

洗涤用碱性纤维素酶及其产生菌的分离方法*

赵 新 刚

(沈阳师范学院生物系 沈阳 110034)

关键词 加酶洗涤剂, 羧甲基纤维素酶

分类号 Q939.9 **文献识别码** C **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-63-65

近年来一种新型的加酶洗涤剂出现于国际市场^[1], 这种洗涤剂中加入了一种新的洗涤成分——羧甲基纤维素酶(CMCCase)。人们喜欢穿棉制内衣, 但穿过的棉织物经反复洗涤后, 在磨损较严重部位会出现发黄、褪色、板结现象, 用普通洗涤剂或加有碱性蛋白酶的洗涤剂无法解决这些问题。通过用电子显微镜, X-射线显微分析仪等进行微观探测发现, 在这些部位, 结晶型的纤维网络中出现了许多由纤维绒毛所组成的非结晶区, 污物颗粒就附着在这些非结晶型的纤维绒毛上, 一般洗涤剂只能洗去表面上的污物, 而对于这些封闭在纤维内部的污物很难去掉, 加有羧甲基纤维素酶的洗涤剂利用羧甲基纤维素酶将非结晶区的水合纤维素分子分解、破坏, 软化由纤维素分子与水组成的胶状结构, 从而使被封闭在其中的污物易于溶出^[2,3]; 同时这些由纤维绒毛所组成的非结晶区也是造成棉织物褪色、板结的原因, 因此加有羧甲基纤维素酶的洗涤剂不仅能去污, 还能起到使棉织物颜色鲜明和柔软效果^[4]。

纤维素酶一般分为外切型葡聚糖酶(EC 3.2.1.91)、内切型葡聚糖酶(即 CMCase, EC3.2.1.4)和纤维二糖酶(EC3.2.1.21)。加入洗涤剂中的是内切型葡聚糖酶即 CMCase。

目前, 在碱性纤维素酶研究与开发领域日本的花王公司(Kao Corporation)和丹麦的 Novo 公司居国际领先地位。我国在此领域的研究起步比较晚, 1990 年起先后有山东大学, 大连轻工业学院, 无锡轻工业学院等单位开展此项工作, 目前处于诱变育种阶段。

1 洗涤用碱性纤维素酶的特点

作为洗涤剂添加成分的纤维素酶一般应具备下述性质^[5]: ①羧甲基纤维素酶即 CMCase; ②最适反应 pH 一般为 8~10 左右; ③耐碱性强, 在碱性环境里酶活力

定, 在 pH12 时能够保持 50% 左右的酶活性; ④在洗涤剂中的成分如螯合剂、表面活性剂等的存在下亦稳定; ⑤自来水中的各种金属离子不抑制或稍抑制酶的活力; ⑥能抗碱性蛋白酶的降解。

上述性质中, 最主要的是在碱性条件下酶亦稳定和具有高活力。碱性纤维素酶可分为两类^[5], 一类是嗜碱性纤维素酶, 其最适酶反应 pH 范围在碱性区(pH>8); 另一类是抗碱性纤维素酶, 最适酶反应 pH 范围在酸性或中性区(pH<8), 但在碱性条件下仍具有相当高的酶活力和稳定性。碱性纤维素酶一般由嗜碱性微生物或耐碱性微生物产生。

2 已发现的主要碱性纤维素酶产生菌

日本学者在 1975 年发现了产碱性纤维素酶的菌株^[6], 这是一株产嗜碱性纤维素酶-A 的芽孢杆菌属的菌株; 进入 80 年代先后有丹麦 Novo 公司的 *Humicola insolens* 及日本花王公司的 *Bacillus* sp. KSM 系列^[1]。

表 1 是根据不完全资料的统计, 按微生物的分类及文章发表的年限顺序, 列出了部分已发现的碱性纤维素酶生产菌。

3 碱性纤维素酶产生菌的分离方法

样品采集地点最主要特点是具备碱性条件, 另外纤维素含量较丰富地点也可选择。

碱性纤维素酶产生菌株的分离方法有很多种, 但其中平板降解圈直接分离法有着快速、简捷、准确、可靠的特点。我们所要分离的菌株分泌 CMCase, 它所作用的底物是 CMC(一般用羧甲基纤维素的钠盐 sodium

* 辽宁省教委科研基金资助项目

1997-12-31 收稿, 1998-04-14 修回

表1 部分碱性纤维素酶生产菌

分类	菌 名	文章发表年代	生长pH特性	酶反应pH特性
细菌	<i>Bacillus</i> sp.	1975	嗜碱性菌	嗜碱性纤维素酶
	<i>Cellulomonas</i> ^[7]	1983	嗜碱性菌	嗜碱性纤维素酶
			嗜碱性菌	有两个酶反应pH高峰
	<i>Bacillus</i> sp. No. N-4	1984	生长pH范围8~11	pH6.7和pH9.5
			嗜碱性菌	
	<i>Bacillus</i> sp. No. 1139	1985	生长pH范围8.8~10.0	酶反应最适pH9.0
			嗜碱性菌	
	<i>Bacillus</i> sp. KSM-635	1986	生长pH范围8~11	酶反应最适pH9.5
			生长pH范围6~9	有两个酶反应pH高峰
	<i>Bacillus</i> sp. KSM-522	1988	最适生长pH6.5	pH7.0和pH10.0
霉菌	<i>Bacillus</i> sp. KSM-19		嗜碱性菌	酶反应最适pH范围
	KSM-64	1990	生长pH范围7~11	8.5~9.5
	KSM-520			
	<i>Bacillus</i> sp. KSM-534		生长pH范围5~11	酶反应最适 pH 范围
	KSM-344			5~7, 在pH8~11时酶
	KSM-539	1990		活力不低于最适 pH
	KSM-577			条件下最高酶活力的
放线菌	KSM-588			50%
	KSM-597			
	<i>Bacillus</i> sp. 074 ^[8]	1995	最适生长pH为中性	pH9.0时, 酶活力为
			最适生长pH为中性偏	3.40u/mL
<i>Humicola insolens</i>			酸性	酶反应最适pH7, pH9
			嗜碱性菌	时相对酶活力为27%
<i>Streptomyces</i> ^[9]				嗜碱性纤维素酶
				酶反应最适pH
<i>Streptomyces</i>				CMCase I为8.5
	<i>Strain KSM-9</i> ^[10]	1988	嗜碱性菌	CMCase II, III为6.0

carboxymethylcellulose 也简称 CMC 来代替)。CMC 属大分子多糖衍生物, 它被降解后生成多种分子量不等的低聚糖。根据上述特性, 人们采用了多种平板降解圈分离法来筛选分离产生 CMCase 的菌株。简要介绍于下:

3.1 CMC-天青法^[11] (CMC-azure) 这是一种将 CMC 与染料天青偶联后作为酶的底物, CMC-天青被 CMCase 降解后, 染料天青被释放出来, 挑选在菌落周围有染色圈的菌株即是产 CMCase 的菌株。

3.2 凉乙醇沉淀法^[12] (precipitation with chilled ethanol) 生长到适当时间的平板菌落, 先经过影印移植后, 再用冷却到 4℃ 的乙醇浸倒平板, 乙醇将没有被降解的 CMC 沉淀下来, 这样, 在产 CMCase 的菌落周围

就会存在清晰的透明圈。

3.3 十六烷基三甲基溴化铵法^[13] (hexadecyltrimethylammonium bromide) 将培养适当时间平板, 用 1% 十六烷基三甲基溴化铵水溶液浸泡一定时间后, 十六烷基三甲基溴化铵将未被降解的 CMC 沉淀下来, 这样, 在菌落周围有清晰透明圈者即产 CMCase。

3.4 台盼兰法^[14] (trypan blue) 将 0.0075% 的台盼兰染料作为一种成分直接加入到分离培养基中, 培养一定时间后, 在菌落周围产生较明显降解圈者即产 CMCase。

3.5 Unitex 染色法^[14] (Unitex dyes) 将培养适当时间的平板, 用 Unitex 染料浸染平板, 而后放到紫外灯下观察, 菌落周围有晕圈(halo)者, 即产 CMCase。

3.6 刚果红法^[15](congo red) 将培养适当时间的平板,用0.1%的刚果红水溶液浸染一定时间后,再用1mol/L NaCl水溶液脱色,刚果红将未被降解的CMC染成红色,而对已被降解的小分子低聚糖类无作用,因此在产CMCase的菌落周围留下了清晰的透明圈。

在上述几种平板降解圈直接分离法分离产CMCase的菌株的方法中,以刚果红法为最好。其它的方法有的受底物来源的限制,有的灵敏度低需培养较长时间,有的则因杀死菌体而需影印移植,这就造成了很多不便。而采用刚果红法则无上述缺点,刚果红对菌体无任何不良的影响,产生的透明圈清晰非常容易辨认,特别是它的高灵敏度,只要菌落长到用肉眼可见,就可产生清晰的透明圈。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Murata M, Hoshino E, Yokosuka M et al. JAACS,

- 1991, **68**(7): 553~558.
- [3] 宋桂经. 微生物学通报, 1997, **24**(6): 364~367.
- [4] Sagakuchi. Fragrance Journal, 1988, **91**: 90~95.
- [5] Kawai. U S Patent, 1990, 4943532.
- [6] 公开特许公报, 昭 50, 28515.
- [7] 公开特许公报, 昭 58, 224686.
- [8] 宋桂经, 王冬, 孙彩云等. 微生物学报, 1995, **35**(1): 38~44.
- [9] 公开特许公报, 昭 61, 19483.
- [10] 中井良三, 铃木哲. 油化学, 1988, **37**: 1165~1168.
- [11] Boriss R, Zemek J, Augustin J et al. Zbl Bakt II Abt, 1980, **135**: 435~442.
- [12] Martin D F, Priest F G, Todd C et al. Appl Environ Microbiol, 1980, **40**: 1136~1138.
- [13] Hanken L, Anagnostakis S L. J Gen Microbiol, 1977, **98**: 109~115.
- [14] Cantwell B A, McConnell D J. Gene, 1983, **23**: 211~219.
- [15] Teather R M, Wood P J. Appl Environ Microbiol, 1982, **43**: 777~780.