

# 产羧甲基纤维素酶的 *Bacillus* sp. B59 培养优化研究

仇倩<sup>1</sup>, 马瑞梅<sup>1</sup>, 解孝满<sup>2</sup>, 董全行<sup>1</sup>, 葛宜和<sup>1</sup>, 冯志彬<sup>1</sup>, 程仕伟<sup>1</sup>

(1. 鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264039; 2. 山东省林木种质资源中心, 济南 265709)

**摘要:** 芽孢杆菌来源纤维素酶具有耐热耐碱等优良特性, 在饲料添加剂等行业具有重要应用。本文以分离自近海土壤的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) B59 为研究对象, 通过优化碳源、氮源、金属盐、初始 pH 值、培养温度和接种量对菌株产羧甲基纤维素酶的影响, 正交试验确定最佳产酶工艺为: 2 g · L<sup>-1</sup> 果糖, 20 g · L<sup>-1</sup> 蛋白胨, 0.5 g · L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>, 3 g · L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>, 0.2 g · L<sup>-1</sup> 羧甲基纤维素, pH 值 8.5, 接种量 1%(v/v), 培养温度 28 ℃。在优化条件下发酵培养 40 h, 获得羧甲基纤维素酶活力为 786.92 U · mL<sup>-1</sup>, 为后续的规模制备及应用奠定基础。

**关键词:** 芽孢杆菌; 羧甲基纤维素酶; 培养优化; 发酵生产

**中图分类号:** Q556 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-8020(2021)02-0146-05

纤维素是植物细胞壁的主要成分, 占植物界碳含量的 50% 以上, 是自然界分布最广、含量最多的一种多糖, 纤维素酶能将纤维素转化成可利用性糖类, 对解决当今世界面临的粮食短缺、环境污染等问题具有重要意义<sup>[1-3]</sup>。此外, 纤维素酶本身还广泛应用于食品、纺织、造纸和洗涤等行业<sup>[4-5]</sup>, 尤其是可作为一种绿色饲料添加剂, 能将饲料中的部分纤维素降解成可消化吸收的还原糖, 提高饲料利用率<sup>[6]</sup>。

纤维素酶是由作用方式不同但能协同催化降解纤维素的三类酶组成的酶系, 包括内切葡萄糖苷酶、外切葡萄糖苷酶和 β-葡萄糖苷酶<sup>[7-8]</sup>。羧甲基纤维素酶(CMCCase) 是内切型纤维素酶, 作用于纤维素的 β-1,4 糖苷键, 其活力高低直接影响纤维素水解效率<sup>[9]</sup>。

目前纤维素酶生产多由微生物发酵方式获得, 很多微生物均可产纤维素酶, 其中丝状真菌来源的研究较多<sup>[10-12]</sup>。近年来细菌来源的纤维素酶尤其是 CMCCase 越来越受到重视, 由于其具有耐碱耐热等催化特性、培养周期短、发酵工艺简单等优点, 在饲料、洗涤等行业领域应用广泛<sup>[13-14]</sup>。本文通过对筛选自烟台近海土壤中的芽孢杆菌

(*Bacillus* sp.) B59 进行培养优化研究, 挖掘其生产 CMCCase 的潜力, 为后续在饲料添加剂领域的应用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) B59, 分离筛选自山东烟台近海土壤, 保存于鲁东大学应用微生物研究所。羧甲基纤维素(CMC) 和 3,5-二硝基水杨酸购自上海生工, 其余所用试剂均为分析纯或生物纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 培养优化

菌种活化培养基: 5 g · L<sup>-1</sup> 酵母粉, 10 g · L<sup>-1</sup> 蛋白胨, 10 g · L<sup>-1</sup> 氯化钠, pH 值 7.0, 装液量为 50 mL/500 mL 三角烧瓶, 121 ℃ 灭菌 20 min。自试管斜面挑一环芽孢杆菌 B59 菌种转接活化培养基, 在 30 ℃、200 r · min<sup>-1</sup> 的恒温摇床中培养 24 h 至菌体浑浊。

收稿日期: 2020-09-05; 修回日期: 2020-11-05

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2019MC037); 山东省重点研发计划(2018GNC113013); 山东省农业重大应用技术创新项目(鲁财指 2014-38)

第一作者简介: 仇倩(1995—), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 研究方向为微生物工程。E-mail: 1633783169@qq.com

通信作者简介: 程仕伟(1976—), 男, 山东潍坊人, 副教授, 硕士研究生导师, 博士, 研究方向为微生物资源利用。E-mail: swbiotech@yeah.net

培养组分的优化:活化菌种按4%(v/v)的接种量接入初始发酵培养基,装液量为50 mL/500 mL三角烧瓶,在30℃、200 r·min<sup>-1</sup>条件下,发酵培养48 h后测定酶活力,依次确定碳源、氮源和金属盐对菌种产CMCase的影响。

培养条件的优化:采用优化后的培养组分:20 g·L<sup>-1</sup>果糖、15 g·L<sup>-1</sup>蛋白胨、0.2 g·L<sup>-1</sup>CMC、2 g·L<sup>-1</sup>ZnSO<sub>4</sub>、1 g·L<sup>-1</sup>FeCl<sub>3</sub>,发酵培养48 h后测定酶活力,确定培养温度、初始pH、接种量对菌种产CMCase的影响。

根据培养组分和培养条件的优化结果,选取对*Bacillus* sp.B59发酵生产CMCase有显著影响的7个因素:果糖、蛋白胨、FeCl<sub>3</sub>、ZnSO<sub>4</sub>、pH值、接种量、培养温度,进行7因素2水平的正交试验,获得菌株产CMCase的最佳培养工艺,经发酵培养的时间曲线验证优化效果,并确定产酶发酵周期。

### 1.2.2 酶活测定<sup>[15]</sup>

发酵液经8000 rpm离心5 min后收集上清酶液,取适当稀释度的上清酶液1 mL,加入1%羧甲基纤维素溶液(pH值7.3)1 mL,45℃水浴保温20 min。反应液加入3 mL DNS试剂,沸水浴5 min,定容至25 mL后取4 mL的反应样液在5000 rpm下离心3 min。取离心后的上清液,以对照组作为空白在540 nm处测定吸光度值,根据葡萄糖标准曲线计算酶活力。以单位体积(mL)单位时间(min)水解羧甲基纤维素产生的葡萄糖质量(μg)为酶活力单位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 碳源对菌株产酶的影响

选用发酵培养基:5 g·L<sup>-1</sup>酵母粉,10 g·L<sup>-1</sup>蛋白胨,0.2 g·L<sup>-1</sup>CMC,10 g·L<sup>-1</sup>氯化钠,20 g·L<sup>-1</sup>碳源,pH值7.0。在30℃下200 rpm培养48 h后测定CMCase活力,碳源对菌株产酶的影响见图1。芽孢杆菌B59产CMCase的最佳碳源为果糖,酶活183.33 U·mL<sup>-1</sup>;其次为葡萄糖,产酶量为125.82 U·mL<sup>-1</sup>。

### 2.2 氮源对菌株产酶的影响

选用发酵培养基:20 g·L<sup>-1</sup>果糖,0.2 g·L<sup>-1</sup>

CMC,10 g·L<sup>-1</sup>氯化钠,3 g·L<sup>-1</sup>磷酸氢二钾,3 g·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钠,15 g·L<sup>-1</sup>氮源,pH值7.0。氮源对芽孢杆菌B59产CMCase的影响见图2,最佳氮源为蛋白胨,产酶量为190.71 U·mL<sup>-1</sup>,其次是酵母粉,速效氮源以硫酸铵为佳。

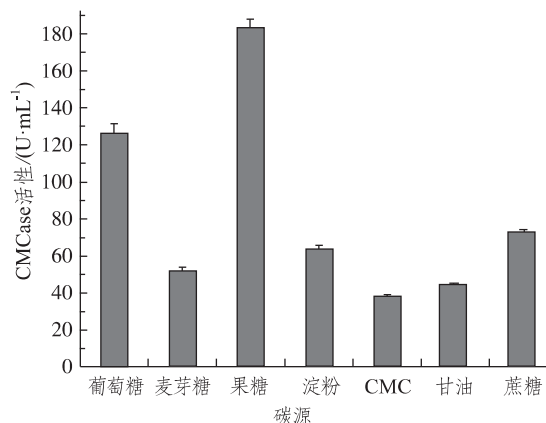


图1 碳源对菌株发酵产CMCase的影响

Fig.1 Effect of carbon sources on the CMCase activity of *Bacillus* sp.B59

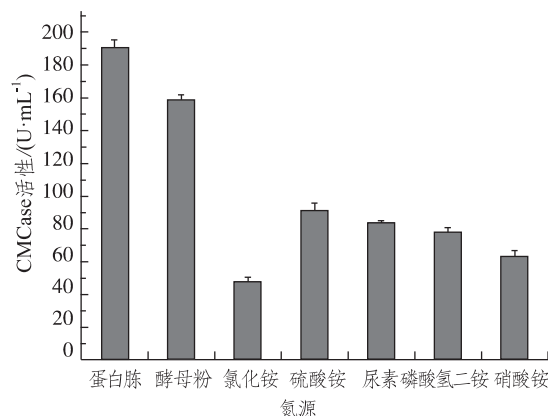


图2 氮源对菌株发酵产CMCase的影响

Fig.2 Effect of nitrogen sources on the CMCase activity of *Bacillus* sp.B59

### 2.3 金属盐对菌株产酶的影响

选用发酵培养基:20 g·L<sup>-1</sup>果糖,0.2 g·L<sup>-1</sup>CMC,15 g·L<sup>-1</sup>蛋白胨,3 g·L<sup>-1</sup>金属盐,得出金属盐对菌株发酵产CMCase的影响,结果见图3。由图3可知,金属盐对菌株产酶有正影响是:ZnSO<sub>4</sub>>FeCl<sub>3</sub>>NaCl>KCl>MnSO<sub>4</sub>>FeSO<sub>4</sub>,而CuSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>和MgSO<sub>4</sub>对菌株产酶存在负效应。最佳产酶金属盐为ZnSO<sub>4</sub>,其产CMCase为195 U·mL<sup>-1</sup>,其次为FeCl<sub>3</sub>,其产酶量为172.52 U·mL<sup>-1</sup>。

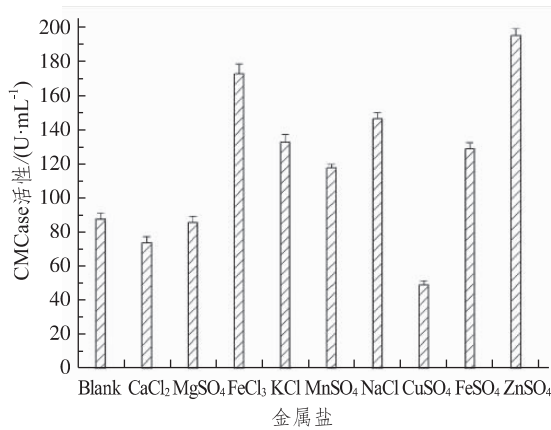


图3 金属盐对菌株发酵产 CMCase 的影响  
Fig.3 Effect of metal salts on the CMCase activity of *Bacillus* sp.B59

#### 2.4 初始 pH 值对菌株产酶的影响

根据碳源、氮源和金属盐对芽孢杆菌 B59 产 CMCase 影响的培养优化结果,采用如下发酵培养组分: 20 g · L<sup>-1</sup>果糖、15 g · L<sup>-1</sup>蛋白胨、0.2 g · L<sup>-1</sup> CMC、2 g · L<sup>-1</sup>ZnSO<sub>4</sub>、1 g · L<sup>-1</sup>FeCl<sub>3</sub>,确定培养基的初始 pH 对菌株产 CMCase 的影响。结果如图 4 所示,随着 pH 值升高酶活呈增加趋势,在 pH 值 8.0 获得最大酶活值 217.49 U · mL<sup>-1</sup>,当初始 pH 值超过 8 时酶活降低,说明在高 pH 值下不利于 CMCase 的表达。

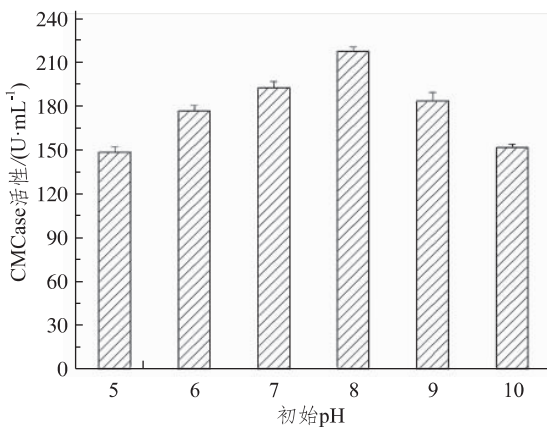


图4 初始 pH 对菌株发酵产 CMCase 的影响  
Fig.4 Effect of initial pH on the CMCase activity of *Bacillus* sp.B59

#### 2.5 培养温度对菌株产酶的影响

采用 2.4 中的发酵培养组分,在初始 pH 值为 8.0 条件下,研究培养温度对芽孢杆菌 B59 产 CMCase 的影响,结果如图 5 所示。在低温条件下,随着培养温度升高,CMCase 的活力呈增加趋

势,在 30 °C 时获得最大酶活力 209.63 U · mL<sup>-1</sup>,当温度超过高于 30 °C 时产酶量呈下降趋势。

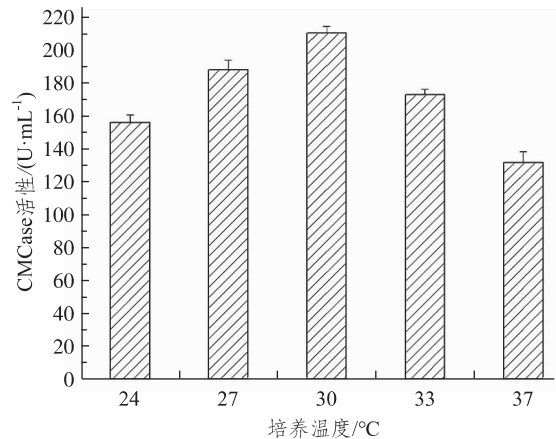


图5 培养温度对菌株发酵产 CMCase 的影响  
Fig.5 Effect of culture temperature on the CMCase activity of *Bacillus* sp.B59

#### 2.6 接种量对菌株产酶的影响

采用 2.4 中的发酵培养组分(pH 值 8.0),在 30 °C、200 r · min<sup>-1</sup>条件下培养 2 d 测定酶活力,结果如图 6 所示。当接种量为 2%(v/v) 时获得最大酶活力 223.54 U · mL<sup>-1</sup>,随着接种量的逐渐增加,酶活略呈降低趋势,增大接种量对 CMCase 产量无积极影响,从成本角度考虑也不经济。

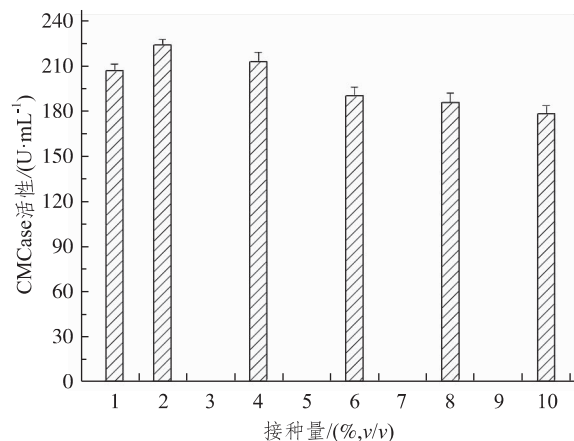


图6 接种量对菌株发酵产 CMCase 的影响  
Fig.6 Effect of inoculation amount on the CMCase activity of *Bacillus* sp.B59

#### 2.7 正交试验优化芽孢杆菌培养条件

依据培养组分和条件对芽孢杆菌 B59 产 CMCase 影响的优化结果,进行 7 因素 2 水平正交试验优化深入优化最佳产酶条件,各组均添加 0.2 g · L<sup>-1</sup> CMC

作为诱导物,其因素和水平见表1,正交试验结果与分析见表2。各因素对产酶影响大小依次为:果糖>ZnSO<sub>4</sub>>FeCl<sub>3</sub>>pH>温度>蛋白胨>接种量,最佳培养条件组合与用量为:25 g · L<sup>-1</sup>果糖,

20 g · L<sup>-1</sup>蛋白胨,0.5 g · L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>, 3 g · L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>,0.2 g · L<sup>-1</sup> CMC,pH 值 8.5,接种量 1%(v/v),培养温度 28 °C。

表1 正交试验因素和水平

Tab.1 Factors and levels of orthogonal tests

水平	A: 果糖/(g · L <sup>-1</sup> )	B: 蛋白胨/(g · L <sup>-1</sup> )	C: FeCl <sub>3</sub> /(g · L <sup>-1</sup> )	D: ZnSO <sub>4</sub> /(g · L <sup>-1</sup> )	E: pH	F: 接种量/(%,v/v)	G: 温度/°C
1	15	10	0.5	1	7.5	1%	28
2	25	20	1.5	3	8.5	3%	32

表2 正交试验的结果与分析

Tab.2 Results and analysis of orthogonal tests

序号	因素							CMCase/(U · mL <sup>-1</sup> )
	A	B	C	D	E	F	G	
1	1	1	1	1	1	1	1	178.98±3.54
2	1	1	1	2	2	2	2	216.19±4.72
3	1	2	2	1	1	2	2	135.76±1.93
4	1	2	2	2	2	1	1	237.37±4.08
5	2	1	2	1	2	1	2	198.46±3.28
6	2	1	2	2	1	2	1	236.08±4.61
7	2	2	1	1	2	2	1	255.53±3.96
8	2	2	1	2	1	1	2	275.86±5.07
K1	765.30	826.71	923.56	765.73	823.68	883.67	904.96	
K2	965.93	904.52	807.67	965.50	907.55	843.56	826.27	
k1	191.33	206.68	230.89	191.43	205.92	221.92	226.24	
k2	241.48	226.13	201.92	241.38	226.89	210.89	206.57	
R	50.16	19.45	28.97	49.94	20.97	11.03	19.67	

注: K<sub>1</sub>,某因素水平1的总和; K<sub>2</sub>,某因素水平2的总和; k<sub>1</sub>,某因素水平1的均值; k<sub>2</sub>,某因素水平2的均值; R,极差

### 2.8 发酵培养曲线

采用优化后的发酵培养组分和条件: 25 g · L<sup>-1</sup>果糖,20 g · L<sup>-1</sup>蛋白胨,0.5 g · L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>,3 g · L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>,0.2 g · L<sup>-1</sup> CMC,pH 值 8.5,接种量 1%(v/v),50 mL/500 mL 瓶,在 28 °C、200 r · min<sup>-1</sup>下发酵生产 CMCase。菌体密度、CMCase 活力随发酵时间的变化曲线如图7所示,经短暂调整期后进入生长对数期,发酵 28 h 后菌体浓度达到最大值为 57.78(OD600),随后进入静止期并逐渐的缓慢降低。CMCase 产量开始随着菌体浓度的增加而迅速升高,在 40 h 时达到最大值 786.92 U · mL<sup>-1</sup>,CMCase 与菌体浓度见有一定关联但没有严格的线性关系。在发酵后期 CMCase 活性随时间延长而快速降低,发酵 48 h 后 CMCase 活力为 523.68 g · L<sup>-1</sup>,远高于正交试验测定的最大值 275.86 U · mL<sup>-1</sup>,说明培养优化获得的最佳条件有利于 CMCase 产量的提高。

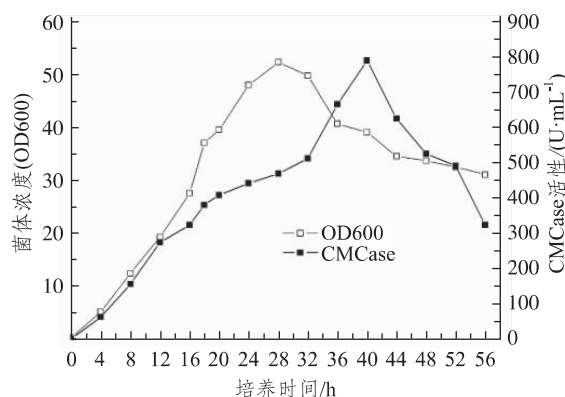


图7 芽孢杆菌 B59 发酵产 CMCase 的培养曲线  
Fig.7 Culture curve of *Bacillus* sp.B59 for the CMCase production

### 3 结语

本文首先通过优化碳源、氮源、金属盐、初始 pH 值、培养温度和接种量对芽孢杆菌 B59 产 CMCase 的影响,在此基础上通过 7 因素 2 水平的

正交试验确定最佳产酶工艺为: 25 g · L<sup>-1</sup>果糖, 20 g · L<sup>-1</sup>蛋白胨, 0.5 g · L<sup>-1</sup>FeCl<sub>3</sub>, 3 g · L<sup>-1</sup>ZnSO<sub>4</sub>, 0.2 g · L<sup>-1</sup>CMC, pH 值 8.5, 接种量 1% (v/v), 在装液量 50 mL/500 mL、培养温度 28 °C 和 200 r · min<sup>-1</sup>下发酵培养 40 h, 在该最优条件下获得 CMCase 活力为 786.92 U · mL<sup>-1</sup>, 具有行业应用潜力。本研究所用的产酶菌株为耐热芽孢杆菌, 属于潜在益生菌, 可将 CMCase 和芽孢杆菌 B59 菌体一并作为饲用微生态制剂用于饲料行业, 市场前景广阔, 相关研究正在深入进行中。

#### 参考文献:

- [1] INFANZÓN-RODRÍGUEZ M I, RAGAZZO-SÁNCHEZ J A, MORAL S, et al. Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* ITV02 from sweet sorghum bagasse in submerged culture using a Box-Behnken design [J]. *Sugar Technology*, 2020, 22: 266-273.
- [2] RAHEJAA Y, KAURA B, FALCOB M, et al. Secretome analysis of *Talaromyces emersonii* reveals distinct CAZymes profile and enhanced cellulase production through response surface methodology [J]. *Industrial Crops & Products*, 2020, 152: 112554.
- [3] SIQUEIRA J G W, RODRIGUES C, VANDENBERGHE L P S, et al. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: a review [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2020, 132: 105419.
- [4] GOUKANAPALLE P K R, KANDERI D K, RAJOJI G, et al. Optimization of cellulase production by a novel endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* TKBR1 isolated from Thalakona forest [J]. *Cellulose*, 2020, 27: 6299-6316.
- [5] EZEILO U R, WAHAB R A, MAHAT N A. Optimization studies on cellulase and xylanase production by *Rhizopusoryzae* UC2 using raw oil palm frond leaves as substrate under solid state fermentation [J]. *Renewable Energy*, 2020, 156: 1301-1312.
- [6] 郝哲, 唐叶衡, 耿荣庆, 等. 稻草秸秆饲料中微生物菌株的分离与鉴定 [J]. *现代农业科技*, 2018, 5: 229-230.
- [7] PHILIP N V, KOTESHWARA A, KIRAN G A, et al. Statistical optimization for coproduction of chitinase and beta 1,4-endoglucanase by chitinolytic *Paenibacillus elgii* PB1 having antifungal activity [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191: 135-150.
- [8] 胡佳俊, 朱仁懿, 高旻天. *Acremonium* 纤维素酶在玉米芯糖化中的应用 [J]. *工业微生物*, 2015, 45(5): 1-6.
- [9] 孙国强, 吕永艳, 刘建雷. 脂肪酸钙对瘤胃发酵及羧甲基纤维素酶活性的影响 [J]. *中国饲料*, 2010, 24: 31-33.
- [10] CHEN L, WEI Y, SHI M, et al. Statistical optimization of a cellulase from *Aspergillus glaucus* CCHA for hydrolyzing corn and rice straw by RSM to enhance yield of reducing sugar [J]. *Biotechnology Letters*, 2020, 42: 583-595.
- [11] 董妙音, 王曙阳, 王雨辰, 等. 丝状真菌在纤维素酶合成过程中碳源代谢调控的研究进展 [J]. *中国酿造*, 2016, 35(10): 1-4.
- [12] BEHERA B C, SETHI B K, MISHRA R R, et al. Microbial cellulases - diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: a review [J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2017, 15: 197-210.
- [13] YADAV A, ALI A A M, INGAWALE M, et al. Enhanced co-production of pectinase, cellulase and xylanase enzymes from *Bacillus subtilis* ABDRO1 upon ultrasonic irradiation [J]. *Process Biochemistry*, 2020, 92: 197-201.
- [14] YAZICI S Q, OZMEN I. Optimization for coproduction of protease and cellulase from *Bacillus subtilis* M-11 by the Box-Behnken design and their detergent compatibility [J]. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2020, 37: 49-59.
- [15] 程仕伟, 李坦坦, 梁会会, 等. 响应面优化金橙黄微杆菌 YT9 的发酵条件生产纤维素酶 [J]. *中国酿造*, 2013, 32(4): 48-51.

(下转第 156 页)

## Artificial Infection of Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus to Post Larvae *Penaeus Vannamei*

WANG Jingjing, YU Jiyue, HOU Zihao, CHANG Linrui, LI Ting, YAN Dongchun

(School of Agriculture, Ludong University, Yantai 264039, China)

**Abstract:** Infectious hypodermic and hematopoietic tissue necrosis virus (IHHNV) is one of the important pathogens that harm the shrimp aquaculture industry. It is widely distributed, harmful, and highly infectious, causing huge economic losses to shrimp aquaculture. The pathogenicity of IHHNV is closely related to the age and size of the host. In this paper, we conducted IHHNV infection experiments on healthy *Penaeus vannamei* post larvae by artificial feeding, IHHNV infection and viral load were detected using ordinary PCR and fluorescence quantitative PCR. The results showed that the post larvae of *Penaeus vannamei* can be infected with IHHNV by artificial feeding, and the infection rate of IHHNV is 43.3%, and the maximum viral load is  $28.7 \text{ copies} \cdot \mu\text{g}^{-1}$  DNA. The results of this experiment provide a theoretical basis for the effective prevention and control of IHHNV in artificial culture of *Penaeus vannamei*.

**Keywords:** Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus; post larvae of *Penaeus vannamei*; artificial infection

(责任编辑 李维卫)

(上接第150页)

**Abstract ID:** 1673-8020(2021)02-0146-EA

## Culture Optimization of *Bacillus* sp.B59 for the Production of Carboxymethyl-cellulase

ZHANG Qian<sup>1</sup>, MA Ruimei<sup>1</sup>, XIE Xiaoman<sup>2</sup>, DONG Quanxing<sup>1</sup>, Ge Yihe<sup>1</sup>, Feng Zhibin<sup>1</sup>, CHENG Shiwei<sup>1</sup>

(1.School of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China; 2.Shandong Forest Germplasm Resources Center, Jinan 265709, China)

**Abstract:** Cellulase from *Bacillus* has excellent properties such as heat and alkaline resistance, that resulted in important applications in feed additives and other industries. In this study, using *Bacillus* sp.B59 isolated from the offshore soil, the influencing factors of carboxymethyl-cellulase (CMCase) producing was studied by optimizing carbon source, nitrogen source, metal salt, initial pH, culture temperature and inoculation amount, and then the orthogonal test was used to determine the optimum CMCase production process, which was  $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  fructose,  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  peptone,  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{FeCl}_3$ ,  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4$ ,  $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  carboxymethyl-cellulose, pH 8.5, 1% (v/v) inoculation amount and culture temperature of 28°C. The maximum CMCase activity was obtained as  $786.92 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  under optimal culture conditions for 40 h. This study lays a foundation for the subsequent scale preparation and application.

**Keywords:** *Bacillus* sp.; carboxymethyl-cellulase; culture optimization; fermentation production

(责任编辑 李维卫)