

碱性纤维素酶及其去污机理

宋桂经

(山东大学微生物研究所 济南 250100)

纤维素酶的研究,已有四五十年的历史。但是,一直是以木霉 (*Trichoderma*)、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研究方向进行的。近年来,碱性纤维素酶在洗涤剂工业上的成功应用,改变了传统的去污机制,建立了一套新的去污机理,被洗涤剂工业称之为一次技术大革命,使碱性纤维素酶成为世界各国普遍重视的一种极具生命力的新型酶制剂。

1 产碱性纤维素酶的微生物及其酶的性质

碱性微生物可以分为嗜碱菌和耐碱菌。只有在

pH8 以上才能生长的被称之为嗜碱菌;最适 pH 是中性,但在碱性条件下也能够生长的属耐碱菌。碱性微生物在自然界中主要分布在碱性环境中,在 pH9~10 的土壤中,碱性菌多达每克 $10^5\sim 10^6$,而 pH4~5 仅有 $10^1\sim 10^3$ 。

嗜碱菌具有独特的生理特性^[1],能够改变周围环境的酸碱度,使之适合于自身的生长,即使培养基的初始 pH 为 11 或 6,培养数日后,会趋向生长最适 pH; Na 离子对生长发育影响较大,培养基中只加入 0.15mol / L

1996-04-03 收稿

表1 *Bacillus* 属细菌产生的碱性纤维素酶的比较

菌株	最适生 长pH	发酵单位 (u/l)	比活性 (u/g)	反应pH (存活50%)	分子量 (万)	文献
<i>Bacillus</i> sp.K-522	(耐) 6.8	150	23	4.5~10.5	3.5	9
<i>Bacillus</i> sp.K-588	(耐) 6.8	160	5	4.5~10.5	2.7 3.0	10
<i>Bacillus</i> sp.K-580	(耐) 6.8	60	33	4.5~10.5	1.8 5.0	11
<i>Bacillus</i> sp.K-344	(耐) 6.8	2900	6	4.5~11	16	12
<i>Bacillus</i> sp.K-539	(耐) 6.8	40	26	4~11	1.8 2.9	13
<i>Bacillus</i> sp.K-577	(耐) 6.8	60	13	4.5~10.5	1.7 3.0	14
<i>Bacillus</i> sp.K-635	(嗜) 8.6	2900	16.2(u/mg)	3.5~12.5	100 500KDa	15
<i>Bacillus</i> sp.K-19	(嗜) 8.6			8.5~9.0(最适)		19
<i>Bacillus</i> sp.64	(嗜) 8.6					19
<i>Bacillus</i> sp.520	(嗜) 8.6					19
<i>Bacillus</i> sp.N-4	(嗜) 8.6			4.5~10.0	50,80 100KDa	16
<i>Bacillus</i> sp.NO.113	(嗜) 8.6			9.0	9.2	16

NaCl, 菌体生长浓度比不加的分别增加 2~3 倍。

碱性微生物产生的碱性酶有 40 多种, 碱性蛋白酶最早获得应用, 70% 的碱性菌能够产生碱性蛋白酶。碱性酶的特点: 1. 最适反应 pH 一般为 8~10 左右; 2. 耐碱性强, 在碱性环境里酶活稳定, 在 pH12 仍然能够保持 50% 左右的酶活性, 这是作为洗涤剂用酶的基本条件; 3. 碱性酶一般都是胞外酶。

碱性纤维素酶的研究比较晚, 但发展的很快。1970 年 UNILIVER 公司^[2]首先发现纤维素酶用于洗涤剂, 可以使由于反复洗涤而变黄、变硬的棉纤维制品恢复原来的洁白和柔软性。但当时在碱性范围具有较高活性的纤维素酶还没有实用化。Horikoshi 等人^[3]从土壤中分离出嗜碱性芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) No. N-1、N-2、N-3 和 N-4 等菌株, 作为碱性纤维素酶的产生菌。但是, 酶活性很低。一直到 1980 年 NOVO 公司^[2]发现了在碱性范围有较高活性的腐植菌, 通过液体发酵, 成功地生产了洗涤剂用碱性纤维素酶, 并很快得到应用。1984 年日本 KAO 公司 Susumu ITO 等人^[4], 利用含有刚果红染料的 CMC 培养基, 分离了上万株能够产生较高活性的碱性纤维素酶产生菌。其中芽孢杆菌 KSM-635 是产生去污力强, 酶活又高的优良菌株。该菌是好气性、周鞭毛、G+ 性的芽孢杆菌, 是只有在 pH8 以上才能生长的嗜碱菌。根据分类结果, 比较接近环状芽孢杆菌 (*B. circulans*) 和短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*); 纤维素、CMC 对该菌的碱性纤维素酶合成无诱导作用; 木糖能够抑制酶的合成; 果糖、麦芽糖作碳源, 可以产生组成型酶 (1.2~4.8u/ml)。这意味着可以不用高粘度的 CMC 或水不溶性的纤维素作碳源, 无疑这对工业化生产中的发酵和后处理工艺带来了很大方便。Susumu ITO 等

人^[5-8], 通过对原有野生菌株进行反复分离筛选, 获得了蛋白酶完全缺损的异化代谢物抑制解除菌株。并进行了对碳、氮源的选择、补充及发酵条件的优化。筛选了对万古霉素、瑞斯托霉素等细胞壁合成抑制剂有抗性的突变菌株, 酶活性提高了 700 倍, 使碱性纤维素酶的产量大幅度地提高。KAO 公司在日本鹿儿岛工厂投产, 终于实现了碱性纤维素酶的大规模工业化生产。1987 年添加碱性纤维素酶的高密度新型加酶洗涤剂投放市场后, 不到半年就占领了市场之首。

日本在碱性微生物及碱性纤维素酶的研究方面, 一直处于领先地位。报道比较多的是芽孢杆菌属。由表 1 可见: 1. 所有的野生菌株的酶活性和酶的比活性都较低, 最高的芽孢杆菌 KSM-635 也只有 2900u/L, 其比活性为 16.2u/mg, 而一般的仅为 5~33u/g; 2. 最适反应 pH 在 7~10, 在 pH4~12 的范围内, 一般都能够保存 50% 以上的酶活性; 3. 嗜碱菌产生的碱性纤维素酶并不一定比耐碱菌产生的更耐碱, CMC 似乎对多数嗜碱菌的碱性纤维素酶合成有诱导作用, 葡萄糖明显地抑制酶合成。但是, 也有例外, 如芽孢杆菌 KSM-635。

通常说的酸性纤维素酶是一种具有 3~10 或更多个组分构成的多组分酶。根据其作用可以分成: 外切 β -1,4-葡聚糖苷酶、内切 β -1,4-葡聚糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶。在这三种酶的协同作用下, 将纤维素最终分解成葡萄糖。到目前为至, 在碱性条件下, 还没有能够分解天然纤维素的纤维素酶。洗涤剂工业用的碱性纤维素酶和酸性纤维素酶不同。经分离纯化后, 它是一种单组分或多组分的只具有内切 β -葡聚糖苷酶 (CMC 酶) 活性的纤维素酶。有的还与中性 CMC 酶组分共存。

我国地域广阔, 微生物资源丰富, 在碱性纤维素酶

的研究方面也作了不少工作。笔者^[17]1990年分离出一些能够产生1000u/L的野生菌13株,有细菌也有放线菌;既有嗜碱菌又有耐碱菌。芽孢杆菌074产的碱性纤维素酶,经过Sephadex G-100、DEAE-Sephadex A-25和疏水相互作用Agarose 4B三种方法分离纯化后,得到一个仅具内切- β -1,4葡聚糖苷酶活性的单组分碱性纤维素酶^[18]。其分子量和等电点分别为52500和4.1;最适反应pH为7~8,在pH4~11可存活50%;最适反应温度为50℃;不能分解天然纤维素;CMC对酶的合成无诱导作用;除Hg⁺ Ag⁺ Zn²⁺ Cu²⁺等少数离子及少数洗涤剂助剂对酶活性有一定影响外,酶活性相当稳定,符合国家洗涤剂用酶标准。

Susumu ITO等人^[9],分离的芽孢杆菌KSM-522是一株最适生长pH为6.8的中性菌,产生的CMC酶的最适反应pH为5~12,经DEAE Bio-GelA柱分离,得到了一个中性CMC酶组分(E-1)和二碱性CMC酶组分(E-2, E-3)。嗜碱性芽孢杆菌KSM-19、64、520^[19],均能产生只少含有4个组分的多组分的碱性CMC酶,最适反应pH均为8.5~9.5,CMC对酶的合成有诱导作用,葡萄糖对酶的抑制作用,与嗜碱菌N-4极为相似。

为了解释碱性纤维素酶的多样性,Susumu ITO等人^[20]将芽孢杆菌KSM-635碱性纤维素酶的基因克隆到大肠杆菌(*Escherichia coli*) HB101,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、为941氨基酸残基、分子量为104626Da的蛋白质编码的开放式解读结构^[21]。关于碱性纤维素酶基因的碱基排列,到目前为止,只报道了芽孢杆菌No N-4的基因*celA*、*celB*、*celC*^[22-23]及芽孢杆菌No-1139的基因*celF*^[24]。芽孢杆菌KSM-635碱性纤维素酶基因的氨基酸残基和其他纤维素酶进行比较发现,有72%与芽孢杆菌No-1139,40%分别与芽孢杆菌N-4及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中的三株菌的中性纤维素酶的氨基酸残基相同^[25-27]。这说明了芽孢杆菌属细菌产生的纤维素酶之间有很高的同性把相同区域比较分析后发现,90氨基酸残基在所有纤维素酶中都存在,这些氨基酸残基都对纤维素酶活性的表达有重要作用。在芽孢杆菌属产生的纤维素酶中,色氨酸残基与活性中心密切相关。90氨基酸残基中有10色氨酸存在,9氨基酸残基只在碱性纤维素酶,18氨基酸残基只在中性纤维素酶中存在。

2 碱性纤维素酶的去污机理

洗涤剂的作用是降低污垢与纤维间的表面张力,使污垢增溶、乳化、分散、以至脱落达到去污的目的。污垢中往往由于有较多的蛋白质和脂质,使污垢更加牢

固不易被洗涤。所以,洗涤剂中添加蛋白酶或者脂肪酶,使污垢中的蛋白质和脂肪被分解。可以大大地提高去污能力。洗涤剂中添加碱性纤维素酶和一般加酶洗涤剂中加蛋白酶或脂肪酶的目的完全相同,都是为了提高洗涤效果。只是加碱性纤维素酶的洗涤效果较前者更好^[28]。同样的污染白布,分别用加碱性纤维素酶和加碱性蛋白酶的洗涤液,连续洗涤三次,前者较后者洁白的多。这是因为它们的去污机理不同。日本KAO公司铃木^[29]用电子显微技术,观测了污染棉纤维的横断超薄切片,清楚地显示了碱性纤维素酶的洗涤效果。它能够使密封在棉纤维缝隙间的污垢脱落。

碱性纤维素酶是如何在基本上不降低棉纤维牢固度的条件下,使污垢变得那么容易除去呢?一方面,棉纤维属天然纤维素的一种,具有比木质纤维素更高的结晶度(大约80%~90%)和更高的聚合度(3500~10000),在同样的条件下,比木质纤维素更难分解。另一方面,碱性纤维素酶和酸性纤维素酶,从反应底物看,都属于纤维素酶类。但是,它们对底物所起的作用不同,酸性纤维素酶对木质纤维素的反应是一个糖化过程,在多种组分的协同作用下,能够得到更多的最终产物葡萄糖。而碱性纤维素酶则不同,它是一种缺少外切葡聚糖苷酶和葡萄糖苷酶的非全组分的内切葡聚糖苷酶,不能发生酶组分间的协同效应,因此,碱性纤维素酶不会象酸性纤维素酶那样,使棉纤维发生比较多的分解破坏。而碱性纤维素酶对棉纤维的反应,实际上主要与棉纤维中仅占10%左右的非结晶区(无定型区)的纤维素分子起作用。所以,洗涤剂中添加碱性纤维素酶,并不会明显地降低棉纤维的牢固度。笔者^[24]用074菌株产生的碱性纤维素酶洗涤液洗涤过的棉布,经国家有关部门测试,完全符合国家洗涤剂用酶标准。

为了说明碱性纤维素酶的去污机理,首先要弄清楚污垢与棉纤维的关系。人们之所以喜欢棉纺织品,是由于它的吸水性能好。吸水性能并不仅仅是纤维素分子上的大量OH基所致,而是由于棉纤维分子内部结构决定的。棉纤维具有由纤维素分子链形成的结构紧密的结晶区和占10%左右的结构松散、排列不规则的非结晶区(无定型区)形成的网状年轮状结构。这些非晶区的纤维素分子的水合,是棉纤维制品吸水性能好的主要原因。

棉纤维的复杂结构使之吸水性好,是一个很大的优点,但同时又带来了一些缺点。因为污垢侵入以后与水分子结合形成胶状物而被封闭在纤维素分子结构中,造成用一般洗涤剂或者是一般加蛋白酶洗涤剂难以洗净。如果用碱性纤维素酶洗涤剂就很容易去掉。

这是因为碱性纤维素酶,选择性地吸附在棉纤维的非结晶区的纤维素分子上。纤维素酶分子是由位于C-末端的纤维素结合域(Cellulose Binding Domain, CBD)和具有催化功能的核心蛋白(Catalytic Domain, CD)组成。基质棉纤维的非结晶区越多(结晶度越低),酶的吸附量就越大。研究表明^[30~31],CBD吸附在纤维素分子表面对纤维素分子链的结构具有疏解作用;梭状芽孢杆菌(*Clostridium fimid*)产生的纤维素酶的CBD,可以非水解性地崩解棉纤维的结构,使纤维膨胀而增加其表面积,使棉纤维结构膨松。这样有利于包埋在纤维间的污垢脱落。同时,促进并提高了酶的催化功能区的催化活性。

用微分扫描量热计,在pH9 30℃的条件下,测定棉纤维的结合水,结果表明:随着碱性纤维素酶浓度的增加,基质棉纤维的结合水逐渐下降^[29]。说明了碱性纤维素酶对棉纤维的作用,不仅使棉纤维结构膨松和选择性的降解,而且,在反应过程中,由于水合纤维素的分解,降低了结合水,使污垢比较容易地脱落。由此说明,碱性纤维素酶在洗涤剂中的作用方式,与一般加蛋白酶或脂肪酶洗涤剂不同,普通加酶洗涤剂中添加的蛋白酶或脂肪酶的作用和洗涤剂的其它助剂一样,都是通过作用于污垢,使之容易脱落。而碱性纤维素酶的作用对象不是污垢而是棉纤维。碱性纤维素酶首先选择性的吸附在棉纤维的无定型区的纤维素分子上,疏松了棉纤维的结构,在酶的作用下,将无定型区的水合纤维素分子分解,降低了结合水,从而使侵入到纤维内部,并与无定型区的水合纤维素牢固结合而形成的胶状污垢,在洗涤剂的共同作用下变得容易溶出,从而达到了提高去污力的目的。

参 考 文 献

- [1] 别府辉彦. スタリーニグ技术, 东京: 讲谈社, 1985, 133~140.
- [2] Sagakuchi. *Fraagrance Journal*, 1988, 91: 90~95.
- [3] Koki Horikoshi. *Nippo Nogeikagaku Kaishi*, 63 (8): 78.
- [4] Ito S, Shikata, Ozaki K, *et al.* *Agric Biol Chem*, 1989, 53: 1275.
- [5] Shikata S, Ozaki K. *BiopHys Acta*, 1988, 952: 282.
- [6] Williams D h, Rajananda V, *et al.* *Top Antibiotic Chem*, 1980, 5: 119.
- [7] Chatterjee A N, PeBiopHys H R. *Biochem Res Commun*, 1966, 24: 489.
- [8] 伊藤进, 下岗正治等. 特开, 平 1: 222771.
- [9] 川合修次, 押野一志. 公开特许, 昭 64, 37285: 495~504.
- [10] 川合修次, 押野一志. 公开特许, 昭 64, 37286: 505~512.
- [11] 川合修次, 押野一志. 公开特许, 昭 63, 240786: 587~598.
- [12] 押野一志, 川合修次. 公开特许, 昭 63, 273474: 417~424.
- [13] 押野一志, 川合修次. 公开特许, 昭 63, 273475: 425~432.
- [14] 押野一志, 川合修次. 公开特许, 昭 63, 279790: 549~555.
- [15] 伊藤进, 佐藤朋一. 公开特许, 昭 63, 109771: 381~393.
- [16] Koki Horikoshi. *NippoNogei kagaku Kaishi*, 63 (8): 7~8.
- [17] 宋桂经, 王东, 孙彩云等. *微生物学报*, 1995, 35 (1): 38~45.
- [18] 王东, 宋桂经, 高培基等. *生物化学与生物物理进展*, 1994, 21 (3): 337~341.
- [19] Shikata S, Saei K, Okoshi H. *Agric Biol Chem*, 1990, 54: 91.
- [20] Ozaki K, Shikata S. *Gen J. Microbiol*, 1990, 136: 1327.
- [21] Hager P J, Rabinowitz J C. *The Molecular Biology of the Bacilli*. II, ed. by D. A. Dabnau, Academic Press. Orlando, Florida, 1985, 1.
- [22] Fukumori F, Sashiharar N. *Bacteriol J*, 1986, 168: 279.
- [23] Fukumori F, Kudo T. *Gene* 1989, 76: 289.
- [24] Fukumori F, Kudo T. *Gen. J, et al. Microbiol*, 1986, 9: 132, 232.
- [25] Robson L M, Chambliss G h. *J Bacteriol*, 1987, 169: 2017.
- [26] MacKay R M, Lo A, Willick G, *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1986, 14: 9159.
- [27] Nakamura A, Uozumiand T, Beppu T. *Eur J Biochem*, 1987, 164: 317.
- [28] 宋桂经, 郭安广, 徐欣等. *日用化工*, 1993, 58 (2): 57~62.
- [29] 铃木哲. *化学*, 1993, 10.
- [30] Din N. *BioTechnology*, 1991, 9: 1096~1099.
- [31] Nin B. *Biochem J*, 1994, 303: 817~823.