

白蚁肠道具耐高温耐碱 β -葡萄糖苷酶活性 共生菌株的筛选鉴定及其产酶条件优化^①

赵素雅, 刘苏瑶, 魏旭阳, 尹晓燕, 牛秋红

南阳师范学院 生命科学与农业工程学院, 河南 南阳 473061

摘要: 从低等木食性白蚁——黑胸散白蚁肠道中通过七叶苷与柠檬酸铁铵的显色反应筛选出 14 株产 β -葡萄糖苷酶的菌株。采用选择培养复筛出 1 株在 60 °C, pH 值为 8 的培养条件下, 具有耐高温耐碱性的产 β -葡萄糖苷酶的菌株 BH1。通过对 BH1 菌株进行形态学鉴定, 结合 16S rRNA 序列对比分析, 初步判断 BH1 属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。运用单因素和正交试验法对其在产酶过程中的培养条件, 如时间、温度、pH 等进行优化。通过单因素试验可知 BH1 菌株产酶最佳碳源是麦麸, 氮源是酵母膏, 无机盐是 NaCl, 最适 pH 值为 8.0, 最适温度为 60 °C。BH1 菌株最佳酶活力为 36.24 U/mL, 在 pH 值为 9.0, 温度为 70 °C 时还具有相对较高的酶活, 也进一步说明了该菌株所产生的 β -葡萄糖苷酶具有耐高温耐碱的特性。

关键词: 黑胸散白蚁; β -葡萄糖苷酶; 筛选鉴定; 耐高温耐碱

中图分类号: Q939.9

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2021)06-0065-10

世界环境问题日益突出, 关于环境污染与保护成为当前研究的重点和热点。地球上的纤维素生物质数量巨大, 应用广泛且价廉, 作为一种可再生资源, 纤维素生物质可以有效缓解环境污染和能源危机, 促进经济的可持续发展^[1]。我国每年纤维素资源的产量也十分庞大, 木质纤维素在作物秸秆中含量丰富, “十二五”期间, 我国秸秆理论总量从 8.4 亿 t 增至 10.4 亿 t, 但对它的利用却不高^[2]。纤维素在大自然中的降解速率非常缓慢^[3]。纤维素酶系可以有效水解纤维素, 使其转化为葡萄糖, 从而提高纤维素资源的利用率。纤维素酶系主要分为 3 类: 1) 内切葡聚糖酶, 也称为 Cx 酶; 2) 外切葡聚糖酶, 又称为 Ci 酶; 3) β -葡萄糖苷酶, 也称为纤维二糖酶^[4-5]。 β -葡萄糖苷酶是组成纤维素酶系中的最重要的纤维素酶, 对天然纤维素降解起着主导作用^[6]。它主要水解化合物末端的非还原性 β -D-葡萄糖苷键, 从而释放出 β -D-葡萄糖和配基^[7]。它的酶活力高低直接影响到纤维素酶的总体酶活, 对纤维素的降解十分重要。 β -葡萄糖苷酶在自然界中存在的形式有很多种, 微生物是其主要存在形式之一, 但是大多数 β -葡萄糖苷酶的酶活较低^[8]。因此从微生物中筛选出高效产 β -葡萄糖苷酶的菌株, 对纤维素资源的利用有着十分重要的意义^[9]。

目前用于商业化生产和应用的 β -葡萄糖苷酶大部分产自于真菌^[10], 其中对霉菌的研究最为广泛。真菌以孢子生殖, 容易被扩散和感染^[11]。细菌也能产 β -葡萄糖苷酶, 且存在范围十分广泛, 但对细菌在这方面研究并不多。细菌与真菌相比, 繁殖速度快, 抗逆性有所提高^[12]。

β -葡萄糖苷酶在常温下的酶解速率缓慢, 在一些极端环境中降解更为艰难。因此研究极端条件下 β -葡萄糖苷酶活性更有意义, 如耐高温耐碱的 β -葡萄糖苷酶菌株比常温的更有优势^[13], 其优势在于耐高温耐碱

① 收稿日期: 2020-12-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31570120), 河南省能源微生物资源可持续利用创新型科技团队项目。

作者简介: 赵素雅, 硕士研究生, 主要从事农业微生物多样性及其绿色转化的研究。

通信作者: 牛秋红, 博士, 教授, 硕士研究生导师。

的 β -葡萄糖苷酶相比常温下的酶热稳定性更高,可以降低生产过程中的成本,减少能耗,同时也减少了生产过程中的杂菌污染^[14]. 苏迪等^[15]于 2012 年筛选获得 1 株有极高耐碱性的产 β -葡萄糖苷酶的菌株 CBG-08,该菌株在 pH 值为 10, 35 °C 时有最大酶活力,活性最高为 48.9 U/mL. 李松等^[16]于 2015 年分离到 1 株可在 50 °C, pH 值为 9.5 的条件下分解纤维素的产 β -葡萄糖苷酶的菌株(*Bacillus* sp.). Schröder C 等^[17]则在 2019 年重组 β -葡萄糖苷酶 Vul_Bgl1A,使其在 105 °C, pH 值为 7.0 的条件下显示最高活性,在 120 °C 下相对活性为 61%,成为迄今为止最耐热活性的 β -葡萄糖苷酶之一. 目前就发酵生产 β -葡萄糖苷酶的参数优化这一方面在国内外学者的研究中引起一阵热潮. 优化 β -葡萄糖苷酶发酵过程中的生产参数可以有效提高其产率,从而提高酶的降解速率. 我国学者彭利沙^[18]于 2016 年发现 1 株产 β -葡萄糖苷酶的绿色木霉 GIM3.139,该菌株在 80 °C, pH 值为 6.16 时具有最佳酶活力,耐酸碱稳定性好,通过单因素正交试验和响应面方法优化其发酵培养基和发酵条件,使 β -葡萄糖苷酶酶活力较初始酶活力提高了 144%. 国外研究相关人员 Martins E D S 等^[19]于 2019 年分离到 1 株具有 β -葡萄糖苷酶活性的嗜热真菌(*Thermomucor indicae-seudaticae*),其最大的酶活性在 pH 值为 3.5~4.5, 70 °C 下发生,通过对生产 β -葡萄糖苷酶的发酵参数进行优化,使酶活性提高了 120.0%.

白蚁肠道内细菌种类十分丰富,且数量惊人. 就目前而言,白蚁研究者从显微研究得到,低等白蚁和高等白蚁后肠中都存在着大量密度和形态不同的优势细菌. 现已从低等白蚁和高等白蚁后肠道中分离出多种异养型细菌,大部分为兼性厌氧菌,有的甚至是严格的好氧型细菌,包括肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)、葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、拟杆菌(*Bacteroids* sp.)和链球菌(*Streptococcus* sp.)等,但白蚁肠道内的优势菌株因与其所共生的白蚁种类不同而有所差异^[20-22]. 白蚁体内共生微生物具有高效消化纤维素食物的能力,为在白蚁中筛选分离纤维素降解酶提供了可靠依据.

本试验利用七叶苷平板从黑胸散白蚁肠道中筛选出产 β -葡萄糖苷酶的菌株,通过选择培养对其耐受性进行研究,筛选出 1 株在 60 °C, pH 值为 8 的高温碱性条件下也能高效分解纤维素的菌株 BH1,并对它的产酶条件,如培养基、培养时间和温度等进行优化. 成果为以后相关学者对耐高温耐碱菌株的筛选鉴定和产酶条件优化这方面的研究提供了参考,白蚁体内共生微生物具有能够高效消化纤维素食物的能力,该成果也为在白蚁中探究降解纤维素机制提供了可靠依据.

1 材料与方法

1.1 材 料

白蚁由华中师范大学杨红老师研究团队友情赠送,为低等木食黑胸散白蚁.

1.2 培养基与试剂

筛选培养基: 酵母膏 1 g, 蛋白胨 2 g, 七叶苷水解物 0.2 g, 柠檬酸铁铵 0.5 g, 琼脂 4 g, 蒸馏水 200 mL, 用稀硫酸溶液和氢氧化钠溶液分别将筛选培养基的 pH 值调至 7, 8, 9, 10, 11, 12.

LB 培养基: 酵母膏 1 g, 蛋白胨 2 g, 氯化钠 2 g, 琼脂 4 g, 蒸馏水 200 mL, pH 值为 7.0.

对硝基苯酚- β -D-葡萄糖苷溶液(p-NPG), 0.2 mol/L pH 值为 7.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液.

1.3 产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选分离

取成年黑胸散白蚁 25 只,用 75%乙醇消毒 5 min,然后用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,去除头、胸部,在无菌操作台下取出肠道组织,匀浆后取菌液进行梯度稀释,吸取 100 μ L 菌液涂布于筛选培养基上,将培养基放入恒温培养箱中,30 °C 倒置培养 2~3 d,观察有无带有透明圈黑色菌落的生成.

1.4 耐高温耐碱 β -葡萄糖苷酶菌株的复筛

待平板上长出菌落后,将带有黑色透明圈的菌落分别接种在 pH 值为 7, 8, 9, 10, 11, 12 共 6 个酸碱梯度的筛选培养基中,将接种不同 pH 的筛选培养基分别放置于温度为 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C 的恒温培养箱中,并进行倒置培养 2~3 d,观察是否产生带有透明圈黑色菌落.

1.5 耐高温耐碱 β -葡萄糖苷酶 BH1 菌株的鉴定

将接种环灼烧并冷却,挑取 BH1 的单菌落划线接种于 LB 固体培养基上,在 30 °C 的恒温培养箱中,倒置

培养 24 h, 观察耐高温耐碱 β-葡萄糖菌株 BH1 单菌落特征, 如大小、颜色、质地、边缘状态、表面状态等.

将上述所得到的 BH1 菌株的单菌落, 用灭菌的牙签挑取于载玻片上, 对 BH1 菌株进行革兰氏染色, 经过初染、媒染、脱色、复染后, 加以镜检并记录.

提取 BH1 菌株的基因组, 用 27 F 和 1 492 R 引物扩增该菌株的 16S rRNA 序列, 将其 PCR 产物送至上海生物有限公司进行纯化和测序. 拼接测序所得序列, 并删去上下游引物前后序列, 借助于 NCBI 中 Blast 功能, 下载多个与菌株 BH1 序列同源性较高的序列, 通过 EzBioCloud 软件进行多序列比对, 之后借助于 MEGA 7.0 软件构建系统发育树.

1.6 β-葡萄糖苷酶活力测定

分别取 7 支已高温灭菌过的试管并标上记号, 按表 1 分别加入 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液和 0.1 mmol/L 的对硝基苯酚溶液, 充分混合均匀, 并于室温下静置 30 min, 在可见分光光度计的 400 nm 波长下, 用 1 号试管作为空白对照, 将分光光度计归零, 测定 2—7 号试管溶液的吸光值, 并记录.

表 1 制备木糖标准曲线的溶液体系 /mL

试管编号	1	2	3	4	5	6	7
0.1 mmol/L 对硝基苯酚	0.0	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
0.5 mol/L 氢氧化钠	5.0	4.8	4.6	4.2	3.8	3.4	3.0

取活化后的菌株 BH1, 挑单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C, 220 r/min 恒温震荡培养 12 h, 以 1 : 100 的比例转接于 250 mL 的 LB 液体培养基中, 37 °C, 220 r/min 恒温震荡培养, 不同时间段于超净工作台吸取 5 mL 的发酵液, 在高速离心机中 8 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液. 用移液枪吸取 0.1 mL 上清液, 加入 0.9 mL 的 0.2 mol/L pH 值为 7.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液, 置于 50 °C 水浴锅中加热 10 min, 然后立即加入 1 mL 预热 10 min 的 5 mmol/L p-NPG 溶液, 室温静置 10 min, 计时结束后快速加入 3 mL 的 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液终止反应, 室温静置 15 min, 于紫外分光光度计 400 nm 处测定吸光值. 以经 100 °C 沸水浴煮沸使 β-葡萄糖苷酶活性失活的样品做空白对照.

β-葡萄糖苷酶酶活力: 在上述反应条件下, 以 1 min 内催化生成 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量为 1 个单位酶活力.

1.7 BH1 菌株的产酶条件优化

碳源的影响: 采用控制变量法, 保持培养基中其他条件不变, 观察使用不同碳源对酶活力的影响.

氮源的影响: 采用控制变量法, 保持培养基中其他条件不变, 观察使用不同氮源对酶活力的影响.

无机盐的影响: 采用控制变量法, 保持培养基中其他条件不变, 观察使用不同无机盐对酶活力的影响.

pH 的影响: pH 会影响菌株的生长和发酵, 通过设置不同 pH 梯度的溶液来观察不同 pH 对酶活力的影响.

温度的影响: 温度会影响菌株的生长和发酵, 通过设置不同温度梯度的溶液来观察不同温度对酶活力的影响.

正交试验: 根据发酵培养基的优化结果, 选取对 BH1 菌株产酶影响较大的 5 个因素, 用试验中获得的结果取 3 个平均值, 通过正交试验进行分析和处理.

1.8 耐高温耐碱 β-葡萄糖苷酶的分离纯化

参考文献方法^[23], 对耐高温耐碱 β-葡萄糖苷酶进行分离纯化.

1.8.1 硫酸铵分级沉淀

先对菌株进行发酵培养, 然后取粗酶液 25 mL, 分别置于 6 个烧杯中, 向烧杯中分别加入饱和度为 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 的硫酸铵溶液, 室温静置一段时间后, 在 4 °C, 8 000 r/min 的条件下离心 20 min, 取上清液测蛋白质的含量, 从而得出最适合酶分离的硫酸铵饱和度, 进而较大程度地除去杂蛋白质.

1.8.2 透析去盐

1) 取长度在 10 cm 左右的透析袋, 放入 NaHCO₃ 溶液中加热煮沸约 10 min, 拿出用蒸馏水清洗干净,

然后放到 1 mmol/L 的 EDTA 溶液中加热煮沸 10 min.

2) 将样品装入透析袋中,用 10 mmol/L pH 值为 6.0 磷酸盐缓冲液在 4 ℃ 的条件下透析 1 d,用磁力搅拌器充分混合溶液,以便加快透析的效率.在此期间,缓冲液每隔 2~3 h 更换 1 次,从而使样品的电导率低于 2 ms/cm,使蛋白质能够在阳离子交换柱上结合.

1.8.3 DEAE-52 柱层析

- 1) 缓冲液和样品用 0.45 μm 的膜进行真空过滤处理,除去其中的不溶性颗粒.
- 2) 将柱子清洗干净并固定在铁架台上,加入去离子水,然后将柱子内的气泡赶净.液面体积大约是柱体积的一半,轻轻搅拌柱材料使其混合均匀,混匀后先缓慢少量加入柱子中,当看到最下面有少量沉降层,再用玻璃棒引流缓慢加入柱材料,在整个过程中,速度不可过快,以保证有沉降层、上层水层、正在沉降层.反应结束后盖上盖子,将上下导管连接在一起,将柱子和铁架台放在层析柜上,竖直放置过夜,让材料因为重力自然压实.
- 3) 在平衡柱子前,要充分洗净机器,保证不留杂质,并用去离子水清洗泵;先连接机器与柱子,用洗脱缓冲液平衡柱子,保持柱子充分平衡,以确保洗去杂蛋白.然后用上样缓冲液洗脱,将柱子内的 NaCl 充分去后准备上样.
- 4) 流速控制为 0.5 mL/min,直到出现穿透峰时结束上样.然后用上样缓冲液将不结合的蛋白充分洗去.
- 5) 进行梯度洗脱,用梯度为 20%,40%,60%,80%,100%的洗脱缓冲液进行洗脱,等到出现洗脱峰时收集样品.
- 6) 洗脱结束,用缓冲液多次冲洗柱子.撤掉柱子,保存层析柜,用去离子水清洗 A 和 B 泵各 15 min,流速为 5 mL/min,以防被盐结晶堵塞导管.若柱材料、柱子和机器长时间不用,应保存在 20%的乙醇中.

1.8.4 蛋白质浓度的测定

用考马斯亮蓝 G250 法:预先把待测酶液稀释,并记录稀释倍数,然后将 0.5 mL 已稀释过的酶液加入到试管中,再加入 2.5 mL 考马斯亮蓝 G250 试剂,充分混匀,室温放置 5 min,在 595 nm 处测定其吸光值.

1.8.5 纯酶活性验证

聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 β-葡萄糖苷酶的分子量,并测定纯酶的活性及酶学性质.

2 结果与分析

2.1 耐高温耐碱 β-葡萄糖苷酶菌株的分离筛选

利用七叶苷与柠檬酸铁铵的显色反应,从白蚁肠道中共筛选出 14 株产 β-葡萄糖苷酶菌株(图 1a).通过复筛对比黑色透明圈的大小得到 4 株产酶活性较高的菌株,命名为 BH1,Z4,H7,RB6(图 1b),分别对上述 4 菌株进行耐高温和耐 pH 性能试验.先对这 4 菌株进行活化,挑取单菌落放到同一 LB 固体培养基平板上,分别置于 20 ℃,30 ℃,40 ℃,50 ℃,60 ℃,70 ℃ 的恒温培养箱中,倒置培养 24 h.在 60 ℃ 的培养条件下,只有 BH1 菌株黑色圈最大(图 1c).同时对这 4 菌株进行活化,挑取单菌落放到不同 pH 值(7,8,9,10,11,12)的 LB 固体培养基平板上,分别置于 37 ℃ 恒温培养箱中,倒置培养 24 h.在 pH 值为 9 的平板上,只有 BH1 菌株黑色圈最大(图 1d).

对这 4 菌株进行酶活对比,结果见表 2.

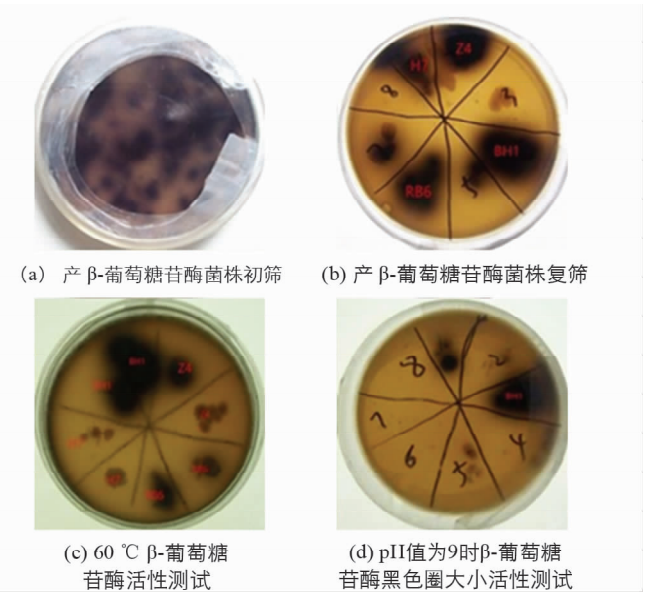


图 1 耐高温耐碱 β-葡萄糖苷酶菌株 BH1 的筛选

表 2 菌株酶活力对比

菌株	酶活/(U · mL ⁻¹)
BH1	15.6
Z4	7.9
H ₇	9.5
RB6	8.2

通过对上述 4 菌株进行耐高温和耐酸碱性能试验,发现 BH1 菌株具有耐高温耐碱的特性,所以选择 BH1 作为目的菌株进行研究,并对 BH1 菌株进行鉴定.

2.2 耐高温耐碱 β-葡萄糖苷酶 BH1 菌株的鉴定

2.2.1 BH1 菌株的形态学鉴定

将 BH1 菌株在 30 ℃ 条件下于恒温培养箱中倒置培养 24 h 后,对其单菌落进行观察,BH1 菌株的单菌落形小近似圆形,灰色,表面较光滑,湿润,质地均匀,较黏稠,易挑取.通过革兰氏染色进行观察,结果见图 2.

由图 2 可以看出,BH1 菌株通过革兰氏染色后,用生物显微镜进行观察,鉴定为革兰氏阳性菌,杆状(0.7~1.5 μm)×(1.6~4.0 μm).

2.2.2 BH1 菌株 16S rRNA 基因的扩增

对 BH1 菌株的 16S rRNA 基因组进行扩增,用 0.8% 的凝胶进行核酸电泳检测,结果见图 3.

由图 3 可以看出,BH1 菌株的 16S rRNA PCR 扩增的长度约为 1 600 bp.

2.2.3 系统发育树的构建

对 BH1 菌株的 16S rRNA 序列构建系统发育树,结果见图 4.

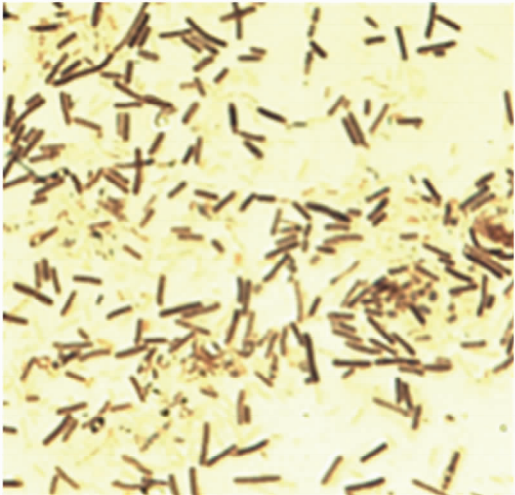
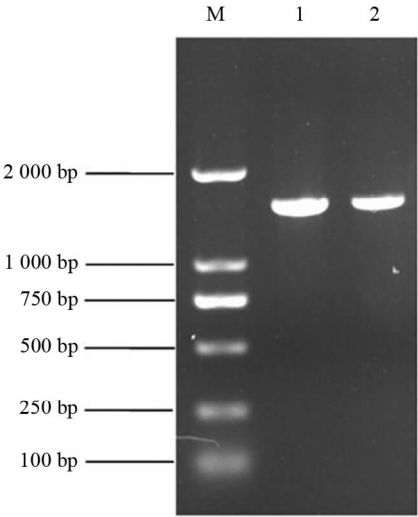


图 2 BH1 菌株的革兰氏染色图



1 为 2 000 Maker; 2 为 BH1 16S rRNA PCR 扩增片段.

图 3 BH1 的 16S rRNA PCR 扩增电泳图

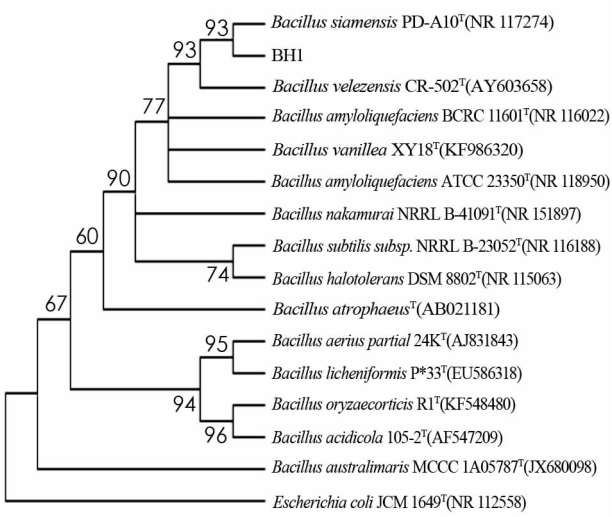


图 4 BH1 菌株的 16S rRNA 序列系统发育树的构建

由图 4 可以看出,BH1 菌株的 16S rRNA 基因组扩增所测序列与 BH1 菌株同源性较高的序列进行比对,发现 BH1 菌株与标准菌株 NR 117274(*Bacillus siamensis*)的同源相似性最高,达到 99.73%.

通过对 BH1 菌株的形态学、生理学及 16S rRNA 序列比对分析,结果表明 BH1 菌株为革兰氏阳性菌,属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.).

2.3 β-葡萄糖苷酶活力测定

制备 β-葡萄糖苷酶的酶活力标准曲线，横坐标为对硝基苯酚溶液浓度，纵坐标为光吸收值(400 nm)，绘制标准曲线，结果见图 5。

由图 5 可以看出，β-葡萄糖苷酶的酶活力测定标准曲线方程为 $y=0.1178x-0.1283$ ， $R^2=0.9993$ 。

2.4 BH1 菌株的产酶条件优化

2.4.1 BH1 菌株培养时间对产酶条件的影响

在初始发酵培养条件下，每间隔固定的时间取一次样，测定样品酶活力值，结果见图 6。由图 6 可以看出，当 BH1 菌株培养至 60 h 时，发酵液中 β-葡萄糖苷酶的酶活力值最高，为 15.6 U/mL。

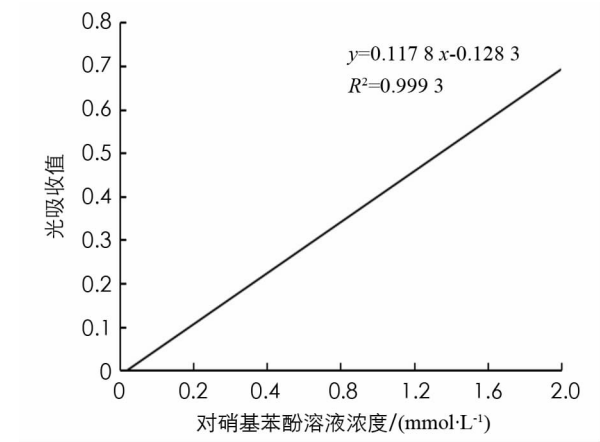


图 5 β-葡萄糖苷酶的酶活力标准曲线

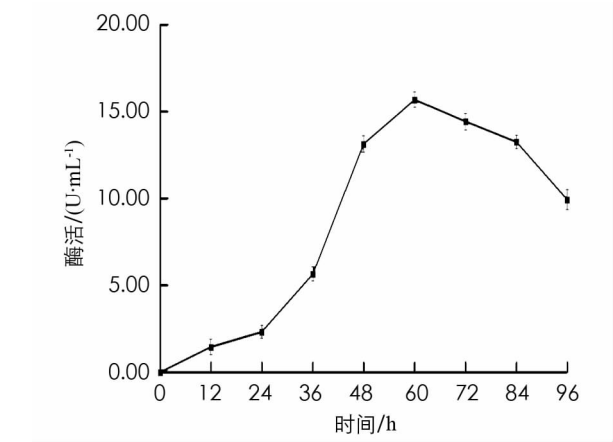


图 6 培养时间对产酶条件的影响

2.4.2 BH1 菌株培养基 pH 对产酶条件的影响

将 BH1 菌株培养基的初始 pH 值分别调至 3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0，在 37℃，180 r/min 条件下培养 60 h。取发酵液测定酶活力，结果见图 7。由图 7 可以看出，在发酵液的培养基 pH 值为 8.0 时，测得的 BH1 菌株酶活力值最大。

2.4.3 BH1 菌株培养温度对产酶条件的影响

将 BH1 菌株培养基的初始温度分别调为 30℃,40℃,50℃,60℃,70℃,80℃，180 r/min 条件下，培养 60 h。取发酵液测定酶活力，结果见图 8。由图 8 可以看出，在发酵液的培养基温度为 60℃时，测得的 BH1 菌株酶活力值最大。

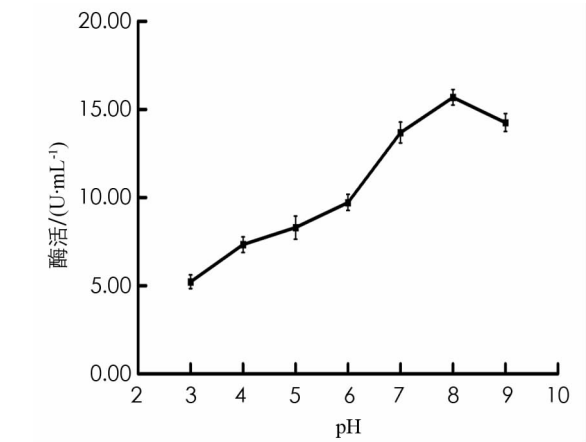


图 7 培养基初始 pH 对产酶的影响

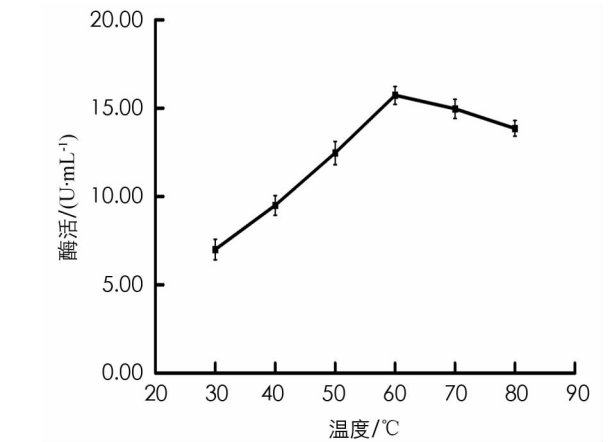


图 8 培养基初始温度对产酶的影响

2.4.4 BH1 菌株的发酵培养基主要成分优化

2.4.4.1 不同碳源对产酶条件的影响

分别在初始培养基中用蔗糖、麦麸、葡萄糖、玉米粉作为碳源，保持其他条件不变，在 37℃，180 r/min 条件下培养 60 h，取发酵液测定酶活力值，结果见图 9。由图 9 可以看出，麦麸是 BH1 菌株发酵

产 β -葡萄糖苷酶培养基中的最佳碳源.

2.4.4.2 不同氮源对产酶条件的影响

分别在初始培养基中用 NaNO_3 、酵母膏、蛋白胨、牛肉膏作为氮源, 保持其他条件不变, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 180 r/min 条件下培养 60 h , 取发酵液测定酶活力值, 结果见图 10. 由图 10 可以看出, 酵母膏是 BH1 菌株发酵产 β -葡萄糖苷酶培养基中的最佳氮源.

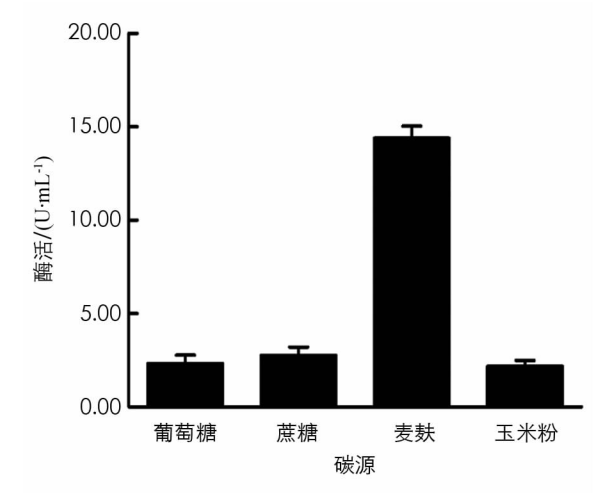


图 9 不同碳源对产酶的影响

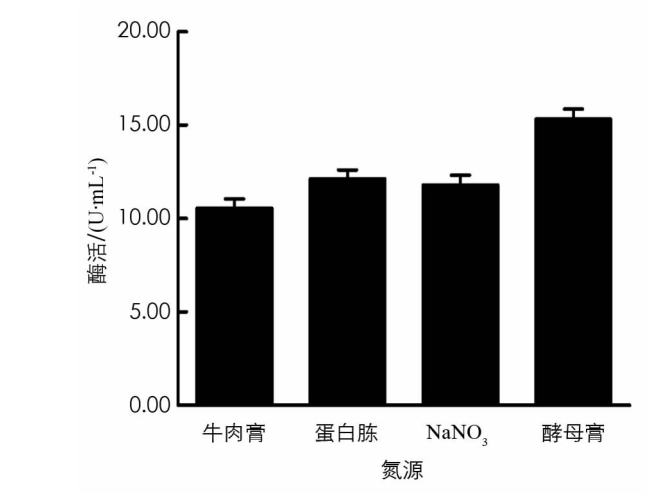


图 10 不同氮源对产酶的影响

2.4.4.3 不同无机盐对产酶条件的影响

分别在初始培养基中添加 0.2% NaCl , 0.2% KH_2PO_4 , 0.2% KCl , 0.04% CaCl_2 , 保持其他条件不变, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 180 r/min 条件下培养 60 h , 取发酵液测定酶活力值, 结果见图 11. 由图 11 可以看出, NaCl 是 BH1 菌株发酵产 β -葡萄糖苷酶培养基中的最佳无机盐.

2.5 正交试验

通过以上试验确定了最佳碳源、氮源、无机盐、初始 pH 值、温度, 然后运用正交试验 $\text{L}_9(3^4)$ 对碳源、氮源、无机盐和初始 pH 的最佳配比等进行分析, 试验设计见表 3, 表 4. 250 mL 三角瓶装液量 20 mL 、温度 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、转速 180 r/min 作为不变条件.

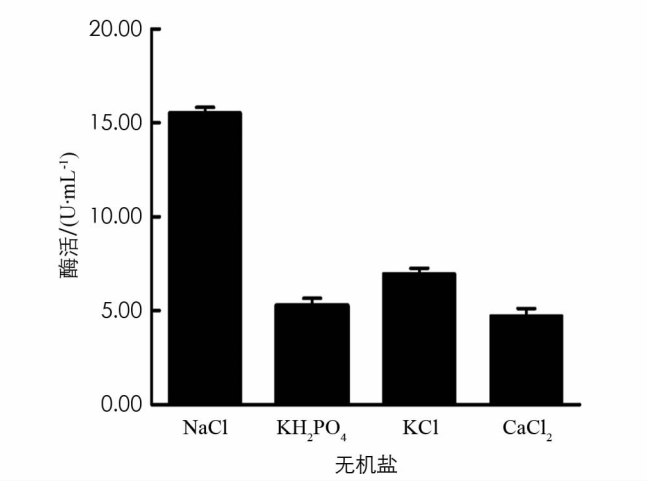


图 11 不同无机盐对酶活的影响

表 4 显示, 4 因素对 β -葡萄糖苷酶活力的影响与单因素试验结果大致相同. 再由方差分析表 5 可知, 每个因素对 β -葡萄糖苷酶活力的影响由大到小为碳源, 初始 pH 值, 无机盐, 氮源, 可见碳源对酶活力影响最大. 最优组合为 $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_3\text{D}_1$, 即当培养基中麦麸浓度为 3% , 酵母膏为 1.5% , NaCl 为 0.10% , 初始 pH 值为 7.0 时, 对 BH1 菌株产酶最好.

表 3 正交试验因素

水平	A 碳源 麦麸/%	B 氮源 酵母膏/%	C 无机盐 NaCl/%	D 初始 pH 值
1	2.0	1.0	0	7.0
2	3.0	1.5	0.05	8.0
3	4.0	2.0	0.10	9.0

表 4 L₉(3⁴) 正交试验设计及结果分析

序号	A 碳源	B 氮源	C 无机盐	D 初始 pH 值	酶活/(U·mL ⁻¹)
1	1	1	1	1	21.187
2	1	2	2	2	20.381
3	1	3	3	3	18.363
4	2	1	2	3	20.985
5	2	2	3	1	24.879
6	2	3	1	2	24.123
7	3	1	3	2	22.895
8	3	2	1	3	19.850
9	3	3	2	1	21.741
K1	0.893	0.792	0.737	1.233	
K2	1.927	1.719	1.196	1.407	
K3	0.526	0.835	1.413	0.706	
k1	0.298	0.264	0.245	0.411	
k2	0.642	0.573	0.399	0.469	
k3	0.175	0.278	0.471	0.235	
R	0.467	0.309	0.226	0.234	

表 5 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比值	F _{0.05}
麦麸	16.898	2	1.967	4.460
酵母膏	0.166	2	0.019	4.460
NaCl	1.594	2	0.186	4.460
初始 pH 值	15.709	2	1.828	4.460
误差	34.370	8	—	—

对正交试验得出的结果进行进一步验证,设计单因素优化后的 4 个因素发酵产酶的最佳条件与正交试验后得出的结果进行对比,做 3 个平行取平均值,结果见表 6,得出发酵最优组合为 A₂B₂C₃D₁.

表 6 验证试验结果

因 素	单因素优化	正交优化
麦麸/%	4.0	3.0
酵母膏/%	1.0	1.5
NaCl/%	0.05	0.10
初始 pH 值	8.0	7.0
酶活/(U·mL ⁻¹)	23.75	36.24

2.6 最佳条件下酶活及酶学性质测定

在 pH 值为 8.0, 60 ℃ 及最佳培养基配方的条件下测定 BH1 菌株粗酶液的活性最高可达 36.24 U/mL. 酶的热稳定性测试结果表明,在高于 70 ℃ 时酶活仍在 50% 以上,该酶的热稳定性比其他大多数真菌来源的 β-葡萄糖苷酶的酶活要高,进而也说明了该酶具有耐高温的特点. 酸碱稳定性测试结果表明,在 pH 值为 9.0 时,该酶的酶活仍保持在 60% 左右,并且稳定,从而进一步说明了该酶具有耐碱的特性,为该酶以后在碱性洗涤剂工业的应用上打下了坚实的基础.

3 结论与讨论

纤维素是一种可再生资源,在全球数量也十分巨大,β-葡萄糖苷酶可有效高速降解纤维素,促进纤维素资源的利用,减少浪费. 因此筛选耐高温耐碱的产 β-葡萄糖苷酶的菌株应用前景广阔.

β-葡萄糖苷酶对 pH 和温度等条件的适应能力不强,在一些极端条件下,如高温、碱性等,菌种产的

β -葡萄糖苷酶活性会降低甚至失活,并且产酶量也急剧下降,因此筛选出具有耐受性和酶活力高的菌株显得十分重要.关于 β -葡萄糖苷酶的耐受性和产酶方面的研究是目前国内外学者研究的热点.我国学者 Xu Z N 等^[24]在 2016 年发现 *Bacillus* sp. ZJ1308 产生的 β -葡萄糖苷酶在 pH 值为 6.0~8.0, 80 °C 和 90 °C 下表现出极高的热稳定性,通过响应面方法来优化培养基组成,在最佳条件下, β -葡萄糖苷酶的活性为 4.71 U/mL.国外研究人员 Almeida J M 等^[25]于 2015 年利用绿色木霉在深层发酵中生产 β -葡萄糖苷酶,通过应用中央复合设计和响应面方法优化生产工艺, β -葡萄糖苷酶活性提高了 3.6 倍.

目前同时在高温和碱性条件下对 β -葡萄糖苷酶的研究不多.本研究通过七叶苷与柠檬酸铁铵的显色反应分离出 14 株产 β -葡萄糖苷酶的菌株,对其温度和酸碱度进行选择培养,筛选出 1 株可以在 60 °C, pH 值为 8.0 的条件下存活且产 β -葡萄糖苷酶活力较好的菌株 BH1.对 BH1 的菌种进行形态学鉴定,结合 16S rRNA 序列进行同源性序列比对分析,确定 BH1 的菌种为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.).为有效提高其酶活力,本研究还对 BH1 菌种的产酶条件,如时间、温度和培养基等进行了优化,结果表明 BH1 菌种在发酵产酶过程中,培养基的最佳碳源是麦麸,氮源是酵母膏,无机盐是 NaCl,最适培养时间为 60 h,最适 pH 值为 8.0,最适温度为 60 °C.结果为以后相关学者对耐高温耐碱的 β -葡萄糖苷酶菌株的研究提供了参考.

参考文献:

- [1] 陈梅.斜卧青霉 β -葡萄糖苷酶的性质和功能研究及基因表达谱分析[D].济南:山东大学,2013.
- [2] 张露,郭晴.秸秆资源化利用的大气污染物排放机理、时空规律与减排策略研究[J].西南大学学报(自然科学版),2020,42(7):143-153.
- [3] 赵钰.产纤维素酶菌株的筛选及酶学性质研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2017.
- [4] KUBICEK C P, KUBICEK E M. Enzymatic Deconstruction of Plant Biomass by Fungal Enzymes [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2016, 35(3): 51-57.
- [5] PAYNE C M, KNOTT B C, MAYES H B, et al. Fungal Cellulases [J]. Chemical Reviews, 2015, 115(3): 1308-1448.
- [6] FENG T T, LIU H T, XU Q G, et al. Identification and Characterization of Two Endogenous β -Glucosidases from the Termite *Coptotermes Formosanus* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(7): 2039-2052.
- [7] OLIVEIRA R P, SANTOS B V, COSTA L, et al. Xylanase and β -Glucosidase Production by *Aspergillus Fumigatus* Using Commercial and Lignocellulosic Substrates Submitted to Chemical Pre-treatments [J]. Industrial Crops and Products, 2017, 95(2): 453-459.
- [8] 陈晨,宋华文,王洁,等.一种筛选胞外纤维素酶产生菌的快捷、灵敏、有效的方法[J].微生物学通报,2015,42(6):1175-1183.
- [9] 刘德海,郝益民,岳丹丹,等.一株产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选及酶学性质研究[J].中国酿造,2013,32(6):47-51.
- [10] 陈红歌,张东升,刘亮伟.纤维素酶菌种选育研究进展[J].河南农业科学,2008,37(8):5-7.
- [11] SCHWARZ W. The Cellulosome and Cellulose Degradation by Anaerobic Bacteria [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(5-6): 634-649.
- [12] 徐杰,杨谦.一株高活力纤维素酶产生菌-链霉菌 C-5 产酶研究[J].太阳能学报,2009,30(5):682-685.
- [13] 陈路劼.降解纤维素嗜热菌的筛选及其功能基因克隆[D].福州:福建农林大学,2008.
- [14] 杨芯卓.嗜热微生物来源的葡萄糖苷酶和木糖苷酶性质及功能研究[D].北京:中国农业科学院,2014.
- [15] 苏迪,徐小蓉,唐婧.高产碱性 β -葡萄糖苷酶的产纤维素酶菌株的筛选[J].贵州农业科学,2012,40(2):87-89.
- [16] 李松,杨倩,范李龙,等.碱性 β -葡萄糖苷酶产生菌株的筛选、鉴定及部分酶学性质研究[J].食品工业科技,2016,37(2):180-184.
- [17] SCHRÖDER C, EIXENBERGER D, SULEIMAN M, et al. Characterization of an Extremely Thermo-Active Archaeal β -Glucosidase and Its Activity towards Glucan and Mannan in Concert with an Endoglucanase [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(23-24): 9505-9514.
- [18] 彭利沙.绿色木霉耐热 β -葡萄糖苷酶的分离纯化、酶学性质及结构表征[D].秦皇岛:河北科技师范学院,2016.
- [19] MARTINS E D S, GOMES E, DA SILVA R, et al. Production of Cellulases by *Thermomucor Indicae*-*Seudaticae*; Char-

- acterization of a Thermophilic β -Glucosidase [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2019, 49(8): 830-836.
- [20] YANG H, PENG J X, LIU K Y, et al. Diversity and Function of Symbiotic Microbes in the Gut of Lower Termites [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(3): 496-499.
- [21] SHINZATO N, MURAMATSU M, MATSUI T, et al. Molecular Phylogenetic Diversity of the Bacterial Community in the Gut of the Termite *Coptotermes Formosanus* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, 69(6): 1145-1155.
- [22] Shinzato N, Muramatsu M, Matsui T, et al. Phylogenetic Analysis of the Gut Bacterial Microflora of the Fungus-Growing Termite *Odontomes formosanus* [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2007, 71(4): 906-915.
- [23] 李丰茂, 李佳欣, 郭小路, 等. ‘忠薯 1’薯皮过氧化物酶分离纯化及其理化性质研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2020, 42(10): 79-87.
- [24] XU Z N, ZHANG L, YU P. Optimization of a Heat-Tolerant β -Glucosidase Production by *Bacillus* sp. ZJ1308 and Its Purification and Characterization [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2016, 63(4): 553-563.
- [25] ALMEIDA J M, LIMA V A, GILONI-LIMA P C, et al. Canola Meal as a Novel Substrate for β -Glucosidase Production by *Trichoderma Viride*: Application of the Crude Extract to Biomass Saccharification [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(10): 1889-1902.

Screening and Identification of Bacteria from Termite Producing β -Glucosidase and Optimization of Conditions for Enzyme Production

ZHAO Su-ya, LIU Su-yao,

WEI Xu-yang, YIN Xiao-yan, NIU Qiu-hong

College of Life Science and Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Nanyang Henan 473061, China

Abstract: Fourteen strains of β -glucosidase-producing bacteria were screened from the intestinal tract of the lower cassava termite, Black-breasted Termite, by color reaction of escin and ferric ammonium citrate. With selective culture, a strain named BH1 producing β -glucosidase with high temperature and alkali tolerance under 60 °C and pH=8 culture conditions was selected. Through morphological identification, combined with 16S ribosomal RNA identification sequence analysis, the BH1 strain was preliminarily identified to belong to *Bacillus* sp. The single factor and orthogonal test method were used to optimize the cultivation conditions, such as time and temperature, in the process of producing enzymes. Through a single factor test, it can be seen that the best carbon source for enzyme production of BH1 strain is wheat bran, nitrogen source is yeast extract, inorganic salt is NaCl, the optimum pH is 8.0, and the optimum temperature is 60 °C. The optimal enzyme activity of BH1 strain is 36.24 U/mL. It also has a relatively high enzyme activity at a pH of 9.0 and a temperature of 70 °C, which further demonstrates that the β -glucosidase produced by this strain has high temperature and alkali resistance.

Key words: black-breasted Termite; β -glucosidase; screening and identification; high temperature and alkali resistance