

海洋产纤维素酶草螺菌的筛选及产酶条件优化

姜乃文, 薛永常*

(大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116034)

摘要 采用羧甲基纤维素钠(CMC-Na)培养基和刚果红染色法,从大连黑石礁海域潮间带沙泥的混合水样中筛选出1株产纤维素酶的海洋杆菌。进行了形态学与生理生化鉴定和16S rDNA鉴定及构建系统发育进化树,鉴定结果证明,该菌株属于草螺菌(*Herbaspirillum huttiense*)。单因素实验表明,最优产酶条件为pH 8.5、接种量 $\geq 5\%$ 、CMC-Na为碳源,蛋白胨为氮源。在单因素实验基础上,选取影响纤维素酶活力较大的3个因素pH、CMC-Na和蛋白胨,利用正交试验优化草螺菌产纤维素酶的最佳条件为pH 8.0、CMC-Na 1.5 g、蛋白胨 1.5 g,优化后酶活力提高为10.498 U/mL。筛选的海洋草螺菌,为大连海域首次发现,具有重要的研究意义。

关键词 草螺菌;纤维素酶;筛选;发酵优化;正交实验

中图分类号 Q938.8

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2020)04-0009-08

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2020.04.002

Screening of Marine Cellulase-Producing *Herbaspirillum huttiense* and Enzyme Producing Conditions Optimization

JIANG Nai-wen, XUE Yong-chang

(Schl. of Bio-Engin., Dalian Polytech. Uni., Dalian 116034)

Abstract Adopting sodium carboxymethylcellulose (CMC-Na) medium and Congo red staining method, one cellulase-producing marine bacillus strain was isolated from the mixed water-sand sample in Heishi (black stone) reef sea area in Dalian. Morphological, physiological-biochemical characterization, and 16S rDNA sequences analysis as well as phylogenetic tree construction were carried out, the results of the identification had proved that the strain belonged to *Herbaspirillum huttiense*. Single-factor experiments showed that its optimized fermentation conditions were as follows: pH 8.5, inoculation volume was $\geq 5\%$ (v/v); carbon source was CMC-Na and nitrogen source was peptone. And three most affecting factors, pH, CMC-Na and peptone were selected for orthogonal experiment, and the optimized fermentation conditions were as follows: pH 8.0, CMC-Na 1.5 g, and peptone 1.5 g, the cellulase activity increased to 10.498 U/mL after the optimization. The screened *Herbaspirillum huttiense* is the first discovered in Dalian sea area and possessed important significance in future research.

Keywords *Herbaspirillum huttiense*; cellulase; screen; fermentation optimization; orthogonal experiment

纤维素是地球上最丰富的可再生生物聚合物,是地球上分布最广、含量最丰富的碳水化合物。环境中存在较多含有纤维素成分的物质,在传统有机溶剂中很难被降解^[1],并容易对环境造成污染。纤维素酶是一类包括多种水解酶,能将

纤维素水解成葡萄糖的复杂的家族,一般分为三类:内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶^[2];纤维素酶可以降解多种类多糖,纤维素可以被纤维素酶分解为小分子糖类^[3],更利于纤维素转化为其他物质。不同菌株产纤维素酶的途

基金项目:辽宁省自然科学基金项目(20180550858)

作者简介:姜乃文 女,硕士研究生。主要研究方向为微生物与分子生物学。E-mail:Jiangnw95@163.com

* 通讯作者。男,教授,博士,硕士生导师。主要研究方向为海洋微生物学基因及功能分析。E-mail:xueych@dlpu.edu.cn

收稿日期:2019-12-11

径^[4,5]各不相同,目前对于产纤维素酶的陆地微生物研究较多,大多数是霉菌,例如烟曲霉^[5]、小刺青霉^[6]、里氏木霉^[7-8]、黑曲霉^[9]。而海洋产纤维素酶微生物^[10-11]研究相比较少,主要集中在海洋细菌,种类单一。Gao 等^[12]的研究使海洋细菌产纤维素酶时间缩短,提高了纤维酶的产率并降低了生产成本;Gupta 等^[13]利用大肠埃希菌整合纤维素酶基因,而使纤维素酶稳定生产。本研究筛选的草螺菌属于革兰阴性菌,因呈螺旋状且定植在草本植物而得名。依据李韵^[14]研究,草螺菌嗜有机酸,高浓度糖培养基中依旧可以生长,主要用于植物的固氮作用;王婷等^[15]对茶叶中分离的草螺菌产生 NH_4^+ 和嗜铁载体但无固氮酶活力;刘伟林等^[16]从茶树分离的草螺菌能利用糖醇类物质产酸、有机酸类和氨基酸为碳源,也是一种绿色的促进生长剂。目前从植物中分离草螺菌较普遍,草螺菌可利用多种底物,并代谢不同种酶的机制,具有重要的研究意义。本研究用刚果红染色法^[11,17],从海域潮间带沙泥和藻类混合水样中筛选出 1 株产纤维素酶的海洋杆菌,利用生理生化特征^[18]结合分子生物学方法^[19]对目的菌株进行鉴定,采用单因素试验和正交试验以确定产酶的最优条件,并对该菌株进行的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 大连市黑石礁海域潮间带的沙泥和藻类混合水样。

1.1.2 培养基(g/L) ①初筛培养基:蛋白胨 20.0,酵母浸粉 10.0,葡萄糖 20.0,琼脂粉 20.0,陈海水配制,pH 6.0,121 °C 灭菌 20 min;②选择培养基:CMC-Na 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, K_2HPO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5,琼脂粉 20.0,去离子水配制,pH 7.5,121 °C 灭菌 20 min;③发酵培养基:CMC-Na 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, K_2HPO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5,去离子水配制,pH 7.5,121 °C 灭菌 20 min;④牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 3.0,蛋白胨 10.0,NaCl 5.0,去离子水配制,pH 7.4,121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂 琼脂粉、酵母浸粉、蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 K_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、甘露醇、CM

纤维素钠盐 800 ~ 1 200 (CMC-Na)、牛肉膏、氯化钠、Gold view I 型核酸染色剂、细菌 DNA 提取试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)、实验所用引物由宝生物工程(大连)股份有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 海洋产纤维素酶菌株的筛选 从大连黑石礁海域潮间带区域采集泥沙和藻类混合水样,静置后取样,梯度稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,涂布于初筛培养基上,30 °C 恒温培养 12 ~ 18 h;观察菌株的生长状况。待长出菌落后,挑取单菌落在选择培养基上划线培养,30 °C 恒温培养 12 ~ 18 h,观察单菌落^[18]。将筛选所得的目的菌株接种于选择培养基,30 °C 恒温培养 3 ~ 4 d,滴加刚果红染色液染色 2 h,倾倒入未结合的刚果红染色液,1 mol/L NaCl 脱色 30 min^[11,17],观察培养基中是否有透明圈出现。选择透明圈大的菌株用于鉴定。

1.2.2 形态、生理生化特征与分子生物学鉴定

对筛选所得的目的菌株进行形态观察和显微镜镜检,并依据《伯杰细菌鉴定手册》^[20]和《常见细菌系统鉴定手册》^[21]进行生理生化特征试验。基因组 DNA 的提取^[24]参照生工生物工程(上海)股份有限公司的细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒说明书。使用细菌的 16S rDNA 序列扩增的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增其 16S rDNA。PCR 反应条件:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 70 s,35 个循环;72 °C 延伸 8 min;4 °C 保藏。扩增产物交由北京六合华大基因股份有限公司进行双向测序。将测序拼接结果提交到 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,并用 ClustalW 2.0 进行同源性分析和 MEGA 6.0 软件构建进化树。

1.2.3 SDS-PAGE 电泳检测 将已构建含有目的基因的重组质粒转入 BL21 大肠埃希菌感受态细胞,热激后涂布在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上培养;挑取表达菌株于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的液体培养基中培养。当 OD 值达到 0.6 时,添加 0.5 mmol/L 诱导剂 IPTG,分别于 20 °C、37 °C 条件下培养,未添加诱导剂的培养基作为对照。将收集到的菌体经超声破碎、离心,将离

心后的上清和沉淀分别处理,再进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.4 酶活力测定 将筛选得到的目的菌株分别接种于发酵培养基中,30 ℃ 恒温,170 r/min 摇床发酵 3~4 d,取 1 mL 发酵液 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1 mL,加入 1 mL 的 1% CMC-Na 溶液,55 ℃ 恒温水浴反应 30 min,加入 1 mL DNS,沸水浴显色 10 min,加入 2 mL 去离子水,混合均匀,于 540 nm 测定吸光度。纤维素酶活力单位:在 30 ℃ 的条件下,菌体每分钟从羧甲基纤维素钠中降解释放 1 μmol 葡萄糖所需要的酶量,为 1 个酶活力单位 U,即 $1 \text{ U} = 1.0 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ 。

1.2.5 草螺菌生长曲线绘制 将筛选得到的草螺菌接种于牛肉膏蛋白胨培养基中,30 ℃,170 r/min 摇瓶培养,每隔 1 h,于 600 nm 下测定吸光度,绘制生长曲线。

1.2.6 pH 对草螺菌产纤维素酶活力的影响 在 pH 7~9 标准试验条件下测定 pH 对纤维素酶活力的影响。不同 pH 值于 540 nm 下测定吸光度,计算草螺菌产纤维素酶活力。测定时其他最适条件:温度 30 ℃,菌液接种量 5%,摇瓶发酵 24 h,以确定反应最适 pH。

1.2.7 接种量对草螺菌产纤维素酶活力的影响

接种量范围(体积分数)设置为 0%~12.5%,其间隔为 2.5%,恒温培养箱控温,在不同接种量下,于 540 nm 测定吸光度,计算草螺菌产纤维素酶活力。测定时其他最适条件:pH 8.5,温度为 30 ℃,摇瓶发酵 24 h,以确定反应最适接种量。

1.2.8 不同碳源对草螺菌产纤维素酶活力的影响 在选择培养基中分别加入 CMC-Na、滤纸、棉花不同碳源,测定不同碳源对纤维素酶活力的影响,于 540 nm 测定吸光度,计算草螺菌产纤维素酶活力。测定时其他最适条件:pH 8.5,温度为 30 ℃,菌液接种量 5%,初始氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,170 r/min,摇瓶发酵 24 h,以确定反应最适碳源。

1.2.9 不同氮源对草螺菌产纤维素酶活力的影响 在选择培养基中分别加入蛋白胨、酵母浸粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 不同氮源,测定不同氮源对纤维素酶活力的影响,于 540 nm 测定吸光度,计算草螺菌产纤维素酶活力。测定时最适条件:pH 8.5,温度为 30 ℃,菌液接种量为 5%,初始碳源为 CMC-Na,摇瓶发酵 24 h,以确定反应最适氮源。

1.2.10 正交试验 在单因素的实验基础上,以纤维素酶的酶活力为考察指标,选取 pH、CMC-Na、蛋白胨 3 个因素,并在每个因素下分别选取 3 个水平。pH:7.5、8.0、8.5;CMC-Na 含量:0.5、1.0、1.5 g;蛋白胨含量:0.5、1.0、1.5 g;采用 $L_9(3^3)$ 正交表,进行 3 因素 3 水平正交试验。

2 结果与分析

2.1 海洋产纤维素酶杆菌的筛选及形态特征和生理生化特征

将采自黑石礁潮间带的混合水样经平板富集培养,培养基刚果红染色,筛选得到 1 株产纤维素酶的杆菌,暂命名为 J-1。图 1 所示,该菌落呈乳白色,表面较光滑,边缘整齐,湿润,有光泽。图 2 所示,显微镜镜检其细胞直杆状,两端椭圆,不产芽胞。参考《伯杰细菌鉴定手册》^[20] 和《常见细菌系统鉴定手册》^[21] 对筛选的杆菌进行生理生化试验,其结果如表 1。

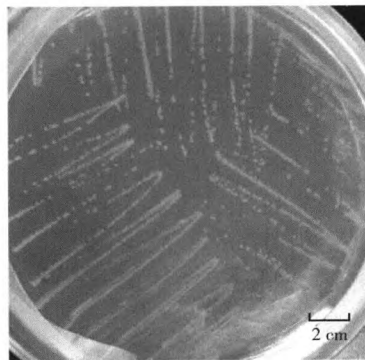


图 1 菌株 J-1 菌落形态

Fig. 1 The colony photograph of strain J-1

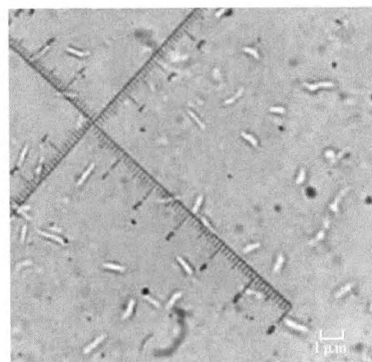


图 2 菌株 J-1 细胞形态

Fig. 2 The cell morphology of strain J-1

表 1 J-1 菌株生理生化特性

Table 1 The physiological and biochemical characteristics of strain J-1

特征	结果	特征	结果
糖发酵	葡萄糖 +	乳糖 -	
	果糖 +	琥珀酸 -	
	麦芽糖 +	淀粉 +	
	乳糖 +	麦芽糖 +	
	蔗糖 +	乙醇 -	
	淀粉 +	肌醇 +	
	木糖 +	柠檬酸 -	
酪蛋白试验	酪蛋白分解 -	葡萄糖 +	
淀粉水解试验	淀粉分解 +	蔗糖 -	
过氧化氢酶试验	产气 -	果糖 +	

注：“+”为阳性反应；“-”为阴性反应

综合形态特征和生理生化特征结果,初步判定筛选得到的 J-1 菌株属于草酸杆菌(*Oxalobacter allison*)。

2.2 菌株的分子生物学鉴定

2.2.1 菌株基因组 DNA 的提取 利用生工生物工程(上海)股份有限公司的细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒,提取菌株 J-1 的基因组 DNA,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 3。



图 3 菌株 J-1 基因组 DNA 电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of J-1 genomic DNA

M;DL15 000 DNA Marker;J-1;J-1 基因组 DNA

M;DL15 000 DNA Marker;J-1;Genomic DNA from J-1

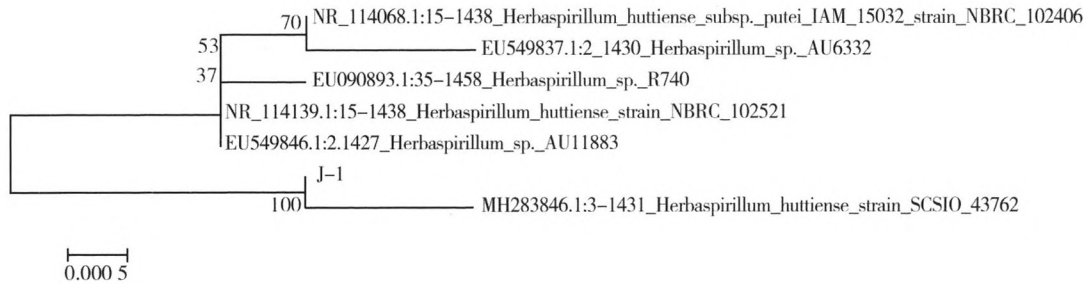


图 5 J-1 菌株系统发育进化树

Fig. 5 The phylogenetic tree of J-1

从图 3 可以看出,在 15 000 bp 的上方有 1 条清晰明亮的条带,此为菌株基因组 DNA 形成的条带,说明提取的基因组 DNA 比较完整,可用于后续 PCR 扩增。

2.2.2 菌株 16S rDNA 基因的扩增 以菌株 J-1 的基因组 DNA 为模板,利用细菌的 16S 区序列扩增的通用引物 27F/1492R 扩增 16S rDNA,PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳,结果如图 4。

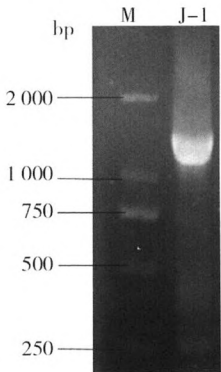


图 4 16S rDNA 扩增电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA

M;DL2 000 DNA Marker;J-1;16S rDNA 扩增产物

M;DL2 000 DNA Marker;J-1;Amplification products of 16S rDNA

从图 4 可看出在 1 500 bp 左右存在 1 条清晰条带,与预期大小一致,将 PCR 扩增产物送北京六合华大基因股份有限公司进行双向测序。

2.2.3 系统进化树分析 测序拼接结果显示,扩增获得的目的菌株 J-1 的 16S rDNA 序列长度为 1 434 bp,将其提交到 NCBI 数据库进行 BLAST 比对。选取 6 株与目的菌株 J-1 同源性较高的菌株,利用 ClustalW 2. 0 进行多序列比对,并通过 MEGA 6. 0 构建系统进化树,结果如图 5。

系统发育树分析表明,菌株 J-1 与 *Herbaspirillum huttiense* SCSIO-43762 属于同一分支,说明亲缘关系较近,菌株 J-1 的序列与草螺菌 MH283846.1 (*Herbaspirillum huttiense*) 相似度为 99%,证明菌株 J-1 属于草螺菌,并暂且命名为草螺菌 J-1 (*Herbaspirillum huttiense* J-1),便于后续研究。

2.2.4 表达产物 SDS-PAGE 电泳检测 将收集到的诱导菌体和未诱导菌体,放入超声破碎仪中破碎,使其充分溶解后,于离心机中离心,使用缓冲液对离心后的沉淀进行溶解,分别对上清和沉淀处理、制样,进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果如图 6。

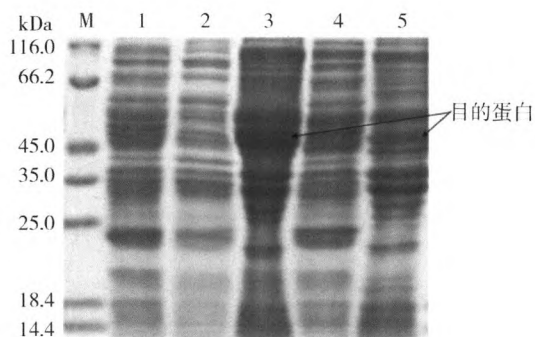


图 6 纤维素酶在大肠埃希菌中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of cellulase expressed product in BL21

M: Protein Marker; 1: 未诱导总蛋白; 2: 上清 (20 °C); 3: 沉淀 (20 °C); 4: 上清 (37 °C); 5: 沉淀 (37 °C)

M: Protein Marker; 1: Total proteins of non-induced; 2: Supernatant (20 °C); 3: Precipitate (20 °C); 4: Supernatant (37 °C); 5: Precipitate (37 °C)

从图 6 可以看出,泳道 3 和泳道 5 均存在目的蛋白,泳道 3 蛋白大量表达,蛋白分子量约为 47.0 kDa,与试验预期蛋白大小一致,与纤维素酶大小近乎一致,可进行后续试验。

2.3 草螺菌产纤维素酶条件的优化

2.3.1 草螺菌 J-1 生长曲线的绘制 将筛选到的草螺菌 J-1 接种于牛肉膏蛋白胨培养基中,30 °C,170 r/min 摇瓶培养,每间隔 1 h,于 600 nm 下测定吸光度,并绘制草螺菌的生长曲线。图 7 所示,草螺菌的初期生长速度较为缓慢,13 ~ 15 h 达到对数生长期,此时期的草螺菌生长速度较快,

并且快速消耗底物;15 h 后草螺菌生物量达到稳定,细菌总数达到最大,活菌数相对稳定,细胞代谢物积累。因此草螺菌发酵时,发酵时间应在 15 h 之后,以保证菌株产生较多代谢物。

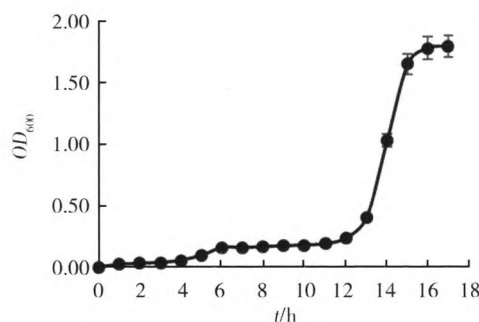


图 7 草螺菌生长曲线

Fig. 7 Growth curve of *Herbaspirillum huttiense*

2.3.2 pH 对草螺菌 J-1 产纤维素酶活力的影响

不同微生物生长的最适酸碱条件不同,相对应菌株的产酶量不同。为了确定草螺菌产纤维素酶的最佳 pH,分别调整培养基初始 pH 为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0。初始条件:温度为 30 °C,碳源为 CMC-Na,氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,接种量 5%,170 r/min 摇瓶发酵 24 h,于 540 nm 下测定吸光度,并计算草螺菌产纤维素酶活力,试验结果如图 8 所示。

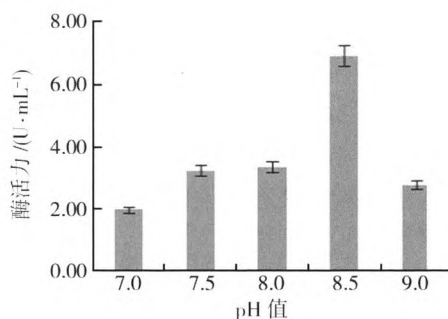


图 8 pH 值对纤维素酶活力的影响

Fig. 8 Effect of pH on cellulase activity

从图 8 可以看出,培养基初始 pH 值为 7 时,纤维素酶活力为 1.98 U/mL,纤维素酶活力最低。随着 pH 值的提高,纤维素酶活力逐渐增强。当初始 pH 值为 8.5 时,纤维素酶活力最大为 6.93 U/mL。pH 值超过 8.5 时,纤维素酶活力则降低。确定筛选的目的菌株适应碱性条件,但过碱条件影响草螺菌代谢的纤维素酶的积累。因此最适的

产酶 pH 值为 8.5。

2.3.3 接种量对草螺菌 J-1 产纤维素酶活力的影响 接种量决定菌株消耗底物的速度,决定菌株代谢产生酶的多少。试验设计了不同接种量对纤维素酶活力的影响。初始接种量(体积分数)设计为 0%、2.5%、5%、7.5%、10%、12.5%。初始条件:pH 值 8.5,温度为 30℃,初始碳源为 CMC-Na,初始氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,170 r/min 摇瓶发酵 24 h,于 540 nm 下测定吸光度,并计算草螺菌产纤维素酶活力。试验结果见图 9。

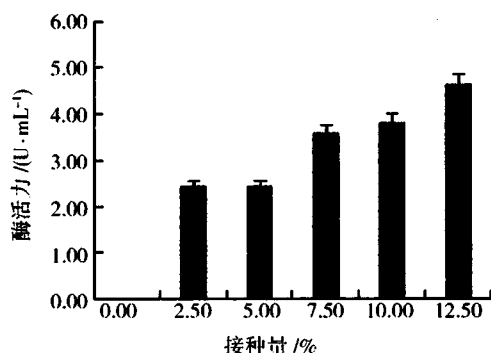


图 9 接种量对纤维素酶活力的影响

Fig. 9 Effect of inoculation on cellulase activity

试验结果表明,纤维素酶活力随接种量增加而升高,当接种量为 2.5% 和 5% 时,纤维素酶活力相近,均在 2.44 U/mL 左右;当接种量大于 5% 时,随着接种量的增加,纤维素酶活力逐渐升高;当接种量为 12.5% 时,纤维素酶活力达到 4.63 U/mL。目的菌株在底物量相同时,接种量越大,菌株的生长速率越快达到稳定期,开始产纤维素酶。本研究中底物量相同,接种量 $\geq 5\%$ 时,菌株生物量达到稳定不再增加。鉴于纤维素酶活力随接种量逐渐升高,选择纤维素酶活力升高的临界点,即接种量 5% 为最佳接种量。

2.3.4 不同碳源对草螺菌 J-1 产纤维素酶活力的影响 碳源是细菌能量的主要来源,也是细菌细胞膜结构磷脂的主要组成成分,能促进细胞内物质运输。为确定不同碳源对纤维素酶活力的影响,分别选用滤纸、CMC-Na、棉花为唯一碳源进行发酵产酶,试验时初始条件:pH 8.5,温度为 30℃,接种量为 5%,初始唯一氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,170 r/min 摇瓶发酵 24 h。于 540 nm 下测定吸光度,计算草螺菌产纤维素酶活力;于 600 nm 下测

定吸光度,绘制其生长曲线,试验结果如图 10。

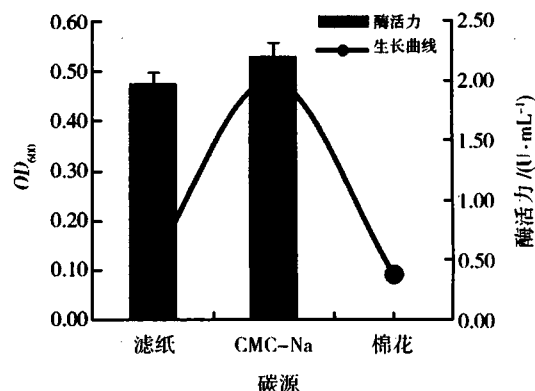


图 10 不同碳源对纤维素酶活力的影响

Fig. 10 Effect of different carbon sources on cellulase activity

结果表明,当以棉花为碳源时,草螺菌生物量最低,并且几乎无纤维素酶活力,可能由于接种时草螺菌利用部分棉花作为碳源促进生长,并不能利用棉花产纤维素,由此分析草螺菌降解纤维素可能存在局限性,并非具有纤维素的物质皆可降解;滤纸为碳源时,草螺菌生物量较低,但是纤维素酶活力为 1.98 U/mL;CMC-Na 为唯一碳源时草螺菌生物量最高,纤维素酶活力最高为 2.21 U/mL。因此确定最适碳源为 CMC-Na。

2.3.5 不同氮源对草螺菌 J-1 产纤维素酶活力的影响 分别选用蛋白胨、酵母浸粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 为唯一氮源,试验时初始条件:pH 8.5,温度为 30℃,接种量为 5%,碳源为 CMC-Na,170 r/min 摇瓶发酵 24 h。于 540 nm 下测定吸光度,计算草螺菌产纤维素酶活力;于 600 nm 下测定吸光度,绘制其生长曲线,试验结果如图 11。

试验结果表明,当以酵母浸粉为唯一氮源时,草螺菌生物量最大,但是纤维素酶活力最低,仅为 2.33 U/mL;以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NaNO_3 为唯一氮源时,草螺菌的生物量水平接近;但以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时,草螺菌产纤维素酶活力为 3.71 U/mL,大于 NaNO_3 为氮源时,草螺菌产纤维素酶活力 3.36 U/mL。蛋白胨为氮源时,草螺菌的生物量介于酵母浸粉和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分别为氮源时草螺菌的生物量之间,纤维素酶活力为 3.48 U/mL,由生物量和纤维素酶活力两个条件共同选择,确定蛋白胨为最佳氮源。

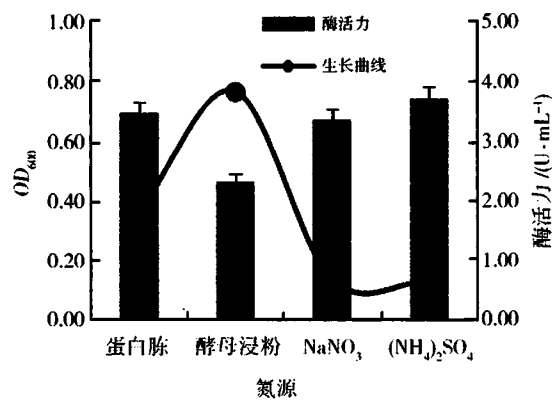


图 11 不同氮源对纤维素酶活力的影响
Fig. 11 Effect of different nitrogen sources on cellulase activity

2.3.6 正交试验结果 在单因素的实验基础上,以纤维素酶活力为考察指标,选取 3 个因素:pH、CMC-Na、蛋白胨,分别标注为 A、B、C,分别选取 3 个水平标记为 -1、0、1,采用 $L_9(3^3)$ 正交表,按因素水平表 2,进行 3 因素 3 水平正交试验,正交实验设计与结果分析如表 3 和表 4。

表 2 正交试验因素水平表
Table 2 The table of orthogonal experiment factors and levels

水平	A pH	B CMC-Na/g	C 蛋白胨/g
-1	7.5	0.5	0.5
0	8.0	1.0	1.0
1	8.5	1.5	1.5

表 3 正交试验设计及结果分析
Table 3 Orthogonal experiment design and analysis of result

试验号	A	B	C	纤维素酶活力/ (U · mL ⁻¹)
1	7.5	0.5	0.5	0
2	7.5	1.0	1.5	5.318
3	7.5	1.5	1.0	9.116
4	8.0	0.5	1.0	9.462
5	8.0	1.0	0.5	7.390
6	8.0	1.5	1.5	10.498
7	8.5	0.5	1.5	9.807
8	8.5	1.0	1.0	9.462
9	8.5	1.5	0.5	4.973
I ₁	2.841	4.261	1.420	
II ₂	5.514	3.509	5.765	
III ₃	5.263	5.848	6.433	
K ₁	0.947	1.420	0.473	
K ₂	1.838	1.170	1.922	
K ₃	1.754	1.949	2.144	
R	0.891	0.779	1.671	

表 4 方差分析
Table 4 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	30.298	2	1.320	3.11	不显著
B	4.727	2	0.206	3.11	不显著
C	47.493	2	2.070	3.11	不显著
误差	91.788	8			

由表 3 可知,3 个因素的影响依次为 C > A > B,即蛋白胨 > pH > CMC-Na。通过表 4 方差分析,选取的 3 个因素影响均不显著,因此不必再进行各因素水平间的多重比较。由 K 值可知,最优条件为 A₂B₃C₃,即 pH 值 8.0、CMC-Na 1.5 g、蛋白胨 1.5 g,在此最佳组合时,纤维素酶活力为 10.498 U/mL。

3 讨论

采用刚果红染色法,从大连黑石礁海域潮间带泥沙和藻类混合水样筛选出 1 株产纤维素酶的海洋杆状菌。生理生化特征和分子生物学鉴定结果:该菌株 16S rDNA 基因测序拼接序列长度为 1434 bp,于 NCBI 进行序列比对并构建系统发育进化树,目的菌株与 *Herbaspirillum huttiense* SC-SIO-43762 亲缘关系较近,证明目的菌株属于草酸杆菌科,草螺菌属,草螺菌。目前对草螺菌产纤维素酶的研究中,在 NCBI 仅可查到该菌株产纤维素酶的蛋白序列,并未查到相关文献,本研究在大连黑石礁海域首次筛选出产纤维素酶的草螺菌,为草螺菌在工业生产中的综合利用提供参考。

目前,对于纤维素酶的研究,真核生物中利用霉菌产纤维素酶的研究较多,较多数据显示霉菌产纤维素酶较稳定。在霉菌的研究方面,Jian 等^[8]从腐木中筛选的小刺青霉菌,纤维素酶的酶活力为 243.73 U/mL;陈合等^[22]从腐烂的玉米秸秆中筛选出木霉菌,纤维素酶的酶活力为 447.22 U/g;张云峰等^[23]在牛粪和林场腐殖质中筛选的黑曲霉,纤维素酶的酶活力为 58.75 IU/mL。而在原核生物的研究方面,Sun 等^[24]从腐烂的土壤和粪便中筛选短小芽胞菌,在最佳产酶条件下,产纤维素酶的酶活力达到 1 204 U/mL。

以上真核和原核产纤维素酶的研究中,所选取的材料均为陆地菌株明显看出陆地菌酶活力较

高也较稳定。而海洋菌的研究中, Han 等^[25]从养殖池采集水样中筛选的 *Vibrio alginolyticus* 和 *Aeromonas sobria* 两种菌产纤维素酶的酶活力分别达到 10.3 U/mL 和 11.5 U/mL; Zhang 等^[26]研究的海洋酵母菌产纤维素酶的酶活力为 4.51 U/mg。相比于陆地菌, 海洋菌产纤维素酶的酶活力普遍偏低, 本研究中正交试验研究的纤维素酶活力为 10.498 U/mL, 也侧面证实了这个推论。

本研究明显发现海洋草螺菌在唯一碳源的试验中, 当棉花作为底物时几乎没有纤维素酶产生。而棉花主要成分为纤维素, 却不能被降解, 可能是海洋草螺菌并不能降解所有陆地含有纤维素成分的物质, 是其存在的缺陷。由本研究筛选出的草螺菌, 可在海水中生长并产生纤维素酶, 鉴于草螺菌大多于植物中分离, 因此潮间带分离的草螺菌可能是一个新的发现。

参考文献:

- [1] 罗康佳, 郭建生, 李静怡, 等. 纤维素的溶解技术与研究现状[J]. 合成纤维, 2018, 47(1): 1-5.
- [2] Zheng L, Zhang HP, Song YP, et al. Isolation, identification and saccharification level of cellulose degrading bacteria[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2017, 44(2): 104-111.
- [3] Taylor II Larry E, Henrissat Bernard, Coutinho Pedro M, et al. Complete cellulase system in the marine bacterium *Saccharophagus degradans* strain 2-40T[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(11): 3849-3861.
- [4] Lambert Camilla, Garvey Megan, Klinger Johannes, et al. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review[J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7: 135-150.
- [5] Yan SM, Wu G. Secretory pathway of cellulase: a mini-review[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, (6): 177-189.
- [6] Islam Farjana, Roy Narayan. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulose producing bacteria in molasses[J]. BMC Res Notes, 2018, 11(1): 445-450.
- [7] Li L, Li MX, Tang GX, et al. Optimization of enzyme production conditions for a cellulase-producing strain[J]. Environmental Science & Technology, 2019, 32(1): 24-29.
- [8] Jian LY, He DJ, Liu JS, et al. Identification of strains producing cellulase and its enzyme activity determination[J]. Journal of Forest & Environment, 2017, 37(2): 207-211.
- [9] Burgin Tucker, Stahlberg Jerry, Mayes Heather B. Advantages of a distant cellulase catalytic base[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2018, 293: 4680-4687.
- [10] Ázar Rafaela I. S. Ladeira, Morgan Tu'lio, Santos Antonio Carlos Freitas dos, et al. Deactivation and activation of lignocellulose degrading enzymes in the presence of laccase[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2017, 109: 25-30.
- [11] 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.
- [12] Gao W, Kim H-J, Chung CH, et al. Enhanced production of carboxymethylcellulase by a marine bacterium, *Bacillus velezensis* a-68, by using rice hulls in pilot-scale bioreactor under optimized conditions for dissolved oxygen[J]. Journal of Microbiology, 2014, 52(9): 755-761.
- [13] Gupta Shefali, Adlakha Nidhi, Yazdan Syed Shamsi. Efficient extracellular secretion of an endoglucanase and a β -glucosidase in *E. coli* [J]. Protein Expression & Purification, 2013, (88): 20-25.
- [14] 李韵. 草螺菌的研究进展[J]. 中国伤残医学, 2013, 21(3): 233-234.
- [15] 王婷, 杨升, 陈亚雪, 等. 两株茶树内生草螺菌的微生物学特性[J]. 微生物学报, 2014, 54(4): 424-432.
- [16] 刘伟林, 占桂婷, 王婷, 等. 草螺菌 *Herbaspirillum* sp. WT00F 的生理生化性质和促生作用研究[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2017, 39(3): 291-298, 304.
- [17] 姜立春, 赵丽萍, 林寿露, 等. 纤维素降解菌的筛选、鉴定与产酶条件优化试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, (6): 166-172.
- [18] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2015.
- [19] 魏群. 分子生物学实验指导(第3版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2015.
- [20] R. E. 布坎南, N. E. 吉布斯. 伯杰细菌鉴定手册(第8版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [21] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册(第8版)[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [22] 陈合, 舒国伟, 杨博, 等. 产纤维素酶真菌的筛选及其产酶条件的研究[J]. 中国酿造, 2008, 3: 14-17.
- [23] 张云峰, 杨井泉, 高磊, 等. 产纤维素酶菌株的筛选与产酶测定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018, (13): 207-210, 247.
- [24] Sun SC, Nan HY, Wang YG, et al. Screening and enzymatic production of a strain of efficient cellulose hydrolyzing bacteria[J]. Chinese Journal of Microecology, 2017, 29(10): 1131-1135.
- [25] Han Y, Cai JP. Isolation and identification of cmcase-producing marine bacteria[J]. Modern Food Science & Technology, 2005, 21(3): 36-38, 44.
- [26] Zhang L, Chi ZM. Screening and identification of a cellulase producing marine yeast and medium and fermentation condition optimization for cellulose production[J]. Periodical of Ocean University of China, 2007, 37(Sup. II): 101-108.