冷活性纤维素酶性质研究

王 玢, 汪天虹

(山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100)

摘要: 对海洋嗜冷菌 MB1 所产冷活性纤维素酶的性质进行了研究。该酶最适反应温度为 35 ℃, 0 ℃时残余酶活约为 20%, 最适 pH 值为 6.0, 在 pH5~7.5 范围内酶活均较高。该酶对热敏感, 50 ℃保温 2 h, 残余酶活为 15%; 60 ℃时, 酶完全失活。

关键词: 海洋嗜冷菌; 冷活性纤维素酶; 热稳定性
中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)02-0040-03

纤维素是高等植物细胞壁的主要成分[1], 是由 D-吡喃式葡萄糖基通过 β-1.4 糖苷键连接而成的链状均一的多糖。纤维素酶是复杂的多酶体系, 主要由 3 类酶组成: 内切酶(EG)、外切酶(CBH)和 β-葡萄糖苷酶(EC); 通过 3 类酶的协同催化作用, 使 β-1.4 糖苷键断裂, 将天然纤维素分子水解为葡萄糖。

海洋低温微生物经过长期的进化, 具有适应低温环境的特殊结构与代谢机制, 其所产酶类大多数具有低温催化和对热不稳定的特征, Margsin 等[2]把最适催化温度在 30 ℃左右, 0 ℃仍有一定催化效率的酶称为嗜冷酶 (Psychrophilic enzyme) 或冷活性酶(Cold-active enzyme)。嗜冷酶(Psychrophilic)具有较低的最适反应温度, 在低温条件下与底物结合能力及催化活性都很强[3]。这些性质使低温酶在基础研究和工业应用方面有巨大潜力。

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[4], 且多数不能分泌至胞外。在嗜冷酶中, 冷活性纤维素酶并不多见[5]。作者从黄海海底泥样中筛选出一株产冷活性纤维素酶海洋嗜冷细菌 MB1[6], 其所产纤维素酶具有较高外切酶活性, 且为胞外酶。

作者对该菌所产外切纤维素酶的性质进行了研究。

1 材料

菌株: MB1, 分离自黄海海底底泥, 本实验室保存。

液体发酵培养基: 球磨微晶纤维素粉 1%, 蛋白胨 1%, 酵母粉 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, NaCl 1%, 蔗糖 0.5%, 陈海水。

2 实验方法

2.1 粗酶液的提取

将菌株 MB1 接入液体发酵培养基, 20 ℃ 150 r/min, 培养 4 d。取发酵液, 在 8 000 r/min 下, 离心 15 min, 测定上清液微晶纤维素酶活力。

2.2 酶活力测定方法

参照 Horikoshi[7] 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(pH6.0)配制的 1% 球磨微晶纤维素粉为底物, 加入 0.2 mL 酶液, 每分钟水解 1% 微晶纤维素粉溶液产生 1 μg 还原糖的酶量定义为一个酶活力单位。

3 结果

将 MB1 菌株接入液体发酵培养基, 15 ℃, 150 r/min, 震荡培养, 培养物用无菌海水稀释后涂布筛选平板, 在不同温度下培养, 并测量单菌落直径, 得其最适生长温度为 20 ℃, 最高生长温度为 40 ℃。测定不同温

收稿日期: 2003-07-10 修回日期: 2003-09-18
作者简介: 王玢(1962-), 女, 山东济南人, 讲师, 硕士, E-mail: fangyao@public.jn.sd.cn; 汪天虹, 责任作者, 电话: 0531-8564431-8109, E-mail: wth@life.sdu.edu.cn

度对产酶的影响, 结果表明: MB1 产纤维素酶最适温度为 20 ℃。将该菌接入发酵培养基, 20 ℃培养 6 d, 每隔 12 h 取样测定纤维素酶活力, 酶活变化曲线如图 1。由图 1 可以看出, 培养 4 d 时产酶活力最高。

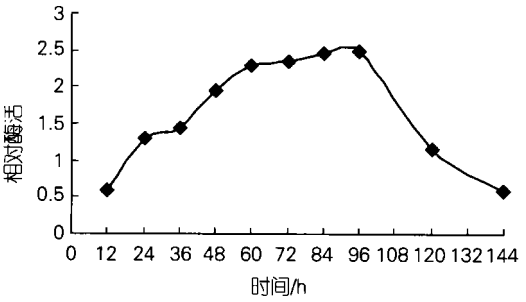

图 1 培养时间对产酶的影响

Fig. 1 The time course of enzyme formation

3.1 纤维素酶最适反应温度

用 pH6, 0.1 mol/ L 磷酸氢二钠- 磷酸二氢钠缓冲液配制的底物溶液, 分别在不同温度(0~ 60 ℃) 条件下, 每隔 5 ℃测定酶活力, 如图 2。实验结果显示, 酶的最适反应温度为 35 ℃, 30~ 40 ℃之间酶活均较高, 45 ℃以后酶活迅速下降。

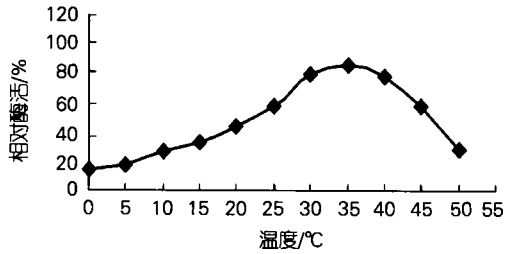

图 2 温度对外切酶活力的影响

Fig. 2 The effect of temperature on cellulase activity

3.2 纤维素酶最适反应 pH

将酶液与不同 pH 缓冲液配制的底物溶液进行反应(0.1 mol/ L 柠檬酸- 柠檬酸钠缓冲液, pH4.0~ 6.0; 0.1 mol/ L 磷酸氢二钠- 磷酸二氢钠缓冲液, pH6.0~ 9.0), DNS 法测定酶活力。结果如图 3。实验结果表明, 该酶最适反应 pH 为 6, 在 pH 5~ 7.5 之间酶活力较高, 属酸性酶。

3.3 纤维素酶稳定性的测定

3.3.1 热稳定性的测定

分别测定酶在 pH6 时对热的稳定性。将酶在不

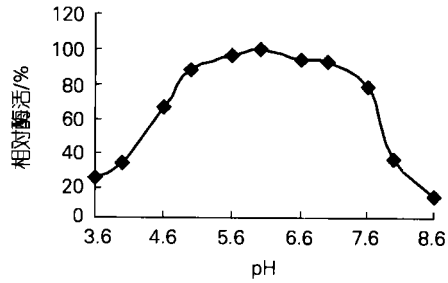

图 3 pH 对外切酶活性的影响

Fig. 3 The effect of pH on cellulose activity

同温度(20, 30, 40, 50, 60 ℃) 下放置 2 h, 测定残余酶活, 以 4 ℃保存的酶液作为对照, 结果如图 4。该酶的热稳定性与普通纤维素酶不同, 40 ℃放置 2 h, 残余酶活维持在 70% 左右, 50 ℃放置 2 h, 残余酶活只有 15% 左右。60 ℃放置 2 h, 酶活完全丧失。0 ℃时酶活维持在 20% 左右, 证明该酶属于嗜冷酶。

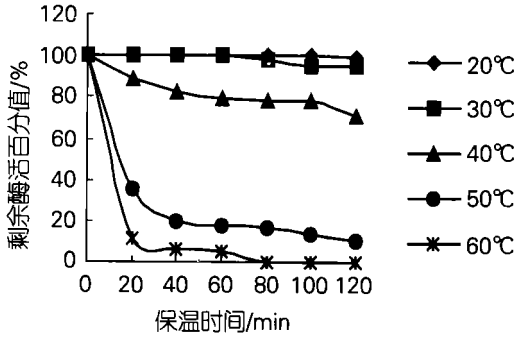

图 4 温度对酶活力稳定性的影响

Fig. 4 The effect of temperature on the stability of cellulase

3.3.2 pH 稳定性的测定

测定酶在 35 ℃时 pH 稳定性。以 pH6.0 的酶活为 100%, 其余经不同 pH 处理 2 h 后测残余酶活力, 结果如图 5。实验结果显示, 该酶在 pH 5~ 7.5 之间均较稳定, 残余酶活都在 75% 以上。

3.4 金属离子和 EDTA 对酶活性的影响

由于某些金属离子可能是酶的抑制剂或激活剂, 故有必要探讨各种离子与酶活力的关系, 为纤维素酶的生产、应用提供依据。

本实验选用钙、铁、锌、镁、铜、锰、银、钡、钴及 EDTA, 使反应液中各种金属离子和 EDTA 的浓度为5 mmol/ L, 35 ℃, pH6.0 条件下测定纤维素酶活力, 以不加金属离子的酶活力为对照。结果见表 1。

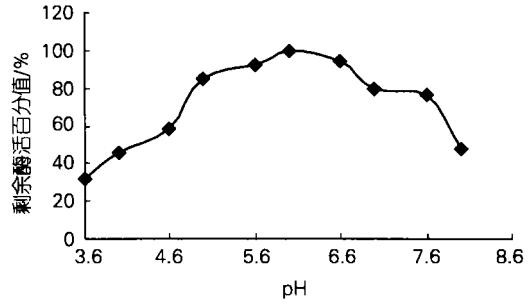

图 5　pH 对纤维素酶稳定性的影响

Fig. 5　The effect of the pH on the stabilityofthe cellulase activity

表 1　金属离子及 EDTA 对纤维素酶活力的影响

Tab. 1　Effects of metallic ions and EDTA on cellulase

金属离子与 EDTA(mmol/L)	相对酶活(%)
Ca^{2+}	116
Mg^{2+}	95
Zn^{2+}	92
Mn^{2+}	110
Fe^{3+}	24
Cu^{2+}	33
Ba^{2+}	89
Co^{2+}	91
Ag^{+}	5
EDTA	11

实验结果显示，各种离子对酶活力有不同的影响，Cu^{2+}，Fe^{3+}，Ag^{+}和 EDTA 对纤维素酶活有明显的抑制作用，Mn^{2+}，Ca^{2+}对纤维素酶有轻微的激活作用，其他离子在实验浓度范围内对酶活无明显影响。

4　讨论

海洋嗜冷菌产生的冷活性纤维素酶具有低温催化和对热不稳定等独特的酶学性质。冷活性纤维素酶在低温下的高催化活性是由于催化残基周围存在一些小氨基酸[8]，这些小氨基酸的存在减少了活性位点周围的空间阻力，增加了活性部位的柔韧性并维持适宜的能量状态，这对于在低温下维持高酶活以及酶的热不稳定性非常重要。冷活性酶的另一个特点是蛋白质折叠结构的柔韧性[5]；在低温下维持高酶活必须具有更加柔韧的结构以进行迅速可逆的催化反应。

本文报道的海洋嗜冷细菌 MB1 所产纤维素酶具有较高外切酶活性，为胞外酶，其最适反应温度 35 ℃，在 30~ 40 ℃之间酶活均较高，0 ℃时酶活仍维持在 20%左右，属嗜冷酶；该酶热稳定性较差，45 ℃以后酶活迅速下降，60 ℃保温 2 h，酶活完全丧失。海洋嗜冷菌 MB1 所产纤维素酶在低温下能保持较高活性，且对热敏感，可望在低温生物加工、纺织、造纸、环保和医药等领域有重要应用价值。

参考文献:

[1] 阎伯旭，齐飞，张颖舒．纤维素酶分子结构和功能研究进展[J]．生物化学与生物物理进展，1999，**26**(3)：233- 237.

[2] 孙　谧，洪义国，李勃生，等．海洋微生物低温酶特性及其在工业中的潜在用途[J]．海洋水产研究，2002，**23**(3)：44- 49.

[3] 辛明秀等．嗜冷菌和耐冷菌[J]．微生物学通报，1999，**26**(2)：155- 156.

[4] 阎伯旭，曲音波，高培基．真菌和细菌纤维素酶的差别及内、外切葡聚糖苷酶的底物专一性[J]．生命科学，1996，**11**(Suppl)：61- 64.

[5] Abiye H. A cold- active glucanase from the ruminal bacterium fibrobacter succinogenes S85[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999, **65**(3): 995- 998.

[6] 王玢，汪天虹，张刚，等．产低温纤维素酶海洋嗜冷菌的筛选及研究[J]．海洋科学，2003，**27**(5)：42- 45.

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

[8] Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzyme: molecular basis of cold adaptation[J]. **Cell Mol Life Sci**, 1997, 53: 830- 841.

(下转第 **48** 页)

(上接第 42 页)

Characteristics of the cold- active cellulase

WANG Bin, WANG Tian- hong
(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Received: Jul., 10, 2003
Key Words: marine cold- adaptive bacteria; cold- active cellulase; thermal stability

Abstract: In this papger properties of cold- active cellulase from marine cold- adaptive bacteria MB1 were characterized. Major characteristics found were that the enzyme has a optimum temperature of 35 ℃ and retained about 20% of maximal activity at 0 ℃. Optimum pH was 6.0 with cellulase active between pH 4.5~ 7.6. Low thermal stability was evident with the enzyme maintaining about 15% of its maximum activity after 2 h of exposure and ceasing activity after heat treatment at 60 ℃.

(本文编辑: 刘珊珊)