

文章编号 1000-5013(2001)01-065-05

黑曲霉产纤维素酶系各组分 特性及酶解条件

戴四发 贺淹才

(华侨大学材料科学与工程学院, 泉州 362011)

摘要 采用正交实验法分析出黑曲霉 3.316 纤维素酶系各组分最适酶解条件,其组合分别为 C_1 酶(pH 5.0, 45 $^{\circ}$ C), C_x 酶(pH 3.5, 65 $^{\circ}$ C)和 βG 酶(pH 4.5, 65 $^{\circ}$ C)。在液体发酵条件下,添加质量分数为 0.003 的碳酸钙时,各组分酶活性最高,其中以 C_1 酶明显增高, C_x 酶几乎无影响, βG 酶则明显降低。 C_1 和 C_x 酶活只有在碳酸钙质量分数小于 0.005 时才有提高, βG 酶则明显降低。添加蛋白胨, C_1 和 βG 酶的最高酶活在碳酸钙质量分数小于 0.003 时有增加, C_x 酶则无明显变化。碳酸钙和蛋白胨对各组分最高酶活形成时间均无影响。在各组分酶分泌规律方面,仅有碳酸钙对 C_1 和 βG 酶有一定影响。

关键词 黑曲霉, 纤维素酶系, 酶组分, 液体发酵, 酶解条件

中图分类号 Q 556.03

文献标识码 A

真菌纤维素酶系(Cellulase System)是一类复杂的复合酶,一般包括3种水解酶。(1)内切葡聚糖酶(endoglucanase). 1,4(1,3,1,4)- β -D-glucan 4 glucanohydrolase, EC3.2.1.4,简称 C_1 酶或 EG。(2)外切葡聚糖酶(exoglucanase). 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase, EC3.2.1.91,简称 C_x 酶,亦称外切纤维二糖水解酶(CBH)。(3) β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase). β -D-glucoside glucohydrolase, EC3.2.1.21,简称 βG ,亦称纤维二糖酶。 C_1 酶和 C_x 酶存有多种异构酶,只有各组分酶的共同协同作用,才能将纤维素彻底水解为葡萄糖^[1~2]。在黑曲霉(*Aspergillus Niger*)产纤维素酶变化规律特性方面,一般是通过固体发酵从单一组分酶考虑分析的^[3~4]。本文就在液体发酵条件下,对添加一些物质对酶系不同组分的影响效应,以及产酶变化特性方面进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌种及来源

黑曲霉 3.316,中国科学院微生物研究所菌种组提供。

1.2 培养基与菌种保藏

收稿日期 2000-06-19

作者简介 戴四发(1973-),男,讲师

基金项目-福建省自然科学基金资助项目

Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www>

(1) 斜面培养基. 即土豆汁葡萄糖琼脂培养基. 将孢子接种于斜面培养基, 于 28 ℃ 下培养, 待形成一层绿色孢子后(约 7 d), 于 4 ℃ 冷藏备用.

(2) 基础培养基. 加浓的 Mandles 盐⁶⁾, 添加质量分数为 0.01 的纤维素粉和质量分数为 0.02 的麦麸.

(3) 产酶培养基. 在基础培养基中添加不同浓度的营养物质.

1.3 孢子悬液与酶液制备

(1) 孢子悬液制备. 从新长成的斜面洗下孢子, 以磁力搅拌器搅拌约 20 min. 打散孢子后, 用显微镜记数, 并调节为每毫升孢子 $(1.00 \pm 0.05) \times 10^7$ 个.

(2) 酶液制备. 将孢子悬液以体积分数为 0.01 的接种量接入装有 50 mL 产酶培养基的 250 mL 摇瓶中, 转速为 $190 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 28 ℃ 发酵培养. 取适量发酵液, 于转速 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 15 min, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠- $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液适当稀释上清液即为酶液.

1.4 定糖分析

采用 DNS 法⁶⁾进行定糖分析, 以葡萄糖为标准, 以相同稀释倍数的酶液作为空白对照.

1.5 蛋白质测定

采用 Bradford 法进行蛋白质质量分数 w 的测定, 以牛血清白蛋白为标准.

1.6 酶活测定和比酶活(U_0)的计算

(1) C_1 酶活测定. 取 1.0 mL 一定 pH 值的酶液, 加入 $(25.0 \pm 0.5) \text{ mg}$ 脱脂棉于试管中密封, 在 45 ℃ 下酶解 20 h 后定糖. 酶活力单位 $U(u \cdot \text{mL}^{-1})$ 为每小时由底物产生还原糖(以葡萄糖计)的微摩尔数.

(2) C_x 酶活测定. 取酶液 0.25 mL, 加入 0.25 mL pH 值相同的质量分数为 0.005 的羧甲基纤维素钠溶液, 于 65 ℃ 酶解 30 min 后定糖, 酶活力单位同 C_1 的酶活力单位.

(3) βG 酶活测定. 酶解底物为质量分数 0.005 的水杨素溶液, 酶解方法与 C_x 酶活测定相同, 酶活力单位同 C_1 的酶活力单位.

(4) 比酶活 $U_0(u \cdot \text{mg}^{-1})$ 的计算. $U_0 = U/w$, 式中 w 为蛋白质质量分数.

2 结果与分析

2.1 黑曲霉纤维素酶系各组分最适作用条件分析

以基础培养基发酵制得的酶液作为实验材料, 通过两因素(pH 值和温度 θ)五水平正交实验进行分析. 酶活结果(本文仅列出 3 组具有高酶活的条件组合), 如表 1 所示. C_1 酶最适作用

表 1 黑曲霉 3.316 纤维素酶系各组分最适酶解条件组合分析

条 件	C_1 酶	C_x 酶	βG 酶
pH	4.5, 5.0, 5.5	3.5, 3.5, 3.0	4.5, 4.5, 4.0
θ ()	45, 45, 45	60, 65, 65	65, 60, 65
$U/u \cdot \text{mL}^{-1}$	0.591, 0.610, 0.600	0.675, 0.695, 0.680	0.297, 0.290, 0.278

条件组合为 pH 5.0 和 45 ℃ 及 pH 5.5 和 45 ℃. 其最适 pH 值范围为 4.5~5.5, 最适温度范围为 45~55 ℃. C_x 酶最适作用条件组合为 pH 3.5 和 65 ℃ 及 pH 3.0 和 65 ℃, 最适 pH 值范围为 4.0~4.5, 最适温度范围为 60~65 ℃.

2.2 碳酸钙对黑曲霉产纤维素酶系特性的影响

碳酸钙质量分数(w_1)对酶系各组分最高酶活、比酶活及其形成时间(t)的影响,如表 2 所示.表 2 中各组分最高酶活形成时间不变.当质量分数为 0.003 时,各组分最高酶活均最高,其对 C_1 酶明显,对 C_x 酶无影响,而对于 βG 酶则明显降低.各组分酶活均随质量分数增高而大幅度降低, C_1 和 C_x 比酶活只有在质量分数低于 0.005 时才有提高, βG 酶均降低明显.

表 2 碳酸钙对黑曲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

w_1	C_1 酶			C_x 酶			βG 酶		
	$U/$ $u \cdot mL^{-1}$	$U_0/$ $u \cdot mg^{-1}$	$t/$ d	$U/$ $u \cdot mL^{-1}$	$U_0/$ $u \cdot mg^{-1}$	$t/$ d	$U/$ $u \cdot mL^{-1}$	$U_0/$ $u \cdot mg^{-1}$	$t/$ d
0.001	20.3	22.9	7	113.0	176.2	5	288.8	230.4	11
0.003	28.3	25.5	7	125.1	193.3	5	302.0	298.1	11
0.005	17.5	27.7	7	105.7	202.1	5	242.6	306.1	11
0.007	3.3	12.7	7	73.3	112.8	5	180.2	281.2	11
基础对照	14.0	18.7	7	123.5	165.5	5	350.7	543.5	11

碳酸钙对酶系各组分酶活变化规律的影响,如图 1 所示.将图 1 与图 2 比较表明,质量分

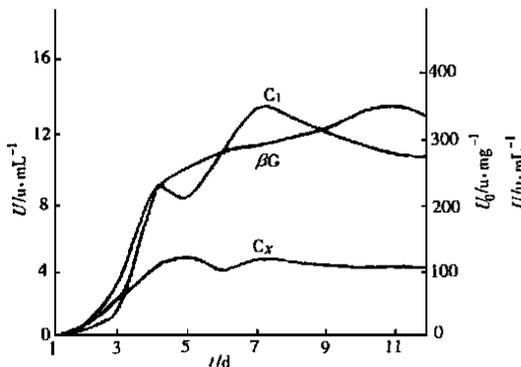


图 1 碳酸钙对黑曲霉产纤维素酶系各组分变化规律的影响

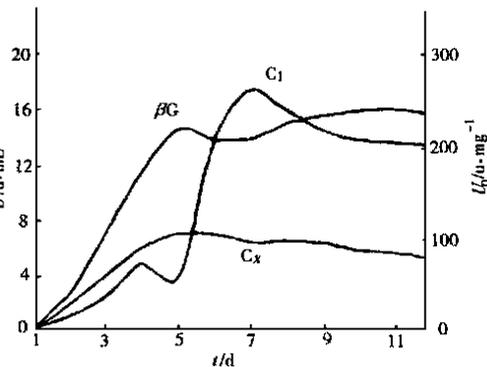


图 2 纤维素粉和麦麸对黑曲霉产纤维素酶系各组分变化规律的影响

数为 0.005 的碳酸钙使 C_1 酶活第二峰值大幅度地高于第一峰值.它缩短了 βG 酶的峰值急剧增长期,并较为稳定,而对 C_x 影响不大.

2.3 蛋白胨对黑曲霉产纤维素酶系特性的影响

表 3 为蛋白胨质量分数(w_2)对纤维素酶系各组分最高酶活,比酶活及其形成时间的影响.由表 3 可知,各组分酶最高酶活形成时间均未改变. C_1 和 βG 酶的最高酶活基本上随质量

表 3 蛋白胨对黑曲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

w_2	C_1 酶			C_x 酶			βG 酶		
	$U/$ $u \cdot mL^{-1}$	$U_0/$ $u \cdot mg^{-1}$	$t/$ d	$U/$ $u \cdot mL^{-1}$	$U_0/$ $u \cdot mg^{-1}$	$t/$ d	$U/$ $u \cdot mL^{-1}$	$U_0/$ $u \cdot mg^{-1}$	$t/$ d
0.000 5	17.7	18.3	7	123.0	164.6	5	365.5	450.0	11
0.001 0	16.5	17.5	7	115.5	161.7	5	361.0	412.4	11
0.002 0	17.0	15.0	7	116.2	127.2	5	388.0	381.0	11
0.003 0	16.3	16.3	7	113.3	150.9	5	364.1	419.8	11

续表

w_2	C_1 酶			C_x 酶			βG 酶		
	$U/$ $u \cdot mL^{-1}$	$U_0/$ $u \cdot mg^{-1}$	t/d	$U/$ $u \cdot mL^{-1}$	$U_0/$ $u \cdot mg^{-1}$	t/d	$U/$ $u \cdot mL^{-1}$	$U_0/$ $u \cdot mg^{-1}$	t/d
0.004 0	13.2	11.1	7	107.3	110.6	5	320.5	356.3	11
0.008 0	11.7	9.9	7	110.8	118.7	5	257.2	341.4	11
1.010 0	11.0	10.3	7	119.5	103.6	5	268.9	285.0	11
基础对照	14.0	18.7	7	123.5	165.5	5	350.7	543.5	11

分数的增加而降低,且均在质量分数小于 0.003 时有促进作用, C_x 酶则无明显变化.各组分比酶活都有所降低,且随质量分数增加而降低更明显.蛋白胨对酶系各组分酶活变化规律的影响,如图 3 所示(以蛋白胨质量分数 0.002 为例).图 3 与图 1 比较可知,蛋白胨对纤维素酶各

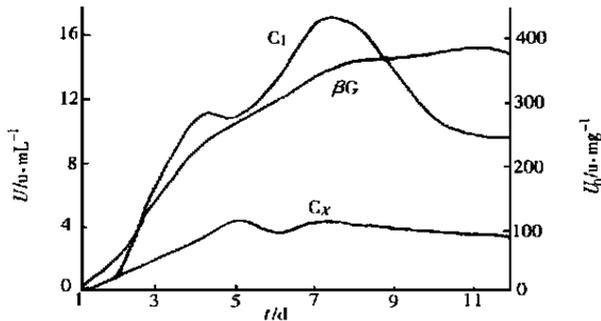


图 3 蛋白胨对黑曲霉产纤维素酶系各组分变化规律的影响

组分酶的分泌变化规律均无明显影响,仅有酶活值上的改变.

3 讨论

有关真菌产纤维素酶系特性等方面,人们主要是以绿色木霉为研究对象,而极少有黑曲霉方面的报道(且一般都限定在固体发酵条件下^[6]).因此,这样很不利于现代化大规模的流水线生产.

不同培养时期,黑曲霉纤维素酶系各组分酶间的均衡性很不一致,为一个动态变化的复合酶体系.同一培养基形成的不同组分酶的分泌规律间有较大的差别,且形成高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及其质量分数,对不同酶组分所起的不同反馈作用(诱导或阻遏)有关.

不同物质对纤维素酶系各组分的影响不一.同种物质不同质量分数,同样有不同的影响效果,即使同种质量分数的同样物质,其对酶系不同组分的影响也会有较大区别.一些物质具有促进某一组分酶的大量分泌,但却抑制其它组分的性质.因此,可以通过培养基的改变,有目的地提高单一组分酶(特别是 βG 酶的产量较高,与绿色木霉酶系形成互补)的产量.从比酶活看,虽然某些物质可以提高酶活值和酶产量(以可溶性蛋白为准,本文未列出),但其比酶活却明显下降.即此种酶的纯度更差,这不利于发酵工程的下游提纯过程.从各组分酶分泌规律分析看,使用不同的影响物质, C_x 酶具有最大的稳定性,其次为 C_1 酶, βG 酶则相对容易变化.其根本原因,还须进行研究.

参 考 文 献

- 1 Stenberg K, Galbe M, Zacchi G. The influence of lactic acid formation on the simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol-using *Saccharomyces cerevisiae* and beta-glucosidase and cellulase-mediated hydrolysis[J]. *Enzyme. Microb. Technol.*, 1990, 26(1): 71 ~ 79
- 2 Gilligan W, Reese E T. Evidence for multiple components in microbial cellulase[J]. *Can. J. Microbiol.*, 1954, 1: 90 ~ 107
- 3 赵小立, 周红军, 费承伟等. 黑曲霉 HD9478 纤维素酶固体发酵条件的研究[J]. *粮食与饲料工业*, 1997, 5: 21 ~ 23
- 4 余晓斌, 李晓华, 丁建琴. 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, 王祖农. 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学教研室编. *生化技术导论*[M]. 北京: 人民教育出版社, 1979. 61 ~ 62

Characteristic of Respective Components from Cellulase System Induced by *Aspergillus Niger* and Condition of Enzymolysis

Dai Sifa He Yancai

(College of Mater. Sci. & Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

Abstract By adopting orthogonal test, the optimal enzymolysis condition for respective component of cellulase system from *Aspergillus Niger* 3.316 induced liquid fermentation are found to be pH5.0, 45 for enzyme C₁, and pH3.5, 65 for enzyme C_x and pH4.5, 65 for enzyme βG. Under the condition of liquid state fermentation, the addition of CaCO₃ in a concentration of 0.3% leads to the highest enzyme activity of various components. In which that of C₁ obviously increases, that of C_x is almost unaffected, while that of βG obviously decreases. The enzyme activity ratio of C₁ and C_x increases only if CaCO₃ keeps in a concentration below 0.5%, while C_x shows no significant change. The addition of peptone leads to the highest enzyme activity of C₁ and βG of CaCO₃ keeps in a concentration below 0.3% while it leads to insignificant change of C_x. The formation time of highest enzyme activity of respective component are unaffected by CaCO₃ and peptone. Regarding to the rule of enzyme secretion of respective component, only CaCO₃ shows a certain effect on C₁ and βG.

Keywords *Aspergillus Niger*, cellulase system, enzyme component, liquid fermentation, enzymolysis condition