

长梗木霉纤维素酶的产生及提取

谭 宏 刘淑欢 李剑英 郭楚盛

(广东省微生物研究所, 广州 510070)

摘要 对长梗木霉 (*Trichoderma Longibrachiatum*) ANU₃-958 纤维素酶的产生及提取进行了研究。结果表明, 固体曲培养 144 小时, 固体曲与浸提液比例为 1:7(W/V), 采用硫酸铵分级沉淀法时所得纤维素酶活力最高。所得冻干纤维素酶粉经测定: 羧甲基纤维素 (CMC) 酶活最高为 2788.89IU/g, 滤纸糖酶活 (FPA) 最高为 79.44IU/g。相对固体曲得率平均为 13.28%。

关键词 长梗木霉; 纤维素酶

纤维素酶 (Cellulase) 是降解纤维素生成葡萄糖的一组酶的总称^[1-3]。长梗木霉 ANU₃-958 是我所 1975 年分离筛选出的性能稳定酶活较高的纤维素酶产生菌株, 其滤纸糖酶活比拟康氏木霉 EA₃-867 高 20—35%。对于酶的提取研究, 国内有关这方面的报道较少, 国外则常有报道^[4]。为此, 我们对长梗木霉纤维素酶进行了研究和探讨。现将研究结果报告如下。

材料与 方法

(一) 菌株

长梗木霉 (*Trichoderma Longibrachiatum*) ANU₃-958。

(二) 试剂及仪器

1. 蔗糖糠: 约 40 目, 广州珠江纸厂提供。
2. 硫酸铵: 工业级, 购自广州氮肥厂。
3. 羧甲基纤维素钠 (CMC): 上海长虹塑料厂产品, 粘度 (pH6)0.3—0.6 Pa·s。
4. 滤纸: Whatman No.1。
5. 纤维素酶: “ONOZUKA R-10”, 纯

品 1 克及 10 克装, SERVA 公司商品。 “经
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

纤维素酶⁷，4克装，上海酒精二厂产品。均由华南师范大学生物系提供。

6. 冷冻离心机：美国 BECKMAN J-6B 型。

7. 72 型分光光度计：上海分析仪器厂生产。

8. 冷冻干燥机：美国 VIRTIS UNITOP 200 型。

(三) 培养基

1. 斜面培养基 (%)：麸皮 2.5，蔗糖 6， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2， KH_2PO_4 1， MgSO_4 0.05，琼脂 2，pH 6.0，121 °C 灭菌 30 分钟。

2. 产酶固体培养基 (%)：蔗糖 麸皮 = 6:4(重量比)， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1， KH_2PO_4 0.05， MgSO_4 0.025，水 2.2 倍，pH 6.0，121 °C 灭菌 30 分钟。

(四) 方法

1. 产纤维素酶长梗木霉培养：500ml 三角瓶中装入产酶固体培养基 75 克，接斜面菌种后于 28 °C 培养 144 小时。培养 72 小时后将固体曲翻动一次。

2. 纤维素酶粗提液制备：固体曲加入 7 倍重量蒸馏水，搅拌，浸提，120 目尼龙布过滤，滤液为酶粗提液。

3. 纤维素酶粉提取步骤及得率计算：酶粗提液用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀，搅拌，静置 12h，离心，收集沉淀少量醋酸盐缓冲液 (0.1mol/L pH5.0) 溶解，过 Sephadex G-25 柱，冷冻干燥

得纤维素酶粉。

$$\text{相对固体曲得率} = \frac{\text{所得纤维素酶粉重量}}{\text{固体曲绝干重量}} \times 100\%$$

4. 纤维素酶活力测定

(1) 羧甲基纤维素 (CMC) 酶活测定：DNS 法。0.5ml 适当稀释的待测酶液，加入 CMC 1.5ml。50 °C 酶解 30 分钟，加 DNS 试剂 3ml，终止反应。沸水浴 10 分钟。72 型分光光度计 530nm 波长测定光密度 OD 值。

(2) 滤纸糖酶活 (FP) 测定：参照 Mandels^[5]、蒋传葵^[6] DNS 法。1ml 适当稀释的待测酶液，加入 1ml 0.2mol/L (pH 4.5) 醋酸盐缓冲液和一条 $1 \times 6\text{cm}^2$ Whatman No.1 滤纸。50 °C 酶解 1 小时，加 DNS 试剂 3ml，终止反应，沸水浴 10 分钟。72 型分光光度计 530nm 波长测光密度 OD 值。

上述酶活单位均使用国际单位 (IU)，1 分钟水解生成 $1\mu\text{mol}$ 葡萄糖的酶量为 1 个国际单位^[4]。

5. 蛋白酶活力测定：Folin 试剂显色法^[7]。40 °C，pH 7.5 条件下，1 分钟分解酪蛋白产生 $1\mu\text{g}$ 酪氨酸的酶量为 1 个酶活单位 (u)。

结果与讨论

(一) 固体曲培养条件对酶活性影响

ANU₃-958 菌固体曲最适产酶条件为：28 °C，pH 6.0，1.0% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，麸皮：蔗糖 = 4:6，培养时间 144 - 168 小时 (表 1)。

表 1 培养时间对 ANU₃-958 菌酶活力影响

测定 \ 时间 (h)	72	96	120	144-168	192
生长	+	++	+++	++	+
FP 酶活 * (IU/ml)	0.039	0.065	0.084	0.12	0.072

* 1:9 酶粗提液测定结果

(二) 浸提液量对纤维素酶活性的影响

用蒸馏水浸提固体曲时，两者比例不同，酶的活性也不同 (表 2)。从单位酶活看，酶活大小分别为 1:5 > 1:7 > 1:9，但酶液的总活力却是 1:7 > 1:9 > 1:5。ANU₃-958 固体曲纤维素酶的

浸提比例选用 1:7 为宜。

(三) ANU₃-958 菌纤维素酶粉活性及得率

采用不同的处理方法共制得 4 批纤维素酶冻干酶粉，其活性及得率测定如表 3。用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀处理所得 A-1

表2 浸提流量与纤维素酶活性的关系

项目 * 浸提比例	固体曲 (g)	粗酶液 (ml)	酶活 (IU/ml)		总酶活 (IU)	
			CMC	FP	CMC	FP
1:5	9	36	6.78	0.21	244.08	7.56
1:7	9	54	5.63	0.17	304.02	9.18
1:9	9	72	3.49	0.12	251.28	8.64

* 指固体曲与蒸馏水重量体积比

A-2、A-3号酶粉，CMC及FP酶活远高于一次性沉淀所得A-4号酶粉。离心对纤维素酶具有纯化作用，但离心次数过多，酶活上升较

慢，得率却下降较快。从生产角度考虑，不一定合算。在酶制剂的开发和利用方面，提高酶活又不致得率降低过快值得进一步探讨。

表3 ANU₃-958 固体曲纤维素酶粉活力及得率

项目 纤维素酶	处理方式		CMC 酶活		FP 酶活		得率 (%)
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀(次)	离心 (次)	OD ₅₃₀	IU/g	OD ₅₃₀	IU/g	
A-1	2	2	0.349	1340.37	0.172	26.94	14.74
A-2	2	3	0.417	2018.52	0.276	57.04	14.14
A-3	2	4	0.332	2788.89	0.256	79.44	12.72
A-4	1	2	0.126	186.3	0.268	6.02	11.5

(四) ANU₃-958 菌纤维素酶粉与几种纤维素酶粉比较

几种纤维素酶粉有关特性及酶活测定结果见表4。溶解性方面，ANU₃-958与ONOUZUKA R-10酶粉均易溶于稀醋酸缓冲液，溶液淡黄透明。上海酒精二厂的纤维素酶粉仅溶解一部分，呈棕色混浊状。ANU₃-958与ONOUZUKA

R-10酶粉均呈砂色，上海酶粉呈棕色。对照表3可知，A-3酶粉比ONOUZUKA R-10 1克装酶粉CMC酶活高122.22IU/g，A-2与A-3酶粉比上海酶粉FP酶活分别高2.22IU/g和24.62IU/g。所以，在溶解性、色泽及CMC酶活等方面，958菌纤维素酶粉已接近或达到国外商品酶粉指标。

表4 几种纤维素酶粉性质及活力

项目 酶粉名称	产地	菌种	装量 (g)	等级	溶* 解性	CMC 酶活		FP 酶活	
						OD ₅₃₀	IU/g	OD ₅₃₀	IU/g
纤维素酶	上海酒精二厂	-	4	纯品	+	0.385	3792.59	0.267	54.82
ONOUZUKA R-10	SERVA	<i>Tr. viride</i>	1	纯品	+++	0.332	2666.67	0.226	104.58
ONOUZUKA R-10	SERVA	<i>Tr. viride</i>	10	纯品	+++	0.391	3081.48	0.278	127.01

* 指溶于稀醋酸缓冲液的能力

+ 溶解 - 部分 +++ 易溶

(五) 沉淀方式对 ANU₃-958 酶活及得率的影响

用(NH₄)₂SO₄分级沉淀法所得纤维素酶粉，其活性及得率均高于一次性沉淀法(表3)。

曲音波^[8]在纤维素酶提取时，采用一次性沉淀法。Wood^[9]则采用分级沉淀法。据张树政^[10]报道，提酶时可根据不同(NH₄)₂SO₄沉淀抽提物中酶的分布图收集酶活性高的中间部分，两

头沉淀物弃之。如果这样,分级沉淀与一次沉淀所得酶粉的酶活应该相差不远,而且应是一次沉淀法的酶粉得率更高。显然,在本研究中一次沉淀法所产生的大量沉淀物中,纤维素酶与蛋白酶、纤维素酶之间、纤维素酶与其他化合物之间可能发生作用^[9],形成了难溶复合物,纤维素酶蛋白的活性中心结构也有可能发生改变使酶失活。为此,我们将纤维素酶A-3及A-4酶粉最后一次 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀复溶后的不溶物分别收集冻干,进行分析(表5)。结果表明,一次沉淀

法最后复溶后不溶物比分级沉淀法最后复溶后不溶物,蛋白酶活高51.11%,CMC及FP酶活分别高188.47%和117.63%。证实在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 最后沉淀复溶后的不溶物中,确实存在着蛋白酶及未溶解的纤维素酶组分,而且一次沉淀法中的不溶纤维素酶组分远高于分级沉淀法中的不溶酶组分。其作用机制有待于更深一步的研究。这也表明,如果改进酶的提取方法,降低酶与酶、酶分子之间的相互作用,ANU₃-958菌的纤维素酶活力可进一步提高。

表5 最后一次 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀复溶后不溶物分析

项目 复溶后不溶物	蛋白酶活		CMC 酶活		FP 酶活	
	OD ₆₈₀	u/g	OD ₅₃₀	IU/g	OD ₅₃₀	IU/g
纤维素酶 A-3	0.143	2491.31	0.347	192.59	0.245	8.28
纤维素酶 A-4	0.200	3764.80	0.360	555.56	0.252	18.02

参 考 文 献

1. King K W and M I Vessal: *Advan. Chem. Ser.*, 95: 7-15, 1969.
2. Wood T M: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 5:111-137, 1975.
3. 志水一允 [日]: 发酵译丛, 3:86, 1987.
4. Wood W A and S T Kellogg: *Methods in enzymology* V.160, Biomass, Pt.A: Cellulose and hemicellulose, Academic Press, Inc. USA, 1988.
5. Mandels M et al.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 6:17, 1976.
6. 蒋传葵等: 工具酶的活力测定, 上海科学技术出版社, p.79-81, 1982.
7. 中山大学生物系生化微生物学教研室: 生化技术导论, 人民教育出版社, p.53, 1978.
8. 曲音波等: 微生物学报, 28(2):121-130, 1988.
9. Wood T M and S I McCrae: *Biochem. J.*, 128:1183, 1972.
10. 张树政等: 酶学研究技术 (上册), 科学出版社, p.21, 1987.

(1992-4-6 收稿)

STUDIES ON THE CELLULASE PRODUCTION AND EXTRACTION FROM *TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM*

Tan Hong Liu Shuhuan Li Jianying Guo Chusheng

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

The cellulase production and extraction from *Trichoderma Longibrachiatum* ANU₃-958 were reported. The results indicated that maximum enzyme activity can be obtained when the fungus was grown on a solid medium for 144 hours, the proportion between the solid culture and the extracting agent was about 1:7(W/V) and extract was precipitated twice by adding solid $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cellulase powder obtained by freeze drying was analysed for its related enzyme activities. The highest CMC and FPA enzyme activity are about 2788.89IU/g enzyme powder and 79.44IU/g enzyme powder respectively. The yield for the solid culture is about 13.28% averagely.

Key words *Trichoderma Longibrachiatum*; Cellulase