

绿色木霉对小球藻细胞壁的酶解作用

邢欢 许文宗 张志荣 钟韵山 李婕 徐仰仓*

(天津科技大学海洋科学与工程学院 天津市海洋资源与化学重点实验室 天津 300457)

摘要:【目的】探讨绿色木霉分泌液能否分解小球藻细胞壁。【方法】用海藻酸钠和氯化钙固定绿色木霉,将游离绿色木霉和固定化绿色木霉分别培养一段时间,离心培养液,用分光光度计法检测上清液中纤维素酶活性。在上清液中加入浓缩的小球藻悬浮液,用显微镜计数细胞壁破碎的小球藻。【结果】绿色木霉能同时分泌内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶及 β -1,4 葡萄糖苷酶 3 种纤维素酶,其中外切葡聚糖酶活性最高。固定化绿色木霉反复使用 5 次后,分泌的纤维素酶活性能保持到初次的 67.4%。市售纤维素酶、游离绿色木霉、固定化绿色木霉初次及第 5 次分解小球藻细胞壁的效率分别为 47.3%、86.5%、81.5%、52.1%。【结论】市售纤维素酶、游离绿色木霉、固定化绿色木霉都能分解小球藻细胞壁,其中固定化绿色木霉因可重复使用,具有潜在的应用前景。

关键词: 小球藻细胞壁, 酶解, 绿色木霉, 纤维素酶, 固定化

Effect of *Trichoderma viride* on resolving cell wall of *Chlorella*

XING Huan XU Wen-Zong ZHANG Zhi-Rong ZHONG Yun-Shan LI Jie
XU Yang-Cang*

(College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, Tianjin 300457, China)

Abstract: [Objective] We studied the effect of *Trichoderma viride* on resolving *Chlorella* cell wall. [Methods] The cell wall of *Chlorella* was resolved by the secretion from free *T. viride* or immobilized *T. viride* in sodium alginate and calcium chloride. The activity of cellulases secreted by free *T. viride* or immobilized *T. viride* was determined by spectrophotometry. [Results] Cell wall of *Chlorella* was resolved by 86.5% by the secretion of free *T. viride*, 34.3% higher than that by cellulases R-10 containing only β -glucosidase. Compared to cellulases R-10, *T. viride* secretion contained three cellulases, namely, endo-glucanase, exo-glucanase and β -glucosidase. This was probably the reason why *T. viride* secretion had higher rate of resolving cell wall. Immobilized *T. viride* could be used repeatedly at least 5 times. The rate of resolving *Chlorella* cell wall by immobilized *T. viride* in the first time and the fifth time was 81.5% and 52.1% respectively. [Conclusion] Cell wall of *Chlorella* can be

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金项目(第 44 批); 天津市科技兴海项目(No. KJXH2012-14); 天津科技大学大学生实验室创新基金项目(No. 1333A116)

*通讯作者: Tel: 86-22-60601458; 信箱: xuyc@tust.edu.cn

收稿日期: 2014-08-27; 接受日期: 2014-11-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-12-26

resolved by the secretion both from free *T. viride* and immobilized *T. viride*.

Keywords: *Chlorella* cell wall, Enzymolysis, *Trichoderma viride*, Cellulases, Immobilization

小球藻(*Chlorella* sp.)是一种普生性单细胞绿藻,含有丰富的蛋白质、糖类及脂肪,其中不饱和脂肪酸的含量较高,且含有二十二碳六烯酸(DHA)^[1]。另外,小球藻还具有特殊的功能成分——小球藻活性生长因子(CGF)^[2],CGF具有抗衰老、活化人体细胞、激活淋巴细胞、增强巨噬细胞吞噬能力,有效抑制变异癌细胞的生长、增强机体的免疫能力,抵抗外来病毒入侵;减轻因药物等有机物、铅、砷、汞等重金属造成的毒害等功能^[3]。我国养殖的小球藻主要有:普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)、椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)和蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)。不论哪种小球藻,细胞壁均非常坚硬,对其有效破壁一直是个难题^[4-5]。小球藻虽然营养丰富,若细胞壁不破碎,其有效成分难以获取,应用价值因此而受到影响。目前,破碎小球藻细胞壁的方法主要为物理法,如研磨法、机械匀浆法、交替冻融法、超声波破碎法、高压均质法^[6]。这些方法或因破壁效率不高、或因破壁时间较长、或因破壁过程中高温对细胞活性物质的损害等原因,在实际应用中受到了不同程度地限制^[7]。小球藻细胞壁的主要成分是纤维素,若能将纤维素分解,则细胞壁也将被破碎。分解纤维素最有效、最温和的催化剂是纤维素酶。绿色木霉是自然界分泌纤维素酶最强的真菌之一^[8]。本文研究了绿色木霉分泌物对小球藻细胞壁的酶解作用。

1 材料与方法

1.1 材料

小球藻(*Chlorella vulgaris*)由本研究室保存。绿色木霉(*Trichoderma viride* AS3.3711)购自中国科学院微生物研究所。纤维素酶 R-10 是 Japan Yakul 公司的产品。

SE 培养基(g/L): NaNO_3 0.250, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075, K_2HPO_4 0.075, KH_2PO_4 0.175, NaCl 0.025, FeSO_4 0.050。

发酵培养基(g/L): 麸皮 10.0, KH_2PO_4 0.2, CaCl_2 0.5, MgSO_4 0.2, 尿素 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5。

1.2 方法

1.2.1 小球藻的培养: 在 25 mL 三角瓶中配制 SE 培养基 150 mL, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 冷却后接入小球藻,然后置于 25 °C、光强 3 000 lx、光周期 14:10 (L/D)的条件下 125 r/min 摇床培养。

1.2.2 绿色木霉的培养: 把活化后的菌种接入发酵培养基。28 °C、125 r/min 摇床培养。

1.2.3 绿色木霉的固定化: 采用海藻酸钠-氯化钙法^[9]。把活化的绿色木霉,加入到无菌的海藻酸钠溶液中,混匀后,用针管吸取该溶液,滴入氯化钙溶液中,不断晃动,形成凝胶珠,将该凝胶珠放在 4 °C 保存。

1.2.4 纤维素酶总活性的测定: 参照张振清^[10]的方法,略加改动。将滤纸剪成条,放入试管底部,加入 2.0 mL 绿色木霉分泌液,50 °C 反应 60 min 后,加入 3.0 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS),沸水浴中 10 min。取出后测定 540 nm 处的吸光值。酶活力单位定义:在上述条件下每分钟催化底物产生 1 μmol 还原糖所需要的酶量为一个酶活单位(U)。

1.2.5 β -1,4 葡萄糖苷酶(CB)活性的测定: 参照王志江等^[11]的方法,略加改动。在 1 mL 对硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷溶液中加入 100 μL 酶液,50 °C 反应 10 min,加入 2 mL 1 mol/L 碳酸钠水溶液终止反应。测定 400 nm 处吸光度。根据对硝基苯酚的生成量计算酶活性。酶活力单位定义:在上述条件下,每分钟催化底物产生 1 μmol 对硝基苯酚所需酶量为 1 U。

1.2.6 外切葡聚糖酶(CI)活性的测定: 参照康纪婷等^[12]的方法,略加改动。反应体系包括:酶液 0.5 mL、5%微晶纤维素悬浊液 1.0 mL、缓冲液 0.5 mL、DNS 试剂 1.5 mL,540 nm 处测吸光度,根据还原糖的生成量计算酶活性,酶活力单位定义同 CB。

1.2.7 内切葡聚糖酶(C_X)活性的测定: 采用 CMC 法^[13-14], 反应体系包括: 酶液 0.5 mL, 1%羧甲基纤维素钠柠檬酸-柠檬酸钠溶液 1.0 mL, 缓冲液 0.5 mL, DNS 试剂 1.5 mL, 540 nm 处测吸光度, 根据还原糖的生成量计算酶活性, 酶活力单位定义同 CB。

1.2.8 小球藻破壁率的计算: 取破壁反应后的小球藻悬浮液, 在 BA210 生物显微镜的油镜下观察细胞壁的破损程度, 细胞壁破损面积大于 1/4 者视为破壁的细胞。

$$\text{小球藻破壁率} = \frac{\text{破壁的细胞}}{\text{所有细胞}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 游离绿色木霉对小球藻细胞壁的酶解作用

取游离绿色木霉发酵液的上清液 25 mL (含 0.25 U 的 β -葡萄糖苷酶)和纤维素酶 R-10 溶液 25 mL (仅含 β -葡萄糖苷酶, 活性为 0.25 U), 分别加入 1.0 mL 小球藻浓缩悬浮液(1×10^{10} 个细胞/mL)。反应 3 h 或 6 h 后计算小球藻细胞壁的破碎率。随着反应时间的延长, 游离绿色木霉和纤维素酶 R-10 分解小球藻细胞壁的效率均提高, 6 h 时, 游离绿色木霉的分解效率为 86.5%, 明显高于纤维素酶 R-10, 前者的分解效率是后者的 1.8 倍(图 1、2)。

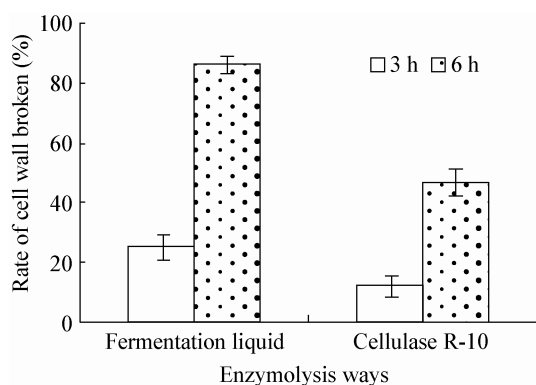


图 1 游离绿色木霉发酵液与纤维素酶 R-10 酶解小球藻细胞壁的差异

Figure 1 The difference in enzymolysis cell wall of *Chlorella* by free *Trichoderma viride* fermentation liquid and cellulase R-10

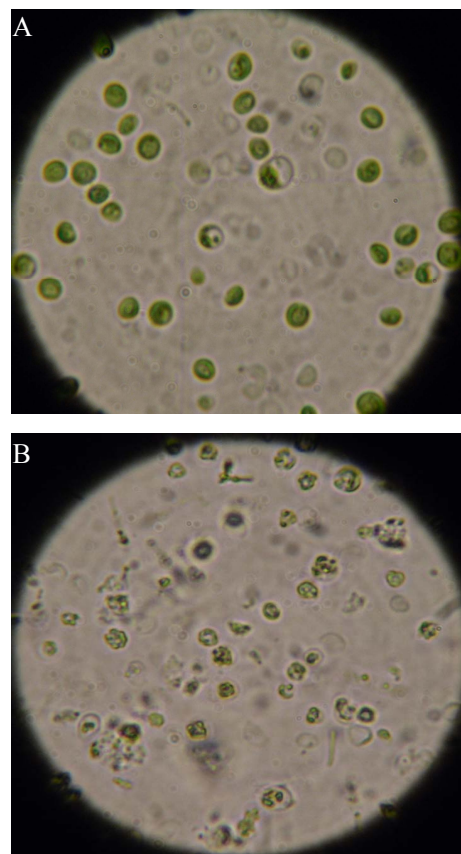


图 2 酶解前后的小球藻细胞

Figure 2 The *Chlorella* cell before and after enzymolysis

注: A: 酶解前; B: 酶解后。

Note: A: Before enzymolysis; B: After enzymolysis.

2.2 绿色木霉培养液各种纤维素酶的酶活测定

图 1 的实验结果发现绿色木霉发酵液破碎小球藻细胞壁的效率明显高于具有同等 β -葡萄糖苷酶活性的纤维素酶 R-10。为了探究原因, 我们检测了绿色木霉分泌的其它纤维素酶。图 3 显示的是 25 mL 绿色木霉培养液中各种纤维素酶及其活性的变化, 绿色木霉能够分泌内切葡聚糖酶(C_X)、外切葡聚糖酶(C_1)和 β -葡萄糖苷酶(C_B) 3 种纤维素酶, 其中 C_1 活性最高, C_B 活性最低。随着绿色木霉培养时间的延长, 培养液中各酶活性均增高, 但增幅各不相同, 96 h 时 C_B 活性比 24 h 时仅提高了 1.8 倍, 而 C_1 活性和 C_X 活性却分别提高了 4.6 倍和 4.0 倍。96 h 后各种纤维素酶活性增长速率变缓(数据略)。

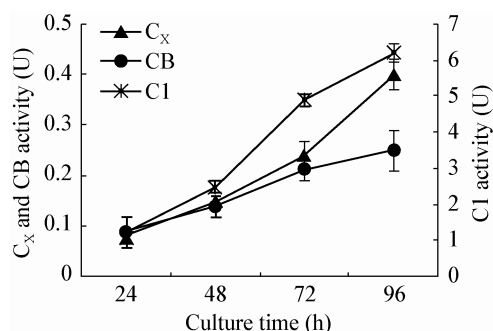


图3 不同培养时间下绿色木霉分泌纤维素酶能力的变化

Figure 3 The activity variation of cellulases produced by *Trichoderma viride* during different culture time

2.3 固定化绿色木霉分泌纤维素酶的特性

图1与图2的实验结果表明绿色木霉分泌液酶解小球藻细胞壁的效率高于市售纤维素酶,但绿色木霉若不能反复使用,其在实践中的应用价值也不高。为此,我们对绿色木霉进行了固定化。把活化后的绿色木霉加入到无菌的3.5%的海藻酸钠溶液中,混匀后用针管吸取该溶液,滴入2.5%的CaCl₂溶液中,不断晃动,25℃下固定3h。将固定化后的凝胶小珠放在发酵培养液中培养96h,之后取出凝胶珠放在另一发酵培养液中继续培养,同时检测前一发酵液中纤维素酶的活性。以此类推,共培养和检测5次,即5个周期。图4是 6×10^9 个游离绿色木霉和 6×10^9 个固定化绿色木霉在不同培养周期内分泌的纤维素酶活性。在第1培养周期,游离绿色木霉分泌的纤维素酶活性高于固定化绿色木霉分泌的酶活性,前者是后者的1.24倍,但因游离绿色木霉只能培养一次,因此只可检测一次酶活性。随着培养周期的增多,固定化绿色木霉分泌纤维素酶的能力缓慢地降低,第5培养周期时,发酵液中纤维素酶的总活性是第1周期的67.4%,是游离绿色木霉的54.4%。

2.4 固定化绿色木霉对小球藻细胞壁的酶解作用

将固定化的绿色木霉凝胶小株放在发酵培养液中连续培养5个周期,4℃、1200 r/min离心每个周期的发酵液,分别取25 mL上清液添加到1 mL

小球藻浓缩悬浮液(1×10^{10} 个细胞/mL),6h后测定小球藻细胞壁的破碎率。如图5所示,第1个培养周期小球藻细胞壁的破碎率为81.5%,破壁程度是游离绿色木霉的94.2%,是市售纤维素酶的1.72倍。随着培养周期的增多,固定化绿色木霉发酵液的酶

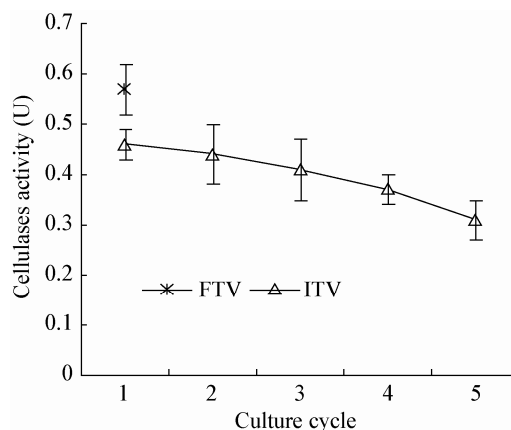


图4 游离和固定化的绿色木霉在不同培养时期分泌纤维素酶活性的差异

Figure 4 The difference in the activity of cellulases produced by free *Trichoderma viride* and immobilized *Trichoderma viride* during different culture cycle

注: FTV: 游离绿色木霉; ITV: 固定化绿色木霉.

Note: FTV: Free *Trichoderma viride*; ITV: Immobilized *Trichoderma viride*.

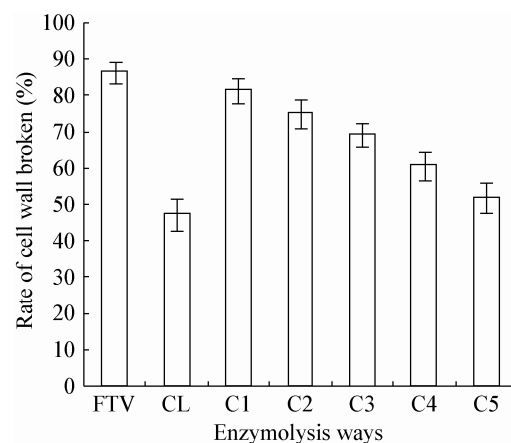


图5 不同来源的酶液对小球藻细胞壁的分解作用

Figure 5 The effect of enzyme solution from different source on resolving cell wall of *Chlorella*

注: FTV: 游离绿色木霉; CL: 纤维素酶; C1-C5: 培养周期.

Note: FTV: Free *Trichoderma viride*; CL: Cellulases; C1-C5: Culture cycle.

解能力逐渐降低,但仍高于市售纤维素酶的酶解能力,第5周期时,固定化绿色木霉发酵液破碎小球藻细胞壁的效率为52.1%,是市售纤维素酶的1.1倍。

3 讨论与结论

小球藻含有丰富的营养物质,是国家药监局批准的新资源食品^[15]。小球藻具有很好的保健作用和药理作用,具有降血压、降血脂、增强免疫力、抗氧化、抗肿瘤、解毒、抗辐射、防治胃溃疡和溃疡性大肠炎等各种炎症的功能^[3]。现已广泛用作保健食品的原料。但是小球藻细胞壁十分坚韧,若不破碎则细胞内的营养物质难以释放,因此破壁成了小球藻产业发展的瓶颈。我们的研究结果表明市售的纤维素酶在室温下能将近50%的小球藻细胞壁分解(图1),说明用纤维素酶分解小球藻细胞壁具有潜在的应用可能。市售的纤维素酶仅含有CB酶,而绿色木霉能同时分泌C1、C_x及CB三种纤维素酶(图3)。有研究报道,纤维素在3种纤维素酶“C1、C_x和CB”的密切配合下才能彻底分解为葡萄糖^[16-18],这可能是绿色木霉分泌物分解小球藻细胞壁的效率高于市售纤维素酶的原因所在。虽然绿色木霉能分泌3种纤维素酶,但三者所占的比例各不相同。C1占总活性的90.5%,CB仅占3.6%(图3),而绿色木霉分泌物却能将80%以上的小球藻细胞壁破碎,说明就破碎细胞壁而言,3种纤维素酶混合液中CB不是限制因子。C1破坏纤维素的结晶结构,作用于不溶性纤维表面,使纤维素结晶链开裂,长链纤维素分子末端部分游离和暴露,使纤维素易于水化,经C1酶作用后的纤维素分子结晶结构已经被破坏,C_x酶即吸附在纤维素分子上面,从键的内部任意位置切开 β -1,4-糖苷键,将纤维素分子断裂为纤维二糖和纤维三糖等^[18]。这就意味着在上述两种酶的联合作用下,小球藻细胞壁上的纤维素已被分解成纤维二糖和纤维三糖,不论后者是否进一步被分解为葡萄糖,细胞壁已被破碎成各种形状的小片。

虽然游离绿色木霉能高效破碎小球藻细胞壁,但游离绿色木霉不能反复使用限制了其在生产中的应用。我们用海藻酸钠和氯化钙将绿色木霉固定成直径约0.5 cm的凝胶小珠,小珠内的绿色木霉不断向外分泌纤维素酶,同时可根据反应需要随时将凝胶小珠取出,这使绿色木霉的反复使用成为可能。研究发现固定化的绿色木霉重复使用5次后纤维素酶总活性还能保持到期初的67.4%(图4),破碎小球藻细胞壁的效率仍高于市售纤维素酶(图5)。说明利用固定化绿色木霉破碎小球藻细胞壁可以降低成本。随着重复使用次数的增多,固定化的绿色木霉分泌酶和破碎小球藻细胞壁的能力均呈递减趋势(图4、5)。可能因为绿色木霉呼吸放出的CO₂使凝胶小珠的pH降低,而海藻酸钠和氯化钙形成的海藻酸钙沉淀在低的pH下易分解,导致部分绿色木霉进入培养液而丢失。综上所述,本实验发现绿色木霉能分解小球藻细胞壁;绿色木霉固定化后可以反复用来破碎小球藻细胞壁,具有产业化的前景。

参考文献

- [1] Chen XQ, Su YC. The research progress of *Chlorella* for application[J]. Biology Teaching, 2012, 37(1): 8-9 (in Chinese)
陈晓清, 苏育才. 小球藻的应用研究进展[J]. 生物学教学, 2012, 37(1): 8-9
- [2] Han SQ, Zhang ZH, Liu HQ. The physiological function research on *Chlorella* growth factors[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2003(5): 99-101 (in Chinese)
韩士群, 张振华, 刘海琴. 小球藻生长因子的生理功能研究[J]. 江苏农业科学, 2003(5): 99-101
- [3] Mindell. The *Chlorella* with broken cell wall defending doctor for people[J]. World Health, 2004(6): 28 (in Chinese)
敏德. 破壁小球藻人类健康的守护医生[J]. 养生大世界, 2004(6): 28
- [4] Doucha J, Livanský K. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(3): 431-440
- [5] Zheng HL, Yin JL, Gao Z, et al. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 164(7): 1215-1224
- [6] He K, Zhang XY, Li YF. The technology of broken cell wall and making algae tablets for *Chlorella*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(2): 147-151 (in Chinese)
何扩, 张秀媛, 李玉峰. 小球藻破壁技术及其藻片研制[J]. 食品工业科技, 2006, 27(2): 147-151

- [7] Zhong YS, Xu YC, Jin BL, et al. Research advances on *Chlorella* cell-breakage technology[J]. Food Research and Development, 2014, 14(7): 120-124 (in Chinese)
钟韵山, 徐仰仓, 荆柏林, 等. 小球藻破壁技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 14(7): 120-124
- [8] Wang JR, Zang MF, Huang T. Study on the structure of cellulase CBHII gene of *Trichoderma viride*[J]. Journal of Genetics and Genomics, 1995, 22(1): 74-80 (in Chinese)
王建荣, 张曼夫, 黄涛. 绿色木霉纤维素酶 CBHII 基因的结构研究[J]. 遗传学报, 1995, 22(1): 74-80
- [9] Liu Y, Gao H, Fan TT. Study on *Trichoderma viride* immobilization in sodium alginate[J]. Food Science, 2007, 28(12): 319-322 (in Chinese)
刘颖, 高晗, 范婷婷. 海藻酸钠包埋法固定化绿色木霉的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 319-322
- [10] Zang ZQ. The calculation equation of the cellulase activity[J]. Plant Physiology Communications, 1980, 12(3): 69-73 (in Chinese)
张振清. 纤维素酶活力的计算方程[J]. 植物生理学通讯, 1980, 12(3): 69-73
- [11] Wang ZJ, Wei HF. Study on the β -glucosidase[J]. Feed Industry, 2006, 27(22): 20-22 (in Chinese)
王志江, 魏红福. β -葡萄糖苷酶的研究[J]. 饲料工业, 2006, 27(22): 20-22
- [12] Kang JT, Wu X, Gan BC, et al. Determination methods of cellulase activity[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2010, 14(4): 151-153 (in Chinese)
康纪婷, 吴翔, 甘炳成, 等. 纤维素酶活力测定方法[J]. 河北农业科学, 2010, 14(4): 151-153
- [13] Wood TM, McCrae SI. Purification and some properties of $\alpha(1\rightarrow4)$ - β -D-glucan glucohydrolase associated with the cellulase from the fungus *Penicillium funiculosum*[J]. Carbohydrate Research, 1982, 110(2): 291-303
- [14] Child JJ, Eveleigh DE, Sieben AS. Determination of cellulase activity using hydroxyethylcellulose as substrate[J]. Canadian Journal of Biochemistry, 1973, 51(1): 39-43
- [15] Ministry of Health of the People's Republic of China. On the approval of *Chlorella pyrenoidosa* and other 4 kinds of new resource food notice[Z]. China Food Additives, 2013(1): 227-228 (in Chinese)
中华人民共和国卫生部. 关于批准蛋白核小球藻等4种新资源食品的公告[Z]. 中国食品添加剂, 2013(1): 227-228
- [16] Reese ET, Siu RGH, Levinson HS. The biological degradation of soluble cellulase derivatives and its relationship to the mechanism of cellulase hydrolysis[J]. Journal of Bacteriology, 1950, 59(4): 485-497
- [17] Enari TM, Niku-Paavola ML. Enzymic hydrolysis of cellulose: is the current theory of the mechanisms of hydrolysis valid?[J]. CRC Critical Reviews in Biotechnology, 1987, 5(1): 67-87
- [18] Chi YQ, Huang K. Research progress on method for determination of cellulase activity[J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2010(24): 32-34 (in Chinese)
池雅琴, 黄奎. 纤维素酶活力测定方法研究进展[J]. 现代农业科技, 2010(24): 32-34

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本刊编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。