

木霉 GXC 产 β -葡聚糖酶条件和酶学性质*

孙建义 李卫芬 顾赛红

(浙江大学动物科学学院饲料科学研究所 杭州 310029)

摘 要:研究了木霉 GXC 产 β -葡聚糖酶的条件。结果表明,最适产酶碳源为麸皮,氮源为硫酸铵;产酶的最适条件为:初始 pH 为 4.0~5.0,30℃培养 44h。粗酶液经硫酸铵沉淀、Sephadex G-25、Sephadex G-100 和 DEAE-Sephadex A-50 柱层析得到纯 β -葡聚糖酶,SDS-PAGE 凝胶电泳显示一条带,测得分子量为 35kD。该酶最适反应 pH5.0,最适反应温度为 60℃,在 40℃以下、pH4.0~5.0 酶活力相对稳定。5.0mmol/L 以下的 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} ,以及 10.0mmol/L 以下的 Co^{2+} 对酶活力有激活作用;而 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 具有抑制作用。

关键词: β -葡聚糖酶,木霉,产酶条件,纯化和性质

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 04-0457-06

β -葡聚糖属结构性非淀粉多糖,是以混合(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -糖苷键连接形成的 D 型葡萄糖聚合物^[1]。大麦整粒和胚乳中, β -葡聚糖含量高达 4.0%~8.0%,在其胚乳细胞壁中 β -葡聚糖占 75%^[2]。在啤酒生产过程中, β -葡聚糖会影响啤酒过滤速度和稳定性;在饲料工业中, β -葡聚糖作为一种重要抗营养因子会影响大麦的生物学效价。 β -葡聚糖酶是指 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(EC.3.2.1.73),主要分解大麦中的 β -葡聚糖(β -1,3 和 β -1,4 混合键连接的 β -D-葡聚糖)。业已证明,在啤酒工业中应用 β -葡聚糖酶(β -1,3-1,4-葡聚糖酶,EC.3.2.1.73)可提高麦汁分离速度、麦汁浸出量和啤酒过滤速度,啤酒混浊度和胶状沉淀物减少;在大麦日粮中添加 β -葡聚糖酶,可改善谷物营养价值,提高畜禽生长速度和饲料转化率,使大麦等禾谷类作为优质的能量饲料而应用于饲料生产^[3]。目前,有关产 β -葡聚糖酶的微生物主要为芽孢杆菌^[4~7]、瘤胃微生物^{8~10}和少数真菌^[11]。

1 材料和方法

1.1 菌种

供试菌株 *Trichoderma* sp. GXC 由浙江大学动物科学学院饲料科学研究所提供。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 斜面培养基:PDA 培养基。

1.2.2 发酵培养基(%): 麸皮 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCl_2 0.01, NaCl 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0016, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0014, CoCl_2 0.002; pH5.0。

1.2.3 培养方法: 250mL 三角瓶装液量为 40mL, 200 r/min, 32℃振荡培养 52h。

* 高等学校骨干教师资助计划资助,国家自然科学基金资助(30000118)项目,浙江省自然科学基金(399409)资助
作者简介:孙建义(1964-),男,浙江杭州人,浙江大学动物科学学院副教授,硕士,现从事微生物及分子生物学研究。

收稿日期:2000-07-10,修回日期:2000-09-26

1.3 β-葡聚糖酶活力测定

参见文献[12],并作适当修改,吸取 1.8mL 1.0% 的 β-葡聚糖(Sigma Co. 大麦 β-葡聚糖)底物(用 0.1mol/L pH4.8 醋酸钠缓冲液配制),预热 5min 后,加入经适当稀释的酶液 200μL,50℃ 水浴反应 10min 后,用 DNS 法测定葡萄糖含量^[13]。酶活力单位定义:在上述反应条件下,每秒钟产生相当于 1nmol 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.4 pH 值

采用 METTLER TOLEDO 320 pH 计测定。

2 结果和讨论

2.1 不同碳源对产酶的影响

改变培养基中碳源种类,进行产酶发酵试验,结果见表 1。由于木聚糖和 β-葡聚糖作为半纤维素成分,交联在一起,因此以麸皮和木聚糖作为碳源产酶最佳,纤维素、β-葡聚糖和糊精效果次之,葡萄糖、甘露糖、木糖、甘露醇、麦芽糖、蔗糖、乳糖、棉子糖和阿拉伯糖对产 β-葡聚糖酶无效果。β-葡聚糖作为碳源可能由于葡萄糖产物抑制而使酶活低于麸皮和木聚糖。

2.2 不同氮源对产酶的影响

改变培养基中氮源种类,进行产酶发酵试验。表 2 显示,除尿素和磷酸氢二铵,无机氮对产酶的效果要优于有机氮源;无机氮中硫酸铵促进产酶效果最为明显,其次为氯化铵和硝酸铵,而尿素效果较差;有机氮以酵母膏最适宜,牛肉膏和蛋白胨次之。

表 1 不同碳源对产酶的影响

表 2 不同氮源对产酶的影响

Table 1 Effect of carbon sources on β-glucanase production			Table 2 Effect of nitrogen sources on β-glucanase production		
Carbon sources	Concentration/%	β-glucanase activity /(U/mL)	Nitrogen sources	Concentration/%	β-glucanase activity /(U/mL)
Bran	1.0	54.44	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0	87.08
Xylan	1.0	53.26	NH ₄ Cl	1.0	71.11
Cellulose	1.0	30.14	NH ₄ NO ₃	1.0	62.08
β-glucan	1.0	18.33	Yeast extract	1.0	44.03
Dextrin	1.0	10.00	Beef extract	1.0	27.64
			(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.0	24.3
			Peptone	1.0	18.05
			Urea	1.0	7.92

2.3 温度对产酶的影响

测定了不同温度条件下对菌株产酶的影响,图 1 表明,该菌株的适宜产 β-葡聚糖酶温度为 30℃

2.4 初始 pH 对产酶的影响

对初始 pH2.0 至 8.0 的培养基进行产酶试验,图 2 表明,培养基的初始 pH 为 4.0 ~ 5.0 时产酶活力最高,说明酸性条件适合该菌株产酶。

2.5 培养时间对产酶的影响

每隔 4h 取样,分别测定 β-葡聚糖酶活力和 pH,结果如图 3 所示,发酵前 20h,培养基 pH 维持在 6 以上,培养基中无 β-葡聚糖酶活力;发酵从 20h 至 24h,pH 迅速下降至 4.0 左

右,在 24h 后开始产生 β -葡聚糖酶,至 44h, β -葡聚糖酶达到高峰,此后酶活力下降,pH 维持在 3 左右。

2.6 β -葡聚糖酶的纯化

所有操作在 4℃ 进行。发酵液经离心去沉淀,上清液用 30% 饱和硫酸铵沉淀,5000 × g 离心 15min 去沉淀,上清液再用 60% 饱和硫酸铵沉淀,10000 × g 离心 15min,弃上清,沉淀物溶解于 50mmol/L pH 5.3 醋酸钠缓冲液中,上 Sephadex G-25 (Amersham Pharmacia Biotech) 柱,用相同缓冲液洗脱,收集和浓缩含 β -葡聚糖酶组分,再上 Sephadex G-100 (Amersham Pharmacia Biotech) 柱用相同缓冲液进行洗脱,收集含酶组分并浓缩,上 DEAE-Sephadex A-50 (Amersham Pharmacia Biotech) 柱,用新缓冲体系(含 20mmol/L NaCl 的 50mmol/L pH5.3 醋酸钠缓冲液和含 300mmol/L NaCl 的 50mmol/L pH5.3 醋酸钠缓冲液)进行线形梯度洗脱,先用起始缓冲液(含 20mmol/L NaCl 的 50mmol/L pH5.3 醋酸钠缓冲液)洗柱后,再进行 NaCl 浓度为 20—300mmol/L 线形洗脱,洗脱速度为 12mL/h,每管收集 3mL,收集有酶活组分,用去离子水透析过夜,冷冻浓缩后于 4℃ 中保存,用于酶学性质研究。经 12.5% SDS-PAGE 凝胶电泳(图 4)只显示一条带,其分子量约为 35kD。

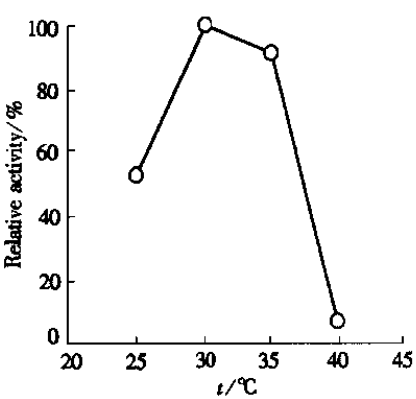


图 1 温度对产酶的影响
Fig.1 Effect of temperature on β -glucanase production

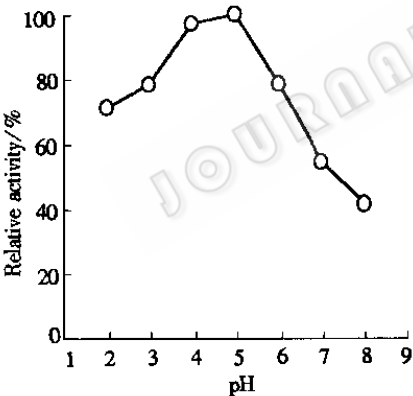


图 2 起始 pH 对产酶的影响
Fig.2 Effect of initial pH on β -glucanase production

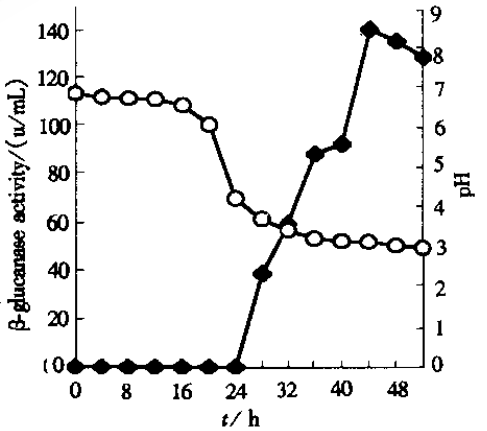


图 3 培养时间对产酶的影响
Fig.3 Effect of time on β -glucanase production
◆—◆ β -glucanase activity; ○—○ pH.

2.7 β -葡聚糖酶的酶学性质

2.7.1 酶作用的最适 pH 和最适温度:在 pH3.0 ~ 8.0 的缓冲体系中(0.10mol/L Na_2HPO_4 ~ 0.05mol/L 柠檬酸),按常规方法测定 β -葡聚糖酶活力,得到 pH-酶活力曲线,结果(图 5-a)表明, β -葡聚糖酶在 pH3.0 ~ 5.0 活力较高,其最适 pH 为 5.0。按常规方法测定 β -葡聚糖酶在 25℃ ~ 85℃ 范围内活力,得到温度—酶活力曲线,如图 5-b 所示, β -葡聚糖酶最适反应温度为 60℃。来自芽孢杆菌的 β -葡聚糖酶最适作用温度和热稳定性要高^[7,14],但也有细菌较低^[12]。

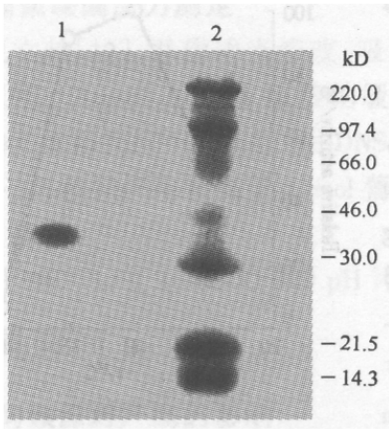


图4 β -葡聚糖酶 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱
Fig.4 SDS-PAGE of purified β -glucanase
1. Purified β -glucanase; 2. Protein marker.

2.7.2 酶的 pH 稳定性和热稳定性:将酶液与不同 pH 缓冲液 (0.1mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \sim 0.05\text{mol/L}$ 柠檬酸) 混合, 40℃放置 1h 后,按常规方法测定残余酶活力,结果(图 6-a)表明, β -葡聚糖酶在 pH4.0~5.0 相对稳定。据报道细菌的最适作用 pH 值一般在 6.0~7.0 之间^[12,15,16]。将酶液分别在不同温度下保温 60min,每间隔 15min 取样,按常规方法测定 β -葡聚糖酶活力,结果(图 6-b)显示,该酶在 40℃以下相对稳定,50 和 60℃酶活力随保温时间延长而下降。

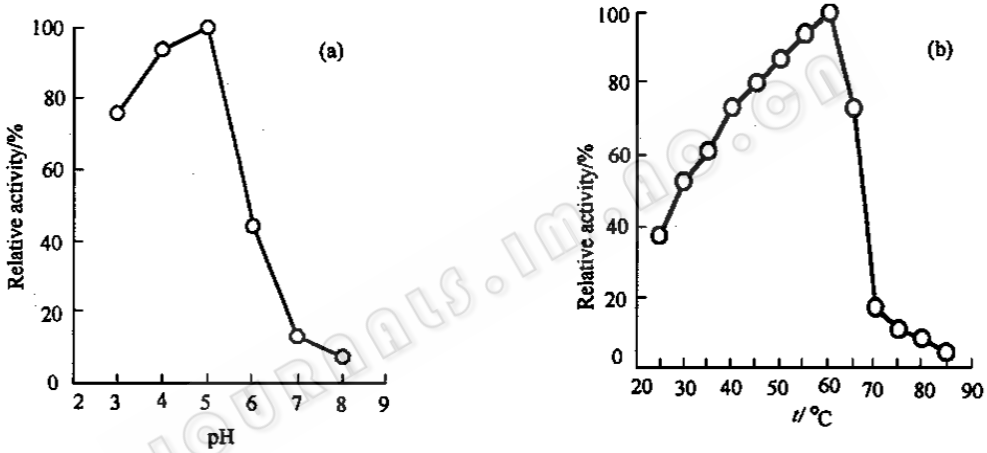


图5 pH(a)和温度(b)对 β -葡聚糖酶活力的影响
Fig.5 Effects of pH (a) and temperature (b) on β -glucanase activities

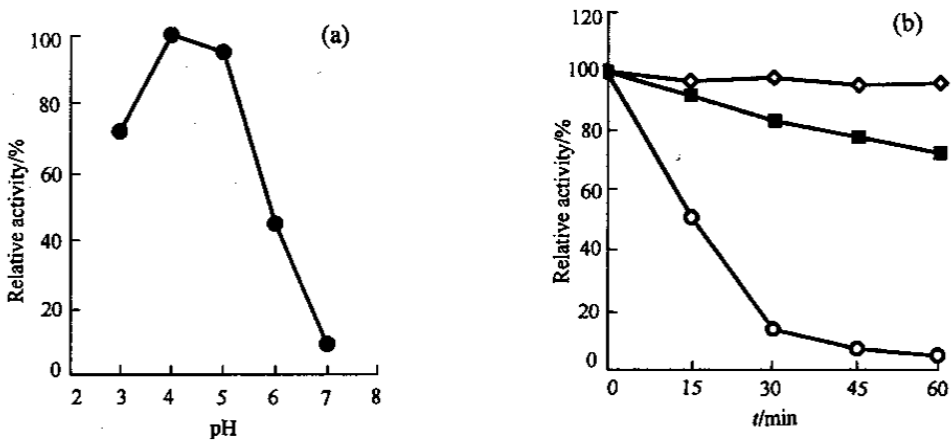


图6 pH(a)和温度(b)对 β -葡聚糖酶稳定性的影响
Fig.6 Effects of pH (a) and temperature (b) on stability of β -glucanase
—◇—40℃; —■—50℃; —○—60℃.

2.7.3 金属离子对酶活的影响:用不同金属离子与酶液混合,使溶液的离子终浓度分别为 1.0、5.0、10.0mmol/L,于 30℃保温 30min,然后按常规方法测定酶活力,以未加入金属离子的酶活力为 100%。表 3 显示,具有一定激活作用的离子有:Ca²⁺、Zn²⁺ 和 Fe²⁺ 和 Co²⁺;具有抑制作用的离子有:Cu²⁺ 和 Fe³⁺。

表 3 金属离子对 β -葡聚糖酶活力的影响
Table 3 Effect of various metal ions on β -glucanase activity

Metal ion	Relative activity / %		
	1.0 mmol/L	5.0 mmol/L	10.0 mmol/L
Control	100	100	100
Zn ²⁺	125.00	108.45	103.84
Fe ²⁺	124.55	114.94	89.53
Co ²⁺	121.59	137.24	130.81
Ca ²⁺	106.36	114.71	63.95
Mg ²⁺	101.49	92.05	86.51
Mn ²⁺	98.86	90.92	84.88
Cu ²⁺	93.18	70.11	54.65
Fe ³⁺	71.59	47.70	31.40

参 考 文 献

[1] Fleming M, Kawakami K. *Carbohydr Res*, 1977, 57: 15 ~ 23.
[2] Fincher G B, stone B A. *Recent Adv Cereal Grain Technol*, 1986, 8: 207 ~ 293.
[3] 李卫芬, 孙建义, 许梓荣. 大麦科学, 2000, 2: 1 ~ 4.
[4] Borriss R, Buettner K M. *Mol Genet*, 1990, 222: 278 ~ 283.
[5] Lloberas J, Perez-pons J A, Querol E. *Eur J Biochem*, 1991, 197: 337 ~ 343.
[6] Gosalbes M J, Perez-Gonzalez J A, Navarro A. *J Bacteriol*, 1991, 173: 7705 ~ 7710.
[7] Louw M E, Reid S J, Watson T G. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, 38(4): 507 ~ 513.
[8] Sait M E, Shella I M, Harry J H. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 64: 3752 ~ 3756.
[9] Flint H J, Mcpherson E C, Bisset J. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 1230 ~ 1233.
[10] Teather R M, Erfle J D. *J Bacteriol*, 1990, 172: 3837 ~ 3841.
[11] Chen Huizhong, Liang Xin, Ljungdahl L G. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(19): 6028 ~ 6034.
[12] Erfle J D, Teather R M, Wood P J, et al. *Biochem J*, 1988, 255(3): 833 ~ 841.
[13] Miller G L. *Anal Chem*, 1959, 31: 426 ~ 428.
[14] Taberner C, Coll P M, Fernandez-Abalos J M, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(4): 1213 ~ 1220.
[15] Moscatelli E A, Edward A H, Edward L, et al. *The Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236(11): 2858 ~ 2862.
[16] Borriss R, Olsen O, Thomsen K K, et al. *Carlsberg Res Commun*, 1989, 54(2): 41 ~ 54.

PRODUCTION AND SOME PROPERTIES OF A β -GLUCANASE FROM *TRICHODERMA* SP. GXC*

Sun Jianyi Li Weifen Gu Saihong

(Institute of Feed Science, College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The factors affecting *Trichoderma* sp. GXC for β -glucanase (1,3-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.73) production have been investigated, the optimal conditions were that carbon and nitrogen sources were bran and ammonium sulfate, respectively, initial pH 4.0 ~ 5.0, shaken at 30°C for 44 h. β -glucanase was purified to electrophoretic homogeneity by using ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-100 and DEAE-Sephadex A-50 chromatography. It's molecular weight was 35kD by SDS-PAGE, and the enzyme functioned optimally at pH 6.0 and 50°C, respectively. In addition, the enzyme was stable at pH 4.0 ~ 5.0 and below 40°C. The β -glucanase activity was significantly inhibited by Fe^{3+} and stimulated by Co^{2+} , respectively.

Key words: β -glucanase, *Trichoderma* sp, Condition of enzyme production, Purification and characterization

* Supported by Foundation for University Key Teacher by the Ministry of Education(30000118)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(30000118)

《微生物学报》承接广告业务

《微生物学报》创刊于 1953 年,双月刊,双月 4 日出版,由中国微生物学会和中科院微生物研究所主办。他是我国微生物学领域唯一的综合性学报级刊物。主要报道我国普通微生物学,工业、农业、医学、兽医微生物学,病毒学,免疫学和生物工程等方面的研究论文、研究简报和短篇综述等。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,深受国内外科研工作者、高等院校师生和企事业科研管理人员的欢迎。他是我国自然科学核心期刊,被国内外一些重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。

凡与微生物学及其各分支学科有关的试剂、药品、仪器、设备,以及与微生物有关的信息等均欢迎在本刊刊登广告。本刊服务热情,信守协议,保证质量,价格合理,竭诚为广大用户服务。

联系电话:(010)62630422 邮编:100080 E-mail: gesg@sun.in.ac.cn

通讯地址:北京市海淀区中关村北一条 13 号《微生物学报》编辑部