

2种真菌纤维素酶系组分活性研究初报

汤 莉, 薛泉宏

(西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 在液体摇瓶培养和固体发酵条件下, 对2株产纤维素酶的野生型真菌的产酶动态和酶系活性进行了分析, 并将固态酶曲与海林产酶粉进行了综纤维糖化对比试验。结果表明, 2菌株酶系组分酶活较高, 尤其是 β 葡萄糖苷酶酶活远高于海林酶粉。

[关键词] 纤维素酶; 酶系组分; 酶活

[中图分类号] Q 554

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)01-0068-03

纤维素酶能将纤维素降解成葡萄糖。该酶是起协同作用的多组分酶系^[1~4]。要使纤维素得以充分水解, 就酶本身而言, 主要考虑两个方面, 一是提高酶的活力; 二是改善纤维素酶系各组分的相对含量, 充分发挥他们之间的协同作用。近年来, 通过大量的诱变育种工作, 纤维素酶活力不断提高, 但纤维素水解产物对酶活性有较强的抑制作用, 其中纤维二糖是抑制纤维素酶水解作用的主要水解产物。许多研究者在改进纤维素酶系组成方面做了大量工作, 为提高 β 葡萄糖苷酶活性, 有人采取在木霉纤维素酶中补加曲霉的 β 葡萄糖苷酶, 或克隆高活性 β 葡萄糖苷酶基因, 构建高效分解纤维素工程菌^[5]。本研究对2株具有较高 β 葡萄糖苷酶活性的野生真菌的酶系组分进行酶活分析, 以了解其产酶情况, 为直接开发利用产纤维素酶真菌, 通过诱变育种或构建高产纤维素酶工程菌提供出发菌。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验菌株 M_1 (白地霉 *Geotrichum candidum*); M_2 (灰绿曲霉 *Aspergillus glaucus*) 由黑龙江八一农垦大学微生物系提供。

酶制剂 黑龙江省海林市万利达集团生产。

培养基及培养 参考文献[6, 7]方法进行。

菌种斜面培养基 马铃薯 200 g, 葡萄糖 10 g, KH_2PO_4 1 g, 琼脂 18 g, 水 1 000 mL, pH 6, 121 °C, 灭菌 30 min。

液体发酵培养基 综纤维(脱木素稻草) 10.0

g, 麸皮 10.0 g, 蛋白胨 0.5 g, 尿素 0.3 g, KH_2PO_4 4.0 g, K_2HPO_4 3.0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.4 g, $CaCl_2$ 0.3 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, Tween80 2.0 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1.6 mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.4 mg, $CoCl_2$ 2 mg, pH 6, 250 mL, 蒸馏水 1 000 mL, 三角瓶装培养基 100 mL, 121 °C 灭菌 30 min。

固体发酵培养基 麦秆粉 7.0 g, 麸皮 3.0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.3 g, KH_2PO_4 0.1 g, 醋酸钠 0.01 g, Vc 0.01 g, 自来水 35 mL, 装入 300 mL 克氏扁瓶中 121 °C 灭菌 60 min, 28 °C 培养。

1.2 方 法

接种方法及接种量 参照文献[7, 10]进行。

酶液的制备 固体发酵物加入 10 倍 0.05 mol/L pH4.8 的柠檬酸缓冲液(加体积分数 0.1% tween-80), 摇匀后 45 °C 保温 1 h, 新华定性滤纸过滤, 得粗酶液。液体发酵物用新华定性滤纸过滤, 得粗酶液。

酶活力测定 参照 IUPAC 推荐的国际标准方法测定。酶活力由 1 g 纤维素酶曲在 1 min 酶解底物生成葡萄糖 μ g 数表示。

滤纸酶活(FPA) 于 25 mL 具塞试管 A 和 B 中加缓冲液 1 mL, 分别加入卷成筒状的滤纸片 1 cm $\times$ 6 cm 1 条, 50 °C 预热 5 min 后在 A 管中加入 0.5 mL 适当稀释的酶液。50 °C 保温 60 min, 取出各加 3 mL DNS 试剂。B 管中补加 0.5 mL 酶液, 煮沸 5 min, 立即冷却, 加蒸馏水至刻度, 用 722 型分光光度计于 540 nm 处测定光密度(B 管为对照)。从葡萄

糖标准曲线上查出相应的葡萄糖含量。

羧甲基纤维素酶活(CMCA) 底物为体积分数 1% 羧甲基纤维素钠溶液 1 mL, 50 ℃ 保温 30 min, 其他同上。

β 葡萄糖苷酶活(BGA) 底物为体积分数 1% 水杨素溶液 2 mL, 50 ℃ 保温 30 min, 其他同上。

粗纤维的制备^[9, 10] 将风干的秸秆切成 2 cm 左右小段, 加体积分数 1% NaOH 溶液(1:12), 121 ℃ 湿热处理 1 h, 分离碱液, 水洗至中性, 处理后的秸秆干燥后粉碎, 过 1 mm 筛。

粗纤维酶解方法^[11, 12] 称取 0.3 g 固态干酶曲, 加 5 mL pH 4.8 的柠檬酸缓冲液, 45 ℃ 浸提 1 h, 取滤液加综纤维 1 g, 补充缓冲液至 50 mL, 置于 250 mL 三角瓶中, 45 ℃ 水浴中酶解 24 h。用 DNS 法测可溶性还原糖浓度, 进一步计算底物糖化率。

$$\text{糖化率}(\%) = \frac{\text{还原糖} \times 0.9}{\text{底物}} \times 100$$

2 结果与讨论

2.1 液体培养纤维素酶系活性

从表 1 可见, FPA、CMCA、BGA 在发酵过程中的产酶趋势大体一致。发酵初期酶活较低, 随着发酵时间的延长而逐渐上升, 达到峰值后又逐渐下降。但同一酶活 2 个菌株间产酶峰期不同。如 M₁ 菌株的 FPA、CMCA、BGA 分别于发酵 72, 84, 84 h 达到峰值, 而 M₂ 菌株除 CMCA 的峰值在 84 h 外, 其他 2 种湿热处理酶活均在发酵 60 h 即达峰值。即 M₂ 菌株的产酶高峰期较 M₁ 菌株早 24 h。从酶活看, M₂ 菌株普遍高于 M₁, 如产酶高峰期 M₂ 菌株的 FPA、CMCA 是 M₁ 菌株的 1.4 倍, BGA 是 M₁ 的 2.3 倍。

表 1 供试菌株液体培养纤维素酶系活性

Table 1 Component enzyme activities of cellulase complex under liquid culture

培养时间/h Culture period	FPA		CMCA		BGA	
	M ₁	M ₂	M ₁	M ₂	M ₁	M ₂
36	3.44	2.34	7.72	9.42	4.94	13.46
60	2.11	12.01	20.39	49.71	7.24	27.39
72	8.39	11.28	32.25	51.17	10.12	17.22
84	4.34	11.04	44.58	62.14	12.07	13.64
96	4.77	8.69	26.06	41.75	9.61	10.52
120	3.81	5.97	31.61	32.46	4.42	6.71

2.2 固态发酵纤维素酶系组分活性

M₁ 和 M₂ 菌株的固态发酵过程中的产酶趋势与液体摇瓶培养基本相似(表 2), 酶活随发酵时间的延长而上升, 达到峰值后, 逐渐回落; 同一酶活 2 个菌株的产酶高峰期除 FPA 均是 144 h, CMCA、

BGA 则不相同。M₁ 菌株的 CMCA、BGA 在发酵 144 h 达到高峰, 而 M₂ 菌株较之提前 72 h; 2 菌株产酶高峰期的酶活数值差异较大, M₂ 菌株的 FPA 是 M₁ 的 2 倍, 而 M₁ 菌株的 CMCA 是 M₂ 的 1.2 倍, M₂ 菌株的 BGA 约是 M₁ 的 1.6 倍。

表 2 供试菌株固态发酵纤维素酶系活性

Table 2 Components enzyme activities of cellulase complex under solid fermentation

培养时间/h Culture period	FPA		CMCA		BGA	
	M ₁	M ₂	M ₁	M ₂	M ₁	M ₂
48	207.1	127.2	1120.1	2113.2	406.4	2475.6
72	482.7	319.8	2316.7	3583.7	941.3	3137.3
96	428.3	862.8	2570.3	3306.3	1327.3	1448.1
120	580.2	1051.7	3461.2	3021.2	1762.2	1211.6
144	603.3	1206.7	4259.7	2706	1991.1	1194.7
168	407.8	941.6	2809.6	2005.1	1617.2	864.3

为了解 M₁ 菌株和 M₂ 菌株产酶能力, 特将其与酶制剂进行对比试验(表 3)。2 菌株在产酶高峰期的滤纸酶活分别是酶制剂的 25.5% 和 51.1%。酶粉的 CMCA 约为 M₁ 菌株 4 倍, 为 M₂ 的 4.7 倍。而 BGA

恰恰相反, M₁ 和 M₂ 菌株分别是酶制剂的 5.5 倍和 8.7 倍。

2.3 综纤维酶解试验

为了解 M₁ 和 M₂ 菌株所产纤维素酶对综纤维

的实际分解能力,将 M_1 和 M_2 菌株发酵 96 h 和 144 h 所得酶曲制得酶液,与海林酶制剂对比,进行酶解试验。结果表明,在 45 酶解 24 h, M_1 菌株发酵 144 h 的酶曲反应体系中还原糖浓度、底物糖化率大于发酵 96 h 的酶曲, M_2 菌株与之相反(见表 4)。可见 M_2 菌株产酶速度较快,酶解能力较 M_1 菌株强。以 M_1 和 M_2 菌株酶解能力较强的酶曲与酶制剂比较, M_1 菌株还原糖浓度、底物糖化率均是酶制剂的 62.2%, M_2 菌株均是酶制剂的 92.2%。 M_1 和 M_2 菌株酶曲的得糖率仅比酶制剂减少 38% 和 8%。若延长酶解时间,2 菌株酶曲得糖率可望进一步提高。

表 3 酶曲与酶制剂酶活的比较

Table 3 Comparison of cellulase activity of strains and enzyme powder $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{g}^{-1})$

样品 Sample	FPA	CMCA	BGA
M_1 菌株 M_1 strain	603.3	4259.7	1991.1
M_2 菌株 M_2 strain	1206.7	3583.7	3137.3
酶制剂 Enzyme powder	2365.3	16748	361.3

表 4 酶曲和酶制剂酶解效果

Table 4 Enzymatic hydrolysis of strains and enzyme powder

样品 Sample	培养时间/h Culture period	还原糖浓度/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Density of reducing sugar	底物糖化率/% Ratio of saccharification	得糖率/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) Reducing sugar content
M_1 菌株 M_1 strain	96	4.3	19.4	719.2
	144	5.6	25.2	936.4
M_2 菌株 M_2 strain	96	8.3	37.4	1383
	144	7.2	32.4	1206
酶制剂 Enzyme powder		9.0	40.5	1501

注:还原糖浓度指 1 L 反应体系中酶解综纤维 24 h 所含还原糖克数。

Note: Density of reducing sugar refers to the mass of reducing sugar when celluloses were hydrolyzed in 1 L reaction system after 24 hours

3 小 结

通过液体摇瓶培养和固体发酵条件下的产酶动态和酶系组成的酶活分析,及固态酶曲的综纤维糖化试验表明, M_1 和 M_2 菌株纤维素酶系组分酶活较高,其中 β -葡萄糖苷酶酶活远超出海林酶粉。若优化产酶条件,2 菌株所产纤维素酶活还可进一步提高。

[参考文献]

- [1] 汪维云. 纤维素科学及纤维素酶的研究进展[J]. 江苏理工大学学报, 1998, 19(3): 20- 28
- [2] 严 岩, 张全福. 纤维素酶的性质应用及其环保意义[J]. 农业环境与发展, 1997, 51(1): 17- 20
- [3] 王兰芬. 纤维素酶的作用机理及开发应用[J]. 酿酒科技, 1997, (6): 16- 17
- [4] Rosanne M nllings. Enzyme M icrob[J]. Technol, 1985, 7(2): 586- 590
- [5] 吴显荣, 穆小民. 纤维素酶分子生物学研究进展及趋向[J]. 生物工程进展, 1994, 14(4): 25- 27
- [6] Mandels M. Measurement of saccharifying cellulase[J]. Biotech and Bioeng Symp, 1976, (6): 21
- [7] 余晓斌, 具润谟. 里氏木霉液体发酵法生产纤维素酶[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(1): 20- 25
- [8] Ghose T K. Measurement of cellulase activity[J]. Pure and Appl Chem, 1987, 59(2): 257
- [9] 外山信男. 纤维素及纤维素酶[J]. 发酵工业, 1981, 39(9): 18- 32
- [10] 刘金旭. 用麦秸培养木霉生产蛋白质饲料的试验[J]. 微生物通报, 1974, (3): 12- 15
- [11] 肖永澜译. 纤维素酶工程的近期进展[J]. 应用微生物, 1977, (1): 1- 6
- [12] 夏黎明, 代淑梅. 应用固定化里氏木霉糖化玉米秸秆纤维素的研究[J]. 微生物学报, 1998, 38(2): 114- 119

Study on the cellulase production and enzyme activity of cellulase system from two cellulolytic fungus

TANG Li, XUE Quan-hong

(College of Resources and Environment, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract The changes of cellulase production and enzyme activity of some components in the cellulase system were analysed from two wild cellulolytic fungus grown on solid medium fermentation and shake flask culture. The results showed that two strains were of quick cellulase production speed, complete components in the enzyme system and high enzyme activity, especially high β -glucosidase activity. Two strains could be applied to cellulase production and be parent strains of mutagen strains.

Key words cellulase; component of enzyme system; enzyme activity