,夏宁,滕建文,等.酶解螺旋藻泥制备活性肽的工艺条件优化研究[J].食品科技,2009(12):244-249.
- [4] 张莹.钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)藻蓝蛋白的酶解及酶解产物的生物活性研究[D].济南:山东大学,2006.
- [5] 李定梅.我国微藻产业的发展概况和前景(一)[J].粮食与饲料工业,2001(5):26-27.
- [6] CIFERRI O. *Spirulina*, the edible microorganism[J]. Microbiological Reviews, 1983, 47(4):551-578.
- [7] 李博生.螺旋藻新种的发现与其生理及分子生物学特性的研究[D].北京:北京林业大学,2003:35-40.
- [8] 胡鸿钧.国外螺旋藻生物技术的现状及发展趋势[J].武汉植物学研究,1997,15(4):369-374.
- [9] 胡鸿钧.螺旋藻生物学及生物技术原理[M].北京:科学技术出版社,2003:10-32.
- [10] 胡鸿钧.螺旋藻养殖原理技术应用[M].北京:中国农业出版社,2002:1-9.
- [11] 李全顺,贾庆舒.螺旋藻的生物特性及其应用价值[J].沈阳教育学院学报,2006,8(2):122-125.
- [12] 曹健,高孔荣.无机碳源和有机碳源的相对含量和相互作用对螺旋藻混合营养生长的影响[J].食品科学,1997,18(12):6-9.
- [13] 田华,赵琪,郭敏.影响螺旋藻生物量的因素研究进展[J].贵州工业大学学报:自然科学版,2005,34(3):28-32.
- [14] 曹世民.螺旋藻两种氮源的比较研究[J].海湖盐与化工,2000,29(5):30-32.
- [15] 李夜光,胡鸿钧,龚小敏.螺旋藻培养液 pH 值变化的机理和碳源利用率的研究[J].生物工程学报,1996(S1):242-248.

铵浓度为 3.5 g/L。在最佳条件下培养,该菌株的酶活达到 462.34 U。

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] DUNLAP C E, CHIANG L C. Cellulose degradation-a common Link[M]//SHULER M L. Utilization and recycle of agriculture wastes and residues. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc, 1980.
- [3] 薛桥丽,王炜,胡永金,等.堆肥中高温纤维素酶菌株的筛选及其酶性质研究[J].中国酿造,2012,31(1):30-33.
- [4] 陈洪章.纤维素生物技术[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [5] ACEBAL C, CASTILLON M P, ESTRADA P, et al. Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* QM9414 on physically treated wheat straw[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1986, 24:218-223.