

# 芽孢杆菌产纤维素酶的研究\*



沈雪亮, 夏黎明

(浙江大学 生物工程与化学工程系, 浙江 杭州 310027)

SHEN X L

**摘要:** 对芽孢杆菌(*Bacillus* sp. ZU-04)产纤维素酶的工艺参数进行了优化, 研究表明: 木糖渣和豆饼粉分别是该菌合成纤维素酶的适宜碳源和氮源, NaCl 和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  对纤维素酶的合成具有重要作用, 其适宜质量用量分别为 0.5%~1.0% 及 0.1%, 麸皮的添加可明显提高发酵液中的酶活力; 3 L 发酵罐中的适宜发酵条件为: 搅拌速度 300 r/min, 通气量 0.3 L/(L·min), 培养温度 37 °C, 中性和碱性纤维素酶活力分别达到了 257.6 和 125.6 U/mL, 显示了良好的工业应用前景。

**关键词:** 纤维素酶; 细菌发酵; 木糖渣

中图分类号: Q556; T5245.9

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2002)03-0054-05

从废纸浆中筛选到一株芽孢杆菌(*Bacillus* sp. ZU-04), 前期研究结果表明, 该菌能分泌内切型 $\beta$ -葡聚糖酶(CM Case), 此酶的作用范围为中性至碱性(pH 值 6.5~10.5), 所以在制浆造纸、纤维素织物的水洗整理<sup>[1]</sup>及洗涤剂工业<sup>[2~3]</sup>中具有潜在的应用价值。为了进一步优化产酶工艺, 提高发酵液中的酶活力, 作者分别在摇瓶及发酵罐条件下对芽孢杆菌产纤维素酶进行了深入研究, 本文主要报道这方面的试验结果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

芽孢杆菌, 从废纸浆中筛选获得, 为浙江大学生物工程实验室保藏菌种<sup>[4]</sup>。

### 1.2 粗原料

1.2.1 废纸浆 由杭州新华造纸厂提供, pH 值 9~10, 含水量约 12%, 纤维素含量约 86% (除特别标识外以下均为质量基数)。

1.2.2 木糖渣 来自河北乐亭木糖厂, 是玉米芯制取木糖后的纤维剩余物, 其化学成分为: 纤维素 62%, 半纤维素 5%, 木质素 18%, 其它 15%。

1.2.3 豆饼粉 来自山东临沂油脂厂, 为黄豆榨油工艺中的生产剩余物。

### 1.3 培养基

1.3.1 液体种子培养基 蛋白胨 1.0%, 酵母粉 1.0%, 羧甲基纤维素(CMC) 1.0%, NaCl 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%; 另配  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10%, 分开灭菌后与上述培养基成分按 19 的比例混合均匀, 使培养基的初始 pH 值为 9.5~10.0。

1.3.2 产酶培养基 豆饼粉 2%, 木糖渣 1%, 麸皮 0.5%, NaCl 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%, 培养基 pH 值为

\* 收稿日期: 2001-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29876036)

作者简介: 沈雪亮(1977-), 女, 浙江杭州人, 浙江大学博士研究生, 从事生物工程研究。

10.0。根据研究需要, 培养基成分的个别变动将在文中指出。

#### 1.4 摇瓶产酶试验

1.4.1 种子培养 250 mL 摇瓶中装液 30 mL, 将芽孢杆菌的斜面菌种移接到液体种子培养基中, 37 °C、200 r/min 下振荡培养 36~48 h, 制成液体菌种。

1.4.2 产酶试验 取 2 mL 的种子液, 按 1% 的接种量转移到 50 mL (250 mL 的三角瓶) 液体产酶培养基中, 于 37 °C, 180 r/min 下振荡培养, 定时取样测定发酵液中的酶活力。

#### 1.5 发酵罐产酶试验

采用自控式 3 L 发酵罐(美国 Cole-Parmer 公司生产), 装液量 70%, 将制备好的液体菌种按 2% 的量接入, 在特定的培养条件下进行发酵试验, 定时取样测定发酵液中的酶活力。

#### 1.6 纤维素酶活力的测定<sup>[5,6]</sup>

取 0.5 mL 适当稀释的粗酶液, 与 1 mL 质量分数为 1% 的羧甲基纤维素钠(CMG-Na) 溶液混合, 在 50 °C 下反应 30 min, 中性纤维素酶活力测定控制反应 pH 值为 6.7, 碱性纤维素酶活力测定控制反应 pH 值为 9.5。用 DNS 法测定反应生成的还原糖(空白试验中除酶液事先灭活外, 其余条件不变)。在上述条件下, 将每小时由底物形成 1.0 mg 还原糖所需的酶量定义为一个活力单位, 以 U/mL 表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 摇瓶产酶试验

2.1.1 碳源 研究了不同碳源对芽孢杆菌产纤维素酶的影响(见表 1)。结果表明: 纤维素粉为碳源时酶活力最高, 废纸浆和木糖渣次之。但纤维素粉价格较贵, 用其作为碳源成本偏高; 而废纸浆和木糖渣都是工业纤维废弃物, 尤其是木糖渣, 作为木糖厂的纤维废弃物, 量大而集中, 目前普遍未得到合理利用, 常常造成环境污染。选用木糖渣作为碳源生产纤维素酶可以变废为宝, 大大降低生产成本, 其社会效益和经济效益都十分明显, 所以在以下试验中均采用木糖渣为碳源。

表 1 不同碳源对芽孢杆菌产纤维素酶的影响

Table 1 Effects of carbon source on cellulase production of *Bacillus* sp. ZU-04

碳源 carbon sources	中性酶活力 / (U·mL <sup>-1</sup> ) neutral cellulase activities	碱性酶活力 / (U·mL <sup>-1</sup> ) alkali cellulase activities	发酵液 pH 值 pH value of broth
1% 羧甲基纤维素 CMC	49.3	31.7	9.8
1% 纤维素粉 cellulose powder	69.6	50.4	9.8
1% 微晶纤维素 avicel	29.8	21.9	9.8
1% 糊精 dextrin	26.7	17.8	9.5
1% 废纸浆 waste pulp	60.1	42.5	9.8
1% 木糖渣 xyliol production residue	61.9	40.3	9.5

2.1.2 氮源 不同氮源对芽孢杆菌产纤维素酶的影响如表 2 所示, 试验结果表明: 豆饼粉是芽孢杆菌合成纤维素酶的适宜氮源, 这种原料价格便宜, 购买方便, 产酶效果良好, 同时添加少量麸皮对纤维素酶合成的促进作用更为明显。

表 2 不同氮源对芽孢杆菌产纤维素酶的影响

Table 2 Effects of nitrogen source on cellulase production of *Bacillus* sp. ZU-04

氮源 nitrogen source	中性酶活力 / (U·mL <sup>-1</sup> ) neutral cellulase activities	碱性酶活力 / (U·mL <sup>-1</sup> ) alkali cellulase activities	发酵液 pH 值 pH value of broth
1% 蛋白胨 peptone+ 1% 酵母粉 yeast extract	53.6	29.6	9.8
1% 蛋白胨 peptone+ 1% 豆饼粉 bean cake	49.7	30.8	9.8
1% 酵母粉 yeast extract+ 1% 豆饼粉 bean cake	57.3	35.3	9.8
2% 豆饼粉 bean cake	66.4	40.8	9.5
2% 豆饼粉 bean cake+ 0.5% 麸皮 wheat bran	81.5	49.5	9.5

2.1.3 营养盐 研究了 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 质量用量对芽孢杆菌产酶的影响(见表 3)。结果表明: NaCl 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>对纤维素酶的合成均有重要作用, 缺少任何一种都会对产酶造成明显影响。在本实验条件下,

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 的质量分数以0.1%为宜,进一步提高其质量分数对纤维素酶的合成无明显作用。 $\text{NaCl}$ 的质量用量可采用0.5%~1.0%,进一步增加用量反而对产酶不利。

表3 不同营养盐质量分数对芽孢杆菌产纤维素酶的影响

Table 3 Effects of nutrient salt mass parts on cellulase production of *Bacillus* sp. ZU-04

营养盐 nutrient salt	中性酶活力/ $(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$ neutral cellulase activities	碱性酶活力/ $(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$ alkali cellulase activities	发酵液 pH 值 pH value of broth
0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$	22.6	11.4	9.5
0.5% $\text{NaCl}$ + 0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$	96.9	60.8	9.5
1.0% $\text{NaCl}$ + 0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$	94.7	63.5	9.5
1.5% $\text{NaCl}$ + 0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$	68.2	41.6	9.5
0.5% $\text{NaCl}$	32.1	15.8	9.5
0.5% $\text{NaCl}$ + 0.2% $\text{KH}_2\text{PO}_4$	101.5	59.5	9.5
0.5% $\text{NaCl}$ + 0.5% $\text{KH}_2\text{PO}_4$	98.2	61.3	9.5

2.1.4 培养液的初始 pH 值 对芽孢杆菌在不同初始 pH 值(6.0~11.0)条件下的生长和产酶情况进行了研究(见表4)。

结果表明:该菌在 pH 值 6.0~8.0 环境下,生长较慢,产酶能力较低;而在 pH 值 9.0~11.0 的条件下,生长良好,纤维素酶活力较高,故确定培养液的适宜初始 pH 值为 10.0。

2.1.5 培养温度 芽孢杆菌在不同温度下的产酶结果表明:该菌的最适温度为

37 °C,当温度在 35 °C 以下和 39 °C 以上时,酶活力明显下降(见图1)。

## 2.2 发酵罐产酶试验

2.2.1 搅拌速度对纤维素酶合成的影响 在通气量为 0.2 L/(L·min) 的条件下,分别采用 100, 200, 300 和 400 r/min 的搅拌速度进行产酶试验,培养 8 h 后定时取样,镜检观察菌体生长状况,并测定发酵液中的酶活力。结果表明(图2,图3):在本实验条件下,搅拌速度以 300 r/min 为宜,产酶高峰期在 28 h 左右出现,中性纤维素酶和碱性纤维素酶活力分别为 216.8 和 117.2 U/mL。降低搅拌速度,将由于溶氧不足而导致菌体生长变慢,产酶的高峰期延后及酶活力下降。100 r/min 时中性和碱性酶活力的峰值拖后至 36 h 左右出现,且最大酶活力比 300 r/min 时分别下降了 12.1% 和 20.7%。另一方面,当搅拌速度提高到 400 r/min,虽然酶活力的峰值提前至 24 h 出现,但中性和碱性酶的最大活力却比 300 r/min 时分别下降 8.9% 和 16.3%,这是由于高的搅拌速度会引起酶蛋白的变性失活;同时在高速搅拌情况下,发酵罐中的泡沫增多,对纤维素酶的合成也不利。

2.2.2 通气量对纤维素酶合成的影响 固定搅拌速度为 300 r/min,将通气量由原来的 0.2 L/(L·min) 分别增大为 0.3 L/(L·min) 和 0.4 L/(L·min) 进行产酶试验,结果表明(图2,图3):通气量增大到 0.3 L/(L·min) 后,菌体生长更快更旺盛,产酶高峰期也有所提前,大约在 24 h 左右出现,中性和碱性纤维素酶活力均显著提高,分别为 257.6 和 125.6 U/mL,44 h 后酶活力开始缓慢下降。当通气量继续增大到 0.4 L/(L·min) 时,菌体生长和产酶状况均无明显改善,但发酵罐中泡沫很多。所以综合考虑,通气量还是

表4 培养液的初始 pH 值对芽孢杆菌产纤维素酶的影响

Table 4 Effects of initial pH value on cellulase production of *Bacillus* sp. ZU-04

培养液的初始 pH 值 initial pH value of broth	中性酶活力/ $(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$ neutral cellulase activities	碱性酶活力/ $(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$ alkali cellulase activities
6.5	63.2	31.3
7.0	79.6	41.8
8.0	88.5	43.5
9.0	118.1	60.3
10.0	115.2	65.2
11.0	92.8	55.7

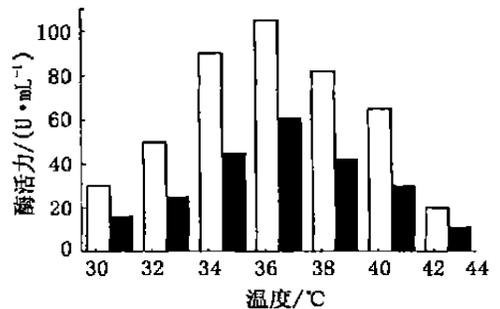


图1 培养温度对芽孢杆菌产纤维素酶的影响  
Fig.1 Effects of culture temperature on cellulase production of *Bacillus* sp. ZU-04

□ 中性纤维素酶活力 neutral cellulase activities (pH 6.7);  
■ 碱性纤维素酶活力 alkali cellulase activities (pH 9.5)

以 0.3 L/(L·min) 较为合适。

由图 2 和图 3 可以看出, 对于芽孢杆菌, 在本实验条件下, 降低搅拌速度和减小通气量, 都会延缓产酶进程, 降低酶活力, 说明该菌对氧气的需求较高。但是另一方面, 搅拌速度和通气量加大, 酶的失活现象也逐渐严重, 酶活力下降加速, 在实际生产中, 掌握这一特点尤为重要。

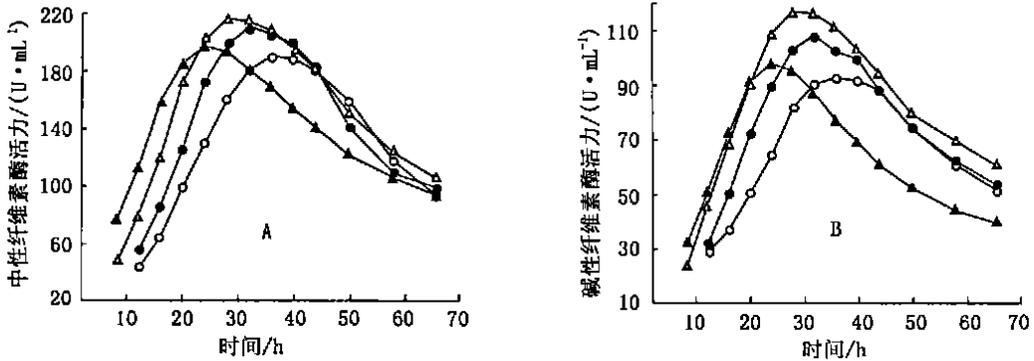


图 2 搅拌速度对纤维素酶形成的影响[0.2 L/(L·min)]

Fig. 2 Effects of stirring speed on cellulase production

(A) 中性纤维素酶的形成过程 time course of neutral cellulase production

(B) 碱性纤维素酶的形成过程 time course of alkali cellulase production

—○—100 r/min; —●—200 r/min; —△—300 r/min; —▲—400 r/min

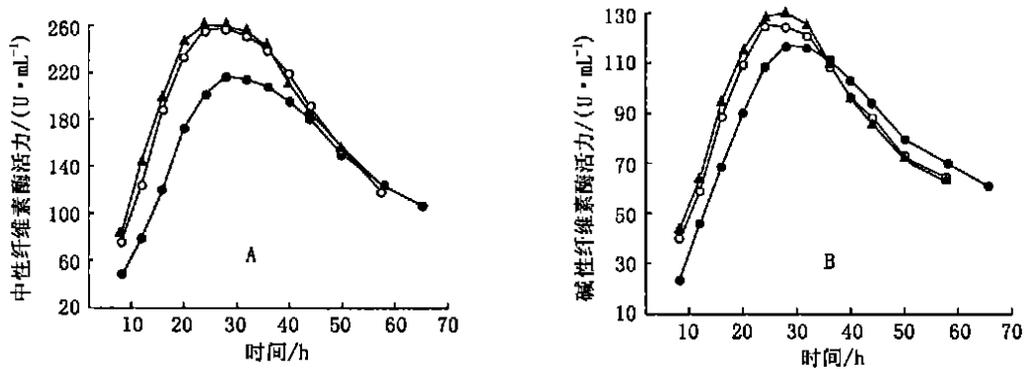


图 3 通气量对纤维素酶形成的影响(300 r/min)

Fig. 3 Effects of aeration on cellulase production

(A) 中性纤维素酶的形成过程 time course of neutral cellulase production

(B) 碱性纤维素酶的形成过程 time course of alkali cellulase production

—●—0.2 L/(L·min); —○—0.3 L/(L·min); —▲—0.4 L/(L·min)

### 3 结论

3.1 木糖渣是用作芽孢杆菌合成纤维素酶的适宜碳源, 具有成本低廉, 酶活力高等优点。

3.2 质量分数为 2% 的豆饼粉是合成纤维素酶的适宜氮源, 同时添加少量麸皮可明显提高发酵液中的纤维素酶活力。

3.3 营养盐 NaCl 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 对纤维素酶的合成具有重要作用, 其适宜质量用量分别为 0.5%~1.0% 和 0.1%。

3.4 芽孢杆菌生长和产酶的适宜 pH 值为 10.0, 适宜温度为 37 ℃。

3.5 搅拌速度和通气量是影响纤维素酶合成的重要因子, 在 3 L 发酵罐中, 适宜发酵条件为: 搅拌速度 300 r/min, 通气量 0.3 L/(L·min)。中性和碱性纤维素酶活力分别可达到 257.6 和 125.6 U/mL, 显示了良好的工业应用前景。

## 参考文献:

- [1] TOLAN J S, FOODY B. Cellulase from submerged fermentation[J]. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 1999, 65(1): 4-67.
- [2] 赵新刚. 洗涤用碱性纤维素酶及其产生菌的分离方法[J]. *微生物学通报*, 1999, 26(1): 63-65.
- [3] 余晓斌, 全文海, 章克昌. 洗涤剂用碱性纤维素酶的研究(I)[J]. *工业微生物*, 1997, 27(4): 5-8.
- [4] 沈雪亮, 夏黎明. 产纤维素酶细菌的筛选及酶学特性研究[J]. *林产化学与工业*, 2002, 22(1): 47-51.
- [5] 王成华, 孙纳新, 王健鹏, 等. 里氏木霉 9+3 纤维素酶产生条件的研究[J]. *食品与发酵工业*, 1996, (5): 1-6.
- [6] 夏黎明, 萧庆, 余世袁. 碳源对固定化里氏木霉合成纤维素酶的影响[J]. *纤维素科学与技术*, 1994, 2(3-4): 72-77.

STUDIES ON CELLULASE PRODUCTION BY *BACILLUS* SP. ZU-04

SHEN Xue-liang, XIA Li-ming

*(Department of Bioengineering and Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)*

**Abstract:** Cellulase production was studied using a bacterial strain (*Bacillus* sp. ZU-04) screened at our laboratory. Cellulase activity could be detected from pH value 6.5 to 10.5. Corn corb residue from xylose industry was the suitable carbon source, and bean cake was the suitable nitrogen source for the strain. NaCl and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  were important to cellulase production, and their optimal mass parts were 0.5%-1.0% and 0.1%, respectively. Cellulase activity could be improved by addition of wheat bran. Optimal culture conditions in a 3 L fermenter were: stirring speed 300 r/min, aeration 0.3 L/(L·min), and culture temperature 37 °C. Neutral and alkali cellulase activities detected from the fermentation broth were 257.6 U/mL and 125.6 U/mL, respectively. The enzyme had a good application potential.

**Key words:** cellulase; bacterial fermentation; corn corb residue

## 欢迎订阅 2003 年下列刊物

中国造纸化学品工业协会会刊《造纸化学品》是国内外公开发行的全面报道造纸用化学品的全国性科技期刊。是《中国学术期刊(光盘版)》的入编刊物。

主要报道造纸用精细化学品的研制、开发、应用及国内外发展动向等。设有专题综述、科学实验、应用技术、经验交流、国内外动态、新产品、新技术、市场与信息、产品介绍、技术成果转让、造纸与化学品商情等栏目。它是沟通造纸和造纸化学品两大行业经济技术合作的技术信息类期刊。该刊以造纸界、化工界、科研机构、事业单位从事科研生产的广大科技人员、技术工人、管理干部及大专院校相关专业的师生为服务对象。并以一定的篇幅发布造纸化学品、造纸机械设备仪表、化工机械设备仪表、技术转让和人才供求方面的广告。

该刊为季刊(刊号 CN 33-1124/TQ, ISSN 1007-2225), 大 16 开本, 全年订费为 30 元(包括邮费), 自办发行, 欢迎单位和个人订阅。本部尚有少量 1999 年、2000 年《造纸化学品》精装本, 订价为 40 元/年, 需订阅者请从邮局汇款, 并注明订阅《造纸化学品》及收件人详细地址。联系地址: 310014 浙江省杭州市湖墅石灰坝 7 号《造纸化学品》编辑部, 联系人: 陈根荣, 电话(传真): (0571) 88315561, E-mail: paperchemj@mail.hz.zj.cn

《杭州化工》创刊于 1970 年, 是杭州市化工学会和杭州市化工研究所联合主办的地区性化工科技综合刊物。主要报道本地区化工原料、石油化工、涂料、纺织、助剂、印染、塑料助剂、合成树脂、农药、橡胶、塑料制品等方面的有关技术总结、学术论文、试验报告、国内外化工动态、技术经济论证及技术革新、技术改造、节能、三废治理、综合利用、环境保护、分析测试等新成果, 并选登部分译文。可供从事化工及应用化工产品的科技人员、技术工人和管理干部参考。该刊为季刊, 全年 4 期, 收订费 30.00 元, 需订购者请按订阅单填写订阅份数、单位名称和详细地址, 连同汇款, 由邮局汇寄, 并注明订阅《杭州化工》及收件人详细地址。联系地址: 310014 浙江省杭州市湖墅石灰坝 7 号《杭州化工》编辑部, 联系人: 陈根荣; 电话(传真): (0571) 88315561, E-mail: paperchemj@mail.hz.zj.cn