

新分离菌 *Streptomyces* 产小分子 CMC 液化酶的研究

李宪臻* 徐德贵 任钢弋 金凤燮

(大连轻工业学院食品工程系, 大连 116001)

高培基

(山东大学微生物研究所, 济南 250100)

摘要 新分离纤维素分解菌经鉴定为链霉菌属中的新种, 暂定名为 *Streptomyces* sp. LX, 革兰氏阳性, 产气生孢子, 好氧生长, 最适生长温度和 pH 为 30℃ 和 7.2。该菌能够完全降解纤维素且不产生还原糖, 并分泌一种分子量为 9.2ku 的液化性质的内切纤维素液化酶, 亦即 CMC 液化酶, 该酶在裂解滤纸为短纤维的过程中既没有还原糖生成, 也没有失重现象发生, 而且纤维素的聚合度也几乎没有明显变化, 推测可能是一种能打开氢键的小分子解链酶。

关键词 纤维素降解, 内切纤维素酶, 短纤维形成, CMC 液化酶, *Streptomyces*

由于纤维素是一种潜在的可再生资源, 因此微生物酶降解纤维素的研究一直受到人们的重视。按照传统的观点, 结晶纤维素的降解是由内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶和葡萄糖苷酶协同作用的结果^[1~3]。然而, Cowling 等发现在褐腐真菌降解纤维素的早期阶段, 纤维素

的聚合度下降、机械强度降低, 但只有很少的还原糖生成^[4], 这与纤维素酶解时造成的聚合度

* 现系山东大学在职博士
国家自然科学基金重大项目课题资助
1995-11-09 收稿

降低而还原糖增加现象明显不同。因此提出了纤维素降解的原初反应假说^[5]。并认为原初反应与小分子物质有关^[6]。但这种小分子只被观察到^[7],并没有被真正分离出来。

纤维素降解机制的研究多集中于木霉和白腐菌等少数菌株^[8-10],而有关在土壤中对植物残体降解起重要作用的放线菌的纤维素酶系则了解的很少^[11]。尽管很早以前就发现链霉菌能降解纤维素^[12,13],但在最近几年才开始对其酶系进行研究^[14,15]。最近作者从土壤中分离出一株链霉菌,在结晶纤维素上培养2~3d,纤维素即可被完全降解,并伴有短纤维生成。在培养滤液中发现有大量的内切纤维素酶生成,其中有一种酶具有很高的羧甲基纤维素(CMC)液化能力,但在CMC粘度迅速下降的过程中却几乎检测不出还原糖的生成。由于这种酶是一种分子量低于1万的小分子酶,它的发现将为纤维素降解机理特别是原初反应的深入研究提供物质基础。本文主要研究这种酶的部分酶学性质。

1 材料与方法

1.1 菌种分离及培养条件

将取自山东大学校园的土样用稀释平板法涂布于纤维素琼脂平板上,于30℃培养3d,选取一株有较大水解透明圈的菌落,再用划线法进一步纯化。该分离菌为革兰氏阳性菌。产气生孢子,好氧生长。按Williams等人所述的方法^[16]对新分离菌进行分类鉴定。结果表明该菌是链霉菌属中的一个新种,暂定名为链霉菌 *Streptomyces* sp. LX^[17],该菌的最适生长温度为30℃,最适pH为7.2。

纤维素琼脂平板制备方法:在含有无机盐培养基(每1L中含有:0.75g 硝酸钠,0.2g 磷酸氢二钠,0.2g 硫酸镁,0.02g 硫酸亚铁,0.07g 氯化钙,2g 蛋白胨,pH7.0)的琼脂(1.5%,W/V)平板上覆盖一层4%(W/V)的Whatman纤维素粉CF11和1.5%(W/V)琼脂的培养基,即制成纤维素琼脂平板。

由斜面上接一环链霉菌于60ml含有1%

Whatman纤维素粉CF11的无机盐培养基中,于150r/min的摇床中30℃培养3d。每间隔一定时间取样测定CMC液化酶活力。

1.2 CMC液化酶活力测定

用粘度法测定CMC液化活力^[18]:将19.8ml溶于0.1mol/L磷酸-柠檬酸缓冲溶液(pH5.6)中的0.5%CMC溶液加入NDJ-1旋转粘度计的样品筒中,于40℃水浴预热10min。迅速加入0.2ml酶液,按2min内粘度下降值计算酶活力。酶活力单位定义为:在上述条件下每分钟使每毫升反应液粘度降低1个厘泊所需的酶量为1个酶活力单位。

按Mandels等的方法测定CMC糖化活力^[19]。

1.3 滤纸纤维素降解

将0.5g Whatman No. 1号滤纸加入到2.5ml含有5mol/L NaNO₃的0.1mol/L pH6.4的磷酸缓冲溶液中,待加入0.5ml粗酶液后,即转入40℃水浴中振荡保温并计时。随时观察滤纸的裂解状况,定期取出样品7000r/min离心,上清液用于测定可溶性糖,沉淀于90℃烘干后,溶于铜乙二胺试剂中^[20],并用粘度法测定残留纤维素的聚合度^[21]。另外,必须同时作一个不加酶液的空白实验,以消除因机械振动而引起的滤纸碎裂误差。

1.4 化学分析

DNS法^[22]测定还原糖,酚-硫酸法^[23]测定可溶性总糖。

2 结果和讨论

2.1 CMC液化酶活力测定

内切纤维素酶(CMCase)活力既可以通过测定溶液中还原糖的释放速度也可以通过测定CMC溶液的粘度降低速度进行检测。CMC粘度降低法测定内切纤维素酶活力非常灵敏,因为内切纤维素酶在远离纤维素链末端的任意位置随机切割糖苷键,可能引起溶液粘度的大幅度降低,但却只伴随有很微量的还原基团释放出来^[24]。事实上,粘度法测定的是内切纤维素酶的绝对酶活力,也就是单位时间内打开糖

苷键的数量^[25]。因为 *Streptomyces* sp. LX 菌所产内切纤维素酶有很高的液化活性,但只有很低的糖化活力,因此,除非特别指明,内切纤维素酶活力都是指液化酶活力。

2.2 CMC 液化酶的诱导生产

图 1 是链霉菌 *Streptomyces* sp. LX 在不同碳源上生长时的产酶情况。该菌能够在以 0.5% 葡萄糖或纤维二糖为碳源的培养基上生长,但其 CMC 液化酶活力仅与以蛋白胨为唯一碳、氮源时的活力相近。在各种所测碳源中都没有可检测出的 CMC 糖化力生成。当以纤维素粉 CF11 为唯一碳源培养 3d 时,得到最大酶活力。Yazdi 等人^[26]在研究 *Neurospora crassa* 菌的产酶情况时发现,若在含有 M/C 纤维素的培养基中加入葡萄糖,不仅可以增加菌体生长,而且可以提高纤维素酶的生产水平。与此相反,我们在含有纤维素粉 CF11 的培养基中再加入可被迅速利用的小分子碳源,如葡萄糖或纤维二糖时,虽然产酶滞后期显著缩短,但酶的生产却没有明显提高。这说明葡萄糖或纤维二糖并不抑制纤维素粉 CF11 的诱导作用。推测可能是链霉菌首先利用葡萄糖或纤维二糖进行菌体生长以增加生物量,随后纤维素粉 CF11 再诱导高浓度的链霉菌产酶,从

而大大缩短酶生产的潜伏期。经测定,小分子糖的最佳浓度为 0.1%。另外,与 Molek^[27]所观察到的现象相似,该菌在以纤维素粉 CF11 为唯一碳源的培养基中培养时,始终只有很微量的还原糖释放出来。

2.3 CMC 液化酶制备

将离心除菌体的培养液用 80% 饱和度的硫酸铵于 5~10℃ 沉淀过夜,18000r/min 离心后收集沉淀,并重新溶解在 20mmol/L pH7.0 的磷酸缓冲溶液中。然后,将该酶液上事先用 20mmol/L pH7.0 的磷酸缓冲溶液(含 0.1mol/L NaCl)平衡过的 Sephadex G-50 柱,并用相同缓冲溶液洗脱,发现有两个活性峰被洗脱下来,其中的一个活性峰的分子量约为 9.2ku,另一个活性峰的分子量较大,经采用 Sephadex G-70 柱测得分子量约为 40ku。本文只研究该低分子量纤维素内切酶的性质,对大分子纤维素酶暂不作研究。

2.4 CMC 液化酶的理化性质

当采用 Folin-酚法检测蛋白质浓度时发现,低分子量 CMC 液化酶活性峰中虽然有紫外吸收,却没有可检出量的蛋白质存在。该酶的紫外吸收光谱也与一般蛋白质的吸收光谱不同,它除了在 280nm 处有一吸收峰外,在 223nm 处还有一个额外的吸收峰。上述性质说明该低分子量纤维素液化酶的酶学特征与一般酶蛋白不完全相同,目前尚未见有文献报道。

2.5 CMC 液化酶的水解方式

为了研究 CMC 液化酶在 CMC 降解过程中的粘度降低和还原糖增加之间的关系,在反应条件完全相同的前提下分别测定了还原糖和粘度随时间的变化,结果如图 2 所示。因为粘度直接与聚合物分子的长度有关,而任何水解反应都将产生还原基团并与聚合物中的裂解位置无关。因此,CMC 的水解将导致溶液粘度的降低和还原糖的增加。由图中曲线可以看出,当 CMC 液化酶作用于 CMC 分子时,溶液的粘度急剧下降,3~5min 内几乎下降至最低值,而还原糖却无任何增加。这与文献结果明

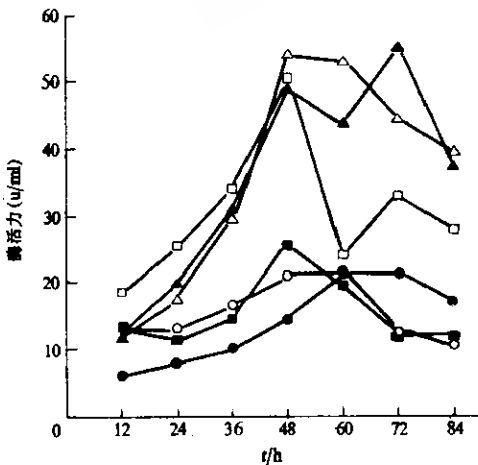


图 1 不同碳源上生长时的酶浓度与发酵时间的关系

●, 无碳源; ○, 葡萄糖; ■, 纤维二糖; ▲, 纤维素粉 CF11;
□, 纤维素粉 CF11+葡萄糖; △, 纤维素粉 CF11+纤维二糖

显不同^[28]。继续延长反应时间后发现,当保温2h时才仅有可检测出的还原糖生成,3.5h后的还原糖量为17.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。因为内切纤维素酶是在CMC分子链内随机断裂 β -1,4-葡萄糖苷键产生还原末端,并使聚合度迅速降低^[27,28],该结果证明了此酶对底物CMC的随机水解性,所以它应是一种内切纤维素酶。但由于其在CMC水解过程中的粘度与还原糖之比亦即最初水解产物的聚合度远高于文献中的内切纤维素酶,说明此酶对CMC水解的随机程度要远高于文献报道的内切酶,所以将这种酶定义为液化性质的内切 β -1,4-葡聚糖酶或CMC液化酶。

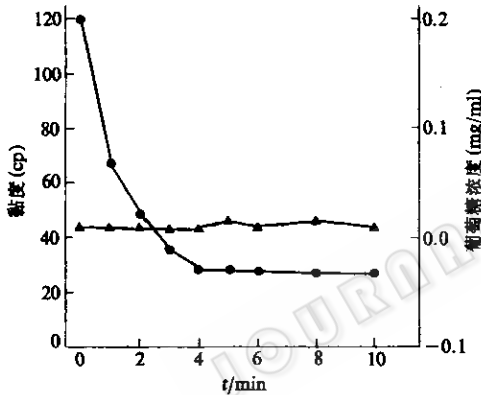


图2 CMC液化酶降解CMC的时间进程曲线

●, 粘度; ▲, 还原糖

2.6 温度和pH对CMC液化酶活性的影响

如图3所示,在不同温度条件下测定CMC液化酶活力时发现,它的最适反应温度为50 $^{\circ}\text{C}$,当将CMC液化酶于不同温度的水浴中保温30min后再在标准反应条件下测定该酶的活力发现,低于60 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活力保持稳定,但即使在沸水浴中加热半小时也仍能保持30%的酶活力;在不同pH的磷酸-柠檬酸缓冲溶液中测得CMC液化酶的最适反应pH为6.4(图4);在pH3~11的缓冲溶液中保温30min可以保留90%的酶活力,pH4~6.4时半小时内酶活力维持不变。如此宽的pH稳定范围和部分抗高温性,说明该小分子CMC液

化酶可能具有与普通蛋白不同的特殊性质。另外,CMC液化酶活力还与缓冲体系有关(图4),当磷酸-柠檬酸缓冲溶液分别被磷酸、柠檬酸、醋酸或广范围缓冲溶液代替时,CMC液化酶的最大酶活力为22.6、27.2、26.5和23.0u/ml,然而CMC液化酶在磷酸-柠檬酸缓冲溶液中表现最高酶活力(32.8u/ml)。与上述四种缓冲溶液相对应的最适pH分别为6.0、5.4、5.4和5.0。

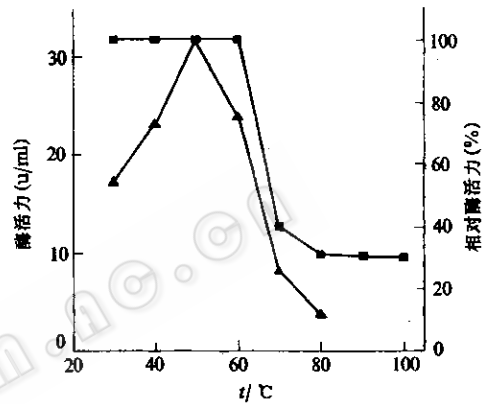


图3 温度对CMC液化酶活力的影响

▲, 最适反应温度; ■, 热稳定性

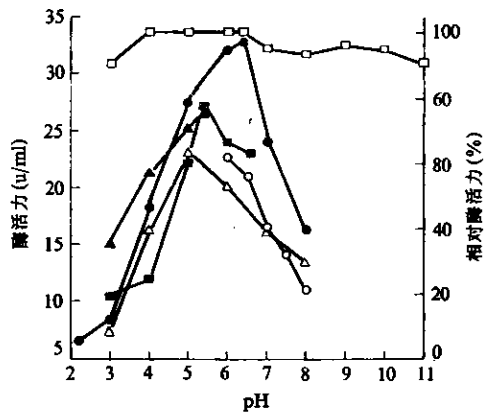


图4 缓冲体系对CMC液化酶活力的影响

●, 磷酸-柠檬酸缓冲溶液; ○, 磷酸缓冲溶液;
 ■, 柠檬酸缓冲溶液; ▲, 醋酸缓冲溶液;
 △, 广范围缓冲溶液; □, pH稳定性

2.7 短纤维的形成

与霉菌纤维素酶类似^[29~31],CMC液化酶与滤纸在40 $^{\circ}\text{C}$ 保温20h后,滤纸即被裂解为短

纤维。所不同的是,即使在滤纸裂解为短纤维后再保温 4d,也未发现有可溶性糖生成,而且滤纸纤维素的聚合度变化很少。推测可能是通过破坏氢键使纤维素解链,表现为形成短纤维,因此这种酶极有可能是一种小分子解链酶。

由于所使用的是粗酶液,本文只研究了 CMC 液化酶的一些最基本的生化性质。进一步的研究工作将设法提纯这种小分子 CMC 液化酶,并进一步搞清楚短纤维形成的机理。

参 考 文 献

- [1] Wood TM, McCrae SI. *Adv in Chem*, 1979, **181**: 181~209.
- [2] Woodward J, Lima M, Lee NE. *Biochem J*, 1988, **255**: 895~899.
- [3] Nidetzky B, Steiner S, Hayn M, Claeysens M. *Biochem J*, 1994, **298**: 705~710.
- [4] Cowling EB, USDA Technical Bulletin, 1961, **1258**: 79~83.
- [5] Coughlan MP. *Biotechnol Gen Engineer Rev*, 1985, **3**: 39~109.
- [6] Koenigs JW. *Wood a Fiber*, 1974, **6**: 66~79.
- [7] Griffin H, Dintais FR, Krull L, Baker FL. *Biotechnol Bioeng*, 1984, **26**: 296~300.
- [8] Mandels M, Reese ET. *Develop Ind Microbiol*, 1964, **5**: 5~20.
- [9] Wood TM. *Biochem J*, 1968, **109**: 217~226.
- [10] Beldman G, Searle-van Leeuwen MF, Rombouts FM, Xoragen FGJ, *Eur J Biochem*, 1985, **146**: 301~308.
- [11] Hägerdahl B, Ferchack JD, Pye EK. *Appl Environ Microbiol*, 1978, **36**: 606~612.
- [12] Enger MD and Sleeper BP. *J Bacteriol*, 1965, **89**: 23~27.
- [13] Reese ET, Siu RGH, Levinson HS. *J Bacteriol*, 1950, **59**: 485~497.
- [14] Ball AS, Brabban A, McCarthy AJ. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **36**: 473~477.
- [15] Spear L, Gallagher J, McHale L, McHale AP. *Biotechnol Lett*, 1993, **15**: 1265~1268.
- [16] Williams ST, Goodfellow MG, Wellington EMH, *et al. J Gen Microbiol*, 1983, **129**: 1815~1830.
- [17] Li X, Gao P. *Let Appl Microbiol*, 1996, **22**: 209~213.
- [18] Wood M, McCaere SI. *Biochem J*, 1979, **128**: 1183~1192.
- [19] Mandels M, Andretti R, Roche C. *Biotechnol Bioeng Symp*, 1976, **6**: 21~23.
- [20] Jayme G, Lant F. *Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistler RL ed.) vol. III, Cellulose*, Academic Press, Inc. New York, 1962, 75~82.
- [21] American Society for Testing, Materials. *Annual Book of ASTM Standards, Part 21: Cellulose, Leather, Flexible barrier materials*. American Society for Resting and Materials, Philadelphia, 1981, 452~460.
- [22] Miller GL. *Anal Biochem*, 1959, **31**: 238~244.
- [23] Wood TM, McCrae SI. *Biochem J*, 1982, **205**: 129~137.
- [24] Wood TM, Bhat KM. *Method Enzymol*, 1988, **160**: 87~112.
- [25] Almin KE, Eriksson K-E. *Arhd Biochem Biophys*, 1968, **124**: 129~134.
- [26] Yazdi MT, Woodward JR, Radford A. *Enzyme Microb Technol*, 1990, **12**: 116~119.
- [27] Molek MA, Chowdhury NA, Youssouf QM, *et al. Enzyme Microb Technol*, 1988, **10**: 750~753.
- [28] Wilson CA, Wood TM. *Enzyme Microb Technol*, 1992, **14**: 258~264.
- [29] Peters LE, Walker LP, Wilson DB, Invin DC. *Bioresource Technol*, 1991, **35**: 313~319.
- [30] Walker LP, Wilson DB, Invin DV. *Enzyme Microb Technol*, 1990, **12**: 378~385.
- [31] Walker LP, Wilson DB, Invin DC, *et al. Biotechnol. Bioeng*, 1992, **40**: 1019~1026.

CMC-LIQUEFYING ENZYME WITH LOW MOLECULAR WEIGHT FROM NEWLY ISOLATED *STREPTOMYCES*

Li Xianzhen Xu Degui Rin Gangyi Jin Fengxie

(Department of Food Technology, Dalian College of Light Industry, Dalian 116001)

Gao Peiji

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract A new bacterium, *Streptomyces* sp. LX, was isolated from soil, which was aerobic Grampositive and could decompose crystalline cellulose completely while only a trace of reducing sugar were found in cultures over the incubation when grown on cellulosic materials. The growth temperature

(下转第 296 页)

(上接第 281 页)

and pH optima of which were 30°C and 7.2 *Streptomyces* sp. LX was found to be inducible for extracellular endo-cellulase with CMC-liquefying activity (CMC-liquefying enzyme). The molecular weight of which is 9.2ku. It was found no detectable reducing sugar released and little weight loss over the fragmentation of filter paper, moreover, there was no significant change in the degree of polymerization of cellulose. Presumably it may be a chain-opening enzyme capable of disturbing to intra or inter chain hydrogen bonds.

Key words Degradation of cellulose, Endocellulase, Fragmentation, CMC-liquefying enzyme, *Streptomyces*