

# 嗜碱芽孢杆菌 N6-27碱性纤维素酶的纯化及性质

田新玉 王欣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**关键词** 嗜碱芽孢杆菌, 碱性纤维素酶, 羧甲基纤维素酶, 纯化及性质

**分类号** Q936

天然纤维素被微生物降解成短链纤维寡糖、纤维二糖和葡萄糖,并被微生物用作碳源。真菌和细菌产生的大部分纤维素酶在 pH4~6 起作用,在碱性环境中一般不起作用。1972 年,Horikoshi<sup>[1]</sup>首次发现了嗜碱芽孢杆菌 N-4 产生的碱性纤维素酶。1984 年完成了该菌产生的两个碱性纤维素酶组分的纯化及酶催化性质的研究<sup>[2]</sup>。随后 Fukumori<sup>[3]</sup>、Kawai<sup>[4]</sup>和 Shikata<sup>[5]</sup>等都分离到产生碱性纤维素酶的菌株,并研究了这种酶用作洗涤添加剂的可能性。Ito 等<sup>[6,7]</sup>对产酶菌株 KSM-635 进行了物理化学诱变,提高了酶活力,并工业化生产,开发出添加碱性纤维素酶的新型洗涤剂。本文报道从我国天然碱湖样品分离的一株嗜碱芽孢杆菌 N6-27 产生的碱性纤维素酶的纯化及性质。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和培养

从内蒙古天然碱湖采集的泥水样品中,经分离、纯化、筛选到产碱性纤维素酶活力较高的菌株 N6-27,经鉴定为嗜碱芽孢杆菌(*Alkalophilic Bacillus* sp.),产酶培养基组分(g/L):CMC-Na 10.0,复合蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2, NaCl 10.0,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10.0(分开灭菌)。500ml 三角瓶装上述培养基 100ml,灭菌后接种,于 37℃ 220 r/min 摇床上振荡培养 48 h,收集培养液。

### 1.2 检测方法

酶活力测定参照 Horikoshi 方法<sup>[1]</sup>,蛋白质测定按 Bradford 方法<sup>[8]</sup>或测定  $A_{280}$ ,以牛血清蛋白为标准。用 Beckman6300 型高效氨基酸分析仪分析酶蛋白氨基酸组分含量。用纸层析方法分析底物的降解产物。

### 1.3 电泳分析

垂直板状 SDS-PAGE 电泳参照 Laemmli 方法<sup>[9]</sup>;参照文献进行酶谱分析<sup>[10,11]</sup>;聚丙烯酰胺薄层等电聚焦电泳参照杨寿钧报道的方法<sup>[12]</sup>。

### 1.4 主要试剂

已知分子量标准蛋白质、载体两性电解质、Bio-gel P-150 和 Sepharose CL-4B(Pharmacia),羧甲基纤维素钠(上海化学试剂公司),纤维二糖、纤维三糖和纤维四糖(Sigma),其它为国产分析纯试剂。

## 2 结果

### 2.1 碱性纤维素酶的纯化

培养液离心除去菌体,于上清液缓慢加入硫酸铵至 60% 饱和度,离心除去沉淀。继续添加硫酸铵至

80% 饱和度,离心收集沉淀,溶解于 pH8.0 缓冲液并透析,得粗酶液。粗酶液经 Sepharose CL-4B 凝胶柱层析, Bio-gel P-150 柱层析等步骤,酶被提纯了 11.3 倍,总收率 22.1%,结果列于表 1。

表1 嗜碱芽孢杆菌N6-27纤维素酶的纯化

步骤	总体积(ml)	总蛋白(mg)	比活(u/mg)	纯化倍数	收率(%)
粗酶液	650	219.0	18.1	1.0	100.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 沉淀	50	49.8	50.2	2.8	67.6
Sepharose CL-4B	320	12.0	114.5	6.3	34.7
Bio-gel P-150	34	4.3	204.0	11.3	22.1

酶提纯各步骤的 SDS-凝胶电泳图谱表明,经过 Bio-gel P-150 柱层析后,在 SDS-PAGE 上为一条带,得到了电泳纯的碱性纤维素酶蛋白。相应的酶谱分析表明粗酶液中至少有 5 条具有酶活性的蛋白带。

## 2.2 酶的基本性质

不连续的 SDS-PAGE 测得酶的分子量为 94 000。聚丙烯酰胺薄层凝胶等电聚焦方法测得酶的等电点 pI 为 4.2。在 pH4.0~12.0 的缓冲液中测酶活力,结果(图 1-A)表明,该酶的最适反应 pH 在 8.5 左右。

在不同温度下测酶活力,获得酶活力-温度曲线(图 1-B),该酶的最适反应温度为 55℃。酶液分别在不同 pH 的缓冲液中 40℃ 保温 30min,然后测酶活力,结果(图 2-A)表明酶在 pH6.0~11.0 范围内稳定, pH11.0 时酶活力仍保留 87%, pH12.0 时酶活力基本丧失。酶的热稳定性测定结果(图 2-B)表明,酶在 50℃ 以下稳定, 60℃ 完全失活。

一定浓度的金属离子溶液与酶液混合,在 37℃ 保温 30 min,然后测酶活力,实验结果表明,Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 和 Hg<sup>2+</sup> 对酶活力有强烈抑制作用,Mn<sup>2+</sup> 有部分抑制作用,Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 和 K<sup>+</sup> 能稍微提高酶活力,其它离子对酶无明显影响。

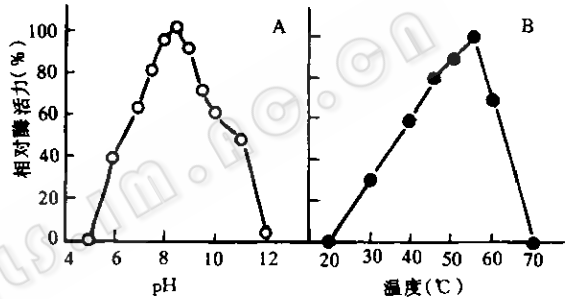


图1 酶反应的最适 pH 和温度

A. 不同 pH 酶活力; B. 不同温度酶活力。

以同样的酶量,分别作用于不同底物,表明该酶仅对 CMC-Na 有强烈的水解能力,对滤纸、结晶纤维

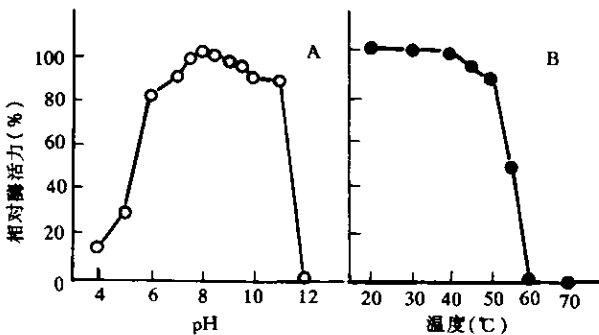


图2 pH 和温度对酶稳定性的影响

A. 不同 pH 下酶稳定性; B. 不同温度下酶稳定性。

素、纤维素粉和 PNPC (*P*-nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside) 仅有非常微弱作用,对纤维二糖没有水解能力。10 $\mu$ l 酶液分别与 50 $\mu$ l 不同纤维寡糖溶液在 40℃ 反应 2h,纸层析结果表明该酶不水解纤维二糖,能水解纤维三糖和纤维四糖,其水解产物为葡萄糖、纤维二糖和纤维三糖,主要成分为纤维二糖。用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求出酶对 CMC-Na 的  $K_m = 6.25\text{mg/ml}$ 。酶蛋白氨基酸组分中天冬氨酸和甘氨酸含量较高,分别为

15.31mol% 和 14.38mol%。

### 3 讨论

许多微生物产生的 CMC 酶都是由多个酶组分组成的, N6-27 菌株产生的碱性纤维素酶纯化仅获得一个酶组分, 从酶纯化步骤的酶谱分析表明, 这株菌产生的纤维素酶至少有五个组分, 这与报道的大多数碱性纤维素酶具有多个组分相一致<sup>[2,4,5]</sup>。纯化的 N6-27 碱性纤维素酶的分子量、稳定 pH 范围和最适反应 pH 都与嗜碱芽孢杆菌 NO.1139 产生的纤维素酶接近, 但最适反应温度、等电点和热稳定性略有区别<sup>[3]</sup>。酶的氨基酸组成与 *Bacillus* sp. NO.1139 氨基酸组成进行了比较, N6-27 酶除甘氨酸含量较高外, 与 *Bacillus* sp. NO.1139 纤维素酶的氨基酸组成十分相似, 天冬氨酸含量均较高, 这可能与这两个酶的耐碱性有关<sup>[1]</sup>。关于酶的耐碱性除氨基酸组成的区别外, 尚需进行更深入的研究。

### 参 考 文 献

- [1] Horikoshi K, Akiba T. *Alkalophilic Microorganisms—A New Microbial World*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1982. 126~129.
- [2] Horikoshi K, Nakao M, Kurono Y *et al.* *Can J Microbiol*, 1984, **30**:774~779.
- [3] Fukumori F, Kudo T, Horikoshi K. *J Gen Microbiol*, 1985, **131**:3339~3345.
- [4] Kawai S, Okoshi H, Ozaki K *et al.* *Agric Biol Chem*, 1988, **52** (6):1425~1431.
- [5] Shikata S, Saeki K, Okoshi H *et al.* *Agric Biol Chem*, 1990, **54** (1):91~96.
- [6] Ito S, Shikata S, Ozaki K *et al.* *Agric Biol Chem*, 1989, **53** (5):1275~1281.
- [7] 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.
- [8] Bradford M. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248~254.
- [9] Laemmli U K. *Nature*, 1970, **227**:680~685.
- [10] Holt S M, Hartman P A. *J Ind Microbiol*, 1994, **13**:2~4.
- [11] Nakamura S. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**:2311~2316.
- [12] 杨寿钧. 凝胶电聚焦测定等电点. 见: 张树政等主编. 酶学研究技术(上册). 北京: 科学出版社, 1987. 195~200.

## PURIFICATION AND PROPERTIES OF ALKALINE CELLULASE FROM ALKALOPHILIC *BACILLUS* N6-27

Tian Xinyu Wang Xin

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** The alkaline cellulase produced by alkalophilic *Bacillus* sp. N6-27 was purified to electrophoresis homogeneity by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractionation, Sepharose CL-4B hydrophobic interaction chromatography, Bio-gel P-150 chromatography. The molecular weight and pI determined by SDS-PAGE and by PAGE-IEF were 94 000 and 4.2, respectively. The optimum temperature and pH for the enzymatic catalysis were 55°C and 8.5, respectively. The enzyme activity was stable under 50°C and in the pH range of 6~11. The substrate was carboxymethylcellulose (CMC). The enzyme activity was strongly inhibited by  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$ .

**Key words** Alkalophilic *Bacillus*, Alkaline cellulase, CMCase, Purification and properties