

碱性纤维素酶的产生条件和一般性质

田新玉 王 欣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 从我国内蒙古地区天然碱湖样品中分离的 200 余株嗜碱细菌中筛选到一株产生碱性纤维素酶的菌株 N6-27, 初步鉴定为芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)。产酶的最适碳源为羧甲基纤维素钠 (CMC), 氮源为复合蛋白胨, Na_2CO_3 浓度为 0.2%, 酶反应的最适温度和 pH 分别为 55℃ 和 8.5, 在 50℃ 以下及 pH6.0~11.0 范围内稳定, 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。

关键词 碱性纤维素酶, 嗜碱芽孢杆菌, 产酶条件和性质

碱性纤维素酶, 这里指的是碱性羧甲基纤维素酶 (Alkaline CMCase), 它在碱性 pH 范围起作用。一般的纤维素酶主要应用于纺织、造纸、食品和饲料等工业, 它们起催化作用时一般为酸性或中性, 故无法应用于洗涤剂工业。洗涤剂水溶液 pH 值在 9.0 左右, 因此洗涤剂用酶必须在碱性条件下具有较高的活性和稳定性, 酶活性不受去污剂和它洗涤剂添加剂的影响, 并且不降解天然纤维素。碱性羧甲基纤维素酶可满足上述条件, 1988 年日本的 Kao 公司已开发出添加碱性纤维素酶的洗衣粉^[1]。本文报道从内蒙古地区天然碱湖分离、筛选的一株产碱性纤维素酶的嗜碱芽孢杆菌 N6-27 的产酶条件及酶的某些性质。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

从分离自内蒙古乌杜淖、哈马台和察汗淖等天然碱湖泥水样品的 200 余株嗜碱细菌中筛选产生碱性纤维素酶的菌株。

1.2 培养基和筛选方法

1.2.1 培养基: 基础培养基 (g/L): 羧甲基纤维素钠 (CMC) 20.0, 复合蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 50.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 及 Na_2CO_3 10.0 (分开灭菌), 固体培养基加 1.5% 琼脂。种子培养基采用 Horikoshi II 培养基^[2]。发酵培养基 (g/L): CMC 10.0, 复合蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2,

NaCl 10.0, Na_2CO_3 10.0 (分开灭菌)。

1.2.2 菌种筛选: 将嗜碱菌点种于基础培养基平板上, 37℃ 培养 48h, 加 0.1% 刚果红染液覆盖平板, 静置 30min, 菌落周围出现清晰透明圈者为产酶菌株。复筛采用液体培养基培养, 37℃, 旋转摇床振荡培养 48h 后测定酶活力, 筛选酶的高产菌株。

1.3 菌种特征鉴定

主要依据《一般细菌常用鉴定方法》^[3]和《伯杰氏系统细菌学手册》第 2 卷^[4]进行初步鉴定, 使用培养基加 1.0% Na_2CO_3 。

1.4 产酶条件试验

改变基础培养基中碳源、氮源的种类和浓度以及无机盐含量, 确定最佳产酶条件。

1.5 粗酶制备和测定方法

1.5.1 粗酶制备: 250ml 三角瓶中装 50ml 种子培养基, 接种斜面菌体, 37℃, 旋转摇床振荡培养 24h 作种子液, 按接种量 2% 转接于 500ml 三角瓶中的 100ml 发酵培养基中, 于 37℃ 振荡培养 48h, 在 4℃, 10000 × g 离心 20min 除去菌体, 取上清液缓慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 80% 饱和度, 4℃ 静置过夜, 离心收集沉淀物, 溶于少量缓冲液 (0.02mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , pH8.0) 中, 对同样缓冲液透析, 即得到粗酶液。

1.5.2 菌体生长测定: 将培养液稀释 10 倍, 用 721-型分光光度计在 600nm 下测定光密度, 以

未接种的培养基等量稀释液作对照。

1.5.3 酶活力测定: 参照 Horikoshi 方法^[5], 以 0.5ml 1.0%(w/v) CMC 溶液为底物(用 pH9.0 的 0.05mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液配制), 加 0.1ml 稀释酶液, 于 50℃ 保温 10min, 然后加入 1.0ml DNS 试剂, 沸水浴煮 5min, 加入 4ml 蒸馏水, 在 540nm 测光吸收, 酶活力定义为每分钟催化产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量为 1 个纤维素酶活力单位。

1.6 主要试剂

羧甲基纤维素 (CMC), 上海化学试剂公司, 复合蛋白胨为日本大五荣化学株式会社产品, 其它试剂均为分析纯。

2 结果

2.1 嗜碱菌 N6-27 的特性

由内蒙古地区天然碱湖样品中分离的 200 余株嗜碱细菌中筛选到一株具有较高碱性纤维素酶活力的菌株 N6-27, 该菌生长的 pH 范围为 7.0~11.5, 最适生长 pH 为 10.0~10.5, 低于 pH7.0 几乎不生长, 表明是一株专性嗜碱菌。24h 细胞杆状(图 1), 细胞大小为 0.7~0.9 \times

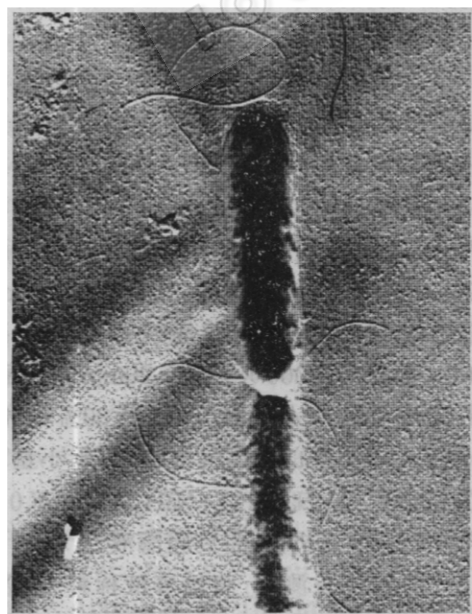


图 1 N6-27 菌体的电子显微镜照片 ($\times 10000$)

3.0~7.0 μ m, 革兰氏染色阴性, 周生鞭毛, 运动, 芽孢中生, 椭圆形 (0.2~0.3 \times 0.3~0.5 μ m), 氧化酶阴性, 接触酶阳性。根据《伯杰氏系统细菌学手册》第 2 卷^[4]描述特征, 菌株 N6-27 属于芽孢菌属 (*Bacillus*)。

2.2 产酶条件

2.2.1 不同碳源对生长和产酶的影响: 改变基础培养基中碳源的种类和浓度, 培养后测定菌生长和酶活力, 试验结果列于表 1, 产酶较适宜的碳源为纤维二糖和 CMC, 其中以 2% CMC 最适。菌株 N6-27 虽能利用多种糖类, 但酶活力均较低或没有酶活力, 纤维素粉和结晶纤维素这些不溶解的纤维素不能诱导酶的产生。

表 1 碳源对产酶的影响

碳源	浓度 (%)	生长 (A_{600})	酶活力 (u/ml)
葡萄糖	1.0	0.46	0.49
果糖	1.0	0.38	0
半乳糖	1.0	0.30	0.39
蔗糖	1.0	0.38	0.48
纤维二糖	0.5	0.35	0.48
	1.0	0.42	1.45
	2.0	0.36	1.30
乳糖	1.0	0.33	0
羧甲基纤维素	0.5	0.2	0.38
	1.0	0.24	0.86
	2.0	0.44	3.26
木聚糖	1.0	0.52	0.47
果胶	1.0	0.46	0.42
纤维素粉	1.0	NM	0
结晶纤维素	1.0	NM	0

NM: 由于底物性质, 未能测定生长。

2.2.2 不同氮源对生长和产酶的影响: 改变基础培养基中的氮源种类和浓度, 培养后测定菌体生长和酶活力, 结果(表 2)表明, 该菌利用复合蛋白胨最好, 浓度为 2% 时, 菌体生长和酶活力最高。

2.2.3 Na_2CO_3 浓度和初始 pH 对产酶的影响:

表 2 氮源对产酶的影响

氮源	浓度 (%)	生长 (A_{600})	酶活力 (u/ml)
酪蛋白	1.0	0.23	2.70
复合蛋白胨	1.0	0.20	3.29
	2.0	0.42	4.54
	2.5	0.40	3.34
细菌蛋白胨	1.0	0.15	2.67
素酪水解物	1.0	0.29	2.10
酵母粉	1.0	0.28	2.04
牛肉膏	1.0	0.18	2.25
NH_4NO_3	1.0	0	0
谷氨酸钠	1.0	0.15	2.5
尿素	1.0	0.05	0.5

Na_2CO_3 对许多嗜碱菌的生长是必需的^[2], 并对培养基的 pH 具有一定缓冲作用, 以不同浓度的 Na_2CO_3 加入基础培养基中进行产酶试验, 结果表明 Na_2CO_3 的最适浓度为 0.2%。用 NaOH 溶液调节培养基的初始 pH 进行试验, 当 pH8.0~9.5 时, 酶活力最高。甚至在 pH11.5 菌体生长仍较好, 酶活力为最高酶活的 89%, pH7.0 以下几乎不产酶。

2.2.4 NaCl 浓度对生长和产酶的影响: 一系列不同浓度的 NaCl 加入基础培养基中进行试验, 结果表明一定浓度的 NaCl 对于菌体生长和酶的产生有促进作用, 菌体生长和产酶最适的 NaCl 浓度为 0.5~1.5%, 超过 1.5% 时产酶受抑制。

2.2.5 酶形成的时间过程: 在上述选定的最佳条件下进行培养, 不同时间取样测定菌体生长和酶活力, 结果如图 2, 菌株 N6-27 在 20h 生长达到了对数期, 生长停滞在 20~48h, 也是产酶高峰期, 此后酶活力缓慢下降。通过以上条件优化, 菌株 N6-27 产酶活力达到 6~7u/ml, 比发酵条件优化前提高近 5 倍。

2.3 碱性纤维素酶的性质

2.3.1 酶反应的最适 pH: 将酶液与底物在不同缓冲液中进行反应 (0.05mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH4.0~6.0; 0.05mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液, pH7.0~9.0; 0.05mol/L

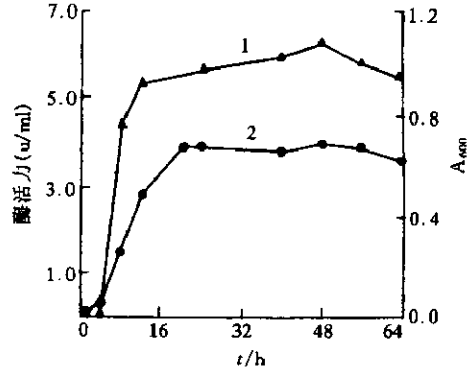


图 2 产酶过程曲线
1. 酶活力; 2. 生长

甘氨酸-NaOH 缓冲液, pH10.0~12.0), 按常规测定酶活力, 结果表明, 该酶最适反应 pH 为 8.5~9.0, pH7.0~10.0 范围内酶活力保持最高酶活的 60% 以上。

2.3.2 pH 对稳定性的影响: 酶液分别在上述不同 pH 的缓冲液中于 40℃ 保温 30min, 按常规方法测剩余酶活力, 以 pH8.5 不保温的酶活力为 100%, 结果表明, 在 pH6.0~11.0 范围内, 酶活力保持最高酶活的 80% 以上, 高于 pH12 时基本失活, 低于 pH6.0 时酶活力迅速下降。

2.3.3 最适反应温度: 在 pH8.5, 0.05mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中, 在给定温度条件下, 按常规测定酶活力, 结果表明, 该酶最适反应温度为 55℃, 35℃ 时酶活力为最适酶活的 50%, 70℃ 酶完全失活。

2.3.4 酶的热稳定性: 将酶液在给定不同温度下保温 10min, 按常规方法测剩余酶活力, 以 4℃ 酶液的酶活为 100%, 该酶在 50℃ 以下较稳定, 60℃ 完全失活。

2.3.5 底物的特性: 以作用于 CMC 的酶活为 1u 的酶量, 分别作用于不同底物, 结果表明, 该酶仅对 CMC 有强烈的水解能力, 而对滤纸、纤维素粉和结晶纤维素 (Avicel) 几乎不作用, 表明 N6-27 菌株产生的酶是一种碱性羧甲基纤维素酶。

3 讨论

嗜碱细菌产生的各种碱性酶已进行了广泛

的研究,但国外报道的大部分嗜碱菌都是分离自土壤^[2],我们已经从天然碱湖分离到产生碱性 β -甘露聚糖酶和碱性淀粉酶的菌种^[6,7],我们认为从天然碱湖分离不同碱性酶产生菌是非常有希望的,最近从分离自碱湖的细菌中筛选到产生碱性纤维素酶的菌种 N6-27,初步鉴定为芽胞杆菌(*Bacillus* sp.)。近年来,对碱性纤维素酶的应用进行了大量研究,日本的 K. Horikoshi^[2], F. Fukumori^[8], S. Kawai^[9] 和 S. Ito^[1] 等,从土壤中分离到许多产碱性纤维素酶的菌株,其中 KSM-635 所产生的酶最适 pH9.5,最适温度 40℃,在 pH6~11 范围内稳定,对 CMC 有很强的水解能力,经过诱变育种,酶活力提高了几百倍^[10,11],已经工业化生产,并成功地用于洗涤添加剂。菌株 N6-27 产生的碱性纤维素酶活力相当已报道野生芽胞杆菌产酶水平,该酶在很宽的 pH 范围内稳定,在碱性 pH 酶活力最高,经过诱变可望进一步提高酶活力,因此有可能用于开发新型的加酶洗涤剂。我们现在正进行酶的纯化及特性研究。

参 考 文 献

- [1] Ito S, Shikata S, Ozaki K *et al.* Agri Biol Chem, 1989, 53(5):1275~1281.
- [2] Horikoshi K, Akiba T. Alkalophilic Microorganisms—A New Microbial World. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1982.
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法,北京:科学出版社,1978.
- [4] Peter H A, Sneath A. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986.
- [5] Horikoshi K, Nakao M, Kurono Y *et al.* Can J Microbiol, 1984, 30: 774~779.
- [6] 田新玉,徐毅,马延和等. 微生物学报, 1993, 33(2):115~121.
- [7] 田新玉,马延和,周培瑾等. 微生物学报,1991,31(5): 364~370.
- [8] Fukumori F, Kudo T, Horikoshi K. J Gen Microbiol, 1985, 131: 3339~3345.
- [9] Kawai S, Okoshi H, Ozaki K *et al.* Agric Biol Chem, 1988, 52(6): 1425~1431.
- [10] Shikata S, Saeki K, Okoshi H, *et al.* Agric Biol Chem, 1990, 54(1): 91~96.
- [11] 伊藤进,川合修次,冈本晖公彦. 日本农芸化学会志, 1990, 64(9): 1445~1454.

PRODUCTION AND SOME PROPERTIES OF ALKALINE CELLULASE

Tian Xinyu Wang Xin

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract *Bacillus* sp. N6-27, which was screened from 200 strains isolated from soda lakes in Inner Mongolia, constitutively produced an alkaline cellulase (CMCase). Higher production of CMCase required the presence of carboxymethyl cellulose and polypeptone with initial pH 8.0~9.5 at 37℃. The optimal pH and temperature for enzyme activity was 8.5~9.0 and 55℃, respectively. The optimal pH for enzyme stability was over the range of 6.0~11.0. It showed strong activity toward CMC, but almost no activity toward filter paper, cellulose powder and Avicel.

Key words Alkaline cellulase, Alkaliphilic *Bacillus*, Enzyme formation and properties