

产碱性纤维素酶菌株的选育和酶合成基本特性

王丹敏* 宋桂经 高培基

(山东大学微生物研究所 济南 250100)

摘要 芽孢杆菌 x-6 菌株经甲基磺酸乙酯(EMS)和紫外线(UV)复合诱变,从其万古霉素(Vm)抗性突变体中选育获得一突变株 EV23,所产生的碱性羧甲基纤维素酶(CMCase)酶活力由原来的 0.84u/ml 提高到 3.53u/ml。EV23 菌株所产该酶基本为组成性地合成纤维素酶,酶合成明显表现出抗降解物阻遏的特点,以葡萄糖为碳源培养,4% 浓度时酶合成水平最高。酶合成效率受菌体生长速率影响较大。在高浓度易代谢基质和三羧酸循环中间物存在下,酶合成将受到一定程度的阻遏。酶合成还与能量代谢有关,探讨了外源 ATP、cAMP 对酶合成的影响。

关键词 碱性纤维素酶,选育,合成

碱性纤维素酶一般属于内切葡聚糖酶(Endo- β -1,4-glucanase),为单一的羧甲基纤维素酶(CMCCase),可作用于纤维素酶的非结晶区。迄今所报道的碱性纤维素酶最适作用 pH 为 8.5~9.5 左右,洗涤剂的水溶液通常 pH 为 9.0 左右,因而此酶可用作洗涤剂的添加剂,在化工印染、碱性废水处理等方面也具有独特的用途,因而对此酶及其产生菌的研究逐渐受到重视^[1,2]。国外已开始工业化生产此酶,并取得了较好的经济效益。

芽孢杆菌的抗药性突变常较高频率地伴随着胞外酶产量提高的突变,所用抗药性标记多数为抑制细胞壁合成类的抗生素,这些抗生素在筛选芽孢杆菌胞外酶高产菌株方面应用广泛,可以大大提高筛选效率^[3]。本文报道了从万古霉素抗性突变体中选育碱性纤维素酶高产菌株及酶合成调节特性的研究。

1 材料和方法

1.1 菌株

Bacillus sp.x-6: 为出发菌株,本实验室分离自山东造纸厂碱性污泥。

1.2 培养基和培养条件

1.2.1 平板分离培养基(%): 麸皮 5.0(取浸汁),葡萄糖 1.0,蛋白胨 0.4,酵母膏 0.25, KH_2PO_4

PO_4 0.1, NaCl 0.5, 琼脂 1.5, pH9.0。

1.2.2 摇瓶产酶培养基(%): 葡萄糖 4.0, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.3, KH_2PO_4 0.1, NaCl 1.0, pH8.5。

1.2.3 基本培养基: 无葡萄糖成分,其余同 1.2.2。

1.2.4 培养条件: 250ml 三角瓶装入 50ml 产酶培养基, 37℃, 160r/min 旋转式振摇(WDM-10 型微生物多用培养箱, 山东大学制造)2d, 接种量 5%。

1.3 碱性纤维素酶高产菌株的选育

1.3.1 EMS-UV 复合诱变处理: 取 EMS 加入到培养至对数期的出发菌培养液中, 终浓度为 1.0%~2.0%, 37℃ 密封振荡处理 30min。取培养物离心、洗涤后, 制备 10^{10} 细胞/ml 的菌悬液, 铺成厚约 1mm 的液层, 紫外灯距离 30cm, 照射 4min。随后将菌体转移入含万古霉素的肉汤培养基中, 富集培养 24h。

1.3.2 抗性突变体的筛选: 取经复合诱变处理的菌液, 离心浓缩 5 倍后各取 0.2ml 分别涂于含 Vm 的梯度平板和含致死浓度的 Vm 平板上。37℃ 培养 3d 后, 挑接抗药性突变体(V_m^r)于斜面

*现址: 武警医学院微生物教研室(天津300162)

1996-10-07 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

上。

1.3.3 高产菌株的筛选: 将获得的抗性突变株进行摇瓶初筛、复筛, 取培养 36h 的发酵液测酶活, 从中选出高产株。

1.4 测定方法

1.4.1 CMCase 酶活力: 浓度为 1.1% 的 CMC-Na 溶液 (用 0.2mol/L, pH9.0 Gly-NaOH 缓冲液配制) 0.9ml, 加入 0.1ml 经适当稀释的酶液, 45℃ 反应 15min, 用 DNS 法测定还原糖^[4], 以每分钟产生 1 μ mol 还原糖 (按葡萄糖计) 的酶量为一个酶活力单位。

1.4.2 菌体蛋白: 将洗好的菌体加入终浓度为 3mol/L 的 NaOH, 振荡后除去沉淀。取上清液测 OD₂₈₀, 以小牛血清白蛋白为标准。

1.4.3 菌体干重: 培养液 4000r/min 离心后所得沉淀物在 105℃ 烘箱里烘干至恒重。

2 结果

2.1 高产菌株的诱变选育

2.1.1 V_m' 突变体的获得: 用 EMS-UV 复合诱变处理出发株菌体, 细胞平均致死率为 98.6%, 菌体经富集培养和药物平板涂布后, 共选得 113 株 V_m' 突变体。另取诱变后的一部分, 直接在非药物平板上分离, 随机挑取 50 余株非抗药性菌株 (V_m')。

2.1.2 V_m' 突变体与酶产量的关系: 将 V_m' 和 V_m 菌株进行摇瓶发酵, 测定其产酶活力。结果发现, 得到的 V_m' 突变株碱性 CMCase 的正变率和正变幅度均高于非抗药性菌株, 前者酶产量提高 40% 以上的正变率达 22.8%, 而后者相应正变率只有 3.4%; 前者酶产量提高幅度为 10%~320%, 而后者只有 10%~80%。

2.1.3 高产菌株的筛选: 从 V_m' 突变体中根据摇瓶初筛和复筛结果, 选到产酶活力最高且相对稳定的菌株, 命名为 EV23, 其产酶活力达 3.53u/ml, 为出发株的 4.2 倍。

2.2 EV23 的酶合成基本特性

2.2.1 碳源的影响: 在基本培养基中分别添加 1% 不同碳源, 进行产酶试验。由表 1 可见, EV23 的碱性 CMCase 基本表现为组成性合成,

酶合成水平受碳源影响较小。葡萄糖、果糖等易代谢碳源在低浓度下不但不抑制酶的合成, 还相对地促进酶的合成。

2.2.2 葡萄糖、甘油浓度对产酶的影响: 以基本培养基分别添加不同浓度的葡萄糖、甘油为碳源, 进行产酶试验 (图 1, 2)。EV23 的酶合成表现出明显的抗降解物阻遏的特点, 以葡萄糖为碳源时尤为突出, 4% 浓度时比合成水平达最大, 糖浓度 > 4% 时, 生长量渐趋恒定, 酶活趋缓下降, 表现出高浓度下的“阻遏”作用。

2.2.3 氮源对产酶的影响: 改变产酶培养基中氮源组成, 观察氮源对酶合成的影响。蛋白胨、牛肉汁、色氨酸这三类有机氮源能极大地促进菌体生长, 生长速率较高, 但酶比合成水平较低; 其它有机及无机氮源虽不能很好地支持生长, 酶合成水平却相对较高, 表明酶合成效率与菌体生长速率有一定的负相关性。

表 1 碳源对 EV23 生长和酶合成的影响

碳源 (1%)	生长量 (mgDCW* · ml ⁻¹)	酶比合成 (u · mg ⁻¹ DCW)
无	0.87	0.48
微晶纤维素	0.81	0.47
羧甲基纤维素	0.78	0.63
可溶性淀粉	1.64	0.64
蔗糖	1.69	0.54
麦芽糖	1.42	0.60
纤维二糖	0.93	0.55
槐糖	1.06	0.54
龙胆二糖	0.80	0.47
葡萄糖	1.78	0.68
果糖	1.19	0.62
甘露糖	0.91	0.60
木糖	1.14	0.51
甘油	1.53	0.60
山梨醇	1.54	0.39

*DCW: 菌体干重 (mg)

2.2.4 有机酸对酶合成的阻遏: 在含 2% 葡萄糖的基本培养基中, 分别添加终浓度为 30mmol/L 的各种有机酸, 进行摇瓶发酵。通过测定菌体生长量和酶的比合成发现, 三羧酸循

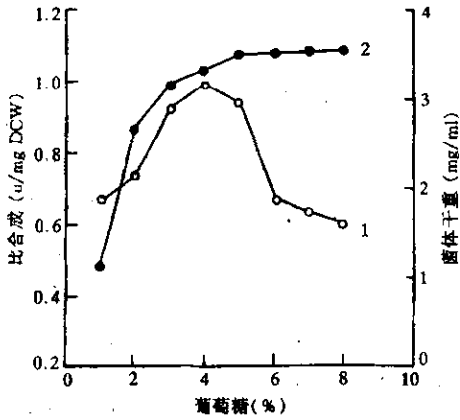


图1 葡萄糖浓度对酶合成的影响

1. 比合成; 2. 菌体干重

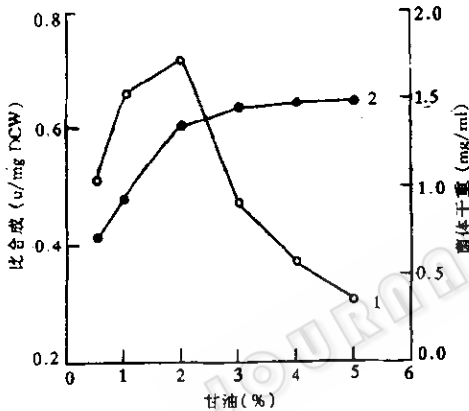


图2 甘油浓度对酶合成的影响

1. 比合成; 2. 菌体干重

环中有机酸除乙酸外,其余对酶合成均有不同程度的阻遏作用。 α -酮戊二酸、柠檬酸由于酸性较强,培养基 pH 过低从而影响生长。

2.2.5 酶合成与能量代谢关系:已知外源 ATP 可以提高胞内 ATP 水平。实验结果表明,加入外源 ATP 可发生 CMCse 合成的有限度阻遏。ATP 添加量 $>2\text{mmol/L}$ 时,阻遏程度基本不变,说明 ATP 只是易代谢碳源阻遏的本质因素之一,不是唯一因素。

采用分批培养法,将在 2% 葡萄糖中培养至 10h 的培养物分成四份,一份作对照,另三份如表 2 添加基质,观察 cAMP 对酶合成的影响。在 2% 葡萄糖培养液中加入 1mmol/L cAMP,可

使酶合成量提高 16%,表明在去阻遏状态下,cAMP 对酶合成有一定的促进作用。但在阻遏状态(5% 葡萄糖)下,cAMP 对酶合成的去阻遏作用不明显。

表 2 cAMP对酶合成的影响

添加物	浓 度	菌体蛋白 (mg/ml)	酶活力 (u/ml)
对照	0	3.62	2.42
cAMP	1mmol/L	3.68	2.80
葡萄糖	5%	3.86	1.95
葡萄糖+cAMP	5%, 1mmol/L	3.81	2.03

3 讨 论

通过选育抗药性突变株来筛选胞外酶高产菌株是一种可靠、有效的方法,目前只适用于芽孢杆菌^[5,6]。大量资料表明,抗药性突变往往较高频率地伴随着胞外酶高产突变,其相关性机理仍不甚清楚。有的研究者认为一些抗药性突变体同时发生了细胞通透性的改变,提高对营养物质的吸收,增加酶的分泌,从而引起胞外酶的增产;有的认为存在着别的相关机理^[3]。人们正试图从生化和基因方面入手来揭示抗性突变与 G 菌胞外酶产量的关系。

细菌纤维素酶的合成调节没有统一、固定的模式^[7,8]。EV23 的碱性纤维素酶合成调控机制基本属于组成型,酶合成水平受碳源种类影响较小。在易代谢基质和高浓度葡萄糖存在下,菌体生长十分旺盛,产酶速率则有一定的降低,表明酶的抗阻遏合成还是有一定限度的。ATP 和 cAMP 只是酶合成调节的本质因素之一。值得注意的是,cAMP 不能解除 EV23 酶合成中的阻遏作用,而不少作者报道,*E. coli* 中降解物阻遏是由于降低了胞内 cAMP 水平,外加 cAMP 可解除阻遏^[9]。表明 EV23 碱性纤维素酶合成的降解物阻遏机制可能与 *E. coli* 不同。

参 考 文 献

- [1] 川合修次:特許公報,1991,平 3:29387.
- [2] Susumn Ito, Shitsuw shikata, Katsuya Ozaki *et al.* Agric Biol Chem, 1989, 53(5):1275~1281.

- [3] Susumu Ito, Yuichi Ohta, Masaharu Shimooka *et al.*
Agric Biol Chem, 1991, 55(9):2387~2391.
- [4] 北京轻工业学院, 大连轻工业学院编. 工业发酵分析,
北京: 中国财政经济出版社, 1963.
- [5] Bunji Maruo, Takashi Tojo. J Gen Appl Microbiol,
1985, 31:323~328.
- [6] Mutsuo Kanno Agric Biol Chem, 1986, 50(10):2633~
2635.
- [7] Lori M R, Glenn H C. Enzyme Microb Technol,
1985, 11(10):633~697.
- [8] Dillon N, Chhibber S, Saxena M *et al.* J Biotechnol,
Lett, 1985, 7:695~697.
- [9] Makman K S, Sutherland E W. J Biochem, Chem,
1965, 240:1309.

SCREENING OF STRAIN PRODUCING ALKALINE CELLULASE AND STUDIES ON THE CHARACTERISTICS OF THE ENZYME SYNTHESIS

Wang Danmin Song Guijing Gao Peiji

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan, 250100)

Abstract After combination treatment of *Bacillus* sp. x-6 with EMS and UV, a mutant EV23 was obtained from its vancomycin-resistant mutants. The alkaline cellulase activity was improved from 0.84u/ml to 3.53u/ml. The synthesis of alkaline GMCase by EV23 occurred almost constitutively with distinct resistance to catabolite repression. When glucose was used as carbon source, the enzyme productivity reached the highest at the concentration of 4%. In addition, the enzyme synthesis that was related to the cell growth rate closely proceeded synchronously with the bacterial growth. The presence of glucose and intermediates in TCA at higher levels caused repression of GMCase formation to some extent. The effects of exogenous ATP and cAMP on the enzyme production were also investigated.

Key words Alkaline cellulase, Breeding, Synthesis