

工业纤维素酶的测定和比较

冯 马

(化学工程系)

摘要 以CMC,滤纸和纤维二糖等作底物,用大量实验测定了纤维素酶活力。研究了产物浓度随时间的变化关系和稀释倍数对测定的影响。9种工业酶制剂的测定和比较结果表明:只有诸活力的综合测定方能全面地反映酶制剂对纤维素的作用。

关键词 纤维素酶;活力测定;FPase;CMCase;纤维二糖酶

0 引言

自然界每年通过光合作用合成大量的生物质(biomass),其中约三分之一为纤维素。将纤维素转变为可发酵糖的唯一现实途径是酶水解,因此,强有力的工业纤维素酶是各国科技工作者的一个重要研究目标。

自60年代以来,一些世界著名的酶制剂公司相继推出了工业纤维素酶。它们大多来源于*T. viride*和*T. reesei*,少数来源于*A. niger*,其性能可有很大的差异,酶的用户自然对该公司产品的活力及其比较感兴趣。

然而,生产商提供的信息常常不足以进行可靠的比较。一方面,并非所有厂家均提供关于酶活力定义及其测定方法的详细资料。另一方面,各公司往往采用不同的酶活力单位,它们之间常常是不可换算的。国际生物化学协会酶委员会曾规定了统一的单位,但由于种种原因,它尚未成为普遍采用的标准。酶活力单位定义的不同首先来源于各工业部门对酶有不同的要求和衡量标准,其次来源于各公司用不同的方法测定活力^[2]。

纤维素酶是一类酶的总称,而非单一的酶。目前在各酶对纤维素的作用机理上,特别是对C₁-C_x酶假设尚有争议^[7]。不过,下述四种酶的存在是众所公认的:(1)内切 β -1,4-葡聚糖酶(endo- β -1,4-glucanase,EC3.2.1.4)。(2)外切 β -1,4-葡聚糖酶(exo- β -1,4-glucanase,EC3.2.1.74)。(3)纤维二糖水解酶(cellobiohydrolase,EC3.2.1.91)。(4)纤维二糖酶(cellobiase,EC3.2.1.21)。其中纤维二糖水解酶又有内切和外切之分。所谓的C_x酶,系指(1)和(2)。而C₁酶则被认为是(3)^[1,4]。图1表示这几种酶的作用位置。

收稿日期:1994-01-13

另外,还有二种酶也可降解纤维素,但人们对这二种酶的作用研究较少。它们是纤维素裂解酶(cellulose lyase)和 β 葡聚糖酶(β -glucanase)。

现在已可用先进的手段将上述几种酶分离,然后分别测活力。可是这样的测定只是定性或半定量的。首先,分离难达完全且难免有活力损失。再者,各酶之间的协同作用不易测定。因此,测得的活力与酶对纤维素的作用效果之间并无等价关系。

因此,目前仍采用测总活力的方法。分为测糖化力和液化力二类方法。前者测定产物中还原基团浓度并将其表为葡萄糖;后者测定体系粘度等物理量,但仅得到一个相对值。

常用于纤维素酶测定的底物有CMC、Avicel和滤纸等。用CMC测得的主要是内切酶EC 3.2.1.4,习惯上称为CMCase。用滤纸或Avicel测得的是各种酶作用的总效果。滤纸是较纯的纤维素,其中相当部分呈结晶态,测得的活力称FPase。Avicel的结晶度较少,测得的活力称Avicelase。另一种较纯的纤维素——棉花,结晶度较高,较少用作测定底物。

笔者从NOVO, Gist-brocades, Solvay, Rohm, Genecor等著名的酶公司获得了多种工业纤维素酶,并对它们的活力作了测定和比较。为维护各公司的商业利益,一律用代号表示这些酶制剂。

1 材料与方方法

所有的底物均用0.1mol HAc-NaAc缓冲溶液制备,pH调至5.0。酶制剂亦用此缓冲液稀释。

用Nelson-Somogyi法测还原糖含量,标准曲线用葡萄糖绘制,浓度范围为0~200 $\mu\text{g/ml}$ 。

1.1 Avicelase 活力测定

使4ml 0.5g/l的Avicel(Fluka)溶液与0.1ml酶溶液在50℃水浴中反应,至一定时间后加入0.1mol NaOH溶液使反应停止,然后测还原糖含量。

1.2 FPase 活力测定

将一片2×2cm的Whatman 1号滤纸放入4ml缓冲溶液中,加入0.2ml酶溶液,在50℃水浴中反应。至预定时间后放入100℃水浴中停留10min,然后在3200G下离心分离5min,取其清液测还原糖。

1.3 CMCase 活力测定

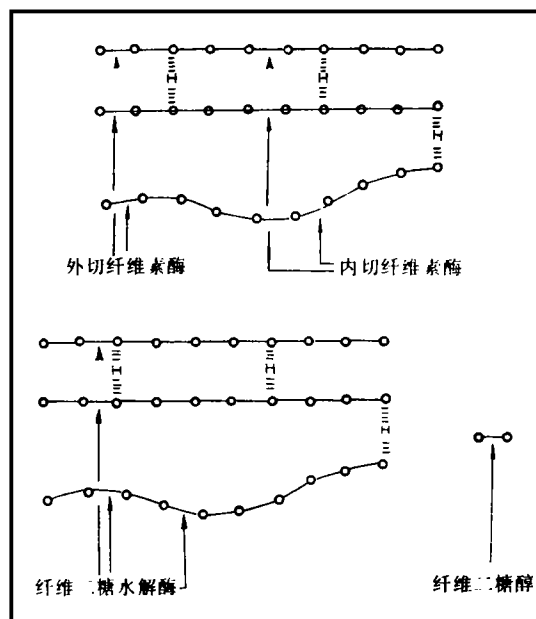


图1 各种纤维素酶的作用部位

使 5ml 1% (W/V) 的 CMC (Sigma) 溶液与 0.25ml 酶溶液在 50℃ 水浴中反应。至预定时间后移入 100℃ 水浴停留 10min, 然后测还原糖。

1.4 纤维二糖酶活力测定

使 5ml 20g/L 的纤维二糖 (Sigma) 溶液与 0.1ml 酶溶液混合, 在 50℃ 水浴中反应。至一定时间后移入 100℃ 水浴中停留 10min. 用 Boehringer 酶法和 YSI 葡萄糖计分别测葡萄糖浓度。

2 结果与讨论

本研究将测定 pH 定在 5.0, 温度定在 50℃, 均在常见纤维素酶的适宜工作范围内, 且与多数酶公司采用的测定条件相符。酶的活力单位一律定义为在测定条件下每分钟产生相当于 1μmol 葡萄糖的还原糖量所需的酶量。这个单位可以很方便地换算成国际单位 (相当于 16.7nKatal)。

2.1 CMCase 活力

一般认为 EC 3.2.1.74, EC3.2.1.91 和 EC 3.2.1.21 对 CMC 基本不起作用^[5]。但由于测还原基团, 故只能认为 CMCase 主要代表了内切纤维素酶 EC. 3.2.1.4 活力, 因为外切纤维素酶 EC 3.2.1.74 也有作用^[6], 尽管可能不占主要地位。内切纤维素酶的作用类似于淀粉水解中的液化酶。因此有人认为测粘度下降较能代表该酶的作用, 不足的是只得到相对值。笔者认为这二种测定是互相补充的。

测定的反应时间分别为 10, 20 和 30min, 用线性回归法, 从还原糖一时间关系的斜率计算活力, 以保证测定时间处在动力学线性区。

表 1 列出 9 种被测酶制剂的活力。就 CMCase 而言, 可分为三类比较。

表 1 工业酶制剂的活力比较

代号	CMCase	FPase	纤维二糖酶	Avicelase
A	1133	14	22	21
B	1658	12	7	—
C	200	83	84	—
D	1350	84	237	—
E	881	18	113	—
F	1050	16	—	—
G	1269	17	174	—
H	886	13	43	—
I	539	5	—	—
J	—	—	1055	—

活力单位: u/ml 或 u/g

前三种酶为一类, 它们均作为工业纤维素酶出售。可以看出酶 C 的 CMCase 活力大大低于其余二种酶, 而酶 B 则是三种酶中 CMCase 活力最高的。

酶 D. E. G. H. I 为另一类。它们是作为植物细胞壁液化酶出售的 (其中酶 D 也同时作为

纤维素酶出售)。植物细胞壁由多种多糖类碳水化合物组成,其中纤维素约占三分之一。细胞壁的水解(液化)既需要强有力的纤维素酶,也需要能水解其他多糖的酶,特别是果胶酶和半纤维素酶。而且各种酶的比例是非常重要的。不难看出,酶 D 和 G 的 CMCase 活力亦较高;而酶 E H 和 I 的活力则较低,尤以酶 I 为最低。

酶 F 为 75% 酶 A 和 25% 酶 J 的混合物,而酶 J 则是一种较纯的纤维二糖酶。然而其 CMCase 活力并不等于酶 A 的 75%,而是高于 75%。这一结果可用二个原因来解释。一是反应速度与酶浓度不成正比。二是纤维二糖是纤维素酶的强抑制剂,故酶 J 的存在有助于使纤维素酶的活力更有效地发挥。

测定时,将各酶制剂稀释了 200 倍。既然反应速度不正比于酶浓度,那么稀释倍数对测定就有不可忽视的影响。这一影响将在下文中讨论。

实际上,酶 E 中含 40% 的酶 F,其活力亦高于此比例。除了以上所列的原因外,在其余的 60% 中亦含有一定的纤维素酶活力。

测定结果可得到二点重要结论:

1) 所用的测定方法能够将各种酶制剂的 CMCase 活力大小加以比较。所得活力数值间有足够的差别,使这一比较有实质意义。

2) 对于 5 种植物细胞壁液化酶,用甜菜、菊芋、洋姜等块根进行的水解试验显示酶 E 为效果最佳者。从 CMCase 测定结果看,除酶 I 外其余诸酶均不是由于缺乏 CMCase 而导致液化效果欠佳。

2.2 FPase 活力

滤纸试验是纤维素酶测定的经典方法之一。其优点是滤纸的物理状态较接近于天然纤维素,故根据滤纸试验结果在工业上应用时较可靠。滤纸试验方法有多种,有的测滤纸崩溃所需时间,有的测崩溃后物系的粘度等物理量。本研究采用测还原基团的方法。

由反应速度计算酶活力时,要求动力学关系(还原基团浓度随时间的变化关系)为一直线。为验证所用的测定方法保证这一线性关系的成立,选择了酶 A,作不同倍数的稀释,测得的动力学曲线见图 2。尽管实验点数不多,但线性关系的存在还是显而易见的。在其他稀释倍数下所得结果与此基本相似。图中直线系用线性回归法获得,一般不经过原点,从其斜率可计算活力。如果测定时只取一点,实际上即假设直线通过原点和该测定点。显然,测得的活力数值是大不相同的。二者相比,测动力学曲线当能更全面地反映反应的特性。

不同稀释倍数下测得的酶活力是不同的(见图 3)。从理论上说,当稀释倍数很大时,亦即底物浓度远大于酶浓度时,反应速度应与酶浓度成正比。换言之,酶活力与稀释倍数无关。从图 3 看这一条件尚未满足。稀释倍数过大,会使误差加大。图 3 指出在稀释 100 倍左右时测得的酶活力最高。图中数据曾经重复试验所证实,因而是可信的。不过,这一结论似乎只对特定的酶成立。对酶 D 也作了测定,但未能归纳出规律。可能是由于反应时间对此酶而言已太长之故。

由此可知,对一未知酶制剂,较可靠的办法是在若干不同稀释倍数下测其活力,方可较全面地了解其特性。而且不可能确定一个统一的稀释倍数,使各种酶的活力值均达最大。于是,决定在不稀释的条件下测定,其结果亦列于表 1 中。

在三种纤维素酶(酶 A、B 和 C)中,酶 C 表现出很高的 FPase 活力。然而实验中观察到用酶 C 作测定时滤纸被分解的程度最低,而其余二种酶则可将滤纸分解成糊状。综合 CM-

Case 和 FPase 的测定结果,可以认为酶 A 和 B,尤其是酶 B,含较多的内切酶,而酶 C 则含较多的外切酶。

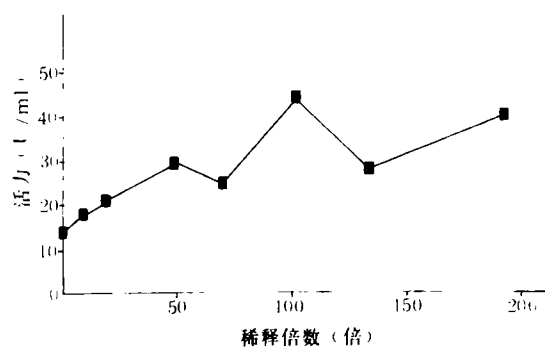
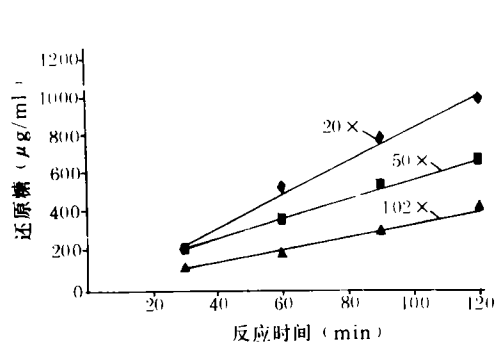


图 2 不同稀释倍数下酶 A FPase 测定时的动力学

图 3 稀释倍数对酶 A 的 FPase 活力测定的影响

在 5 种植物细胞壁液化酶中,酶 D 的 FPase 活力遥遥领先。实验观察指出它与酶 C 一样,滤纸被分解的程度也是较低的。不同的是它的 CMCase 活力也是较高的。由此可以认为这种酶所含的内切酶和外切酶活力之间有很好的平衡。至于其他液化酶,除酶 I 的 FPase 活力较低外均相差无几。

有趣的是,尽管酶 F 中仅含 75% 的酶 A,其 FPase 活力反而高于酶 A。这充分说明了纤维二糖酶的重要性。

上述测定结果证实了所谓 C_1 酶的重要性。酶 D 既不缺乏内切纤维素酶 EC 3.2.1.4., 又不缺乏外切纤维素酶 EC 3.2.1.74,是什么原因使其滤纸液化力低呢?最顺理成章的解释是它缺乏能作用于结晶纤维素的酶,亦即 C_1 酶。从文献报道的研究看,这种 C_1 酶就是纤维二糖水解酶 EC 3.2.1.91,因为唯有它能作用于结晶纤维素。

2.3 纤维二糖酶活力

纤维二糖酶的作用与淀粉水解中的糖化酶类似,不同的是它对小分子量底物表现出较高的活力。其活力测定因可得到纯底物—纤维二糖而较为简单。本研究中用二种方法测葡萄糖浓度,所得结果一致。其中葡萄糖计用一由葡萄糖氧化酶制成的电极测定葡萄糖浓度,既快速又准确。测定时反应时间取为 10, 20 和 30min。从动力学曲线(葡萄糖浓度 vs. 时间)的形状看,有三种类型:

1) 动力学为一通过原点的直线。具有此特征的有酶 C 和 J。后者为诸制剂中唯一的纤维二糖酶。酶 C 的动力学直线见图 4。

2) 动力学为一不通过原点的直线。此时仍可用线性回归法通过直线的斜率计算活力,但不计入原点。属于此类的酶有酶 D、E、G 和 H。图 5 为酶 D 的动力学直线。

3) 酶 A 和 B 的纤维二糖酶活力很低。虽然也可勉强归纳出一直线,但准确度不高。很明显,这二种酶制剂中缺乏纤维二糖酶。

各酶制剂的纤维二糖活力亦列于表 1 中。与酶 J 相比,其他酶的纤维二糖酶活力均低得多,尤以酶 A 和 B 为甚。酶 E 中含 10% 的酶 J 和 30% 的酶 A,其活力符合这个比例。这里由

于底物单一,其他酶已不起作用。

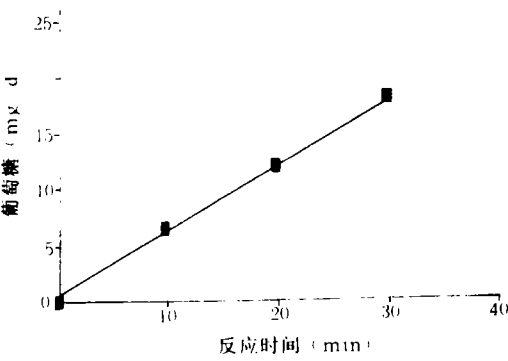


图4 酶C的纤维二糖酶测定动力学

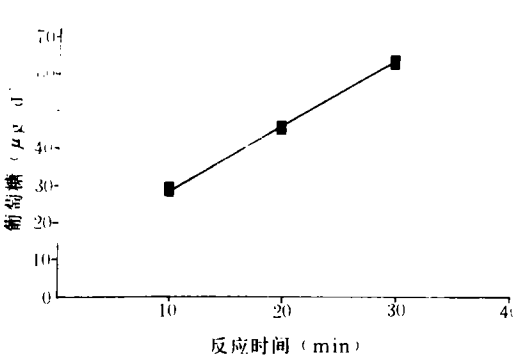


图5 酶D的纤维二糖酶测定动力学

在诸液化酶中数酶D的活力最高。结合FPase和CMCase的测定结果,它应当是诸制剂中对纤维素的水解作用最强的。酶E和G属于较低的档次,二者相比酶E又略差些。酶H和I则明显地属于效果较差之类。

在诸纤维素酶中,酶A和B均须辅以纤维二糖酶方能有效地作用于纤维素。酶C可以单独应用,但由于缺乏内切纤维素酶,其效果不好。

2.4 Avicelase 活力

Avicelase活力与FPase有相同的意义。但由于Avicel的结晶度低,测得的活力不同FPase。一般情况下二者有一已足够,在本研究中用酶A进行了试验以与FPase测定作比较。

理论上,Avicel应当比滤纸容易水解。但实测的结果正相反。将酶A稀释100倍后,与Avicel作用1h后还原糖浓度为36.3μg/ml,而与滤纸作用同样时间后还原糖浓度为187μg/ml。稀释50倍后,二者分别为72.6和358μg/ml,以此计算的反应速度倒是正比于酶浓度的。

从动力学曲线(图6)看,无论稀释倍数如何均非直线,无法从反应速度计算酶活力。

由此看来,用Avicel作底物并不优于滤纸。再者,很难用Avicel制备均匀、稳定的高浓度悬浮液。

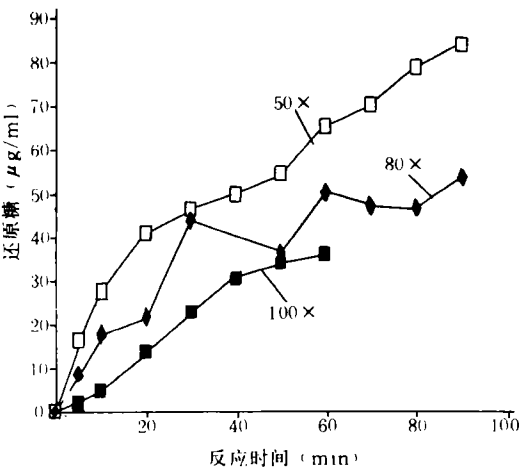


图6 酶A的avicelase测定动力学曲线

3 结 论

纤维素酶测定的困难,一方面在于底物的复杂性,另一方面在于各酶之间的协同作用。若欲对酶制剂的特性有全面的认识,只用一种底物,在一定条件下反应一定时间,从而计算活力的方法显然是不够的。

本研究力求用不太复杂的分析手段测定工业酶制剂的活力,并对它们作比较。为此,试验了几种不同底物,在大量实验的基础上建立了测定几种酶活力的方法。

CMCase 实际上代表了内切纤维素酶,测定时宜作产物浓度一时间关系直线,用线性回归法求斜率,从而计算活力。

FPase 为各种酶作用的总效果。在直至 2h 的时间范围内动力学仍为直线。但稀释倍数对测定结果有较大影响。

Avicelase 的意义与 FPase 同,但不易得到线性动力学关系,且反应速度低于滤纸试验。

纤维二糖酶的测定较容易,但同样宜测动力学关系。因为动力学直线可能不通过原点。

用以上方法对 9 种工业酶制剂作测定,对它们的作用有了较全面的认识。

在 3 种工业纤维素酶中,酶 A 和 B 基本相同。它们都必须辅以纤维二糖酶方能有效地作用。而酶 C 则缺少内切酶活力而较多地含有外切纤维素酶。

在 5 种植物细胞壁液化酶中,以酶 D 的活力较高,且各种酶的活力较平衡,唯有纤维二糖水解酶活力似嫌不足。酶 I 活力明显较弱。酶 E、G 和 H 则相差不大。

用这几种酶对甜菜和葡芋等块根进行水解试验的结果表明,酶 D 和 E 效果最好,酶 G 次之,酶 H 和 I 较差。这一顺序与它们的纤维素酶活力密切相关。不过,水解块根时果胶酶和半纤维素酶均起十分重要的作用,故酶 E 能有较好的效果。

参 考 文 献

- 1 Beldman G. The cellulase of *Trichoderma viride*: [博士论文]. 1986
- 2 NOVO'S, handbook of practical biotechnology, 1986
- 3 Caminal G, Lopez-santin J, Sola L. Kinetics modeling of the enzymatic hydrolysis of pretreated cellulose Biotechnol Letters, 1982, 4(1):51~56
- 4 Gusakov A V, Sintsyn A P, Klvosov A A. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose 1. A mathematical model for a batch reactor process Enzyme Microb. Technol, 1985, 7:346~352
- 5 王璋. 食品酶学. 1990
- 6 张树政. 酶制剂工业. 1989
- 7 Godfrey G, Reichelt J. Industrial enzymology, 1983

Enzymatic Activity Determination and Comparison of Industrial Cellulase Preparations

Feng Biao

(Chem. Eng. Dept.)

Abstract CMC, filter paper and cellobiose were taken as substrates for the activity determination of cellulases. The effects of the relationship between product concentration. Reaction time and dilution factor on the determination were studied. The determination and comparison between nine industrial enzymes showed that only the combined of activity tests were able to give comprehensive action pattern of on the cellulose.

Key-words Cellulase; Activity determination; FPase; CMCase; Cellobiase