

## 黄绿木霉固定化生产纤维素酶及酶学特性的研究



SUN Dong-mei

孙冬梅<sup>1,2</sup>, 杨 谦<sup>1\*</sup>, 宋金柱<sup>1</sup>, 陈忠祥<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨工业大学生命科学与工程系, 黑龙江 哈尔滨 150001;

2. 黑龙江八一农垦大学生命学院, 黑龙江 大庆 163319)

**摘 要:** 利用海藻酸钙凝胶包埋法制备固定化细胞黄绿木霉, 结果表明: 海藻酸钠质量浓度 50 g/L, 培养基初始 pH 值 4.0~4.5, 以滤纸浆为培养基碳源培养的小球的稳定性好。发酵产酶培养时以滤纸浆为碳源, 海藻酸钠质量浓度为 50 g/L, CaCl<sub>2</sub> 质量浓度控制在 20 g/L, 培养基初始 pH 值选择为 4.5, 产酶效果好、酶活力高、保持时间长。添加表面活性剂 Twin-80 后, 产酶能力可进一步提高。通过 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 分级沉淀、Sephadex G-100 分子筛层析和 DEAE Sephadex A-50 离子交换层析等步骤, 分离纯化出黄绿木霉纤维素酶系中达到电泳纯的 3 种内切葡聚糖酶 (EG I、EG II、EG III) 和 2 种 β-葡萄糖苷酶 (BG I、BG II)。通过 SDS-PAGE 和 IEF 电泳测得 5 个酶组分的相对分子质量 ( $M_r$ ) 分别为 62 300、71 900、52 600、85 300 和 78 300, 等电点分别为 5.4、4.8、5.0、5.6 和 5.8。

**关键词:** 纤维素酶; 黄绿木霉; 固定化; 等电点

中图分类号: TQ351.011; Q814.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2006)02-0079-04

## Studies on Cellulase Production by Immobilized Cells and Characteristics of Cellulase

SUN Dong-mei<sup>1,2</sup>, YANG Qian<sup>1</sup>, SONG Jin-zhu<sup>1</sup>, CHEN Zhong-xiang<sup>1</sup>

(1. Department of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology University, Harbin 150001, China;

2. Department of Life Science, Heilongjiang August First Reclamation University, Daqing 163319, China)

**Abstract:** Immobilized cells were prepared through embedment of *Trichoderma aureoviride* with calcium alginate. The suitable culture conditions were sodium alginate 50 g/L, initial pH value of the substrate 4.0-4.5 and using filter paper pulp as carbon source of the substrate. The enzymatic activity of the immobilized cells was improved when concentration of calcium dichloride was 20 g/L, initial pH value of the substrate was 4.5, concentration of sodium alginate was 50 g/L using filter paper pulp as carbon source of the substrate. Addition of the surfactant Twin-80 could further increase enzymatic activity. Three endoglucanases and two β-glucosidases from the fungi were separated and purified to electrophoretic homogeneity through processes of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fractional precipitation, Sephadex G-100 gel chromatography and DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography. They were designated as EG I, EG II, EG III, BG I and BG II, with relative molecular weights ( $M_r$ ) of 62 300, 71 900, 52 600, 85 300 and 78 300 by SDS-PAGE, and isoelectric points of 5.4, 4.8, 5.0, 5.6 and 5.8, respectively.

**Key words:** cellulase; *Trichoderma aureoviride*; immobilization; isoelectric point

林产资源的生物利用是运用现代生物技术对可再生的林产资源进行加工利用。随着全球性能源危机、粮食危机和环境危机的到来,人们对林产资源的利用更加重视,尤其是可再生的植物纤维资源的深度加工利用,已引起国内外的普遍关注。目前,林产资源生物利用领域的研究,主要包括可再生的植物纤维资源生产清洁能源和蛋白饲料、纤维素酶和半纤维素酶的应用、功能性糖醇和低聚糖的开发、香料化合物生物合成、萜类化合物的生物转化等。纤维素是世界上最大的可再生性有机质资源,据估计每年全球通过生物合成可再生性纤维素达 1 000 亿吨以上,但被利用的极少。如果能将纤维素转化成葡萄

收稿日期: 2004-12-07

作者简介: 孙冬梅(1970-),女,黑龙江北安人,副教授,博士生,从事微生物研究

\* 通讯作者: 杨 谦, 教授, 博士生导师, 从事生物学研究。

糖、乙醇及其它化工产品或生产单细胞蛋白,既可以缓解当今世界面临的粮食和能源危机,又可以减少纤维素废料引起的环境污染<sup>[1-3]</sup>。近年来,纤维素资源的开发利用受到广泛重视,纤维素酶的需求量越来越大。固定化酶和固定化细胞是国外六七十年代发展起来的一项新的生物技术,固定化细胞可反复使用,发酵过程易于控制,后提炼工艺简化及降低成本和实现连续发酵。因此,固定化技术已广泛应用于工业、医学、化学分析、环境保护、能源开发等各个方面。在发酵领域中,固定化技术已应用于乙醇、氨基酸、有机酸、酶制剂和抗生素等产品的生产<sup>[4-5]</sup>。海藻酸钙凝胶是一种常用的制备固定化酶载体,本研究探讨了利用其固定黄绿木霉进行纤维素酶的生产并对获得的纤维素酶组分进行分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

黄绿木霉(*Trichoderma aureoviride*),实验室分离得到。

### 1.2 固定化细胞的制备

用 Mandel's 营养液加 0.005 g/L 木糖、0.015 g/L 葡萄糖、0.003 g/L 蛋白胨、0.2 g/L 滤纸浆、pH 值 4.5 加热配制成 50 g/L 的海藻酸钠溶液。将黄绿木霉孢子悬液按一定比例加入上述海藻酸钠溶液中,使混合孢子悬液最终孢子含量为  $10^7 \sim 10^8$  个/mL。用 20 mL 针头缓慢均匀注射混合孢子悬液到质量浓度 20 g/L 的  $\text{CaCl}_2$  中,形成凝胶颗粒小球。硬化 16 h 以上,用无菌水洗涤 2~3 次,即制得固定化小球。

### 1.3 产酶培养

在 250 mL 三角瓶中装 45 mL 产酶培养基,放入 90~100 个固定化小球进行摇床培养,前 36 h 摇床转速为 120 r/min,36 h 后进入产酶期转速保持为 100 r/min,温度保持在 28~30 ℃。

### 1.4 固定化小球稳定性的研究

**1.4.1 海藻酸钠质量浓度的影响** 分别配制质量浓度 30、40 和 50 g/L 的海藻酸钠作为黄绿木霉孢子的包埋载体,制成固定化小球进行产酶摇床培养,比较其稳定性。

**1.4.2 培养基碳源的影响** 选用稻草、结晶纤维素、滤纸浆 3 种纤维质原料作碳源,利用产酶培养基摇床培养固定化的黄绿木霉孢子,比较其稳定性。

**1.4.3 培养基 pH 值的影响** 选初始 pH 值 3.8、4.5 和 5.4 的培养基进行摇床培养,比较其稳定性。

### 1.5 羧甲基纤维素(CMC)酶活测定

CMC 酶活定义:以 CMC-Na 为底物,在反应条件下(50 ℃ 水浴加热 30 min),以水解反应中每 30 min 产生 1 mg 葡萄糖的酶液的量为一个单位(U)。CMC 酶活力测定方法如下:在产酶培养的三角瓶中过滤出 1 mL 溶液,与 4 mL 蒸馏水混合均匀,作为粗酶液待测,取上述粗酶液 1 mL 和加入底物 1% 的 CMC-Na 溶液 1 mL。50 ℃ 恒温水浴 30 min 后,加入 2 mL DNS 终止反应。煮沸 5 min 显色后,流水快速冷却至室温,用紫外分光光度计在 540 nm 下比色,测其 O. D. 值。

### 1.6 酶组分

**1.6.1 酶的分离纯化** 将固定化后得到的粗酶液经  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀、葡聚糖凝胶 Sephadex G-100 分子筛层析<sup>[6]</sup>和葡聚糖凝胶 DEAE Sephadex A-50 离子交换层析<sup>[7]</sup>,得到纯化后的酶蛋白。粗酶液分离纯化得到 EG I、EG II、EG III、BG I 和 BG II。

**1.6.2 酶的组成 SDS-PAGE 电泳和 IEF 电泳分析** 具体操作步骤参照 Bio-Rad 蛋白质组双向电泳实验操作手册,所用试剂均购自 Bio-Rad 公司。SDS-PAGE 电泳选用分离胶质量分数为 12%,浓缩胶质量分数为 6%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化小球稳定性

**2.1.1 海藻酸钠质量浓度与培养基碳源对小球稳定性的影响** 通过对小球结构变化的考察发现:随着海藻酸钠质量浓度的升高小球稳定性增强,50 g/L 的小球摇床培养 8 d 仍然完整并可保持 12 d 以上。

但海藻酸钠质量浓度过高,会使小球硬度过强,不利于菌丝生长,因而以 50 g/L 为宜。稻草、结晶纤维素和滤纸浆 3 种纤维质原料作碳源,摇床培养 12 d, 3 种原料显示出明显的差异:稻草对小球破坏严重,结晶纤维素次之,滤纸浆组小球则保持完好。

**2.1.2 培养基初始 pH 值对小球稳定性的影响** pH 值对小球稳定性有明显影响,pH 值低的培养基小球稳定性较好,根据黄绿木霉生长对 pH 值的要求,培养基初始 pH 值控制在 4.0~4.5 较为适宜。

## 2.2 固定化对产酶的影响

**2.2.1 小球硬化液 CaCl<sub>2</sub> 质量浓度对产酶的影响** 将海藻酸钠处理的孢悬液滴入 CaCl<sub>2</sub> 溶液中,可形成海藻酸钙凝胶小球颗粒,达到硬化的目的。分别选质量浓度 15、20 和 25 g/L 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液处理海藻酸钠孢悬液,然后进行产酶摇床培养,测定其产酶规律。检验的结果说明,3 种不同质量浓度 CaCl<sub>2</sub> 处理过的固定化小球产酶活力差异极其显著,CaCl<sub>2</sub> 质量浓度越高,小球稳定性越好,但过度硬化会造成凝胶颗粒内物质传递的困难,不利于产酶。因而选择适宜的 CaCl<sub>2</sub> 质量浓度,既可保证固定化小球达到一定的强度又有利于产酶。尤其是前 8 d 使用 20 g/L CaCl<sub>2</sub> 处理过的固定化小球产 CMC 酶酶活比其他两个都要高。8 d 以后都有不同程度的下降。但是 20 g/L CaCl<sub>2</sub> 处理过的小球仍然保持较好(见表 1)。

**2.2.2 培养液初始 pH 值对产酶的影响** 分别在初始 pH 值为 3.8、4.5 和 5.4 的摇瓶培养液中进行产酶培养。结果发现,pH 值 3.8 的培养基产 CMC-Na 酶效果不是很好,第 6 天以后开始下降;pH 值 4.5 的培养基产 CMC-Na 酶效果最好,在第 8 天左右达到高峰。但是下降得比较快,到 10 d 以后 3 种 pH 值的培养基产 CMC 酶速度下降基本一致。综合考虑,培养液初始 pH 值以 4.5 为宜(见表 1)。

**2.2.3 表面活性剂对产酶的影响** 表面活性剂能提高细胞的通透性,有利于纤维素酶排出。Twin-80 是常用的一种表面活性剂,有资料曾经报道 Twin-80 能显著提高其他木霉纤维素酶活力。用加体积分数 0.1% Twin-80 和不加 Twin-80 的培养液进行产酶培养,测定黄绿木霉产酶规律。结果证实,在固定化培养液中加入 Twin-80 可使 CMC 酶酶活提高 17% 左右,且保持的时间比较长(见表 1)。

表 1 固定化条件对产酶活性的影响

Table 1 Effect of immobilization conditions on cellulase activities

条件 conditions		不同培养时间的 CMC 酶酶活 CMCase activity at different time/U			
		6 d	8 d	10 d	12 d
CaCl <sub>2</sub> 质量分数/% CaCl <sub>2</sub> mass part	1.5	0.452	0.898	0.534	0.505
	2.0	0.774	1.058	0.812	0.457
	2.5	0.391	0.577	0.612	0.503
pH 值 pH value	3.8	0.469	0.455	0.372	0.185
	4.5	1.078	1.193	0.629	0.354
	5.4	0.789	0.926	0.502	0.276
Twin-80	不加 non added	0.775	0.745	0.575	0.621
	加 added	0.694	0.665	0.631	0.614

**2.2.4 固定化细胞与游离细胞产酶的比较** 固定化细胞产 CMC 酶酶活明显高于游离细胞产 CMC 酶酶活,酶活产率提高了 177.6% 之多(见图 1)。

## 2.3 纤维素酶系的分离纯化

**2.3.1 酶的分离纯化** 在分子筛层析过程中出现了 5 个蛋白峰,其中峰 II 检测到  $\beta$ -葡萄糖苷酶活,峰 IV 和峰 V 检测到了内切酶活,将内切酶活力部分和  $\beta$ -葡萄糖苷酶分别收集合并浓缩,各自经过离子交换层析后,共得到了 5 个纤维素酶组分,即 EG I、EG II 和 EG III 以及 BG I、BG II。

**2.3.2 酶的相对分子质量( $M_r$ )和等电点的测定** 纤维素酶各组分的 SDS-PAGE 电泳图谱对以上分离纯化的内切酶各组分样品进行电泳分别表明,在 SDS-PAGE 胶上形成单一蛋白条带,说明各组分已达电泳纯。经与标准蛋白的比较和计算,各组分的  $M_r$  和等电点见表 2。

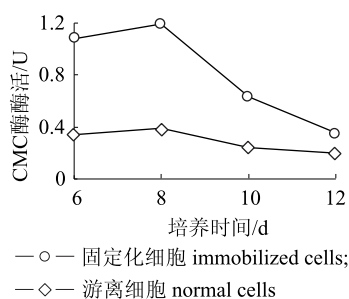


图1 固定化细胞与游离细胞产酶的比较

Fig.1 Comparison of immobilized cells and normal cells

表2 纤维素酶系各组分的  $M_r$  和等电点

Table 2  $M_r$  and isoelectric point of cellulase components

组分 components	$M_r$	等电点 isoelectric point
EG I	62300	5.4
EG II	71900	4.8
EG III	52600	5.0
BG I	85300	5.6
BG II	78300	5.8

### 3 结论

**3.1** 通过改变海藻酸钠溶液的质量浓度,培养基碳源和培养基初始 pH 值这 3 个条件发现,固定化小球确实能够满足进行发酵培养的要求,并探索出了适宜的产酶培养条件:以滤纸浆作为培养基碳源,海藻酸钠质量浓度 50 g/L、CaCl<sub>2</sub> 质量浓度 20 g/L、培养基初始 pH 值 4.0 ~ 4.5。

**3.2** 通过与没有进行固定化的游离细胞产酶进行对比,研究了固定化细胞是否有效提高了产酶活力。探讨了小球硬化液 CaCl<sub>2</sub> 质量浓度、培养基初始 pH 值、表面活性剂 Twin-80 对产酶的影响。结果显示,固定化细胞产酶能力强于游离细胞,如果在固定化的同时添加 Twin-80 等表面活性物质,更有利于提高纤维素的产酶活力。

**3.3** 通过分离纯化得到该菌株纤维素酶的不同组分获得了该酶的相对分子质量( $M_r$ )与等电点,这将为后续研究提供理论基础。

#### 参考文献:

- [1] 刘家建, 陆怡. 纤维素酶的研究及应用综述[J]. 林产化工通讯, 1995, 29(1): 6-10.
- [2] 王建平. 纤维素酶的研究进展及趋向[J]. 舟山师专学报:自然科学版, 1995(3):42-47.
- [3] 宋波, 邓晓皋. 纤维素酶的研究进展[J]. 上海环境科学, 2003, 22(7): 491-494.
- [4] 杨斌. 半纤维素酶的细胞固定化研究[J]. 纤维素科学与技术, 1995, 3(1): 42-45.
- [5] 张应玖. 果胶酶的固定化研究[J]. 生物技术, 1996, 6(2): 26-29.
- [6] GHOSE T K. Measurement of cellulase activity[J]. Pure & Appl Chem, 1987, 59(2): 257-268.
- [7] 张龙翔. 生化实验方法和技术[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 2-3.