

康宁木霉 QF-02 纤维素酶酶学性质的研究

邹水洋^{1,2} 郭祀远²(¹东莞理工学院化学与环境工程学院, 东莞 523808 ²华南理工大学轻工研究所, 广州 510640)

摘要: 对康宁木霉 QF-02 生产的纤维素酶的一般酶学性质进行了研究。该纤维素酶系中滤纸酶、羧甲基纤维素酶、微晶纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶的最适作用温度分别为 55℃、65℃、50℃ 和 70℃, 最适作用 pH 为 4.0-5.0 在 40-50℃ 范围内热稳定性较好, 24 h 保温后的残留酶活在 48.5% 以上; 在 pH 3.0-8.0 范围内比较稳定, 4℃ 保存 24h 后的残留酶活在 75.7% 以上。与几种商品纤维素酶相比, 该纤维素酶对未处理和碱预处理稻草都表现出较强的糖化能力。

关键词: 纤维素酶 酶学性质 酶解糖化 康宁木霉 稻草

Study on the Enzymatic Properties of Cellulases from
Trichoderma koningii QF-02Zou Shuiyang^{1,2} Guo Siyuan²(¹ College of Chemistry and Environmental Engineering, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808² Light Industry and Chemical Engineering Research Institute, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract The enzymatic properties of cellulase series from *Trichoderma koningii* QF-02 were studied. The optimum temperatures of FPase, CMCase, avicelase and β -glucosidase were 55℃, 65℃, 50℃ and 70℃ respectively, with the optimum pH 4.0-5.0. The cellulase series exhibited a rather high heat resistant character. It was observed that more than 48.5% of enzymatic activity could still remain after incubation at 40-50℃ for 24 h. Within the pH of 3.0-8.0, the cellulase series were rather stable and the residual enzymatic activity could be above 75.7% after being kept at 4℃ for 24 h. The enzymatic activity of the cellulase was higher than that of several commercial cellulases for saccharification of untreated and alkali pretreated rice straw.

Key words Cellulase Enzymatic property Enzymatic saccharification *Trichoderma koningii* Rice straw

纤维素酶不仅在生物质能的开发中有着巨大的应用潜力, 近年来在食品、饲料、酿造、造纸、纺织等轻工业领域的应用也日益广泛^[1]。纤维素酶实际上是指能协同作用将纤维素催化水解最终产生葡萄糖的一组酶的总称, 按底物特异性可将其分为 3 种组分: 纤维二糖水解酶 (EC 3.2.1.91, 又称为外切纤维素酶)、内切纤维素酶 (EC 3.2.1.4) 和 β -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21)。由于微生物基因的多样性, 不同来源的纤维素酶蛋白在分子结构、酶学性质以及酶系组成比例等很多方面都表现出丰富的多样性^[2-5]。了解不同来源纤维素酶的酶学性质, 对于其作用机理的认识及实际应用都是非常必要的。本

实验室在前期的工作中, 选育了一株纤维素酶高产菌——康宁木霉 (*Trichoderma koningii*) QF-02, 以稻草为碳源进行液态发酵, 达到了较高的产酶水平^[6-7]。本研究对康宁木霉 QF-02 生产的纤维素酶的最适温度、最适 pH、热稳定性、pH 稳定性以及糖化性能等一般酶学性质进行了进一步研究, 以期为其在工业上的应用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 纤维素原料 稻草原料来自湖南岳阳市农场, 稻草在 75℃ 烘干, 粉碎后过 40 目筛备用; 碱预处理稻草是将稻草粉经 2% NaOH 在室温下浸渍

收稿日期: 2009-12-29

基金项目: 东莞市科技计划项目 (2008108101013)

作者简介: 邹水洋, 男, 博士, 讲师, 主要从事发酵工程及酶工程研究; E-mail: zsy2046@163.com

24 h后,以蒸馏水洗至中性,再在 75℃烘干备用。

1.1.2 试剂 Whatman No. 1 滤纸、水杨素、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 和微晶纤维素 (Avicel) 由 Sigma 公司生产。葡萄糖测定试剂 (GOD-POD 法) 由北京金豪制药有限公司生产。其它化学试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.1.3 酶制剂 自制酶由康宁木霉 QF-02 按文献 [6] 优化的条件生产, 经过滤及离心分离 (4000 × g, 10 min) 获得上清液, 然后将上清液按文献 [5] 描述的方法用 70% 饱和度 NH₄SO₄ 进行盐析, 经离心分离 (5000 × g, 20 min) 收集酶泥, 溶于 pH 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (即初步纯化的酶制剂) 于 4℃ 冷藏备用。伯奥纤维素酶由上海伯奥公司生产, 生产菌为绿色木霉。纤维素酶 Onozuka R-10 由 Biorzyme Life Sciences Dep 生产, 生产菌为 *Aspergillus* sp. 纤维素酶 Primafast 200 和 Primafast 8L 由 Genencor Bio-Products Co Ltd 生产。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液最适作用温度及 pH 的测定 将自制酶分别于 40–80℃ 水浴和 pH 2.0–6.0 缓冲液中测定各组分活力, 以酶活最高的温度和 pH 作为最适作用温度和最适作用 pH (其相对酶活规定为 100%)。

1.2.2 粗酶液热稳定性及 pH 稳定性试验 热稳定性试验: 将自制酶分别置于 40–60℃ 水浴保温 24 h 分别测定各组分的残留活力。pH 稳定性试验: 将自制酶置于 pH 1.0–10.0 缓冲液中, 4℃ 恒温保存 24 h 后再调节 pH 至 4.8 左右, 分别测定各组分的残留活力。

1.2.3 自制酶与商品纤维素酶对稻草的酶解性能试验 以稻草粉 (未处理或经碱预处理) 作为酶解底物, 酶解反应在 0.025 mol/L, pH 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中进行, 250 mL 锥形瓶装入稻草 4 g 料液比 4%, 自制酶与商品纤维素酶的载量均控制在 5.0 FPU/g 稻草, 50℃ 酶解 48 h 后测定其总还原糖与葡萄糖含量。以上试验均平行做 3 个样品, 试验结果取其平均值, 标准偏差小于 5%。

1.2.4 酶活力的测定 滤纸酶 (FPase) 和羧甲基纤维素酶 (CMCase) 活力按国际理论和应用化学协会 (IUPAC) 规定的方法 [8] 分别以 Whatman No. 1 滤纸和 CMC-Na 为底物测定; β-葡萄糖苷酶 (β-glucosidase) 活力参照 Mandels 的方法 [9] 以水杨素为底物测定。微晶纤维素酶 (Avicelase) 活力根据文献 [10] 的方法以 Avicel 为底物测定。FPase、CMCase 和 Avicelase 活力分别代表纤维素酶全酶活力、内切酶活力和外切酶活力 [11]。

1.2.5 还原糖与葡萄糖含量的测定 还原糖含量以葡萄糖为标准按 DNS 法测定 [12]。水解液中葡萄糖含量用葡萄糖氧化酶法 (GOD-POD 法) 测定: 将样液稀释至葡萄糖含量 0–0.100 mg/mL, 取稀释液 1.00 mL 于比色管, 加入 GOD-POD 试剂 1.00 mL, 在 37℃ 下保温 5 min, 加蒸馏水 2.00 mL, 摇匀后于 510 nm 处比色测定葡萄糖含量。

2 结果与讨论

2.1 制酶最适作用温度

在 40–80℃ 测定了自制酶各组分的活力 (图 1), 结果表明, FPase 在 50–60℃ 范围内的酶活力比较接近, 最适温度为 55℃。对于各组分而言, Avicelase 最适温度为 50℃; CMCase 表现出较高的温度适应性, 最适温度为 65℃; β-glucosidase 表现出最高的温度适应性, 最适温度为 70℃。和一些文献报道的真菌纤维素酶 [13–14] 相比, 自制纤维素酶系中 CMCase 和 β-glucosidase 具有较高的最适作用温度。

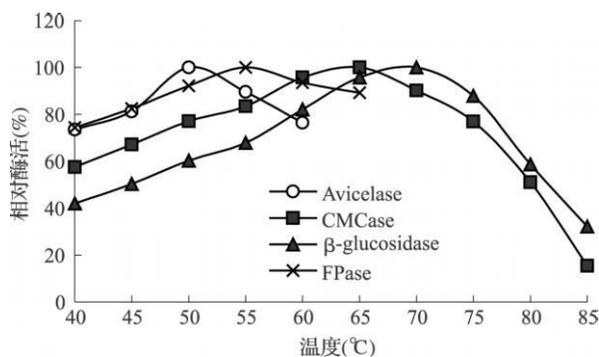


图 1 温度对自制纤维素酶活力的影响

2.2 自制酶最适作用 pH 值

在 pH 2.0–6.0 的缓冲体系测定了自制酶各组分的活力, 结果如图 2 所示, FPase 的最适 pH 为 5.0, Avicelase 和 CMCase 最适 pH 为 4.8, β-glucosidase 最适 pH 为 4.0。由此可见自制的纤维素酶是典型的酸性酶, 其作用的最适 pH 在 4.0–5.0 与其

发酵产酶的最适 pH^[6,7] 基本一致。

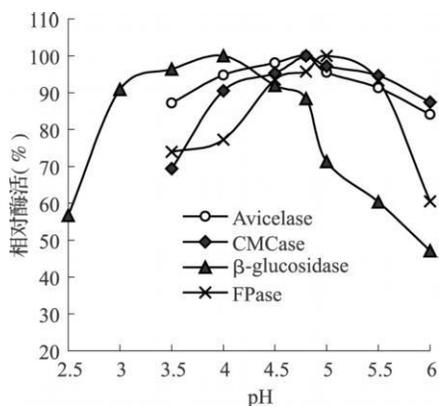


图2 pH对自制纤维素酶活力的影响

2.3 自制酶的热稳定性

纤维素酶在木质纤维素酶解中采用的温度大多在 45–55℃, 因此将自制酶分别置于 40–60℃ 保温 24 h, 测定其残留活力, 结果如表 1 所示。表 1 显示, 自制纤维素酶在 50℃ 以下较稳定, 24 h 保温后的酶活残留率接近或超过 50%, 这对于其工业应用是很有益的。在 55℃ 以上 FPase、Avicelase 和 CMCase 的失活严重; β -glucosidase 在 55℃ 仍然具有较强的耐热性, 但在 60℃ 时残留酶活下降到 30%。

表 1 自制纤维素酶在不同温度下保温 24 h 后的残留酶活

温度 (°C)	相对酶活 (%)			
	Avicelase	CMCase	β -glucosidase	FPase
40	88.4 ± 3.8	95.0 ± 4.1	97.1 ± 4.4	89.6 ± 3.5
45	62.3 ± 2.9	56.5 ± 2.6	64.7 ± 3.0	58.9 ± 2.1
50	53.2 ± 2.5	48.5 ± 2.0	61.0 ± 2.8	49.6 ± 2.2
55	40.8 ± 1.6	43.4 ± 2.3	52.9 ± 2.3	36.8 ± 1.8
60	16.1 ± 0.8	21.6 ± 0.9	30.0 ± 1.2	12.5 ± 0.4

2.4 自制酶的 pH 稳定性

酶在不同 pH 环境中的失活主要是酶蛋白不可逆变性的结果。试验中观察到 pH ≤ 2.0 和 pH ≥ 9.0 时, 酶液会产生大量絮凝沉淀。pH 调节至 4.8 后于 25℃ 轻微搅拌 2 h 仍有部分沉淀不能溶解。图 3 中的试验数据显示, 在较宽的 pH 范围内自制酶有较好的稳定性, 其中 FPase 和 Avicelase 稳定范围在

pH 3.0–8.0, CMCase 和 β -glucosidase 稳定范围分别在 pH 2.0–8.0 和 pH 3.0–9.0。在上述 pH 范围内, 自制酶各组分残留活力均达到 75.7% 以上。

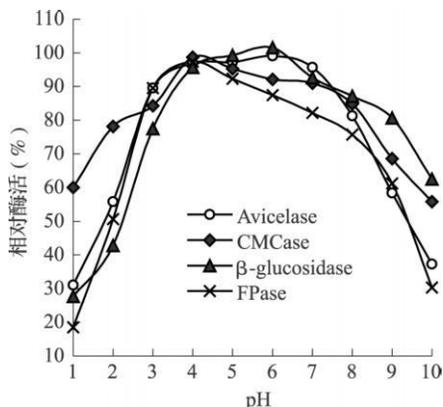


图 3 自制纤维素酶在不同 pH 下保存 24 h 后的残留酶活

2.5 自制酶对稻草的酶解糖化性能

一些文献表明^[15,16], 不同来源的纤维素酶对木质纤维素原料的酶解糖化能力有很大差别。为此, 本试验以稻草这种具有代表性的木质纤维素原料作为酶解底物, 在相同滤纸酶活载量下比较了自制酶与几种商品纤维素酶对稻草的酶解糖化性能。

对于未预处理的稻草粉, 自制酶和几种商品纤维素酶的糖化效率都比较低, 还原糖产量小于 6 mg/mL (图 4), 这是由于天然纤维素原料中木质素和半纤维素的物理屏障使纤维素难以酶解的缘故。经碱预处理的稻草粉去除了大部分木质素和一部分半纤维素, 显著改善了纤维素与酶的可及性, 其酶解糖化率比未预处理时提高了 2–3 倍 (图 5)。比较酶解产生的还原糖与葡萄糖可以发现, 不论是未预处理稻草粉还是碱预处理稻草粉, 自制酶都表现出较强的糖化能力, 4 种商品纤维素酶中仅 Primafst 200 与之相当, 其它几种酶都相差甚远。尤其对碱预处理稻草粉, 自制酶的优势更加明显, 其还原糖与葡萄糖产量比伯奥酶、Onozuka R-10 和 Primafst 8L 高出 47%–342%。以上试验初步展示了自制酶在木质纤维素生物转化中良好的应用潜力。至于优化的酶解工艺条件以及在其它领域的应用还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李燕红, 赵辅昆. 纤维素酶的研究进展. 生命科学, 2005, 17(5): 392-397.
- [2] Bayer EA, ChanzytH, Laned R, et al. Cellulose cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*, 1998, 8: 548-557.
- [3] 吕明生, 吕凤霞, 房耀维, 等. 低温纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及酶学性质初步研究. 食品科学, 2007, 28(12): 235-239.
- [4] Saha BC. Production, purification and properties of endoglucanase from newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 1871-1876.
- [5] 缪静, 张术臻, 程显好, 等. 纤维素酶提取工艺及酶学性质的研究. 安徽农业科学, 2008, 36(19): 7954-7955, 7960.
- [6] 邹水洋, 肖凯军, 郭祀远. 康宁木霉液态发酵高产纤维素酶和木聚糖酶. 华南理工大学学报(自然科学版), 2009, 37(6): 69-73.
- [7] 邹水洋, 吴清林, 肖凯军, 等. 康宁木霉与米根霉混合发酵生产纤维素酶和木聚糖酶的研究. 河南工业大学学报(自然科学版), 2009, 30(3): 69-73.
- [8] Ghose TK. Measurement of cellulase activity. *Pure and Appl Chem*, 1987, 59(2): 257-268.
- [9] Mandels M, Andreotti R, Roche C. Measurement of saccharifying cellulose. *Bio Technol Bioeng Symp* 1976, 6: 21-33.
- [10] Zhang Q, Lo CM, Ju LK. Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* RuC-30. *Bioresour Technol* 2007, 98: 753-760.
- [11] 刘洁, 李宪臻, 高培基. 纤维素酶活力测定方法评述. 工业微生物, 1994, 24(4): 27-32.
- [12] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M](第2版). 北京: 高等教育出版社, 1997: 1-3.
- [13] 刘小杰. 康氏木霉纤维素酶的发酵及其对稻草利用的初探[D]. 浙江大学, 2003: 80-81.
- [14] 林元山, 刘晨辉, 王继瑞, 等. 绿色木霉内切纤维素酶的分离纯化及酶学性质的研究. 湖南农业科学, 2007, (5): 59-62.
- [15] Thygesen A, Thomsen AB, Schmidt AS, et al. Production of cellulase and hemicellulase degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet oxidised wheat straw. *Enzyme Microb Technol* 2003, 32: 606-615.
- [16] Jørgensen H, Olsson L. Production of cellulase by *Penicillium brevicellulosum* BT 20888-Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme Microb Technol* 2006, 38: 381-390.

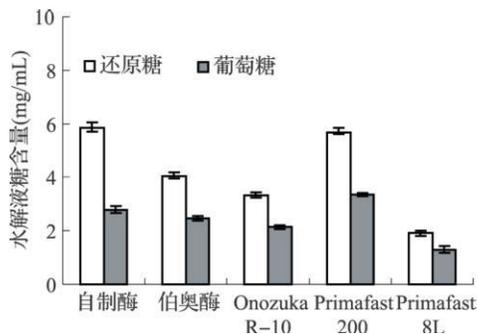


图4 不同酶源对未处理稻草的酶解糖化

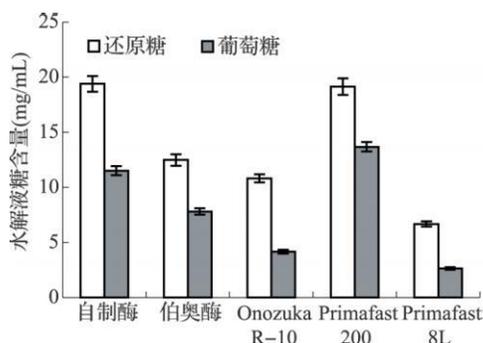


图5 不同酶源对碱预处理稻草的酶解糖化

3 结论

康宁木霉 QF-02 生产的纤维素酶的主要酶学性质如下, 该纤维素酶系中滤纸酶、羧甲基纤维素酶、微晶纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶的最适作用温度分别为 55℃、65℃、50℃和 70℃, 最适作用 pH 为 4.0-5.0, 在 40-50℃ 范围内热稳定性较好, 24 h 保温后的残留酶活在 48.5% 以上; 在 pH3.0-8.0 范围内比较稳定, 4℃ 保存 24 h 后的残留酶活在 75.7% 以上; 与几种商品纤维素酶相比, 该纤维素酶对未处理和碱预处理稻草都表现出较强的糖化能力。本研究结果展示了康宁木霉 QF-02 产生的纤维素酶在木质纤维素生物转化中具有良好的应用潜力。