

洗涤剂用碱性纤维素酶的研究进展

徐铨卿¹ 高红亮^{1*} 黄 静¹ 吴自荣¹ 杨雪霞²

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)¹

(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)²

摘要: 迄今报道的绝大多数纤维素酶的最适 pH 都在酸性和中性范围, 当添加到洗涤剂中, 由于处于碱性环境而无活力, 不能发挥作用。近年来, 国内外对由碱性芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 产生的碱性纤维素酶 (CMCase, endo- β -1, 4-glucanase, EC 3.2.1.4) 进行了广泛的研究。对该酶产生菌株的筛选和培养条件、酶学性质, 以及该酶基因的克隆和表达等方面的研究进行综述; 并对我国目前未能实现该酶工业化原因进行了初步分析, 并提出解决途径。

关键词: 嗜碱性芽孢杆菌, 碱性纤维素酶, 洗涤剂

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2002) 06-0090-05

THE PROGRESS OF THE ALKALINE CELLULASE THAT USE IN LAUNDRY DETERGENTS

XU Wei-Qing¹ GAO Hong-Liang¹ HUANG Jing¹ WU Zi-Rong¹ YANG Xue-Xia²

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062)¹

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)²

Abstract: The great majority of cellulases, so far reported, have optimal pH in the acidic or neutral range, which have no activity in detergent because of the alkaline condition of detergent compositions. Recently, researchers have given extensive attention to the alkaliphilic *Bacillus* species which were found to produce an alkaline carboxymethyl cellulase (CMCase, endo- β -1, 4-glucanase, EC 3.2.1.4). In this paper, we reviewed the progress of strain selection and the conditions of incubation, its enzymology properties, its gene clone and expression. We also analyzed the reasons that the enzyme hasn't been realized the industrial production in our country and give some proposals of the resolving way.

Key words: Alkaliphilic *Bacillus* sp., Alkaline CMCase, Laundry detergents

近年来, 嗜碱性细菌作为新型的微生物资源倍受人们的关注。在理论研究方面, 其嗜碱机理引起了人们广泛的兴趣; 在应用方面, 其稳定地产生碱性胞外酶日益引人关注。

嗜碱性细菌或是专性嗜碱性细菌, 或是兼性嗜碱性细菌; 前者最适生长 pH 为碱性 (≥ 8.0), 后者最适生长 pH 为中性, 但在碱性条件下也能够生长。已经分离到的嗜碱细菌中多为好氧菌, 且分类上多属芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。

嗜碱性芽孢杆菌所产的碱性酶在食品、化工、造纸、麻纺、环境保护等领域均有重要作用。近几年, 碱性纤维素酶在洗涤剂工业上的成功应用, 改变了传统的去污方法, 建立了一套新的去污机制, 提高了洗涤效果, 并有柔软、增艳等作用, 被洗涤剂工业称之为一次技术革命; 在日本和丹麦它已作为洗涤剂的添加剂而被广泛使用^[1]。

1 碱性纤维素酶的去污机理

人们很早就知道纤维素酶可提高洗涤效果^[2], 但长期以来是以木霉 (*Trichoderma*)、

* 联系人

收稿日期: 2001-10-19, 修回日期: 2002-02-03

曲霉 (*Aspergillus*) 属等真菌产生的酸性纤维素酶为研究对象、以将木质纤维素转化成葡萄糖为主要目标^[1], 这些真菌纤维素酶的最适 pH 和稳定 pH 范围一般都是酸性或中性, 在碱性条件 (pH=9.0~10.0) 下无活力, 不能发挥作用, 因此适用于洗涤剂的纤维素酶必须是碱性纤维素酶。碱性纤维素酶实际上是纤维素酶全酶的一个组分——羧甲基纤维素酶 (Carboxymethyl Cellulase, CMCase), 它不含有纤维素酶全酶的其他两个组分 β -(1, 4) 葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶。碱性纤维素酶在碱性 pH 范围内具有较高的活性和稳定性, 其酶活不受去污剂和其它洗涤添加剂的影响, 不降解天然纤维素, 具备洗涤剂用酶的条件。至今发现的洗涤用碱性纤维素酶产生菌, 大多是嗜碱性芽孢杆菌。

当今社会生活中, 人们越来越青睐棉纺织品, 因为它具有良好的透气和吸水性能, 但也正因为棉纤维的这些特性, 却使体液、汗渍等污垢很容易被吸收到纤维内部, 洗涤时普通洗衣粉很难洗干净, 几次穿-洗循环后, 与皮肤接触的部位就会渐渐发黄、变硬。究其原因, 是由于棉纤维的纤维素分子链由结晶区和非结晶区两部分组成, 虽然结晶区中的纤维素分子结合状态规则且非常紧密, 相互间的牢固结合使其保持结构, 污垢等其他物质无法侵入, 但是非结晶区中的纤维素分子排列不规则、结合疏松, 水很容易侵入 (这正是棉纤维织品透气、吸水性能好的主要原因), 水以及污垢在非结晶区的入侵、结合, 形成了凝胶状结构, 致使一般洗涤剂无法去除这些被封闭在凝胶结构中, 即棉纤维内部的污垢, 因此洗涤效果差。

碱性纤维素酶的去污机理, 不同于普通的碱性蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等仅作用于污垢本身的去污机理, 而是直接作用于织物非结晶区, 能有效地软化、水解纤维素分子与水、污垢结合形成的凝胶状结构, 使封闭在凝胶结构中的污垢较容易地从纤维非结晶区中分离出来, 最终去除附着在织物表面及侵入织物内部的尘泥、皮脂等污垢, 达到令人满意的洗涤效果。碱性纤维素酶的主要成分为内切酶, 仅对非结晶区纤维素水解活力较高, 对结晶区纤维素水解活力很低, 故不会造成织物强度的明显下降、对织物产生损伤。因此碱性纤维素酶是洗涤剂的理想添加剂。

2 碱性纤维素酶产生菌株的筛选与培养条件的研究

碱性纤维素酶的研究从 70 年代才开始, 是近 20 年内发现的新酶种, 但发展很快。已发现的产酶菌有中性细菌、嗜碱性细菌、放线菌、霉菌等。研究较多且具实用价值的是嗜碱性芽孢杆菌。

日本学者对碱性纤维素酶进行了大量的研究。1970 年 UNILIVER 公司首先发现纤维素酶用于洗涤剂, 可以使由于反复洗涤而发黄变硬的棉纤维织品恢复原来的洁白和柔软^[2]; 1972 年 Horikoshi 报道发现了嗜碱芽孢杆菌 N-4 能产生碱性纤维素酶^[3]; 1974 年日本东京工业大学研究了嗜碱性芽孢杆菌 N-1、N-4 产的酶为分解代谢阻遏型^[4]; 1985 年, Fumiyasu Fukumori 经研究指出了添加葡萄糖会强烈抑制嗜碱性芽孢杆菌 No.1139 产酶, 该菌在 37℃ 培养 3d 后的产酶活力为 0.83U/mL^[5]; 1988 年 Shuyi Kawai 的研究表明中性菌-芽孢杆菌 KSM-522 产酶的最佳碳源为麦芽糖, 该菌在 30℃ 培养 3d 后, 酶活力为 1.38U/mL~1.70U/mL^[6]; 1990 年 Shitow Shikata 发现了 3 株诱导型产酶菌株 KSM-19、KSM-64、KSM-520, 在最佳培养条件下, 酶活力分别为 1.6U/mL、5.2U/mL、3.3U/mL^[7]。在这些研究中, 日本花王公司的组成型碱性纤维素酶产生菌——嗜碱性芽孢杆菌 KSM-635 的研究进展最为显著, 他们分别用非纤维素碳源如葡萄糖、麦芽糖、蔗糖

等作为碳源,可使酶活由 1.94U/mL 提高到 3.98U/mL;用半连续培养法,在菌体生长对数期或延滞期,把 30%~99.9%的培养液用新鲜培养液取代,到第八批连续培养时,酶活达到了 4.65U/mL~5.76U/mL;在培养液中添加 0.5%的木聚糖,30℃培养 3d,使酶活由 2.2U/mL 提高到 6.27U/mL^[4];以抗生素万古霉素、瑞斯托菌素作为筛子,用甲基磺酸乙酯、亚硝基胍等诱变剂进行诱变处理,筛选抗性菌株,使酶活由 4.28U/mL~4.59U/mL 提高到 16.8U/mL~20.05U/mL^[8]。并且木村曦晴还发现在培养基中添加 3×10^{-8} g/L~ 100×10^{-8} g/L 含铁无机盐或 300×10^{-8} g/L 肌红蛋白,能使酶活力由 20U/mL 提高到 40U/mL~60U/mL,该酶活是迄今为止相关文献中报道的最高的。1991年,花王公司的 KSM-635 万古霉素、瑞斯脱菌素抗性的高产突变株 KSM635-12v,酶活达 27.2U/mL^[9]。90年代以来,日本含碱性纤维素酶的洗涤剂已占 60%的市场,而组成型碱性纤维素酶产生菌嗜碱芽孢杆菌 KSM-635,通过解除分解代谢阻遏,细胞壁、膜变异促进酶的分泌、培养条件优化等提高产酶的手段和各种途径,使酶活提高了数十倍,实现了工业化生产,是目前唯一报道已工业化生产的菌株。

我国碱性纤维素酶的研究工作还处于初始阶段:山东大学微生物研究所的宋桂经等对其从碱性土样中分离得到的芽孢杆菌 074 产生的碱性纤维素酶进行了纯化及性质的初步研究,该菌在 pH 9.0 条件下能产生具有较高活性的纤维素酶;羧甲基纤维素钠对该酶的产生有一定促进作用,但不是唯一碳源;用最佳培养基和培养条件,48h 酶活力最高可达 6U/mL^[10]。中国科学院微生物研究所的田新玉等在 1997~1998 年间从我国天然碱湖样品中也分离筛选出一株产碱性纤维素酶的嗜碱芽孢杆菌 N6-27,其产酶的最适碳源为羧甲基纤维素钠,氮源为复合蛋白胨^[11]。无锡轻工业大学还对碱性纤维素酶的生产进行了发酵试验^[12]。武警医学院微生物教研室的王丹敏等从芽孢杆菌 x-6 菌株的抗性突变株中曾获得 EV23 菌株,该菌产组成型纤维素酶,酶活为 3.53U/mL^[13]。新疆师范大学生物系的欧尔比特·安尼瓦尔等还发现了能产细胞外嗜碱性纤维素酶的艾丁湖极端嗜碱菌 A04^[14]。

综观国内外刊载的文献资料,所有的野生菌株的酶活都较低,一般在 0.83U/mL~6U/mL 之间,但通过优化培养条件以及对野生菌株进行诱变等方法,可使酶活提高 2~30 倍不等,其中 40U/mL~60U/mL 酶活单位是迄今相关文献中报道的最高单位。

3 碱性纤维素酶酶学性质的研究

1984年,堀越弘毅对嗜碱性芽孢杆菌 No-4 产生的酶,经 Serphadex G-100、羟基磷灰石柱纯化,从碱性范围有 CMCase 活力的部分分离到两个组分,其分子量均约为 50kD,最适 pH 为 10.0,稳定 pH 范围为 6.0~10.0,稳定温度分别为 60℃和 80℃^[2];1990年,Hiromi Okoshi 分离所得的中性芽孢杆菌 KSM-522 产生的酶,经 3 次 DEAE Bio-Gel A、一次羟基磷灰石柱纯化,分离到 3 个组分,分子量分别为 49 kD、34 kD 和 35 kD;等电点 pI 分别为 4.4、3.5 和 3.5;最适 pH 分别为 6.0、7.0~10.0 和 7.0~10.0;稳定温度分别为 40℃、50℃和 50℃;Hg²⁺ 对酶活强烈抑制,Cu²⁺ 中等程度抑制,Co²⁺ 对酶激活(150%~160%)^[7];同年,Tadashi Yoshimatsu 等对嗜碱芽孢杆菌 KSM-635 产的碱性纤维素酶的分离纯化和性质进行了较为详细的研究,经 DEAE-Aoyoppearl 650S 和 Bio-Gel A-0.5m 柱纯化,分离得到两个组分,分子量分别为 130 kD、103 kD,最适 pH 为 9.5;稳定 pH 范围为 6.0~11.0;最适温度为 40℃;稳定温度范围为 45℃~50℃;

Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 抑制酶活, Co^{2+} 对酶激活, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 可提高酶的热稳定性^[15]。

1994 年, 山东大学微生物系的王冬等也对芽孢杆菌 074 产的纤维素酶经过 Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-25 和苯基交联琼脂糖 Agarose 4B 3 种层析方法, 分离纯化到一个仅具有内切 β -葡聚糖酶 (CMC 酶) 活性的纯组分, 分子量和等电点分别为 52.5kD 和 4.1; 最适反应温度为

表 1 不同来源碱性纤维素酶的酶学性质

菌株号	稳定 pH (存活 50% 以上)	最适反应 温度 (°C)	分子量 (kD)	等电点	文献
KSM-522	5.0 ~ 12.0	60; 50	34; 35	4.4; 3.5	7
KSM-635	6.0 ~ 11.0	40	100 ~ 500	4.0 以下	15
KSM-19	4.5 ~ 12.0	50	34; 120		7
KSM-64	3.0 ~ 13.0	50	80; 180		7
KSM-520	3.0 ~ 13.0	50	80; 170		7
N-4	5.0 ~ 10.5	55	50; 80; 100		3
No.1139	5.0 ~ 12.0	40	92	3.1	3
074	4.0 ~ 12.0	50	52.5	4.1	16
N6-27	6.0 ~ 11.0	55	94.0	4.2	17
A04	5.0 ~ 12.0	40			14

50°C; 最适反应 pH 为 7.0; Hg^{+} 、 Ag^{+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 等少数离子及少数表面活性剂、助剂对酶活性有一定影响^[16]; 1998 年, 中国科学院微生物研究所的田新玉等对芽孢杆菌 N6-27 菌株产生的纤维素酶经过 Sepharose CL-4B 凝胶柱层析和 Bio-gel P-150 柱层析纯化, 酶的分子量和等电点分别为 94kD 和 4.2; 酶在 pH6 ~ 11 范围内均稳定, 其最适反应温度为 55°C; 最适反应 pH 为 8.5; 酶的主要作用底物为 CMC, 对滤纸、纤维素粉和结晶纤维素 (Avicel) 几乎不作用^[17] (见表 1)。

综合国内外的文献资料可知, 碱性纤维素酶的最适反应 pH 在 7.0 ~ 10.0 之间, 而稳定 pH (即可保存 50% 以上酶活性的 pH 值) 为 3.0 ~ 13.0 之间, 最适反应温度在 40°C ~ 60°C 之间; 分子量在 100kD 左右, 等电点在 4.4 以下; Hg^{+} 、 Co^{2+} 和 Cu^{2+} 等离子对酶有不同作用的影响。

4 碱性纤维素酶基因的克隆与表达

1990 年, Susumu ITO 等人将芽孢杆菌 KSM-635 碱性纤维素酶的基因克隆大肠杆菌 HB101 中, 得到了质粒 pBC100, 通过测定碱基序列, 弄清了 KSM-635 的碱性纤维素酶基因是一个全长 2824bp、含 941 氨基酸残基、分子量为 104,626D 的蛋白质编码的开放式解读结构^[1]。

1991 年, NOVO 公司专利报道了用基因工程方法把芽孢杆菌的内切纤维素酶基因克隆到大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中并表达, 产生了用于洗涤剂的纤维素酶。

1996 年, J. Sanchez-Torres 等报道了将嗜碱性芽孢杆菌 N186-1 的纤维素酶基因克隆并在大肠杆菌中表达。它是一个 2539bp (Hind III 片段)、编码 389 氨基酸残基、分子量为 39kD 的蛋白质编码的开放式解读结构^[18]。

应用分子生物学技术克隆和表达碱性纤维素酶的基因, 并构建产碱性纤维素酶的基因工程菌株, 是提高酶产量的重要手段。目前市场上的酶制剂 80% 以上来自于基因工程重组菌株, 因此, 对碱性纤维素酶基因的克隆、表达, 应该是一种很有前途的方法。

5 应用前景

近年来,日本、美国、欧洲某些国家的加酶洗涤剂已占市场洗涤剂的80%~90%。我国是洗涤剂消费大国,据统计:1997年我国合成洗涤剂279.91万吨,1998年为280.34万吨^[19];若以保守估计,其中的30%添加碱性纤维素酶,则酶年产量(按2%添加量计)^[4]达1.68万吨,所以国内市场前景应十分乐观;但我国现有的加酶洗涤剂中,以加碱性纤维素酶的洗涤剂所占比例还很小,未能达到产业化,这与洗涤用酶的预计用量有很大的差距,究其原因主要是酶的品种、活性及酶颗粒制备技术等与国外还有较大的差距,尤其在酶种上较单一,除碱性蛋白酶和脂肪酶外,其它酶种均处于研究阶段,而未投入实际应用;而碱性纤维素酶的研制和应用还处于起步阶段。就目前国内有关碱性纤维素酶的研究水平来看:①酶活性还比较低,在国内还不能达到工业化生产水平的要求;②对酶的纯化、酶学性质研究还很少,特别是对酶在洗涤剂中的性质研究很少;③对酶添加到洗涤剂中酶的作用机理的研究机理不够深入。这些都阻碍了碱性纤维素酶的工业化生产的应用,因此当前迫切需要解决的问题主要有两个:首先是提高产酶水平,可通过3个途径来研究解决:对野生菌株通过现代物理化学方法进行诱变处理;通过现代基因工程的方法构建基因工程菌株,以提高酶产量;针对不同的菌株,优化其产酶工艺。其次是将碱性纤维素酶添加到洗涤剂中,进一步研究其在洗涤剂中的去污机理和洗涤剂对酶的影响,以提高酶在洗涤剂中的使用效率,并实现工业化生产。

碱性纤维素酶及其相应的新型加酶洗涤剂的研制开发对我国的酶制剂、洗涤剂工业的发展将有重大的促进作用。此外,碱性纤维素酶在化工印染、碱性废水处理和化妆品等方面也具有独特用途,所以对碱性纤维素酶的研究具有非常广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 宋桂经. 微生物学通报, 1997, 24 (6): 364~367.
- [2] Horikoshi K, Nakao M, Kurono Y, et al. Can J Microbiol, 1984, 30: 7774~7794.
- [3] Horikoshi K. Nippo Nogeikagaku Kaishi, 63 (8): 7~8.
- [4] 伊藤进. 公开特许公报, 昭63: 112981.
- [5] Fukumori F, Kudo T, Horikoshi K. Journal of General Microbiology, 1985, 131: 3339~3345.
- [6] Kawai S, Okoshi H, Ozaki K, et al. Agric Biol Chem, 1988, 52 (6): 1425~1431.
- [7] Shikata S, Saeki K, Okoshi H, et al. Agric Biol Chem, 1990, 54 (1): 91~96.
- [8] 伊藤进, 下岗正治. 公开特许公报, 平1: 222771.
- [9] Susumu I. Agric Bio Chem, 1991, 55 (9): 2387.
- [10] 宋桂经, 王冬, 孙彩云, 等. 微生物学报, 1995, 35 (1): 38~44.
- [11] 田新玉, 王欣. 微生物学通报, 1997, 24 (4): 195~198.
- [12] 田亚平, 全文海. 食品与发酵工业, 1998, 24 (3): 1~6.
- [13] 王丹敏, 宋桂经. 生物学研究, 1999, 16 (4): 15~16.
- [14] 欧尔比特·安, 迪丽拜尔·托, 迪丽都孜·铁, 等. 干旱区研究, 2000, 17 (1): 27~31.
- [15] Tadashi Y. Journal of General Microbiology, 1990, 136: 1973~1979.
- [16] 王冬, 宋桂经, 高培基. 生物化学与生物物理进展, 1994, 1 (3): 237~241.
- [17] 田新玉, 王欣. 微生物学通报, 1997, 24 (4): 195~198.
- [18] Sanchez T J, Perez P, Santamaria R I. Appl Microbiol Biotechnol, 1996, 46: 149~155.
- [19] 中国统计年鉴. 北京: 中国统计出版社, 1999. 18: 445.