

芽孢杆菌 E2 菌株纤维素酶性质的研究

官家发 卢世珩 陈晓林** 范成英 张发群

(中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

芽孢杆菌 E2 菌在 55℃ 下生长良好, 在培养液中能大量积累胞外纤维素酶(190mu/mL 培养液), 所产生的纤维素酶为单一的羧甲基纤维素酶(CMCase)。羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为其专一性底物。该酶作用的 pH 为 4.5-8.0; 最适 pH 为 6.5-7.0; 在 pH4.0-8.0 范围内较稳定。酶作用的最适温度为 55℃; 在 60℃ 处理 10、30、60、90 以及 120 分钟后, 残余酶活分别为 95%、80.3%、41.4%、19.3% 和 7.0%; 在 65℃ 和 70℃ 处理 10 分钟后残余酶活分别为 59% 和 19%。 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对酶促反应稍有促进作用; Ag^+ 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 有明显的抑制作用。

关键词 芽孢杆菌 E2 菌株; 羧甲基纤维素酶

近年来, 人们对特殊环境中的纤维素酶产生菌发生浓厚兴趣。这些菌具有独特的酶学性质, 扩大了纤维素酶的应用范围。此外, 一些特殊环境中的原核纤维素酶产生菌能产生单一组分的纤维素酶, 除了便于酶的分离纯化外, 这些菌还是纤维素酶基因克隆的理想供体菌。

我们从堆肥等土样中筛选分离到几株原核好氧纤维素酶产生菌, 包括好氧细菌和放线菌, 其中一株好氧细菌芽孢杆菌 E2 菌株能在 55℃ 良好生长, 并在培养液中大量积累胞外纤维素酶。这株菌所产生的纤维素酶为单一的羧甲基纤维素酶(CMCase), 不能分解天然纤维素, 因此不属于真正纤维素分解菌(Truly cellulolytic organism)。这与 1985 年日本理化学研究所堀越等人报道的 *Bacillus* sp. strain 1139 的性质基本一致^[1], 所不同之处是后者属于中温菌, 能在高 pH 条件生长并产生羧甲基纤维素酶^[2]。芽孢杆菌 E2 菌株纤维素酶形成条件的研究已经报道^[3]。本文报道芽孢杆菌 E2 菌株及其所产纤维素酶的某些特性。

材料和方法

(一) 菌种

纤维素酶产生菌 E2 菌株: 中国科学院成都生物研究所官家发等同志分离自堆肥。

(二) 培养基

1. 用于细菌鉴定的培养基: 按《一般细菌常用鉴定方法》(中国科学院微生物研究所

本文于 1991 年 12 月 22 日收到。

· 国家自然科学基金资助项目及四川省科委应用基础研究资助项目。

** 现址: 四川省攀枝花市攀钢公司环保卫生处监测站(617063)。

细菌分类组,科学出版社,1978)及《芽孢杆菌属》[(美)R·E 戈登等著]所列的培养基配制。

2. 用于纤维素酶酶学性质研究的培养基:

(1)种子培养基:CMC-Na 5g, NaNO_3 1g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.18g, KH_2PO_4 0.9g, KCl 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 水解酪素 3g, 酵母膏 1g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1%) 0.1ml, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.1%) 0.2ml, CaCl_2 (10mg/ml) 1ml, 蒸馏水定容至 1000ml (pH6.8)。

(2)发酵培养基:CMC-Na 5g, NH_4NO_3 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KCl 0.5g, 水解酪素 3g, 酵母膏 1g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1%) 0.1ml, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.1%) 0.2ml, CaCl_2 (10mg/ml) 1ml, 磷酸盐缓冲液(1/15mol/L, pH6.8) 100ml, 蒸馏水定容至 1000ml。

(三) 酶活力分析法

参照文献[4]中 CMCase 活力测定法进行。一个酶活单位被定义为在 1 分钟内转化底物产生 $1\mu\text{mol}$ 还原糖(按葡萄糖计)所需的酶量。

(四) 粗酶制备

参照文献[5]接一环生长良好的 E2 菌株斜面细胞接到装有 50ml 种子培养基的 250ml 三角瓶中,置恒温摇床(美国 New Brunswick Scientific Co., INC.)于 45℃, 150r/min 培养过夜,作为液体种子。继而以 1.0%接种量接种到装有 100ml 发酵培养基的 500ml 三角瓶中,相同条件下培养 14 小时。将培养物于 4℃、10000Xg 离心(日立 20PR-52D 高速冷冻离心机)30 分钟,取上清液,加入 2.5 倍 95%冷乙醇,置-20℃冰箱过夜。再于 4℃、6000Xg 离心 30 分钟,取沉淀、真空干燥,得白色粗酶制剂。粗酶制剂比活为 5.7mu/mg。

结 果

(一) 纤维素酶产生菌 E2 菌株的鉴定

1. 菌株的形态特征和培养特征:菌体呈杆状,两端钝圆,不分枝,大小约为 $0.5-0.7 \times 2.0-2.5\mu\text{m}$ 。细胞原生质染色均一。有芽孢,孢子大小约为 $0.7 \times 1.2\mu\text{m}$,芽孢中生或偏中生,稍膨大,椭圆形。单兰式染色阳性。在葡萄糖、蛋白胨培养基上 34℃培养 1-2 天,生长良好,形成灰白色菌落。菌落不透明,边缘光滑,表面有皱折,多形态。

2. 纤维素酶产生菌 E2 菌株的生理特征:V·P 反应阳性。过氧化氢酶反应阳性。硝酸盐还原反应阳性。牛奶酪化。能水解淀粉。能水解明胶。能利用柠檬酸盐。不利用丙酸盐。能利用葡萄糖、木糖和甘露糖产酸。不利用阿拉伯糖产酸。7%NaCl 生长。生长温度 30-55℃。最适生长温度 45-50℃。生长 pH5.5-10.5。最适生长 pH6.5-7.0。

综合 E2 菌株的形态特征、培养特征和生理特征,依据《伯杰细菌鉴定手册》第八版, E2 菌株应属于芽孢杆菌属。定名为芽孢杆菌 E2 菌株(*Bacillus* sp. strain E2)。鉴于 E2 菌株能在 55℃生长、最适生长温度在 45-50℃之间,它属于高温菌。

(二) E2 菌株纤维素酶的性质

1. 最适底物浓度及反应初速度:当反应体系中酶量为 190mu 时,最适底物(CMC-Na)浓度为 1%。当底物(CMC-Na)浓度为 1%,反应体系中酶量为 95mu 时,初速

度能维持多于 90 分钟,酶量为 190mu 时,初速度能维持 45 分钟。

2. 温度对酶活力的影响:将 1ml 粗酶液(190mu/ml)与 1.5ml 含 1.0%CMC-Na 的磷酸盐缓冲液(1/15 mol/L, pH6.8)混合,于不同温度下保温 30 分钟,测定酶活力。结果(图 1)指出,酶作用的最适温度为 55℃。

3. pH 对酶活力的影响:将 1ml 粗酶液与 1.5ml 含 1.0%CMC-Na 的一系列不同 pH 的缓冲液混合,55℃保温 30 分钟,测定酶活力。结果(图 2)指出,酶作用的 pH 范围为 4.5—8.0。最适 pH 为 6.5—7.0。

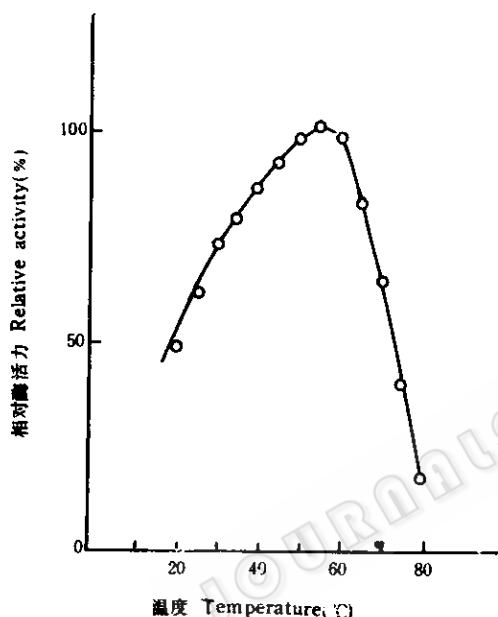


图 1 温度对酶活力的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the enzyme activity

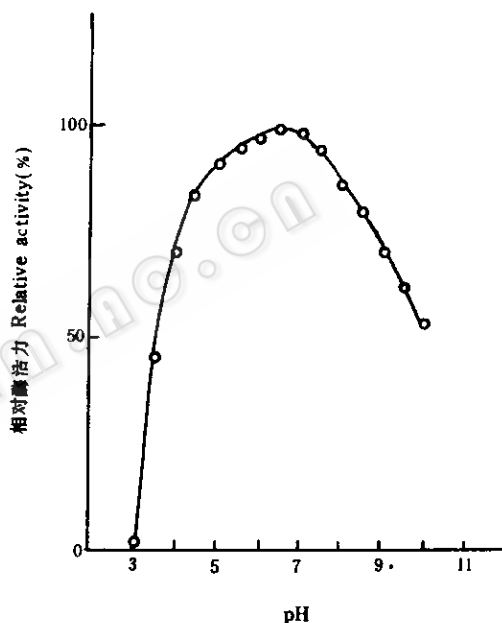


图 2 pH 对酶活力的影响

Fig. 2 Effect of pH on the enzyme activity
pH3.0—7.0 buffer was made by 1/15mol/L citric acid and Na_2HPO_4 ; pH7.5—10.0 by 1/15 mol/L Tris-HCl

4. 温度对酶稳定性的影响:(1)把

0.5mL粗酶液在 60℃、65℃、70℃保温 10 分钟,再与 2.0ml 含 1.0%CMC-Na 的磷酸盐缓冲液(1/15mol/L, pH6.8)混合,于 55℃保温 30 分钟,测定残余酶活。结果(图 3)指出,于 60℃、65℃和 70℃保温 10 分钟后,残余酶活分别为 95%、59%和 19%。(2)将粗酶液在 60℃保温,于不同时间取出,0.5ml 与 2.0ml 含 1.0%CMC-Na 的磷酸盐缓冲液(1/15mol/L, pH6.8)混合,于 55℃保温 30 分钟,测定残余酶活。结果指出,粗酶液在 60℃处理 10、30、60、90 和 120 分钟后,残余酶活分别为 95%、80.3%、41.4%、19.3%和 7.0%。

5. pH 对酶稳定性的影响:将 1ml 不同 pH 的粗酶液(190mu/ml,用不同 pH 的 1/30mol/L 磷酸盐缓冲液和 1/30mol/L Tris-HCl 缓冲液配制)在 60℃水浴保温 10 分钟后,

加入 1.5ml 含 1%CMC-Na 的 0.2mol/L,pH6.8 磷酸盐缓冲液,55℃反应 30 分钟,测定酶活力。图 4 指出,该酶在 pH4.0—8.0 之间较稳定。

6. 各种金属离子对酶活性的影响:将含有 5.0μmol/L 不同金属离子和 1.0%CMC-Na 的磷酸盐缓冲液(1/15mol/L,pH6.8)2.0ml 与 0.5ml 粗酶液混合,55℃反应 30 分钟,测定酶活力。结果(表 1)表明:Mg²⁺ 和 Ca²⁺对酶促反应稍有促进作用,而 Ag⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺和 Zn²⁺则有明显的抑制作用,其余离子未见明显影响。

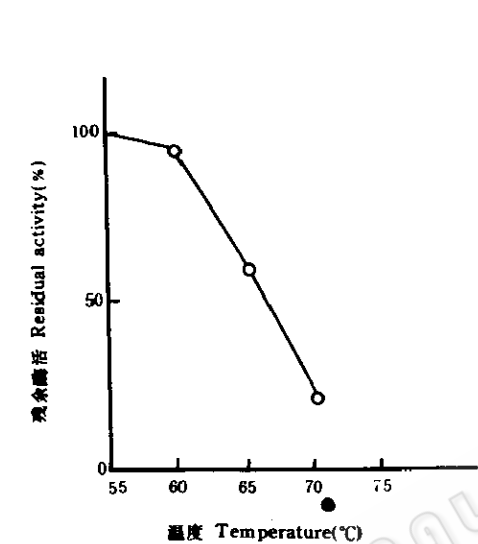


图 3 温度对酶稳定性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the stability of enzyme

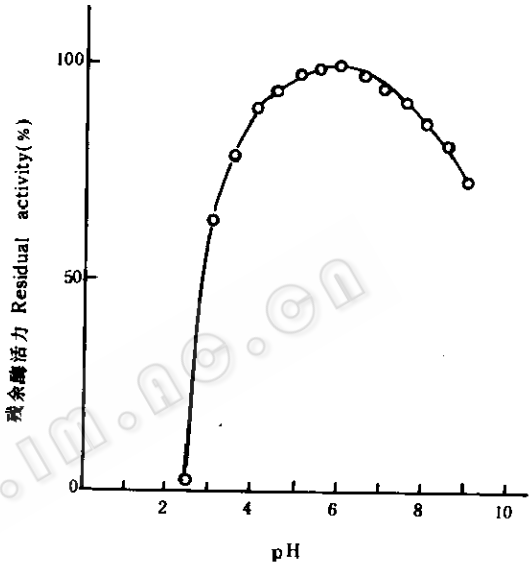


图 4 pH 对酶稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH on the stability of enzyme

表 1 各种金属离子对酶活性的影响

Table 1 Effect of various metal ions on enzyme activity

| 金属离子 Metal ions | None | Na ⁺ | K ⁺ | Li ⁺ | Ag ⁺ | Mg ²⁺ | Mn ²⁺ | Ca ²⁺ | Ba ²⁺ | Cu ²⁺ | Fe ²⁺ | Zn ²⁺ |
|------------------------------|------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 残余酶活(%) Residual activity | 100 | 99.0 | 90.3 | 92.7 | 25.2 | 108.0 | 35.7 | 109.8 | 94.6 | 38.7 | 61.9 | 72.5 |

7. 底物专一性:取 1ml 粗酶液(190mu/ml)分别与 2ml 含有 1.0%CMC-Na、1.0%微晶纤维素(Avicel)、1.0%纤维素粉、1.0%滤纸和 1.0%棉花纤维的磷酸盐缓冲液(1/15mol/L,pH6.8)混合,55℃保温 30 分钟,加入 2.5ml 还原糖显色剂 DNS,沸水浴保温 10—15 分钟,用 721 型分光光度计测定波长 530nm 处光吸收。为了检测β-葡萄糖苷酶的活力,取 0.2ml 粗酶液与 0.2ml 含有 4mmol/L pNPG(对-硝基苯基-β-葡萄糖苷)的磷酸盐缓冲液混合,55℃保温 30 分钟,加入 2.1ml 2%的 Na₂CO₃ 水溶液,测定波长 420nm 处光吸收。结果指出,来自芽孢杆菌 E2 菌株培养物上清液的粗酶制剂只作用于羧甲基纤维素钠(CMC-Na),而不作用于任何天然纤维素和 pNPG。

讨 论

真正纤维素分解细菌(Truly cellulolytic bacteria)产生纤维素酶复合酶系,包括微晶纤维素酶(Avicelase)、羧甲基纤维素酶(CMCase)和 β -葡萄糖苷酶(β -Glucosidase)三大组分,以同细胞连接的方式存在,细胞同纤维素的紧密接触是纤维素水解的必须条件^[6]。底物专一性测定结果以及文献[3]一文指出,E2菌株不能利用任何天然纤维素作为碳源生长,说明该菌不产微晶纤维素酶,只产羧甲基纤维素酶且分泌到培养液中,这是该菌的特点之一。这一特点与1985年日本理化学研究所堀越等人报道的 *Bacillus* sp. strain 1139 的性质基本一致^[1],不同之处在于它们的培养温度和所产 CMCase 的性质有区别。底物专一性测定结果不能断定 E2 菌株细胞不能合成 β -葡萄糖苷酶,该菌能利用纤维二糖生长并产生 CMCase^[3]可作为 E2 菌株细胞内存在 β -葡萄糖苷酶的旁证。

鉴定结果指出,芽孢杆菌 E2 菌株同枯草芽孢杆菌有许多相似之处,后者产生 β -1,3-1,4 葡聚糖酶,该酶的基因已在大肠杆菌和酵母中克隆和表达,并构建了啤酒发酵工程菌株^[7],E2 菌株所产酶能作用于羧甲基纤维素钠的 β -1,4 键,能否作用于葡聚糖分子的 β -1,3 键值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Fukumori, F. et al. : *Journal of General Microbiology*, **131**: 3339—3345, 1985.
- [2] Fukumori, F. et al. : *Journal of General Microbiology*, **132**: 2329—2335, 1986.
- [3] 官家发等:微生物学报,**32**(6):412—417,1992.
- [4] 齐义鹏:纤维素酶及其应用,第210—212页,四川人民出版社,成都,1980年.
- [5] Horikoshi, K. et al. : *Canadian Journal of Microbiology*, **30**(6): 774—779, 1984.
- [6] Gong, C. S. et al. : *Annual reports on fermentation processes*, **3**: 111—140, 1979.
- [7] Hinchliffe E. : *EBC Congree*, p. 267—274, 1985.

STUDIES ON SOME PROPERTIES OF CELLULASE FROM *BACILLUS* SP. STRAIN E2

Guan Jiafa Lu Shiheng Chen Xiaolin Fan Chengying Zhang Faqun
(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610041)

Several strains of prokaryotic microorganisms producing cellulase, including aerobic bacteria and actinomycetes, were isolated from compost samples. One of them, strain E2, was able to grow well at 55°C and produced large amount of extracellular CMCase (190mu/ml of culture broth) in culture broth. According to *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Buchanan and Gibbons 1974), this isolate belongs to the genus *Bacillus* and was designated as *Bacillus* sp. strain E2. *Bacillus* sp. strain E2 produced only CMCase. This strain was not a truly cellulolytic microorganism, because it does not produce Avicelase. CMCase from *Bacillus* sp. strain E2 was active over a pH range from 4.5 to 8.0, with a optimum pH range from 6.5 to 7.0. The optimum temperature for the enzyme activity was 55°C. After incubation at 60°C for 10 min, 30 min, 60 min, 90 min and 120 min, residual activities were 95%, 80.3%, 41.4%, 19.3% and 7.0% respectively. It retained 59% and 19% of the original enzyme activity respectively after incubation at 65°C and 70°C for 10 min. The CMCase activity was inhibited by Ag^{1+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} and Zn^{2+} , and increased slightly by Mg^{2+} and Ca^{2+} .

Key words *Bacillus* sp. strain E2; CMCase