

产低温纤维素酶海洋嗜冷菌的筛选及研究

王 玢¹ 汪天虹^{1*} 张 刚¹ 刘世利¹ 肖 天²

(¹ 山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

(² 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 从黄海的深海海底泥样中筛选出一株产纤维素酶的海洋细菌,初步鉴定为革兰氏阴性杆菌。该菌既能产生羧甲基纤维素酶,又能降解微晶纤维素,且有淀粉酶活。对该菌生长特征及所产纤维素酶的性质进行了初步研究。此菌最适生长温度为 20℃,最高生长温度为 40℃,在 0℃也能生长,是典型的嗜冷菌。该菌所产纤维素酶最适反应温度为 35℃,10℃仍有较高酶活,最适 pH 值为 6.0,属酸性酶。

关键词 纤维素酶,嗜冷酶,海洋嗜冷细菌

中图分类号 Q93.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)05-0042-04

纤维素酶系通常由作用方式不同,而能相互协同催化水解纤维素的三类酶组成,内切 β -1,4-葡聚糖酶(EG)、外切葡聚糖纤维二糖水解酶(CBH)和 β -葡萄糖苷酶(EC)。一般认为,EG 随机地水解磷酸膨胀纤维素、羧甲基纤维素(Carboxymethyl cellulose, CMC)等无定形纤维素,释放纤维寡糖;而 CBH 可以水解微晶纤维素 Avicel 和棉花等结晶度高的纤维素,从纤维素链的非还原端释放纤维二糖^[1]。纤维素酶产生菌种类繁多,如细菌、放线菌、丝状真菌等。以往有关纤维素酶和纤维素降解的研究中,侧重点主要在真菌,但自然界中还存在相当数量的分解纤维素细菌,它们以自己独特的方式消化纤维素。细菌产生的纤维素酶较少,主要是内切酶,大多无外切酶的形成^[2]。

长期生活在低温环境中的海洋微生物所产生的酶大多数具有低温催化和对热不稳定的特征;其酶活性的最适温度移向低温并在低温下(0~4℃)仍保持高比例的活性,因此被称为低温酶^[3]。低温纤维素酶能在较低的环境条件下加速生物降解的过程,可用于纺织、造纸、环保、医药、饲料以及分子生物学研究等方面,无论在基础理论研究还是应用研究都有较高价值。

本文报道从黄海海底淤泥中筛选出一株纤维素酶产生菌,初步鉴定为革兰氏阴性杆菌。其所产纤维素酶既能水解羧甲基纤维素,又能降解微晶纤维素;

该菌还有产生淀粉酶的能力。本文对产低温纤维素酶的菌株 MB1 的生长特性及所产纤维素酶粗酶液的性质进行了初步研究。

1 材料

1.1 样品采集

由中国科学院海洋研究所于 2000 年 10 月在黄海 28°10'~35°00'N, 121°1'~127°47.5'E 范围内,水深 25~1 000 m 处采集泥样 9 个。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基 土豆 10%,陈海水。

1.2.2 选择性培养基 筛选具有羧甲基纤维素钠(CMC-Na)酶活的菌株 CMC 1%,蛋白胨 1%,酵母粉 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%,NaCl 1%,琼脂 2%,陈海水。

筛选具有微晶纤维素酶活菌株 以 1%球磨 Avicel 代替上述 1%CMC-Na,其余相同。

第一作者:王玢,出生于 1962 年,讲师,山东教育学院生物系,E-mail:fangyao@public.jn.sd.cn

* 责任作者, Tel: 0531-8564431-8109; Fax: 0531-8565610; E-mail:wth@life.sdu.edu.cn

收稿日期:2002-06-03;修回日期:2003-02-18

筛选具有 CF-11 酶活的菌株 以 1% 球磨纤维素粉 CF-11 做碳源, 其余相同。

筛选具有淀粉酶活的菌株 淀粉 1%, 蛋白胨 0.5%, 酵母粉 0.5%, NaCl 1%, 琼脂 2%, 陈海水。

1.2.3 发酵培养基 CMC 1%, 蛋白胨 1%, 酵母粉 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, NaCl 1%, 葡萄糖 0.2%, 陈海水。

2 实验方法

2.1 海底细菌的富集与产纤维素酶低温菌的筛选

取 1 g 泥样加入盛有 10 mL 无菌水的试管中, 振荡均匀后, 取 5 mL 悬浮液加入盛有 50 mL 富集培养基的三角瓶中, 在 15 °C, 150 r/min 下, 振荡培养 3~5 d 后, 移取 5 mL 培养液至另一盛有新鲜培养基的三角瓶中继续培养, 重复操作 5~6 次。取 1 mL 培养物用无菌海水稀释后涂土豆培养基平板, 15 °C 培养 5~6 d, 挑取单菌落, 点种到筛选培养基平板上, 20 °C 培养 5~7 d, 待平板上长出菌落后, 将其分别影印到另外的筛选培养基平板上, 原平板用 0.5% 刚果红染色 50 min, 5% NaCl 脱色发现有 24 株菌有透明圈; 表明它们都是分泌胞外 CMC 酶的低温菌。测水解圈和菌落大小, 计算二者之比, 将 6 株比值最大的菌株分别编号为 MB1, MB2, MB3, MB4, MB5, MB6, 保藏于土豆培养基固体斜面上。

2.2 酶活力测定

2.2.1 CMC 酶活力测定 参照 Horikoshi^[4] 方法, 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定酶解后还原物的生成量, 以表示酶的活力。以 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (pH 6.0) 配制的 1% CMC-Na 为底物, 加入 1 mL 酶液 (或 1 g 酶粉), 每分钟水解 1% CMC-Na 溶液产生 1 μg 还原糖的酶量定义为一个 CMC 酶活力单位。

2.2.2 微晶纤维素酶活力测定 缓冲液同上, 以 1% 微晶纤维素粉为底物。

2.2.3 CF-11 酶活力测定 缓冲液同上, 以 1% CF-11 为底物。

2.2.4 淀粉酶活力测定 缓冲液同上, 以 1% 可溶性淀粉为底物。

3 结果

3.1 纤维素酶产酶活力比较

将 6 株菌 MB1, MB2, MB3, MB4, MB5, MB6 分别接入发酵培养基, 在 15 °C, 150 r/min 下, 培养 6 d。取发酵液, 在 8 000 r/min 下, 离心 15 min, 测定上清液 CMC 酶活并进行比较 (实验结果见图 1), 其中 MB1 产 CMC 酶活最高。

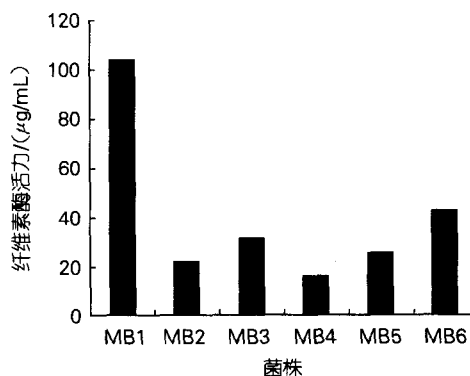


图 1 6 株细菌的纤维素酶产酶活力

Fig. 1 Cellulase activities produced by 6 strains of bacteria isolated from the near sea mud of Huanghai Sea

3.2 培养时间对产酶的影响

挑取酶活最高的 MB1 进行生长特征及酶学性质研究。经革兰氏染色, 镜检, 初步鉴定 MB1 为革兰氏阴性杆菌。将 MB1 接入发酵培养基培养 6 d, 每隔 12 h 取样测定纤维素酶活力, 酶活变化曲线见图 2。

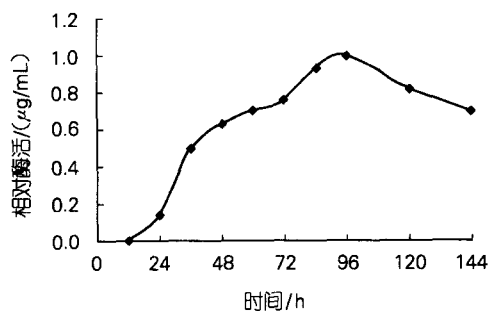


图 2 培养时间对产酶的影响

Fig. 2 The time course of enzyme formation

3.3 温度对菌株生长和产酶的影响

测定 MB1 在不同温度下的生长状况及产酶最适温度。MB1 最适生长温度为 20 °C, 但在 0 °C 也能生长, 其最高生长温度为 40 °C。MB1 产纤维素酶的最适温度为 15~25 °C (见图 3), 表明该菌属于嗜冷菌。

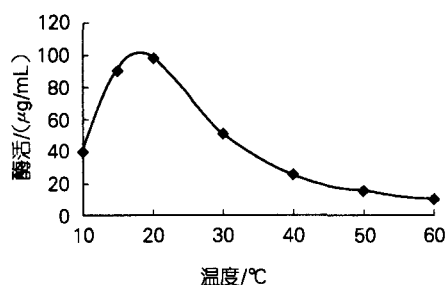


图3 MB1产纤维素酶最适温度

Fig. 3 The optimum temperature of the cellulase-excreted by MB1

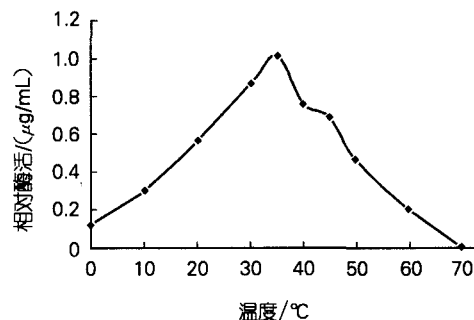


图5 温度对MB1纤维素酶活性的影响

Fig. 5 The effect of temperature on cellulase activities produced by MB1

3.4 MB1 纤维素酶性质初步研究

3.4.1 酶反应最适 pH 将酶液与 1% CMC-Na 在不同缓冲液中进行反应, (0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH 4.0~6.0; 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液, pH 6.0~9.0; 甘氨酸-NaOH 缓冲液, pH 10.0); DNS 法测定酶活力。实验结果表明, 该酶最适反应 pH 为 6.0, 在 pH 5.0~7.0 之间酶活力较

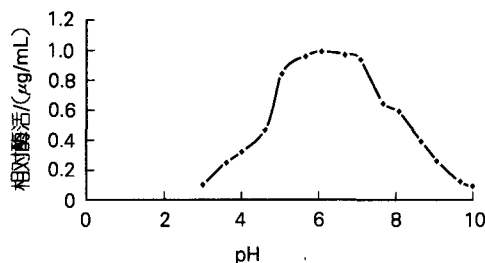


图4 pH对MB1纤维素酶活性的影响

Fig. 4 The effect of pH on cellulase activities produced by MB1

高, 结果见图 4。

3.4.2 最适反应温度 在 pH 6.0, 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中, 在不同温度条件下, 按 DNS 法测定酶活力, 如图 5。实验结果表明, 该酶最适反应温度为 35 °C, 30~40 °C 之间酶活力较高。

3.4.3 MB1 产纤维素酶和淀粉酶活力 分离 MB1 在纤维素底物和可溶性淀粉液体培养基中生长 4 d 后的上清液, 分别将粗酶液作用于不同的底物, 测定水解酶活力。实验结果表明, MB1 产纤维素酶对

表1 MB1产纤维素酶和淀粉酶活力水平

Tab.1 The activities of the crude enzymes produced by MB1

酶的种类	底物	酶活(μg/mL)
内切葡聚糖酶	CMC-Na	121.9
外切葡聚糖纤维二糖水解酶	微晶纤维素	102.2
外切葡聚糖纤维二糖水解酶	CF-11	83.2
淀粉酶	可溶性淀粉	48.17

CMC-Na 有较强的水解能力, 也能降解微晶纤维素和 CF-11; MB1 也有淀粉酶活力。实验结果见表 1。

3.4.4 酶的热稳定性 将粗酶液分别在 20, 30, 40, 50, 60 °C 保温 24 h, 按常规方法测定残余酶活, 以 4 °C 保存的酶液酶活为 100%, 计算残留的相对活力。结果显示, 4 °C 存放酶液活力最高, 20 °C 保温 24 h 后, 能保留 50% 左右的酶活; 40 °C 时, 能保留近 40% 的酶活, 60 °C 时, 只剩约 20% 的酶活。由实验结果可见随着酶液存放温度的提高, 该酶的热稳定性下降, 这也是嗜冷酶的一个显著标志。

4 讨论

嗜冷酶具有较低的最适反应温度, 在低温下能维持结构的稳定性, 从而具有较高的低温催化活性。现已有文献报道, 通过结构分析及预测, 发现嗜冷酶的活性中心并未有特殊的结构, 而是与中温酶的活性中心有着极强的保守性^[5]。据报道, 嗜冷酶的低温催化活性与酶蛋白的整体结构有关, 嗜冷酶在低温下的高活性可能是由蛋白结构的柔韧性以及酶活性中心附近的基团修饰引起的。酶蛋白内部功能域之间相互作用

用较少而与溶剂之间分子的作用增强,从而形成较伸展的分子结构,使酶的活性中心更容易与底物接近;因而可能在低耗能的情况下发挥作用^[5]。

本文从黄海海底淤泥中分离筛选到一株产生纤维素酶的细菌,其最适生长温度 20 ℃,酶的最适反应温度为 35 ℃,但在 10 ℃ 仍有一定酶活,是典型的嗜冷酶。关于嗜冷纤维素酶在较低环境条件下的生物降解作用机制,对较低条件下蛋白质结构与功能关系的深入了解等,有待于进一步开展相关的低温酶酶学和分子生物学的深入研究。本文的实验结果有助于该方向研究的进行。

参考文献

1 陈冠军,秦梦华,曲音波,等. 纤维素酶脱墨机理的研究

进展. 生物工程进展, 2001, 21(3): 17-21

2 阎伯旭,曲音波,高培基. 真菌和细菌纤维素酶的差别及内、外切葡聚糖酶的底物专一性. 生命科学, 1999, 11 (增刊): 61-64

3 刘晨光,刘成圣,刘万顺,等. 海洋生物酶的研究和应用. 海洋科学, 2000, 24(7): 24-26

4 Horikoshi K, Nakao M, Kuroki Y, et al. Cellulase of an alkalophilic *Bacillus* strain isolated from soil. *Can J Microbiol*, 1984, 30: 774-779

5 辛明秀,周培瑾. 冷适应微生物产生的冷活性酶. 微生物学报, 2000, 40(6): 661-664

SCREENING AND CHARACTERIZATION OF THE COLD-ADAPTIVE CELLULASE-PRODUCING BACTERIA

WANG Bin¹ WANG Tian-Hong¹ ZHANG Gang¹ LIU Shi-Li¹ XIAO Tian²

(¹State Key Lab. of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, 250100)

(²Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Jun., 3, 2002

Key Words: Cellulase, Cold-adaptive enzyme, Marine cold-adaptive bacteria

Abstract

One strain of cold-adaptive cellulase-producing bacteria which can degrade carboxymethyl cellulase (CMC) and Avicel was isolated from the submarine of the Yellow Sea and the East China Sea. The strain denominated MB1 with high cellulase production was further studied on the growth characteristics and enzyme properties. The optimum and highest growth temperatures for MB1 are 20 ℃ and 40 ℃, respectively. The optimum temperature for the CMCase is 35 ℃ and the optimum pH is 6.0. But even under 10 ℃, the enzyme still shows some activities. It is expected that the cold-adapted cellulase could be used in textile, paper making, food industry, fodder industry and so on.

(本文编辑:刘珊珊)