

文章编号: 1000-5692(2003)02-0146-05

里氏木霉产纤维素酶系各组分分泌特性

吴石金¹, 罗锡平², 夏一峰¹

(1. 浙江工业大学 生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310032; 2. 浙江林学院 工程学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 在液体发酵条件下, 以纤维素粉或麦麸为不同碳源及添加碳酸钙和酵母膏对里氏木霉产纤维素酶系不同组分的最高酶活、比酶活及其形成时间、分泌规律等进行了探讨。结果表明: 以纤维素粉或麦麸为不同碳源时, 各组分的最高酶活、酶活比及其形成时间均有较大差异, 并以混合碳源(1.0%纤维素粉+2.0%麦麸)时为最佳, 内切型 β -1, 4-葡聚糖酶(C_1)外切型 β -1, 4-葡聚糖酶(C_x)和 β -葡萄糖苷酶(BG)的最高酶活分别达到 76.18×10^{-5} , 313.25×10^{-5} 和 $135.59 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$, 比酶活分别为 72.18×10^{-5} , 331.57×10^{-5} 和 $124.29 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$, 最高酶活形成时间为9~10 d。添加碳酸钙可明显提高 C_1 和 C_x 的最高酶活及提高 C_1 的比酶活, 降低BG的最高酶活及比酶活和缩短 C_1 和 C_x 的最高酶活形成时间; 添加酵母膏能明显提高BG最高酶活但降低其酶活比; 而 C_1 和 C_x 的比酶活和最高酶活则随其浓度变化而增减不一。3种组分酶的分泌规律和酶系的均衡性极不相同, 其中对BG的影响较为滞后。图3表3参12

关键词: 生物化学; 里氏木霉; 纤维素酶系; 产酶特性; 均衡性

中图分类号: Q556.03 文献标识码: A

真菌纤维素酶系(cellulase system)是一种多组分的复合酶, 一般包括3种水解酶, 即内切型 β -1, 4-葡聚糖酶(endoglucanase, EC3.2.1.4, 也称 C_x 酶或CMC酶)、外切型 β -1, 4-葡聚糖酶(exoglucanase, EC3.2.1.91, 也称 C_1 酶或外切纤维二糖水解酶即CHB)和 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, EC3.2.1.21, 简称BG或纤维二糖酶^[1])。 C_1 酶和 C_x 酶均有多种异构体, 在将天然纤维素水解成葡萄糖的过程中, 必须依靠3种组分的协同作用才能完成。对特定的酶解底物而言, 纤维素酶制剂的质量不仅取决于总活力(滤纸酶活力)的大小, 而且还取决于复合酶系的组成情况。纤维素酶的生产过去多采用固体曲发酵法, 这种方法难于控制和酶提取过程复杂, 不利于现代化流水企业。相反, 液体深层发酵具有易控制易提取等优点, 具有十分看好的研发潜力^[2]。我国液体深层发酵生产纤维素酶尚处于初步试验和开发阶段, 许多发酵条件有待于优化, 里氏木霉*Trichoderma reesei*又是用于生产纤维素酶最常用的菌种, 这是此文立题的依据。就真菌纤维素酶分泌特性方面, 人们过去一般是从单一组分酶的考虑分析, 而未对3种酶组分同时进行其均衡性及相互之间的影响效应进行分析^[3,4]。在液体发酵条件下, 文章针对酶系均衡性等问题进行了探讨, 为进一步深入研究提供理论依据。

收稿日期: 2002-08-10; 修回日期: 2003-02-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39460060)

作者简介: 吴石金(1971-), 男, 江西赣州人, 讲师, 硕士, 从事生物化学与分子生物学等研究。

1 材料与方 法

1.1 培养基

1.1.1 斜面培养基 采用 PDA (土豆汁葡萄糖琼脂) 培养基。将孢子接种于斜面培养基, 于 28 °C 下培养, 待形成一层绿色孢子后, 于 4 °C 保藏备用。

1.1.2 基础培养基 浓的 Mandle's 营养盐添加 0.01 g·kg⁻¹ 纤维素粉和 0.02 g·kg⁻¹ 的麦麸^[5]。

1.1.3 产酶培养基 即在基础培养基中添加不同浓度的营养物质。

1.2 菌种筛选、孢子悬液和酶液的制备

1.2.1 菌种 为作者在浙江工业大学生物与环境工程实验室筛选, 经初步诱变改良。

1.2.2 孢子悬液 从新长成的斜面洗下孢子, 用磁力搅拌器搅拌约 20 min, 打散孢子后通过血球计数板在显微镜下计数, 并调节孢子浓度至 $(1.00 \pm 0.05) \times 10^7$ 个·mL⁻¹。

1.2.3 酶液制备 将孢子悬液以 (mL·L⁻¹) 10% 接种量接入装有 50 mL 产酶培养基的 250 mL 摇瓶中, 转速 200 r·min⁻¹, 30~31 °C 发酵培养, 发酵一定时间后取适量发酵液, 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 以缓冲液适当稀释上清液就是酶液。

1.3 总还原糖测定

见文献 [6], DNS 法, 以葡萄糖为标准。

1.4 蛋白质测定

见文献 [7], Bradford 法, 以牛血清白蛋白为标准。

1.5 酶活测定与比酶活 (r_{ea}) 的计算

C₁ 酶、C_x 和 B_G 酶活的测定依据文献 [6] 进行, 比酶活的计算依据文献 [8] 进行。

以上涉及的定糖分析均以相同稀释倍数的酶液作为空白对照。

1.6 数据分析

方差分析法和 q 检验法^[9]。

2 结果与分析

2.1 碳源对里氏木霉产纤维素酶特性及酶系均衡性的影响

使用单一及混合碳源 (以纤维素粉和麦麸) 分析它们对酶系各组分最高酶活、比酶活及其形成时间的影响。结果见表 1。

表 1 碳源对里氏木霉产纤维素酶系各组分最高酶活及其形成时间和比酶活的影响

Table 1 Effect of carbon resource on highest enzyme activity, enzyme activity ratio and formation time of highest enzyme activity of cellulase components in *Trichoderma reesei*

碳源水平/ (g·kg ⁻¹)		C ₁ 酶			C _x 酶			B _G 酶		
麦麸	纤维素粉	$a_{1e} \times 10^{-5}$	$r_{ea} \times 10^{-5}$	t	$h_{ea} \times 10^{-5}$	$r_{ea} \times 10^{-5}$	t	$h_{ea} \times 10^{-5}$	$r_{ea} \times 10^{-5}$	t
0.0	2.0	16.187	151.897	8	181.336	613.289	6	29.789	206.158	10
1.0	1.0	61.762	102.987	9	272.221	391.078	10	52.244	72.214	10
1.0	2.0	31.306	127.409	10	187.871	504.368	10	63.129	198.073	10
2.0	0.0	25.522	106.021	7	207.742	566.380	4	33.123	99.653	9
2.0	1.0	76.182	72.848	9	313.246	331.566	10	135.594	124.292	10
2.0	2.0	68.030	89.351	10	253.217	468.627	10	60.112	115.957	10

说明: a_{1e} 为最高酶活, 单位为 mol·s⁻¹; r_{ea} 为比酶活, 单位 mol·s⁻¹; t 为最高酶活形成时间, 单位 d

从表 1 结果看出, 使用单一碳源时, 不同组分酶的最高酶活形成时间悬殊较大, 特别以 C_x 酶最短, 而以纤维素粉和麦麸混合碳源时则较一致。各组分均以 1.0 g·kg⁻¹ 纤维素粉和 2.0 g·kg⁻¹ 麦麸为混合碳源时有最高酶活, 以 2.0 g·kg⁻¹ 纤维素粉碳源时有最高比酶活。

图 1 表明, C₁ 酶和 B_G 始终呈缓慢上升趋势, 至峰值后便趋于稳定, C_x 酶可在较短时间内接近峰值, 而后有一个较小的下降期, 最后又恢复上升至最高酶活值。

2.2 酵母膏对里氏木霉产纤维素酶特性及酶系均衡性的影响

从表2可以看出,使用酵母膏时,随着酵母膏质量分数的增加,C₁酶和C_x酶的最高酶活形成时间有不同程度的缩短,而对BG则基本不变;最高酶活以BG有显著增加,其次为C_x酶;各组分比酶活与酶活变化在一定程度上呈负相关。由图2(以0.40 g·kg⁻¹酵母膏为例)与图1比较分析说明,酵母膏对C₁酶和C_x酶的分泌规律有一定的影响,C_x酶的峰值期较短,C₁酶有缓慢下降的趋势,对BG的影响不明显。

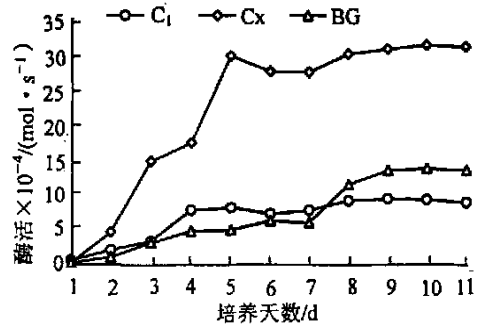


图1 纤维素粉(1.0 g·kg⁻¹)和麦麸(2.0 g·kg⁻¹)对里氏木霉产纤维素酶系各组分分泌规律的影响
Figure 1 Effect of 1.0 g·kg⁻¹ cellulase powder and 2.0 g·kg⁻¹ wheat bran on secretory rule of components in cellulase system during production process of *Trichoderma reesei*

表2 酵母膏对里氏木霉产纤维素酶系各组分最高酶活及其形成时间和比酶活的影响

Table 2 Effect of yeast extract past on highest enzyme activity, enzyme activity ratio and formation time of highest enzyme activity of cellulase components in *Trichoderma reesei*

影响因子	C ₁ 酶			C _x 酶			BG 酶		
	a _{he} × 10 ⁻⁵	r _{ea} × 10 ⁻⁵	t	h _{ea} × 10 ⁻⁵	r _{ea} × 10 ⁻⁵	t	h _{ea} × 10 ⁻⁵	r _{ea} × 10 ⁻⁵	t
酵母膏/(g·kg ⁻¹)									
0.05	60.03	123.89	7	197.87	260.99	6	187.27	55.94	10
0.10	79.43	98.00	7	205.69	257.30	6	197.64	53.91	10
0.20	131.66	82.40	6	245.99	228.95	6	220.97	49.64	10
0.40	142.22	92.98	6	262.99	218.96	5	260.61	38.90	10
0.80	108.93	72.84	5	304.92	202.28	5	242.64	42.60	10
1.60	72.07	57.97	5	287.66	174.85	5	224.47	40.75	10
基础对照	45.91	76.28	9	193.94	278.96	10	130.37	130.00	10

说明: a_{he}为最高酶活,单位为 mol·s⁻¹; r_{ea}为比酶活,单位 mol·s⁻¹; t为最高酶活形成时间,单位 d; 基础对照培养基即以浓的 Mandel's 培养基添加 0.01 g·kg⁻¹纤维素粉和 0.02 g·kg⁻¹的麦麸

2.3 碳酸钙对里氏木霉产纤维素酶特性及酶系均衡性的影响

从表3可以发现,随着碳酸钙质量分数的增加,最高酶活形成时间除BG保持不变外,C₁酶和C_x酶均大幅度地缩短为4d;最高酶活以C₁酶和C_x酶有明显提高,以0.40 g·kg⁻¹的浓度为佳,而BG则总体降低;比酶活只有C₁酶有提高,BG则降低,C_x酶的变化不明显。根据图3(以0.40 g·kg⁻¹碳酸钙为例)与图1的比较分析表明,碳酸钙对C₁酶和C_x酶的分泌规律影响极大,二者分泌的稳定性较差,在短期内达到高峰值后又明显降低,C₁酶出现了2个峰值,但碳酸钙对BG的分泌规律则影响不明显。

表3 碳酸钙对里氏木霉产纤维素酶系各组分最高酶活及其形成时间和比酶活的影响

Table 3 Effect of CaCO₃ on highest enzyme activity, enzyme activity ratio and formation time of highest enzyme activity of cellulase components in *Trichoderma reesei*

影响因子	C ₁ 酶			C _x 酶			BG 酶		
	a _{he} × 10 ⁻⁵	r _{ea} × 10 ⁻⁵	t	h _{ea} × 10 ⁻⁵	r _{ea} × 10 ⁻⁵	t	h _{ea} × 10 ⁻⁵	r _{ea} × 10 ⁻⁵	t
碳酸钙/(g·kg ⁻¹)									
0.10	162.08	112.44	4	256.70	285.60	4	64.24	50.41	10
0.20	181.66	107.04	4	278.65	279.89	4	71.614	52.81	10
0.40	211.74	100.95	4	312.29	220.63	4	93.918	45.57	10
0.80	196.21	100.17	4	254.90	215.61	4	92.61	57.61	10
基础对照	79.33	77.99	9	193.94	265.29	10	80.36	118.74	10

说明: a_{he}为最高酶活,单位为 mol·s⁻¹; r_{ea}为比酶活,单位 mol·s⁻¹; t为最高酶活形成时间,单位 d; 基础对照同表2

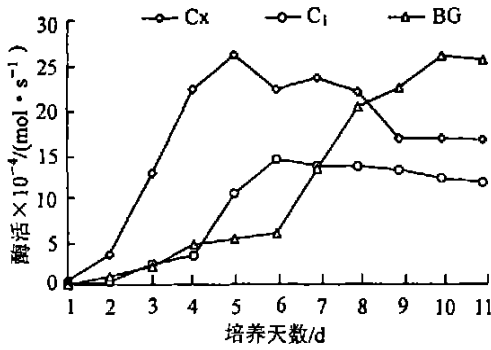


图 2 0.40 g⁻¹酵母膏对里氏木霉产纤维素酶系各组分分泌规律的影响

Figure 2 Effect of 0.40 g⁻¹ yeast extract on secretory rule of components in cellulase system during production process of *Trichoderma rezei*

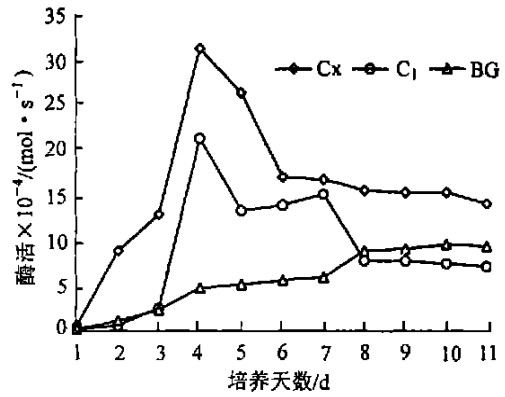


图 3 0.40 g⁻¹碳酸钙对里氏木霉产纤维素酶系各组分分泌规律的影响

Figure 3 Effect of 0.40 g⁻¹ CaCO₃ on secretory rule of components in cellulase system during production process of *Trichoderma rezei*

3 讨论

生产纤维素酶常用的菌种是绿色木霉和里氏木霉。纤维素酶的生产过去多采用固体曲发酵法,这种方法难于控制和酶的后提取过程复杂,不利于现代化大规模的流水线生产^[9]。相反,液体深层发酵具有易控制易提取等优点,具有十分看好的研发潜力。纤维素酶系是一个动态变化的复合酶体系,不同培养时期,真菌纤维素酶系各组分间的均衡性很不一致,这些均衡性主要指酶系各组分之间最高酶活及其形成时间,比酶活的大小和酶活水平的一致性。酶系的均衡性程度直接影响着纤维素酶系分解纤维素成分功能的发挥,因为纤维素酶分解纤维素成分是一个多酶协作的过程。同一培养基形成的不同组分酶的分泌规律有较大的差别,且形成峰值的时间常常不一致,这可能与纤维素在不同分解时期所形成的各种产物对不同组分酶的反馈作用(诱导或阻遏)不同有关^[11]。

从各组分酶的分泌规律分析碳源的影响,说明碳源的取舍对纤维素酶系各组分的影响很大。本试验从纤维素酶系均衡性的角度出发,探讨碳源的影响效应。结果表明,以 1.0 g⁻¹纤维素粉和 2.0 g⁻¹麦麸为混合碳源时有最高酶活, C_x 酶和 C_i 酶在培养初期活力上升较快,第 5 天可达到最大值,但 BG 的活力在产酶初期上升很慢,到产酶后期才开始明显上升。总的说来, C_x 酶具有较好的稳定性, C_i 酶次之, BG 酶则波动较大。

由于纤维素酶系各组分之间生化性质的复杂性和酶学作用的交迭和异构酶的存在,对纤维素酶系均衡性的研究一直是一个棘手的问题,国内外在这方面的研究都比较少见。最近国外有人提出,混合微生物发酵法是解决纤维素酶系均衡性的新途径^[12],因不同真菌的纤维素酶系在各组分均衡性方面有互补的现象,这是一个涉及微生物生态学的内容,将 2 类甚至 2 类以上的真菌混合在一起发酵,寻求均能大量分泌纤维素酶的发酵方法和工艺条件,生产出优质高效的混合纤维素酶系。

参考文献:

- [1] Fogarty M, Kelly C T. *Microbial Enzymes and Biotechnology* [M]. 2nd ed. Dublin: Department of Industrial Microbiology, Dublin University, 1990. 1-4.
- [2] Gillian W, Reese E T. Evidence for multiple components in microbial cellulase [J]. *Can J Microbiol*, 1984, 17 (1): 90-107.
- [3] 张加春, 王权飞, 余尊祥, 等. 里氏木霉合成纤维素酶的产生条件研究 [J]. *食品与发酵工业*, 1999, 26 (3): 21-23.
- [4] 余晓斌. 黑曲霉产纤维素酶的研究 [J]. *生物技术*, 1997, 7 (4): 13-15.
- [5] 曲音波, 高培基. 青霉的纤维素酶抗降解物阻遏突变株的选育 [J]. *真菌学报*, 1984, 3 (4): 238-243.
- [6] 中山大学生物系微生物教研室. *生化技术导论* [M]. 北京: 人民教育出版社, 1979. 61-62.
- [7] Eriksson K, Pettersson B. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulcherrimum* for the breakdown of cellulose [J]. *Euro*

J Biochem, 1975, **51**: 213-218.

- [8] 焦鸿俊, 杨婉身. 基础生物化学 [M]. 南宁: 广西民族出版社, 1995. 96
- [9] 贵州农学院. 生物统计附实验设计 [M]. 第2版. 北京: 农业出版社, 1993. 80-107.
- [10] 夏黎明 萧庆, 余世袁. 碳源对固定化里氏木霉合成纤维素酶的影响 [J]. 纤维素科学与技术, 1994 **2**(3): 72-77.
- [11] 夏黎明 余世袁, 程芝. 影响固定化里氏木霉合成纤维素酶的动力学因素 [J]. 南京林业大学学报, 1994 **18**(3): 7-12.
- [12] Ljungdahl L G, Eriksson K E. *Advances in Microbial Ecology* [M]. New York: K C Marshall Plenum Press. 1985. 5-238.

A study of effect of carbon source on properties of cellulose system during liquid fermentation process from *Trichoderma reesei*

WU Shi-jin¹, LUO Xi-ping², XIA Yi-feng¹

(1. College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, Zhejiang, China; 2. School of Engineering, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: In the condition of liquid fermentation, we have studied the effects of different factors on highest enzyme activity (a_{he}), enzyme activity ratio (r_{ea}), formation time of highest enzyme activity (FTH) and secretary rule of components in cellulase system in *Trichoderma reesei* with cellulase, wheat bran and a mixture of two as different carbon sources and additions of CaCO_3 and yeast extract paste. The results show that there are great differences among a_{he} , r_{ea} and FTH of different compositions when cellulase and wheat bran are used as carbon sources. The mixed carbon source (1.0% cellulase+2.0% wheat bran) results in peak a_{he} (C_1 , C_x and BG reach 76.18×10^{-5} , 313.25×10^{-5} , $135.60 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$ and r_{he} (C_1 , C_x and BG reach 72.18×10^{-5} , 331.57×10^{-5} , $124.29 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$). The addition of CaCO_3 can increase the a_{he} (C_1 and C_x reach 196.21×10^{-5} , $254.90 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$) and r_{ea} of C_1 (100.17×10^{-5}) and C_x ($215.61 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$) and reduce the r_{ea} of BG ($57.61 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$), formation time of a_{he} of C_1 and C_x distinctly. The addition of yeast extract paste can increase a_{he} of BG ($260.61 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$) and reduce the r_{ea} of BG ($38.9 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$), secretary rule dramatically. The equilibrium of all components are very different and their effects on BG are lagged behind. [Ch, 3 fig. 3 tab. 12 ref.]

Key words: biochemistry; *Trichoderma reesei*; cellulase system; characteristics of enzyme production; balance