

文章编号 :1009-038X(2002)06-0622-04

草菇纤维素酶系统的诱导、分布及初步定性

李 迅, 吴华伟, 邵蔚蓝

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036)

摘 要:以蔗糖、果胶、羧甲基纤维素、木聚糖或稻草为碳源培养草菇(*Volvariella volvacea*),并对它所产生的纤维素酶进行初步研究,发现纤维素酶系主要是由纤维素诱导产生. 纤维素酶中的 β -葡萄糖苷酶和纤维二糖酶分布在胞内,内切葡聚糖酶分布在胞外. β -葡萄糖苷酶的最适反应温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,最适 pH 为 6.6,在 pH 6.6~7.8 时比较稳定,保温 1 h 酶活的半衰温度是 45 $^{\circ}\text{C}$. 纤维二糖酶的最适反应温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 、最适 pH 为 5.8,在 pH 6.2 最稳定,保温 1 h 酶活的半衰温度是 44 $^{\circ}\text{C}$. 内切葡聚糖酶的最适反应温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,最适 pH 为 5.4,在 pH 6.6~7.0 时比较稳定,保温 1 h 酶活的半衰温度是 58 $^{\circ}\text{C}$.

关键词:纤维素酶;诱导;分布

中图分类号: S 646.13

文献标识码: A

Inducement, Distribution and Properties of Cellulase from Mushroom(*Volvariella volvacea*)

LI Xun, WU Hua-wei, SHAO Wei-lan

(The key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Volvariella volvacea* was cultivated in the media with sucrose, pectin, carboxymethyl cellulose(CMC), xylan or straw as carbon source, and cellulases were mainly induced by cellulose material. Cellobiohydrolase and β -glucosidase were detected in the hyphal filaments, endoglucanase was in culture filtrate. The optimal conditions for β -glucosidase were pH 6.6 at 60 $^{\circ}\text{C}$, the enzyme was stable over a pH range of 6.6~7.8, and had 1-h half-life at 45 $^{\circ}\text{C}$. The optimal conditions for cellobiohydrolase were pH 5.8 at 60 $^{\circ}\text{C}$, it was stable at pH 6.2, and had 1-h half-life at 44 $^{\circ}\text{C}$. The optimal conditions for endoglucanase were pH 5.4 at 50 $^{\circ}\text{C}$, it was stable over a pH range of 6.6~7.0, and had 1-h half-life at 58 $^{\circ}\text{C}$.

Key words: cellulase; inducement; distribution

纤维素酶的研究开始于 20 世纪 50 年代,最初的目的为了防止棉花、木材和纸张的腐烂. 随着人口的不断增长和资源的进一步消耗,可再生资源的开发利用已经成为人们共同关注的问题. 研究的

重点也就转到了利用纤维素酶来开发新能源和防止纤维素废物的污染上^[1-2]. 在植物的光合作用产物中,纤维素占了较大的比重^[3]. 但是目前对纤维素的有效利用却较少,其中很多被浪费掉^[4,5]. 因此

收稿日期 2002-08-07; 修订日期 2002-10-17.

作者简介:李迅(1975-),女,江苏无锡人,发酵工程硕士研究生.

万方数据

寻找有效的纤维素酶成为了关键的问题,它的解决对人类有不可估量的效益.草菇,又名麻菇、杆菇等,属真菌门,盛产于我国南方,具极高的营养价值,是世界上第五大重要的经济栽培品种^[6].草菇主要在草质纤维上生长,草质纤维中含有大量的纤维素,因此草菇中应有完备的纤维素酶系.本文中主要阐述了纤维素及其诱导及分布,并对其酶系进行了初步定性.

1 材料与方法

1.1 主要试剂与设备

主要试剂购于美国 SIGMA 公司,包括 木聚糖(xylan, from birchwood), 果胶, p-nitrophenyl- β -D-cellobiose (pNPC), p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG), p-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 羧甲基纤维素(CMC),购自中国医药集团上海化学试剂公司.

UV-2000 型分光光度计(UNICO), IEC multiry 高速冷冻离心机(Thermo IEC).

1.2 菌种及培养基

草菇(*Volvariella Volvacea*)菌种由南京师范大学何强泰先生惠赠.

种子培养基:蔗糖 20 g/L, KH_2PO_4 0.6 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, VB_1 0.5 mg/L, 琼脂 20 g/L.

摇瓶培养基:各种不同的碳源 10 g/L, KH_2PO_4 0.6 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, VB_1 0.5 mg/L.

1.3 草菇的培养及粗酶的制备

种子在 37 °C 静止培养 4~5 d, 摇瓶培养基在 37 °C 以 200 r/min 的转速培养 4~5 d.

1.3.1 胞外酶的制备 将草菇的摇瓶培养液用尼龙布过滤,取滤液,在 4 °C 以 9600 r/min 离心 10 min,取上清液,用 80% 饱和度的硫酸铵在 4 °C 沉淀并平衡 2 h,在 4 °C 以 9600 r/min 离心 10 min,取沉淀,用适量的 pH 6.5 的 MOPS 溶解,所得的溶液即胞外酶液.

1.3.2 胞内酶的制备 将草菇的摇瓶培养液用尼龙布过滤,取菌丝体,用 25 mmol/L pH 6.5 的 MOPS 洗 3 遍后,将菌丝体于 4 °C 用匀浆器匀浆 10 min,加入适量的 pH 6.5 的 MOPS 得到匀浆液,在 4 °C 以 9600 r/min 离心 10 min,取上清液,即得到胞内酶液.

1.4 酶活的测定方法

1.4.1 内切葡聚糖酶的测定方法 取 100 μL 质量分数 1% 的 CMC 溶液,加 80 μL 25 mmol/L pH 6.5

的 MOPS,加 20 μL 酶液,50 °C 温度条件下反应 30 min,加 600 μL 终止剂/显色剂 PAHBAH(配方为:4 体积单位的 0.5 mol/L NaOH 与 1 体积单位的溶于 0.5 mol/L HCl 的 5% PAHBAH 混合^[7]),于 100 °C 水浴 10 min,冷却后测 A_{410} 值.

1.4.2 纤维二糖酶的测定方法 200 μL 2.5 mmol/L 的 pNPC 溶液,加 200 μL 缓冲液,加 100 μL 酶液,于 50 °C 反应 30 min,用 500 μL 1 mol/L 的碳酸钠终止反应,测 A_{410} 值.详见文献[8].

1.4.3 β -葡萄糖苷酶的测定方法 200 μL 2.5 mmol/L 的 pNPG 溶液,加 200 μL 缓冲液,加 100 μL 酶液,于 50 °C 反应 10 min,用 500 μL 1 mol/L 的碳酸钠终止反应,测 A_{410} 值.详见文献[8].

1.4.4 酶单位的定义 在上述反应条件下,1 min 内催化产生 1 μmol 产物所需的酶量.

1.5 酶的性质分析方法

1.5.1 最适反应温度的测定 在 20~80 °C 范围内,每隔 5 °C,分别测定酶活,以酶活最高为 100% 计算相对酶活.

1.5.2 最适反应 pH 在不同的 pH 条件下分别测定酶活,以酶活最高为 100% 计算相对活性.在 pH 3.8~6.2 范围内缓冲液是 50 mmol/L 的邻苯二甲酸氢钾缓冲液,在 pH 5.8~8.0 范围内缓冲液是 50 mmol/L 的磷酸缓冲液.

1.5.3 温度稳定性 在相对稳定的 pH 下,使酶在某个温度下保温不同的时间,再测定相对酶活,以未保温(4 °C 保存)的酶样活性为 100%,确定酶的半衰期为 1 h 的温度值.

1.5.4 pH 稳定性 酶在不同的 pH 条件下保温相同的时间,再分别测定残留酶活性,与不保温的酶活比,计算百分比.

1.5.5 缓冲液的选择 参考 1.5.2.

2 结果与分析

2.1 酶的诱导和分布

纤维素酶系中的内切葡聚糖酶分布在胞外,纤维二糖酶和 β -葡萄糖苷酶主要分布在胞内(表 1).这样的分布与酶的催化作用有一定的相关,内切葡聚糖酶是个内切酶,主要作用于纤维素主链,因为纤维素主链很难进入细胞膜,所以内切葡聚糖酶主要分布在胞外.纤维二糖酶和 β -葡萄糖苷酶主要分解低聚寡糖,产生菌体能直接利用的糖,因此纤维二糖酶和 β -葡萄糖苷酶主要分布在胞内.内切葡聚糖酶、纤维二糖酶、 β -葡萄糖苷酶都是由 CMC 诱导的,木聚糖对 β -葡萄糖苷酶也有一些诱导作用.

表 1 酶的诱导和分布

Tab.1 Inducement and distribution of enzyme						
碳源	内切葡聚糖酶酶活/ (U/mL)		纤维二糖酶酶活/ (U/mL)		β-葡萄糖苷酶酶活/ (U/mL)	
	胞内	胞外	胞内	胞外	胞内	胞外
木聚糖	0	0.04	0.16	0	2.3	0.16
CMC	0	1.97	0.39	0	5.25	0.39
木聚糖 + CMC	0.05	2.41	0.4	0	5.51	0.09
木聚糖 + CMC + 果胶	0.02	2.04	0.29	0	4.60	0.04
果胶	0	0	0	0	0	0
蔗糖	0	0	0	0	0	0
用碱处理过的稻草	0	4.03	0.56	0	13.61	0.26

2.2 最适反应条件

2.2.1 最适反应温度 由图 1 可以看出,纤维素酶系中的内切葡聚糖酶和葡萄糖苷酶的最适反应温度是 60 ℃,纤维二糖酶的最适反应温度是 50 ℃.

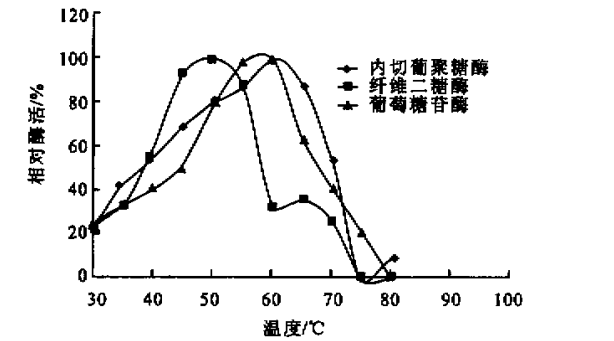


图 1 温度对酶活的影响

Fig.1 Effect of temperature on enzyme activity

2.2.2 最适反应 pH 由图 2 可知,葡萄糖苷酶的最适反应 pH 是 6.6,纤维二糖酶的最适反应 pH 是 5.8,内切葡聚糖酶的最适反应 pH 是 5.4.

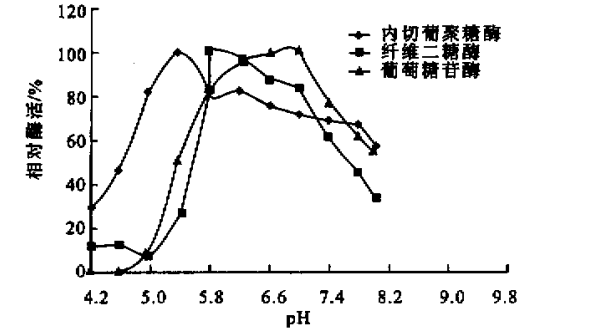


图 2 pH 对酶活的影响

Fig.2 Effect of pH on enzyme activity

2.3 酶的稳定性

2.3.1 酶的 pH 稳定性 纤维素酶的 pH 稳定性由图 3 可以看出,葡萄糖苷酶在 pH 6.6~7.8 都比较稳定,在 pH 7.0 时最稳定.纤维二糖酶在 pH 6.2 时最稳定.内切葡聚糖酶在 pH 6.6~7.8 都较稳定,在 pH 7.0 时最稳定.

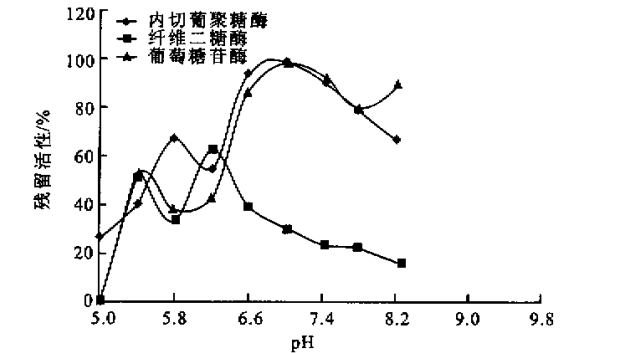
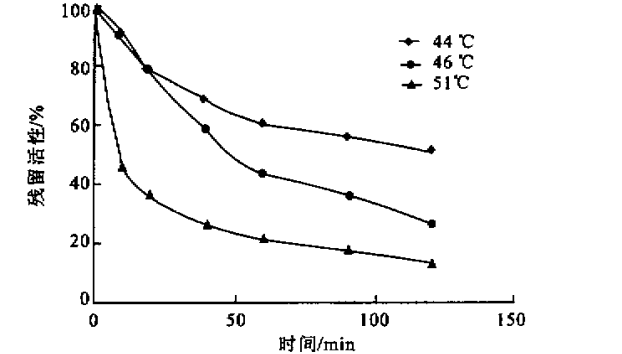


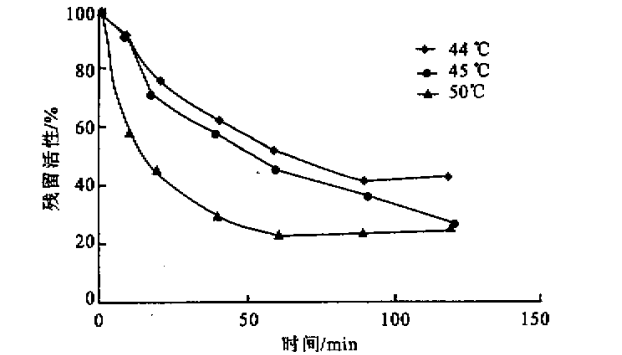
图 3 pH 对酶的稳定性的影响

Fig.3 Effect of pH on enzyme stability

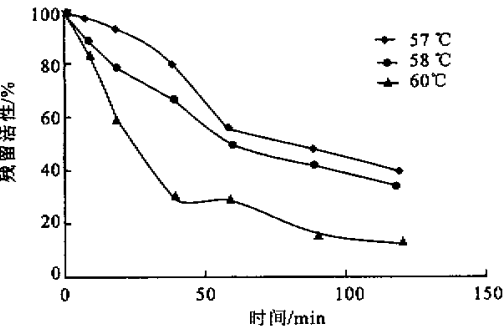
2.3.2 酶的温度稳定性 由图 4 可以知道,纤维素酶系中葡萄糖苷酶的半衰温度是 45 ℃,纤维二糖酶的半衰温度是 44 ℃,内切葡聚糖酶的半衰温度是 58 ℃.



a. 葡萄糖苷酶



b. 纤维二糖酶



c. 内切葡聚糖酶
图 4 温度对酶的稳定性的影响

Fig.4 Effect of temperature on enzyme stability

3 结 论

大多数真菌产生的纤维素酶是复合酶,也是诱导酶,草菇产生的一整套纤维素酶也是诱导酶.使用不同的碳源,发现以处理过的稻草为碳源对纤维素酶的诱导作用最大,CMC 的诱导作用次之,与其他碳源联合使用可得到较完善的酶活较高的纤维

素酶系.分析原因,这是由于稻草中含有大量的纤维素和半纤维素,经过碱处理后,降解生成大量的可溶性碳水化合物,包括纤维二糖和葡萄糖等,而这些又是纤维二糖水解酶和葡萄糖苷酶的强诱导剂;同时半纤维素是半纤维素酶的诱导物,而纤维素被半纤维素包埋,因此半纤维素的降解有利于纤维素的暴露,使得内切葡聚糖酶更容易作用.在饲料用农作物秸秆中加入纤维素酶等酶制剂和菌制剂是提高其营养价值的主要方法,目前缺少能有效降解秸秆类物质的酶系,而草菇纤维素酶的特点是能大幅度提高农作物秸秆的降解率和利用率,应用前景光明.实验还证明内切葡聚糖酶主要分布在胞外,主要将长链的纤维素切成短链,而其他外切酶主要分布在胞内,进一步将寡聚糖分解,只有少量的葡萄糖苷酶分布在胞外与内切葡聚糖酶协同作用.作者对这些酶进行了酶学定性,对这些特性的了解,为草菇的纤维素酶的进一步应用研究奠定了基础.

参考文献：

[1] 高才昌, 张树政. 酶制剂工业(下册)[M]. 北京:北京科学出版社, 1984. 595.
[2] 王祖农. 纤维素酶研究工业进展[J]. 山东大学微生物, 1986 (增刊):1.
[3] GLAZER A N, NIDAIDO H. Microbial Biotechnology[M]. New York :Freeman Company, 1995.
[4] 张启先. 纤维素和纤维素酶[J]. 微生物学通报, 1976, 3 (2):31.
[5] 上海植物生理研究所纤维素酶组. 国外纤维素酶研究概况[J]. 应用微生物, 1975 (2):1.
[6] CHANG S T. Mushroom research and development-equality and mutual benefit[A]. In :Royse D J. Mushroom biology and mushroom products[C]. Phila :Pennsylvania State University Park,1996.
[7] LEVER M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates[J]. Anal Biochem,1972,47 273.
[8] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure & Appl Chem,1987, 59(2) 257-268.

(责任编辑 秦和平)