

一株绿色木霉产外切 β -葡聚糖苷酶条件 及其纯化与性质的研究

何 平, 吴文能, 张敬璇, 刘松涛, 黄卓烈, 巫光宏

(华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 从树林中腐烂木块上采集并筛选出一株分泌外切 β -葡聚糖苷酶(exo-1, 4- β -D-glucanase or cellobiohydrolase, CBH)的绿色木霉菌株. 在 100 mL 的锥形瓶中装入 40 mL 培养基的产酶状况最好, 其通气量最佳, 培养液初始 pH 为 8 时绿色木霉产生的 CBH 活力最高. 随绿色木霉生长时间的延长, CBH 的活力与培养基中的葡萄糖含量呈交替的一高一低的波浪状变化. 通过硫酸铵分部分离、葡聚糖 G-100 凝胶过滤、DEAE-纤维素 52 阴离子交换柱层析等方法使绿色木霉所产的 CBH 达到了电泳纯, 纯化倍数为 16.3. CBH 的反应最适温度为 60 $^{\circ}$ C, 最适 pH 为 6.0, K_m (底物为羧甲基纤维素钠)为 17.34 mg/mL.

关键词: 外切 β -葡聚糖苷酶(CBH); 绿色木霉; 酶活力

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2005) 03-0069-05

Isolation, purification and characterization of exo-1, 4- β -D-glucanase produced by a strain of *Trichoderma viride* sp.

HE Ping, WU Wen-neng, ZHANG Jing-xuan, LIU Song-tao, HUANG Zhuo-lie, WU Guang-hong
(College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: A strain of *Trichoderma viride* sp. producing exo-1, 4- β -D-glucanase (cellobiohydrolase, CBH) was isolated from a piece of rotten wood. Culturing in 100 mL conical flasks with 40 mL liquid medium provided optimal aeration and, with the liquid medium at an initial pH of 8, produced the maximal amount of CBH activity. Along with the growth of the mold, the activity of the CBH produced as well as the amount of glucose in the medium changed, fluctuating between high and low then low and high in turns. Through a series of purification procedures, including ammonium sulfate precipitation, sephadex G-100 gel filtration, and DEAE-cellulose 52 ion-exchange column chromatography, pure electrophoresis grade CBH was obtained at 16.3 times the concentration of the primary product. The optimal pH for CBH activity was about 6.0, the optimal temperature about 60 $^{\circ}$ C, and the K_m (CMC-Na as substrate) was 17.34 mg/mL.

Key words: exo-1, 4- β -D-glucanase (CBH); *Trichoderma viride*; enzyme activity

纤维素是地球上最丰富、最庞大且可更新的碳水化合物资源^[1]. 对人类来说, 纤维素是一种潜在可再生的重要的能源和资源. 随着全球化的食品和能源危机日益加剧, 纤维素资源的利用已引起世界范围的普遍关注^[2]. 纤维素酶是降解纤维素生成葡萄糖的一组酶的总称, 它往往是起协同作用的多组分

复合酶系. 外切 β -葡聚糖苷酶 (exo-1, 4- β -D-glucanase, EC. 3. 2. 1. 91 or cellobiohydrolase, CBH) 为纤维素酶的一组分, 此酶作用于纤维素线状分子末端, 水解 β -1, 4-糖苷键, 每次切下一个纤维二糖分子, 再由 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase, EC. 3. 2. 1. 21) 将纤维二糖水解开成葡萄糖分子^[3]. 近年来纤维素酶已广泛应

用于食品、医药、饲料和纺织等领域。纤维素酶的分离纯化及其性质的研究逐渐引起人们的关注^[4]。

自然界中许多细菌、放线菌和真菌能分解纤维素。研究生产纤维素酶的微生物大多属于真菌,主要有木霉属 *Trichoderma*、曲霉属 *Aspergillus*、青霉属 *Penicillium*、根霉属 *Rhizopus* 和漆斑霉属 *Myrothecium*。目前,最具有潜在工业应用价值的是木霉,特别是绿色木霉 *Trichoderma viride*、康氏木霉 *T. Koningii*、里氏木霉 *T. reesei*,因为它们具有很强的降解结晶纤维素的能力,能大量分泌纤维素酶,酶稳定性较好,而且又是胞外酶,容易分离,适用于酶作用机理研究和酶制剂的生产^[5-6]。本研究通过筛选试验,得到一株高产高活力纤维素酶的绿色木霉。该菌株分泌的是胞外酶,其中主要是CBH。笔者对CBH进行分离纯化,并对其部分性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌种的来源

从华南农业大学树木园的土壤中、潮湿的树皮及腐烂的木块上采集样本,加适量的无菌水温和搅拌,取1 mL悬浊液,分别涂抹于固体筛选培养基上,待长出若干菌落后,对生长良好的菌种进行分离,分别测定其所产酶活性的高低,最终筛选出最优的1株产酶菌株,并用于进一步试验。

1.2 培养基及培养方法

1.2.1 培养液的制备 2.00 g KH_2PO_4 , 1.40 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.30 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.30 g CaCl_2 , 5.00 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.56 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.40 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.00 mg CoCl_2 , 蒸馏水定容至1 000 mL,调pH为5.8。

1.2.2 固体筛选培养基的制备及培养方法 在内径为90 mm的培养皿中,平铺1张 $d=90$ mm的滤纸,用培养液湿润,灭菌,并将灭过菌的培养液滴在滤纸上,浸润滤纸至饱和。划线培养:28 °C,3~5 d。

1.2.3 液体发酵培养基的制备及培养方法 每10 mL营养液中,补充碳源:0.1 g纸浆,8.0 mg葡萄糖。500 mL三角瓶中装液体培养基100 mL,每瓶接种3环,于28 °C,120 r/min摇瓶培养5~8 d^[7-9]。

1.3 酶活力的测定分析方法

取酶液0.5 mL加5.1 g/L羧甲基纤维素钠溶液(CMC-Na,用0.25 mol/L pH4.5乙酸-乙酸钠缓冲液配制)1.5 mL,60 °C准确反应15 min,然后加3,5-二硝基水杨酸(DNS)显色液1 mL、蒸馏水2 mL,沸水浴5 min,冷却至室温,测定 $D_{540\text{nm}}$ 值。以在60 °C、pH4.5下,1 h产生1 mg葡萄糖所需酶量为一个酶活力单位

(U)^[10]。

1.4 CBH的纯化

1.4.1 硫酸铵分部分离 绿色木霉发酵的酶液过滤后,经60%~80%饱和度硫酸铵盐析,离心(4 °C、10 000 r/min、15 min),收集沉淀,用0.05 mol/L pH7.0的磷酸盐缓冲液溶解。离心(同上),取上清液。

1.4.2 Sephadex柱层析 取上清液20 mL,上Sephadex G-100层析柱(2 cm×40 cm),用0.05 mol/L pH5.0柠檬酸缓冲液洗脱,流速为10 min/管,每管3 mL。测定各管 $D_{280\text{nm}}$ 和CBH活力。洗脱液出现2个蛋白峰,其中第2峰与酶活力峰重叠,收集此峰洗脱液共151 mL(CBH活力为380.9 U/mL,蛋白质质量浓度为0.107 mg/mL)。

1.4.3 DEAE-纤维素52阴离子交换柱层析 经预处理的DEAE-纤维素52装柱(2 cm×40 cm),然后用0.05 mol/L pH7.0的磷酸盐缓冲液平衡。将上述洗脱液通过超滤浓缩至原体积的1/3(CBH活力为1 031.8 U/mL,蛋白质质量浓度为0.31 mg/mL),离心(同上),取上清液20 mL上柱。用含0.1~1.5 mol/L NaCl的0.05 mol/L pH7.0的磷酸盐缓冲液进行离子强度线性梯度洗脱。控制流速为10 min/管,每管约4 mL,洗脱液出现2个蛋白峰,其中第2峰与酶活力峰重叠,收集此峰洗脱液为纯酶液。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳(PAGE)

用浓缩胶质量浓度为50 g/L、分离胶质量浓度为12 g/L进行电泳分离,各泳道的点样量都为40 μL ,开始用80 V电压,过了浓缩胶后用160 V的电压,电泳5~6 h。脱胶后用考马斯亮蓝($\rho=1$ g/L)-甲醇($\varphi=450$ mL/L)-冰乙酸($\varphi=100$ mL/L)溶液染色1.5 h,用冰乙酸($\varphi=75$ mL/L)-甲醇($\varphi=50$ mL/L)溶液脱色。

1.6 蛋白质的测定

按Bradford方法^[11],并以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

2 结果与分析

2.1 优良菌株的筛选与鉴定

从各种原材料——树林的土壤中、潮湿的树皮及腐烂的木块上,获得几株产纤维素酶的菌株,最终选出1株具有最强的分解纤维素能力的木霉,对其进行了初步提纯复壮,繁殖培养,经华南农业大学食品学院石木标副教授鉴定确认为绿色木霉 *Trichoderma viride* sp. (图1)。

2.2 通气量对产酶的影响

使用100 mL的锥形瓶,分别装入10、20、30、40、

50、60、70 mL 液体发酵培养基,并接种等量的一环,28 °C下,摇瓶(120 r/min)培养6 d后,分别测定酶活力。从图2可以看出,在100 mL的锥形瓶中装液量为40 mL的酶活力状况最高,达15.06 U/mL,其通气量为最佳。

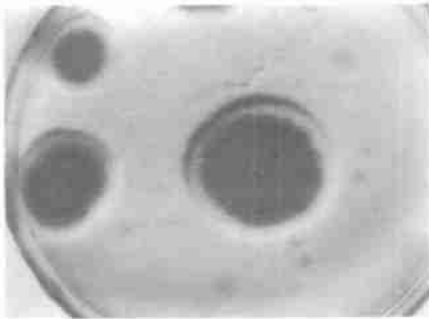


图1 初发菌株在固体培养基上的菌落

Fig. 1 Colony of original fungus on solid medium

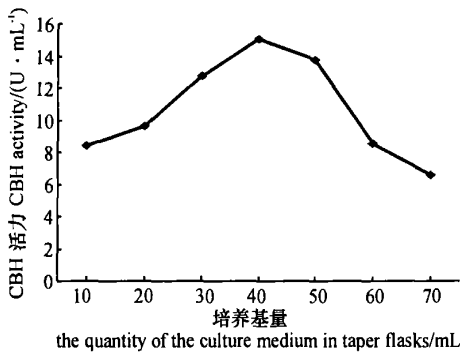


图2 通气量对产酶的影响

Fig. 2 Effects of the quantity of aeration on CBH production

2.3 培养基初始 pH 对绿色木霉产 CBH 的影响

培养基初始 pH 对绿色木霉产 CBH 的影响如图3,从图3可见,装液量为40 mL,于28 °C,120 r/min摇瓶培养8 d.培养液初始 pH 为8的产CBH的活力最高,达到11.9 U/mL.

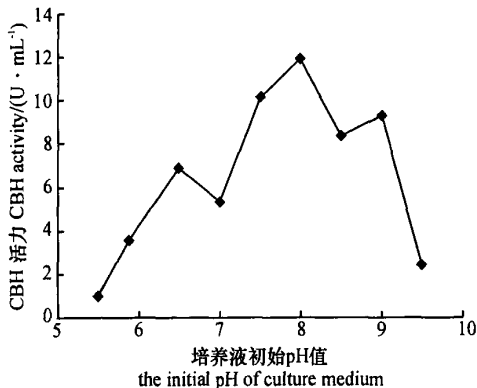


图3 培养液初始 pH 对绿色木霉生产 CBH 的影响

Fig. 3 Effects of the initial pH of culture medium on CBH activity, produced by *Trichoderma viride* sp.

2.4 CBH 活力、培养基中葡萄糖质量浓度与绿色木霉生长时间的关系

从图4可以看出随绿色木霉生长时间的延长,其分泌的CBH活力呈波浪状变化,其中,培养第4、12、22 d的酶活力较高,分别为15.3、18.5、13.6 U/mL;同时,其培养基中的葡萄糖含量也呈波浪状变化,其峰值正好在CBH峰值之后.在培养初期,随着产酶量的增多,分解纤维素的能力增大,葡萄糖的含量也就随后相应增加;但当CBH活力达到一定量时,分解纤维素产生的较高浓度的葡萄糖又对CBH表现出分解代谢产物的阻遏效应,使产酶量下降,继而分解纤维素能力降低,产糖量也回落;葡萄糖降低到一定浓度时,就解除阻遏,CBH活力又开始上升,分解纤维素的能力又逐渐增强.如此轮回,从而使CBH的活力与培养基中的葡萄糖含量呈交替的一高一低的波浪状变化.

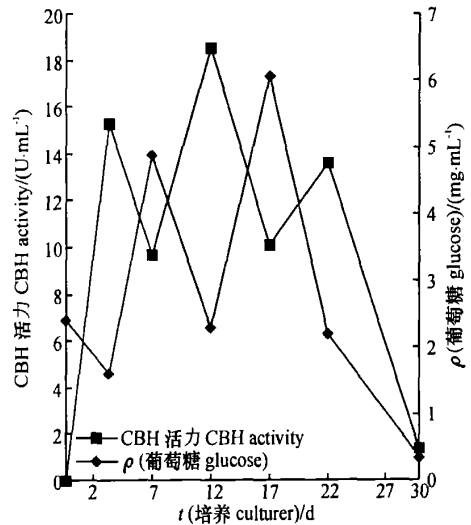


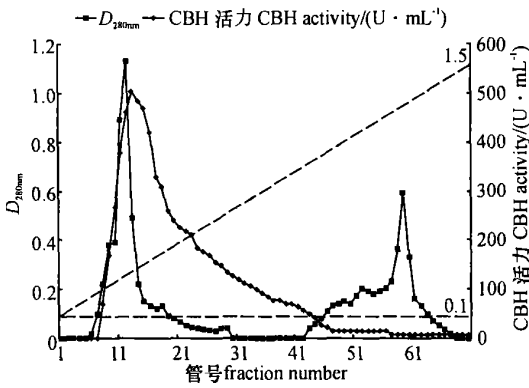
图4 CBH 活力和培养基中葡萄糖质量浓度与绿色木霉的生长时间的关系

Fig. 4 The relationship between CBH activity and glucose mass density of culture medium and growth time of *Trichoderma viride* sp.

2.5 酶的分离纯化

绿色木霉发酵酶液过滤后,经60%~80%饱和硫酸铵分部盐析、Sephadex G-100 凝胶过滤、DEAE-纤维素52柱层析(图5)等步骤纯化,酶液达电泳纯(图6).纯化结果如表1.纯化倍数为16.3,活力回收率达24.7%.

经过Sephadex G-100过滤层析后,出现2个蛋白质峰,CBH活性峰落在第2个蛋白峰,洗脱液收集合并,用超滤法浓缩后上DEAE-纤维素52层析柱,离子强度线性梯度洗脱结果如图5.由图5可见,酶活力峰与第1个蛋白质峰基本重叠,而第2个蛋白质峰基本没有酶活性



洗涤 30 支管后, 再用含 0.1~1.5 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L pH7.0 的磷酸盐缓冲液洗脱, 流速为 10 min/管, 每管 4 mL。After eluted 30 tubes, it was eluted by 0.05 mol/L pH7.0 phosphate buffer containing 0.1~1.5 mol/L NaCl. Velocity of flow was 10 min per tubes 4 mL per tuber

图 5 DEAE-纤维素 52 柱层析图谱

Fig. 5 DEAE-cellulose 52 chromatography



1: 粗酶超浓缩液[上样量为 40 μ L, ρ (蛋白质)=0.15 mg/ml]; 2: 过 DEAE-纤维素 52 的浓缩液[上样量为 40 μ L, ρ (蛋白质)=0.11 mg/ml]

1: coarse CBH concentrated by super filtration [sample volume was 40 μ L, ρ (protein)=0.15 mg/ml]; 2: concentrated CBH purified by DEAE-cellulose 52[sample volume was 40 μ L, ρ (protein)=0.11 mg/ml]

图 6 CBH 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 6 Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of CBH

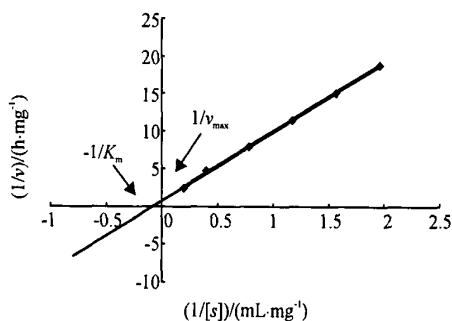
表 1 CBH 的分离纯化结果

Tab. 1 Yields and specific activities during purification of CBH

提纯步骤 purification stage	$V_{\text{总 total}}$ / mL	总蛋白 total protein/mg	总酶活力 total activity/U	比活力 specific activity/ $(U \cdot \text{mg}^{-1})$	纯化倍数 purification fold	回收率 recovery/%
培养物滤液 culture filtrate	11 071	337.1	172 707.6	512.3	1.0	100.0
硫酸铵盐析 ammonium sulfate precipitation	251	91.7	79 790.9	870.1	1.7	46.2
葡聚糖凝胶过滤 gel filtration on sephadex G-100	151	16.1	57 511.6	3 572.1	7.0	33.3
二乙基氨基乙基-纤维素 52 DEAE-cellulose 52	97	5.1	42 658.8	8 364.5	16.3	24.7

2.6 米氏常数(K_m)的测定

用 0.05 mol/L pH5.0 柠檬酸缓冲液配制不同浓度的 CMC-Na 溶液作为底物, 其质量浓度分别为: S 、 $S/2$ 、 $S/4$ 、 $S/6$ 、 $S/8$ 、 $S/10$ ($S=5.1$ mg/mL CMC-Na)。按酶活力测定方法, 测定不同 CMC-Na 质量浓度下的酶活力。采用 Lineweaver-Burk 作图法(图 7), 并得出



酶活力 440 U/mL, ρ (蛋白质)=0.053 mg/mL

CBH activity was 440 U/mL, ρ (protein)=0.053 mg/mL

图 7 CBH 的 K_m 值的双倒数法作图

Fig. 7 Double reciprocal graph of K_m of CBH

直线方程: $1/v=9.3043/S+0.5264$, 求得 CBH 的 K_m (底物 CMC-Na) 值为 17.34 mg/mL。

2.7 CBH 作用的最适温度

将酶反应温度从 10 $^{\circ}$ C 递变至 100 $^{\circ}$ C 检测其 CBH 活性(图 8), 发现在 60 $^{\circ}$ C 时 CBH 的 v_{max} 活性最高, 达 411.5 U/mL, 即 CBH 作用的最适温度为 60 $^{\circ}$ C。

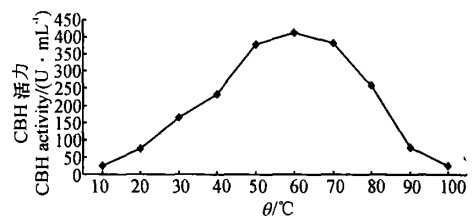


图 8 反应温度对 CBH 活性的影响

Fig. 8 Effects of reactive temperature on CBH

2.8 pH 值对 CBH 反应活性的影响

配制不同 pH 的 CMC-Na 溶液(pH2.2~10.0, 其中 pH8 以下用 0.05 mol/L 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓

冲液, pH8 以上用 0.05 mol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液), 按酶活力测定方法, 测定不同 pH 下的酶活力。发现在 pH6.0 时 CBH 的酶反应活力最大, 达 405.7 U/mL, 即 CBH 作用的最适 pH 值为 6.0。

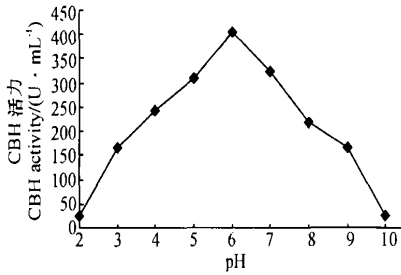


图9 pH对CBH反应活性的影响

Fig. 9 Effects of reactive pH on CBH activity

3 讨论

绿色木霉属化能异养型生物, 它能在任何具有唯一碳源的无机培养介质上生长, 无需另外补加维生素、氨基酸和一些生长因子。绿色木霉的菌落呈绿色、黄绿色至蓝绿色不等, 且似乎黄绿色的菌种比蓝绿色的菌种更为好气^[5]。

笔者筛选出的是一株蓝绿色菌种。在 100 mL 的锥形瓶中装入 40 mL 培养基的产酶状况最好, 其通气量最佳, 培养液初始 pH 为 8 时, 绿色木霉在 28 °C 下培养 5~8 d, 产生的 CBH 活力最高; 与兰时乐等^[12] 培养的绿色木霉的培养条件基本相似。

绿色木霉 CBH 属于诱导酶类。纤维素即为其诱导物, 而葡萄糖则具有明显的分解代谢产物阻遏效应^[5], 所以在本试验中当 CBH 活力达到一定量时, 分解纤维素产生的较高浓度的葡萄糖又对 CBH 表现出分解代谢产物的阻遏效应, 使产酶量下降, 继而分解纤维素能力降低, 产糖量也回落; 葡萄糖降低到一定浓度时, 就解除阻遏, 纤维素酶活力又开始上升, 分解纤维素的能力又逐渐增强。如此轮回, 从而使 CBH 的活力与培养基中的葡萄糖含量呈交替的一高一低的波浪状变化。

在液体发酵培养基中, 添加微量的葡萄糖(0.8 mg/mL)予以“激活”接种的少量菌种, 有利于这些初始菌种平稳、快速度过滞留期。兰时乐等^[12] 在培养基中添加 10~20 g/L 葡萄糖作为起始碳源。

在液体发酵培养时, 适当速度摇床振荡, 有利于提高 CBH 的产率。虽然摇速快有利于使菌丝和孢子

分配均匀, 减少分解产物的局部积累, 且增大通气量, 但摇速太快会使纸浆粘在三角瓶壁上, 且对菌丝有机机械损伤, 所以摇速控制在 120 r/min 较好。

笔者通过硫酸铵分部分离、葡聚糖 G-100 凝胶过滤、DEAE-纤维素 52 阴离子交换柱层析等方法使绿色木霉所产的 CBH 达到了电泳纯。CBH 的反应最适温度为 60 °C, 最适 pH 为 6.0。最适温度与最适 pH 均较周津等^[13] 的绿色木霉 A₁₀CBH 的高。

参考文献:

- [1] 栗学俐, 贺飞. 纤维素酶水解纤维素还原糖的测定[J]. 湖北化工, 1999, (1): 43-44.
- [2] 《微生物诱变育种》编写组. 微生物诱变育种[M]. 北京: 科学出版社, 1973. 1-2.
- [3] 杨智源, 陈荣忠, 杨丰, 等. 短小芽孢杆菌葡聚糖内切酶基因的克隆及序列测定[J]. 微生物学报, 2001, 41(1): 76-81.
- [4] 管斌, 丁友, 谢来苏, 等. 还原糖测定方法的规范[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(3): 74-78.
- [5] 管斌, 谢来苏, 隆言泉, 等. 里氏木霉纤维素酶高产菌株发酵特性的测试[J]. 中国酿造, 2000, (5): 14-16.
- [6] 曾文青, 刘蓉, 曾勤. 纤维素酶系高产菌株的选育[J]. 四川省卫生管理干部学院学报, 2000, 19(1): 4-6.
- [7] 崔福锦, 马建华, 那安, 等. 不同真菌纤维素酶一些生物化学性质的比较[J]. 真菌学报, 1984, 3(1): 59-125.
- [8] 西北水土保持生物土壤研究所微生物室发酵饲料组. 一种产生纤维素酶菌种的筛选方法——染色滤纸条法[J]. 微生物通报, 1974, 2(8): 8-11.
- [9] 郑佐兴, 段明星, 徐文联, 等. 高活性纤维素酶菌株的筛选及其产酶条件的研究[J]. 微生物学杂志, 1995, 16(3): 35-38.
- [10] 李亮亮, 牛森. 纤维素酶活力测定方法的比较研究[J]. 辽宁农业科学, 2001, (4): 16-18.
- [11] BRADFORD M A. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [12] 兰时乐, 陈娴, 李慧, 等. 产纤维素酶菌种 TPI202 的选育及产酶条件研究[J]. 生物技术, 2003, 13(2): 12-13.
- [13] 周津, 阮宏, 孙连魁. 绿色木霉 A₁₀ 纤维素酶的分离纯化及理化性质研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 1994, 24(5): 465-469.

【责任编辑 李晓卉】