

生物酶洗毛鞘氨醇杆菌 *Sphingobacterium sp.*的筛选与表征

郑来久^{1,2}, 徐春圆¹, 杜冰¹

1. 大连工业大学辽宁省清洁化纺织重点实验室, 大连 116034
2. 东华大学生态纺织教育部重点实验室, 上海 200051

摘要 羊毛纤维材料初加工普遍采用表面活性剂和无机盐作用的化学方法, 此方法需要在较高温度和较强机械作用下进行, 耗水耗能大, 同时洗毛废水排放到自然界中造成环境污染严重, 且纤维材料表面存在化学残留, 影响洗净毛纤维的品质, 易造成纤维损伤。为解决化学洗毛方法造成的环境污染和化学物质残留, 本文研究了生物酶洗毛技术, 在原毛表层污物中分离得到一株适于生物酶洗毛的高产脂肪酶菌株, 经形态鉴定、16S rDNA 菌种鉴定和生理生化指标鉴定, 确定为脂肪酶产生鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium sp.*)。通过 Rhodamine B 显色培养基的荧光实验得出 H/C 值 (荧光圈直径 H 与菌落直径 C 之比) 为 2。经酶活力测定, 在 30℃ 条件下鞘氨醇杆菌在 11h 达到产酶高峰 (101.67U/mL)。经脂肪酶洗毛实验验证, 洗净毛含脂率为 1.031%, 鞘氨醇杆菌对羊毛生物脱脂有较好的适用性。

关键词 生物酶洗毛; 菌种筛选; 鞘氨醇杆菌

中图分类号 TS133+2

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.33.003

Screening and Identification of *Sphingobacterium sp.* for Wool Enzymatic Scouring

ZHENG Laijiu^{1,2}, XU Chunyuan¹, DU Bing¹

1. Liaoning Provincial Key Laboratory of Textile Cleaning, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China
2. Key Laboratory of Science & Technology of Eco-textile of Ministry Education, Donghua University, Shanghai 200051, China

Abstract Chemical wool scouring method was widely used in the initial processing of the wool fiber material. This method depended on surfactant and inorganic and required high temperature and strong mechanical action. Huge amount of water and energy were consumed, and scouring wastewater was discharged in nature, causing serious environmental pollution. There were chemical residues on the surface of wool fiber, affecting the quality of scoured wool fiber and easily causing damage to fiber. In order to reduce environmental pollution and chemical residues of chemical wool scouring, the enzymatic scouring technology is researched, and the scouring strain that overproduce lipase is selected from the soiled surface of raw wool identified as *Sphingobacterium sp.* based on morphological, 16S rDNA sequencing, physiological, and biochemical tests. By means of Rhodamine B chromogenic medium fluorescence experiments, the H/C value of *Sphingobacterium sp.* is 2 (H/C is the ratio of Fluorescent ring diameter to colony diameter), and its enzyme activity could reach at an enzyme-producing peak (101.67U/mL) at 30℃ after 11h incubated. After verification experiment of enzymatic scouring, the greasy rate of enzymatic scoured wool fiber is 1.031%, therefore the lipase-producing strain, that is, *Sphingobacterium sp.* possesses the good applicability for the enzymatic scouring.

Keywords enzymatic scouring; strain screening; *Sphingobacterium sp.*

收稿日期: 2011-09-16; 修回日期: 2011-10-31

基金项目: 东华大学生态纺织教育部重点实验室访问学者基金项目 (Eco-VS-001); 辽宁省创新团队项目 (LT2010010)

作者简介: 郑来久, 教授, 研究方向为天然纤维生物技术, 电子邮箱: fztrwx@dpu.edu.cn

0 引言

羊毛是一种重要的天然纺织原料,羊毛纤维沾粘羊自身代谢产物、沙土、杂草等杂质,需要在纺织加工前进行洗毛处理。目前,国内外主要采用化学方法洗毛,此方法存在洗后羊毛表面化学残留多、洗毛废水中羊毛脂再回收利用率低、洗毛废水环境污染严重等问题。

近年来,Monlleo等^[1]用商品脂肪酶处理羊毛纤维,并研究了处理后的羊毛纤维的物理和化学变化。EI-Sayed等^[2]研究了酶处理对于羊毛防毡缩的作用。何泽寿等^[3]研究利用壳聚糖制成生物膜处理洗毛废水。王丽丽等^[4-5]基于生物酶洗毛技术研究探讨了生物酶在羊毛清洗中的研究及应用最新进展,指出生物酶处理工艺在节能环保、清洁生产、提高产品附加值方面具有明显优势。但生物酶洗毛技术仍处于研究阶段。生物酶很少单独用于洗毛工艺,通常是与其他合成洗涤剂一起使用来达到洗净毛的目的,且大部分为商品酶,其效果也不太明显。本文从内蒙原毛筛选出脂肪酶生产菌,并通过驯化培养,得到一株性能稳定的优良洗毛菌种。

1 材料与方法

1.1 实验材料

内蒙羊毛:品质支数为64^s,辽宁省阜新超懿集团提供。

1.2 培养基

富集培养基:蛋白胨 10g/L, K₂HPO₄ 0.5g/L, NaCl 0.5g/L, MgSO₄·7H₂O 1g/L, (NH₄)₂SO₄ 1g/L, 羊毛脂聚乙烯醇乳化液 120mL/L, pH7.5, 115℃灭菌 20min。

分离培养基 I:蛋白胨 10g/L, K₂HPO₄ 0.5g/L, NaCl 0.5g/L, MgSO₄·7H₂O 1g/L, (NH₄)₂SO₄ 1g/L, 羊毛脂聚乙烯醇乳化液 120mL/L, 琼脂 20g/L, pH7.5, 115℃灭菌 20min。

分离培养基 II:蛋白胨 10g/L, K₂HPO₄ 0.5g/L, NaCl 0.5g/L, MgSO₄·7H₂O 1g/L, (NH₄)₂SO₄ 1g/L, 0.5% Rhodamine B 溶液 10mL, 琼脂 20g/L, pH7.5, 115℃灭菌 20min。

种子培养基:蛋白胨 20g/L, 葡萄糖 20g/L, K₂HPO₄ 0.5g/L, MgSO₄·7H₂O 1g/L, (NH₄)₂SO₄ 1g/L, 羊毛脂 10g/L, pH7.5, 121℃灭菌 20min。

发酵培养基:蛋白胨 20g/L, 蔗糖 10g/L, K₂HPO₄ 0.5g/L, MgSO₄·7H₂O 1g/L, (NH₄)₂SO₄ 1g/L, 羊毛脂 10g/L, pH7.5, 121℃灭菌 20min。

1.3 筛选方法

富集培养:将5g原毛浸入100mL无菌水中,充分振荡,在无菌条件取1mL原毛菌悬液接种入50mL富集培养基中,30℃,180r/min,富集培养48h,共富集三代。

初筛培养:将富集菌液梯度稀释涂布在分离培养基 I 平板上,30℃培养48h。将长势优良的单菌落接种到斜面培养基上。

荧光圈比较:将初筛得到的菌种接种在分离培养基 II 上,在350nm紫外灯下观察,选择H/C比值较大的菌株用于

后续的工作。

1.4 洗毛实验

影响生物酶洗毛的主要因素有温度、时间、浴比、pH值4个因素,固定其中3个因素,进行单因素优化实验。温度:pH7.5,浴比1:35,温度分别为25℃、30℃、35℃、40℃、45℃,洗毛20h。时间:温度40℃,pH7.5,浴比1:35,洗毛时间分别为12h、16h、20h、24h、28h。浴比:温度40℃,pH7.5,浴比分别为1:20、1:25、1:30、1:35、1:40,洗毛20h。pH:温度40℃,浴比1:35,起始pH值分别为5.5、6.5、7.5、8.5、9.5,洗毛20h。

将5g羊毛放入500mL的三角瓶中,将相同量的菌种发酵液在无菌条件下接种于三角瓶中,在上述不同的温度、时间、浴比和pH条件下进行洗毛实验,根据GB6977-86^[6]测定洗净毛含脂率,将洗净毛样品测得干重后,在索氏脂肪抽出器中经乙醇反复抽提,溶剂回收,提取物烘干、称重,经计算得到乙醇提取物的含量,即得羊毛纤维含脂率。确定最优洗毛工艺,并通过洗净毛含脂率测定初步判定微生物所产脂肪酶的脱脂性能,进一步确定其对羊毛脱脂的适用性程度。

1.5 生长曲线测定

将筛选出的菌种接种到LB培养基中,每隔2h取培养液少许,使用722S可见分光光度计在600nm波长处测定OD值,绘制菌种生长曲线^[7],确定对数生长期时间。

1.6 酶活力测定

酶活力单位(U)定义为:在一定条件下,将每分钟分解底物(羊毛脂)释放出1μmol游离脂肪酸所需酶量定义为1个脂肪酶活力单位,国际单位(IU),以IU/mL表示。

脂肪酶液制备:在30℃下,通过“单菌落→液体种子培养基→液体发酵培养基”的流程制备脂肪酶液,种子培养菌液在对数生长期取得;酶液在4℃,10000r/min离心10min,得到的上清液即为脂肪酶液。

酶活力测定:依据QB/T1803-1993^[8]工业酶制剂通用试验方法测定脂肪酶酶活,以最高酶活力为标准绘出相对酶活力曲线。

将筛选出的菌种与已知脂肪酶产生菌—枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)进行对比,确定所筛菌种产脂肪酶的优势。

1.7 菌种16S rDNA扩增鉴定

在培养基中挑取细菌于10μL灭菌水中,100℃水浴变性后离心取上清液作为模板,使用TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Code No.D310),以Forward primer/Reverse primer 2为引物扩增目的片段。取5μL产物进行琼脂糖凝胶电泳。

用TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0(Code No.DV805A)切胶回收目的片段,取1μL产物再次进行琼脂糖凝胶电泳。

目的片段由华大基因(大连)有限公司进行DNA测序。

1.8 生理生化试验

对筛选出的菌种进行糖发酵试验、接触酶、甲基红和明

胶液化实验等生理生化试验^[9],确定其种属。

2 结果与分析

2.1 筛选结果

从羊毛表面筛选出 20 株脂肪酶产生菌,再通过富集培养基传代 3 次优选出 5 株菌,并将 5 株菌接种于同一分离培养基 II,最后得到 8[#] 菌株 H/C 比例最大。如图 1 所示,由于单菌落的荧光圈较微弱不易观察,故以图片所示方式显示,其 H/C 值为 2。

2.2 含脂率测定

从图 2 可以看出,采用 8[#] 洗毛菌发酵液处理原毛,在温度为 40℃,pH 为 7.5 时,洗净毛含脂率最低;随着浴比的增大和洗毛时间的增长,洗净毛含脂率逐渐降低,当浴比大于 1:35,洗毛时间长于 20h 之后,净毛含脂率变化越来越不明显。因此从实际生产周期和节约能源角度考虑,8[#] 菌所产脂肪酶的最佳洗毛工艺条件为温度 40℃,pH7.0,浴比 1:35 和时间 20h,洗净毛的含脂率为 1.031%。该菌对羊毛纤维脱脂效果显著,可进一步进行菌种鉴定。

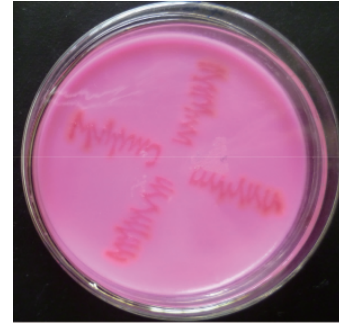


图 1 8[#] 洗毛菌荧光圈

Fig. 1 Fluorescent circle of No.8 strain

2.3 酶活力曲线测定结果

通过对 8[#] 菌与枯草芽孢杆菌培养液的 600nm 处的 OD 值进行分析得到以下结论:8[#] 菌在 7—12h 为对数生长期,枯草芽孢杆菌在 6—11h 为对数生长期。

取 8[#] 菌与枯草芽孢杆菌对数生长期的菌液以 1% 接种量接种于液体分离培养基 I 中进行酶活力测定,绘出相对酶活力曲线(图 3)。从图 3 得到以下结论:8[#] 菌在第 11h 达到产酶

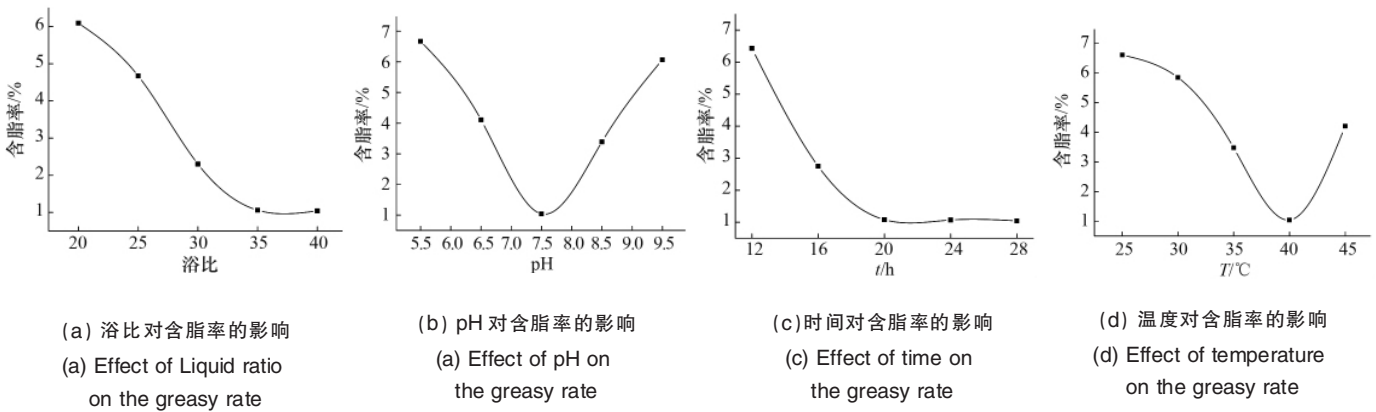


图 2 8[#] 洗毛菌的洗毛工艺条件优化

Fig.2 Optimization of wool scouring process of No.8 strain

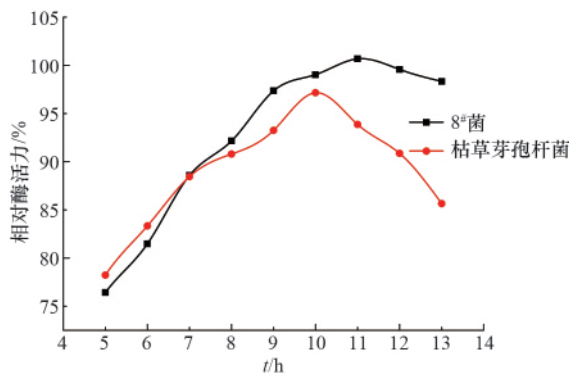


图 3 8[#] 洗毛菌与枯草芽孢杆菌相对酶活力曲线

Fig.3 Curves of relative enzyme activity of No.8 lipase producing strain and *Bacillus subtilis*

高峰(101.67U/mL);而枯草芽孢杆菌在第 10h 达到产酶高峰(97.16U/mL),前者比后者的酶活力高 4.64%,说明 8[#] 脂肪酶产生菌具有一定的优化潜力。

2.4 16S rDNA 扩增鉴定结果

以 Forward primer/Reverse primer 2 对所筛选的菌株进行菌落 PCR 扩增,结果如图 4。该菌能扩增出长度约为 1600bp 的 16S rDNA 目的片段。用 DNA 纯化试剂盒对目的片段进行回收,然后 PCR 并再次电泳,得到单一条带,如图 5。经测序并采用 blast 软件进行序列同源性比较,选取同源性最高的序列进行分析。得到该菌的 16Sr DNA 与鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium sp.*)同源性达到 99%。

2.5 菌种生理生化表征鉴定结果

对 8[#] 洗毛菌进行了形态观察与生理生化实验,其结果见



图4 16S rDNA 凝胶电泳图

Fig.4 Gel electrophoresis of 16S rDNA

注: M, DNA Marker DL2000; 8#, 该菌 PCR 产物; 2, 阳性对照; 3, 阴性对照。

Notes: M, DNA Marker DL2000; 8#, PCR products; 2, positive contrast; 3, negative contrast.

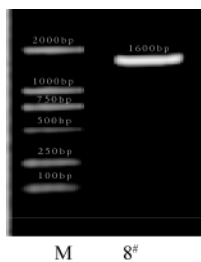


图5 目的 DNA 回收扩增后电泳图

Fig.5 Gel electrophoresis of recycled fragment

注: M, DNA Marker DL2000; 8#, 该菌 PCR 产物。

Notes: M, DNA Marker DL2000; 8#, PCR products.

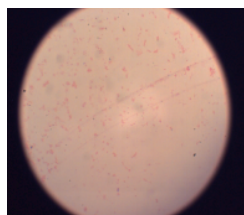


图6 8# 洗毛菌显微镜图片

Fig.6 Microscope picture of No.8 strain

表 1 8# 洗毛菌生理生化特征

Table. 1 Physiological and biochemical characteristics of No.8 lipase producing strain

检测项目	8# 洗毛菌
脂肪酶	+
蛋白酶	-
50℃生长	-
厌氧生长	-
葡萄糖产酸	+
葡萄糖产气	-
V-P 检测	+
明胶液化实验	-
甲基红	-
接触酶	+

图6、表1。综合以上结果,得出8#洗毛菌菌落形状为圆形,直径约为0.5—1mm,边缘整齐,表面光滑且呈淡黄色有光泽,显微镜下观察为杆菌、革兰氏阴性、好氧微生物。

根据V-P检测、甲基红、糖发酵试验、接触酶等特征,利用伯杰细菌鉴定手册进行查找,并综合blast比对结果确定8#洗毛菌为鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium sp.*)。

3 结论

筛选分离出一株适于生物酶洗毛的高产脂肪酶菌株,经形态鉴定、16S rDNA 菌种鉴定和生理生化指标鉴定,确定其为脂肪酶产生菌鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium sp.*)。在30℃条件下,该菌在11h达到产酶高峰(101.67U/mL)。经洗毛实验验证,洗净毛含脂率为1.031%,具有良好的适用性。

参考文献 (References)

- [1] Monlleo D, Julia M R, Pinazo A, Erra P. Use of lipases for wool modification [J]. *Melliand Textilberichte/ International Textile Reports (German Edition)*, 1994, 75(5): 402-404.
- [2] El-Sayed H, Hamed R R, Kantouch A, et al. Enzyme-based feltproofing of wool[J]. *AATCC Review*, 2002, 2 (1): 25-28.
- [3] 何泽寿, 徐春圆, 杜冰, 等. 壳聚糖固化生物膜处理洗毛废水研究[J]. *毛纺科技*, 2011, 39 (5): 17-20.
He Zeshou, Xu Chunyuan, Du Bing, et al. *Wool Textile Journal*, 2011, 39 (5): 17-20.
- [4] 王丽丽, 高忠涛, 杜冰, 等. 基于响应面法优化生物酶洗毛工艺 [J]. *毛纺科技*, 2010, 38 (7): 9-14.
Wang Lili, Gao Zhongtao, Du Bing, et al. *Wool Textile Journal*, 2010, 38 (7): 9-14.
- [5] Zheng L J, Du B, Wang L L. Bio-scouring process optimization of wool fiber and wastewater utilization [J]. *Journal of the Textile Institute*, 2011, DOI: 10.1080/00405000.2011.559023.
- [6] 国家标准局. 洗净羊毛油、灰、杂含量试验方法. GB6977-86[S]. 国家标准局, 1986-11-07.
National Bureau of Standards. Content of oil, ash, mixed of scoured wool test method. GB6977-86[S]. National Bureau of Standards, 1986-11-07.
- [7] 杨革. 微生物学实验教程[M]. 北京: 科技出版社, 第一版. 2004, 9: 99-100.
Yang Ge. *Microbiology laboratory science tutorial*, 1st ed [M]. Beijing: Science and Technology Press, 2004, 9: 99-100.
- [8] 中华人民共和国轻工业部. 工业酶制剂通用试验方法. QB/T1803-1993[S]. 中华人民共和国轻工业部, 1993-07-29.
Ministry of Light Industry of People's Republic of China. Industrial enzyme test method. QB/T 1803-1993 [S]. Ministry of Light Industry of People's Republic of China, 1993-07-29.
- [9] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 第三版 1999, 6: 116-120.
Shen Ping, Chen Xiangdong. *Experimental Microbiology 3rd ed* [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999, 6: 116-120.

(责任编辑 张媛媛, 马骁骁)