

绿色木霉纤维素酶系中 C₁ 酶的提纯与性质

中国科学院微生物研究所纤维素酶组

(北京)

从绿色木霉 (*Trichoderma viride*) X₂-85 的麸曲抽提液中,分离出纤维素酶系中的 C₁ 酶,经纯化后,用聚丙烯酰胺凝胶电泳和超速离心鉴定,都为均一蛋白。在我们的实验条件下,它对羧甲基纤维素、β-葡萄糖苷及纤维二糖,都不表现活性。该酶能降解微晶纤维素、磷酸膨胀纤维素和脱脂棉,主要产物是纤维二糖。用 Sephadex G-100 凝胶过滤和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其分子量,分别为 54,000 和 55,000。其沉降系数为 4.18。

纤维素酶降解纤维素的机制,至今尚未搞清楚。1950 年 Rease 曾提出过一个所谓 C₁-C_x 的假说。C_x 酶能水解纤维素的衍生物如羧甲基纤维素 (CMC),但不能水解天然纤维素。水解天然纤维素需 C₁ 和 C_x 协同作用,也就是说,天然纤维素经 C₁ 酶作用后的产物,才能被 C_x 酶降解为纤维寡糖。此后有人分离出了 C₁ 酶^[1,2],并对其进行了较深入的研究,发现 C₁ 酶并不象 Rease 所假设的那样,它基本上是一种 β-1, 4-葡聚糖纤维二糖水解酶^[3-6]。当然目前对 C₁ 酶性质的说法并不完全一致。本文主要报道 C₁ 酶的提纯方法、纯度鉴定及其某些物理化学性质。

材料与 方法

一、材料

1. 菌种采用我所照射变异的绿色木霉 X₂-85 菌株。
2. 纤维粉, Carl Schleicher & Schiill 公司生产,型号 No. 123。
3. Sephadex G-100 (40—120 目) DEAE-Sephadex A-50 (200—400 目) Pharmacia 公司出品。
4. 葡萄糖氧化酶液 (活力 140 单位/毫升) 北京化工厂生产。

5. 过氧化物酶粉,上海东风制剂厂生产,由萝卜提取。

6. 聚酰胺-66 薄膜,上海试剂四厂生产。

二、方法

(一) 菌的培养及粗酶的抽提

1. 菌的培养

(1) 种子培养: 种子培养基为麸皮:麦芽根:稻草粉:水 (4:4:2:12), 于 500 毫升三角瓶中接入 X₂-85 菌株,在 29℃ 培养 3 天,作为种曲。

(2) 曲盘扩大培养: 培养基为麸皮:麦芽根:谷壳:水 (4:4:2:15)。种曲接种量为 0.5%。在 26—28℃ 恒温室培养 35—40 小时。待菌生长成熟后取出风干,即为成曲。

2. 粗酶的抽提: 水与麸皮之比为 5:1, 37℃ 搅拌抽提 1 小时,抽提液用饱和度为 30% 的硫酸铵沉淀除去孢子,再用饱和度为 80% 的硫酸铵沉淀,离心去上清液,将沉淀物风干,研细,即得粗酶粉。

(二) 酶活力测定方法

1. 棉花增溶: 每个分析样品包括 1 毫升 0.1M pH4.6 醋酸缓冲液 (含 0.02% NaN₃)、0.5 毫升待测酶液及 5 毫克脱脂棉。于 40℃ 保温 7 天,用直径 3.5 厘米的布氏漏斗,铺以玻璃纤维滤布过滤,所得的棉花依次用 2N 氢氧化铵、水、2N 醋酸和水洗涤。然后将棉花连同玻璃滤布转移至 50 毫升三角瓶中,加入 0.18N 重铬酸钾 (溶于 50% v/v

本文于 1976 年 2 月 12 日收到。

硫酸中)溶液 5 毫升,沸水浴加热 30 分钟后,加入 15 毫升蒸馏水,并用 0.1N 的硫酸亚铁铵滴定剩余的重铬酸离子,用邻苯氨基苯甲酸作指示剂。每次测定均需有一个不加棉花的样品以及只加棉花不加酶的样品做为对照,从滴定差数计算出每消耗 1 毫升硫酸亚铁铵相当多少棉花量。

2. CMC 糖化力的测定:取 0.5 毫升待测液,加 4.5 毫升 0.5% CMC-Na (溶于 0.1M pH 4.6 醋酸缓冲液中),45°C 保温 45 分钟,然后吸取 0.5 毫升用 Somogyi 法^[13]测定还原糖。在本实验条件下产生 0.1 毫克还原糖为一个酶活单位。

3. C_1 酶水解磷酸膨胀纤维素活力:取 0.5 毫升待测液加 4.5 毫升磷酸膨胀纤维素(1 毫克/毫升悬浮于 0.1M pH 4.6 醋酸缓冲液中)。磷酸膨胀纤维素是按照 Walseth^[14]描述的方法制备的。37°C 保温 6 小时后,煮沸 10 分钟,再静置 15 分钟,取上清液用 Somogyi 方法测定还原糖。在本实验条件下产生 0.1 毫克还原糖为一个酶活单位。

4. 葡萄糖苷酶活力的测定:取 0.5 毫升待测酶液加入 2 毫升 0.5% 水杨苷(溶于 0.1M pH 4.6 醋酸缓冲液中),45°C 保温 30 分钟。然后吸取 0.5 毫升用 Somogyi 法测定还原糖。在本实验条件下产生 0.1 毫克还原糖为一个酶活单位。

5. 纤维二糖酶活力的测定:取 0.5 毫升待测酶液加 2.0 毫升 0.5% 纤维二糖(溶于 0.1M pH 4.6 醋酸缓冲液中),37°C 保温 30 分钟,然后加入 3 毫升葡萄糖氧化酶试剂(每毫升包括 20 单位葡萄糖氧化酶,0.016 克过氧化物酶及 0.028 克联大茴香胺,溶于 0.4M pH 7.0 Tris-磷酸-甘油缓冲液中),37°C 保温 30 分钟后,加入 4 毫升 5N H_2SO_4 于 530 毫微米比色。在本实验条件下每产生 0.1 毫克葡萄糖为一个酶活单位。

6. 凝胶电泳:纯度鉴定用聚丙烯酰胺凝胶电泳,基本上采用 Dovics^[15]的方法。所用玻璃管内径为 0.45×10 厘米。凝胶浓度为 7%,每管凝胶电流为 3 毫安。所用染料为 0.1% 考玛氏亮兰 R_{250} (溶于 50% 三氯乙酸中)。电泳后凝胶在 7% 乙酸中脱色。

7. 超离心:沉降系数分析用 Hitachi UCA-1A 型超速离心机。转速为 54,000 转/分,缓冲液为 0.1M pH 4.6 醋酸缓冲液,酶浓度为 5 毫克/毫升。

8. 分子量测定:

(1) 凝胶过滤分子筛法:用 Sephadex G-100 柱(1.5×50 厘米)基本上按照 Whitaker^[16] 描述的方法进行。

(2) S. D. S. 聚丙烯酰胺凝胶电泳:基本上按照 Weber 描述的方法^[17]进行。

9. 聚酰胺薄膜层析:用聚酰胺-66 薄膜(8×8 厘米)。展开剂为甲酸乙酯:甲醇=8:1。显色剂为苯胺:乙醇:磷酸:苯=0.1:20:1:75。喷显色剂后加热至 110°C,数分钟后即显色。

实验结果

一、酶的提纯

(一) 纤维素粉柱提纯

称取 30 克粗酶粉,用 Sephadex G-50 柱(2.8×4.1 厘米)分两次脱盐后,冷冻干燥,得 3 克脱盐酶粉。将其溶于 100 毫升 0.1M pH 4.6 醋酸缓冲液(含 0.02% NaN_3)中,上到预先用同样缓冲液平衡的纤维素粉柱上。图 1 所示为绿色木霉纤维素酶系在纤维素粉柱层析洗脱结果。

(二) Sephadex G-100 柱提纯

经纤维素粉柱洗脱后,将其中有棉花增溶活力部分(26—37管)汇合,用饱和度为 80% 的硫酸铵沉淀,再溶解于少量水中,用 Sephadex G-50 柱脱盐后,冷冻干燥。溶于少量 0.1M pH 4.6 醋酸缓冲液中,然后上到预先用同样缓冲液平衡的 Sephadex G-100 柱(2.5×57 厘米)上,进行凝胶过滤。用同样缓冲液洗脱,其洗脱结果见图 2。

(三) DEAE-Sephadex A-50 (细粒度)上提纯

将 Sephadex G-100 下柱之棉花增溶活力主峰(16—22 管图 2 箭头所示部分)汇合,上到预先用 0.1M pH 4.5 甲酸-NaOH 缓冲液平衡的 DEAE-Sephadex A-50 柱(1.5×9 厘米)上。用同样缓冲液从 pH 4.5 到 pH 3.5 进行梯度洗脱。其结果见图 3。

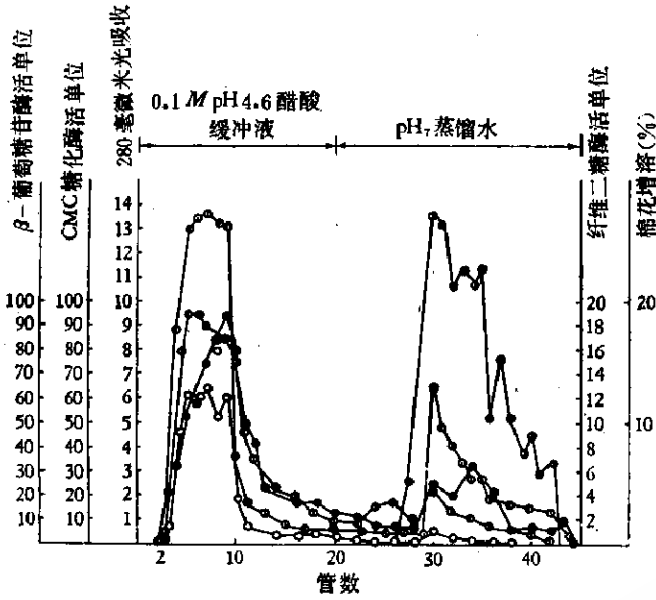


图1 绿色木霉之纤维素酶系通过纤维素粉柱(5×100厘米)后酶活分布图。

温度：8℃，流速：50毫升/小时。第一峰用0.1M pH4.6醋酸缓冲液(含0.02%NaN₃)洗脱。分部收集，每管体积为50毫升。第一峰以后部分，用pH7.0蒸馏水(用NaOH调pH，含0.02%NaN₃)洗脱，分部收集，每管体积为250毫升。

●——● 为280毫微米光吸收，■——■ 为棉花增溶活力，▲——▲ 为CMC糖化活力，○——○ 为芳香基β-葡萄糖苷酶活力，△——△ 为纤维二糖酶活力。

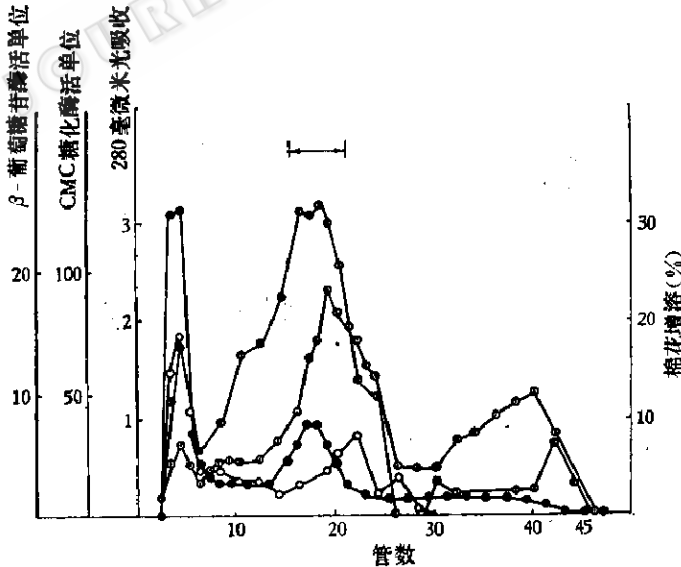


图2 绿色木霉的纤维素酶系通过纤维素粉柱后其C₁酶活部分用Sephadex-G-100柱(2.5×57厘米)进一步提纯。

●——● 为280毫微米光吸收，■——■ 为棉花增溶活力，▲——▲ 为CMC糖化活力，○——○ 为芳香基β-葡萄糖苷酶活力。(所有测定均取洗脱液稀释10倍后测定)。

温度：8℃，流速：6毫升/小时，分部收集，每管体积为4毫升。

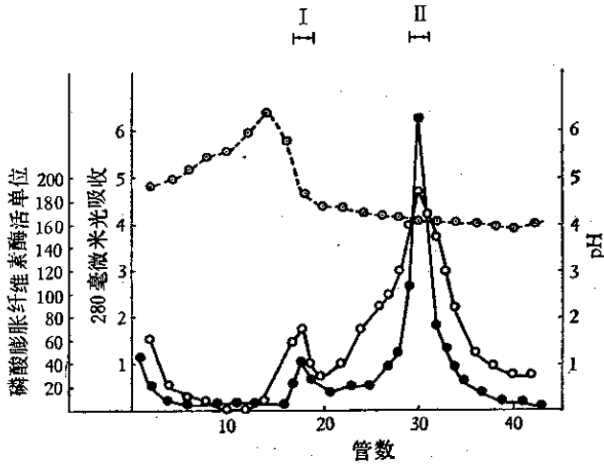


图3 C_1 酶部分在 DEAE-Sephadex A-50 柱(1.5×9 厘米)上的提纯。

●——● 为 280 毫微米光吸收曲线，○——○ 为用磷酸膨胀纤维素测得的酶活曲线，●·····● 为 pH 曲线。
温度：7°C，流速：0.6 毫升/小时。分部收集，每管体积为 5 毫升。

部分 II 为提纯之 C_1 酶，此部分测不出纤维二糖酶、 β -葡萄糖苷酶及 CMC 酶活力。

二、纯度鉴定

(一) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

经 DEAE-Sephadex A-50 提纯的 C_1 酶部分，即部分 II，用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定，结果仅有一个区带，如图 4。

(二) 超离心沉降

用超速离心机测定 C_1 酶的沉降，沉降常数经计算 $S_{w,20} = 4.18$ ，图 5 为单一对称峰。

三、 C_1 酶的某些性质

(一) 作用底物的特异性

提纯为聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的 C_1 酶对磷酸膨胀纤维素和微晶纤维素 (Whatman 纤维粉 C_{41}) 表现活性，后者的产物中 94.5% 为纤维二糖，5.5% 为葡萄糖。对脱脂棉作用较为缓慢，产物中 96.1% 为纤维二糖，3.9% 为葡萄糖，降解后的产物经聚酰胺薄层分析的结果，见图 6。

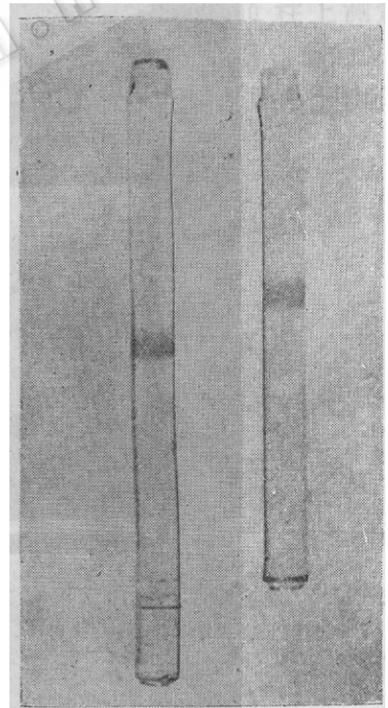


图4 C_1 酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

蛋白样品：50 微克
每管电流：3 毫安
电压：300—400 伏
电泳时间：2 小时。

图中 4-1 分离胶浓度为 10%，4-2 为 7%。电泳后用考玛氏亮蓝染色。

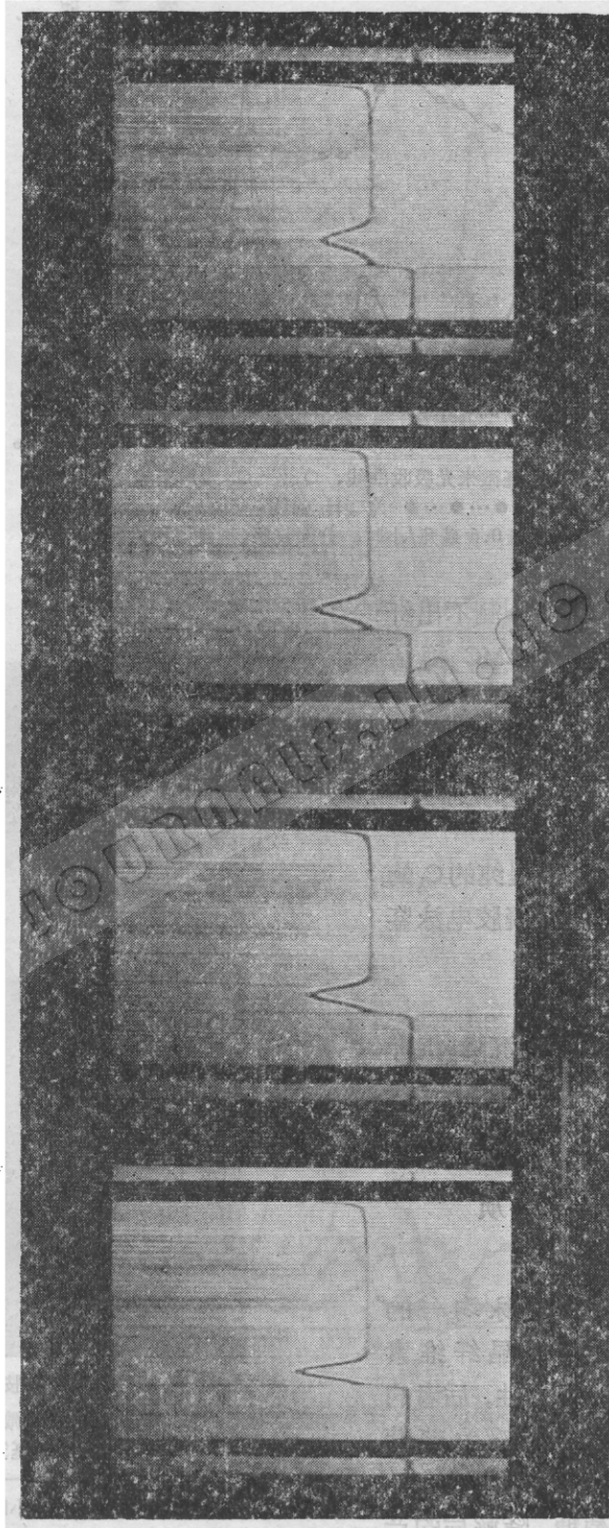


图5 C₁ 酶超速离心沉降图
样品: 5 毫克/毫升(溶于 0.1M pH4.6 醋酸缓冲液中)。稳定后每间隔 6 分钟拍照一次。

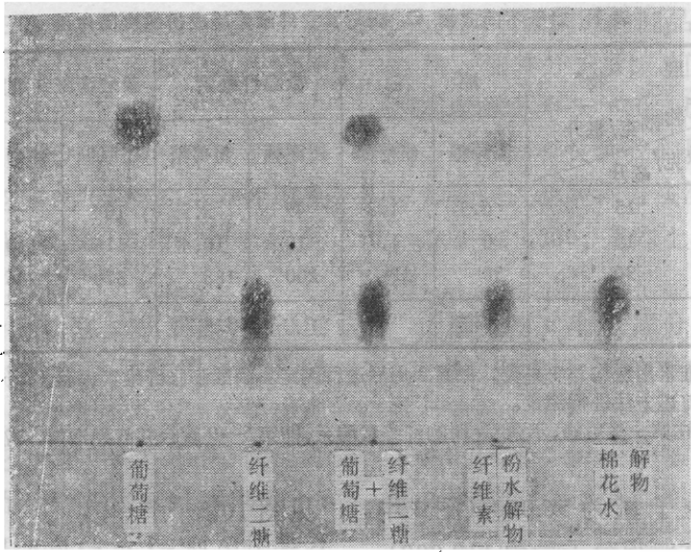


图 6. C_1 酶作用于磷酸膨胀纤维素和微晶纤维素后, 产物的聚酰胺薄层分析。

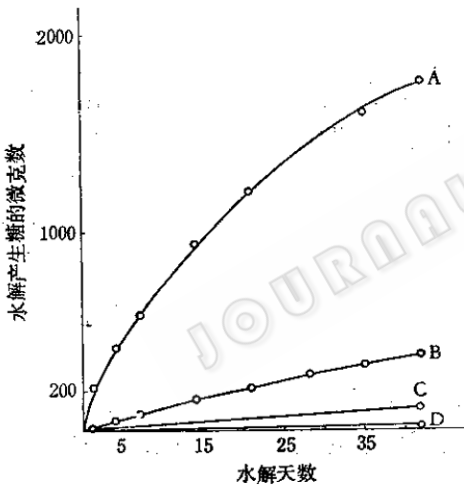


图 7 C_1 酶作用产物与作用时间的关系图

A、B 为纤维二糖增长曲线, C、D 为葡萄糖增长曲线; A、C 均以微晶纤维素为底物, B、D 均以棉花为底物。

C_1 酶作用产物与作用时间的关系见图 7。随时间延长纤维二糖和葡萄糖的产量增加。纯化的 C_1 酶以 0.5% 的酶浓度在本实验条件下测不出 CMC 酶、纤维二糖酶和 β -葡萄糖苷酶的活性。

(二) C_1 酶与 C_x 酶(CMC 酶、纤维二糖酶等)的协同作用

提纯的 C_1 酶作用于脱脂棉、微晶纤维素及磷酸膨胀纤维素时与纤维素酶系中的

其它成份表现有协同作用。见表 1。

(三) C_1 酶分子量的测定

1. 在 Sephadex G-100 柱上测定: 按 Whitaker 的方法^[10], 根据 C_1 酶的 V/V_0 为 1.61, 从图中查知其分子量为 54,000。见图 8。

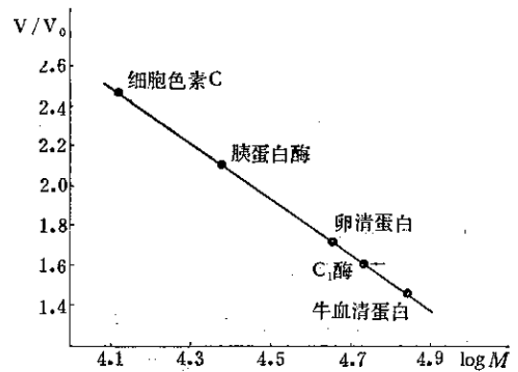


图 8 几种标准蛋白 V/V_0 与其分子量的关系图
图中标标准蛋白分子量如下: 细胞色素 C 13,000、胰蛋白酶 23,800、卵清蛋白 45,000、牛血清蛋白 70,000。

2. S. D. S. 凝胶电泳测定: 基本上按照 Weber 的方法^[11], 分两组进行, 一组胶浓度为 10%, 交联剂浓度为 0.27%, 测得 C_1 酶分子量为 55,000。见图 9。另一组胶浓度为 10%, 交联剂浓度为 0.135%, 测得

表 1 对于不同底物 C_1 酶与其它纤维素酶成份的协同作用

酶	底物* 酶浓度微克/毫升 产物微克/毫升	棉花		微晶纤维素		磷酸膨胀纤维素		CMC	纤维二糖
		还原糖	葡萄糖	还原糖	葡萄糖	还原糖	葡萄糖	还原糖	葡萄糖
		协同效果				3.4 倍		1.7 倍	
C_1	15	6.3	1.3	49	5.5	104	1	0	0
C_x^{**}	15	0	1.7	10	10.4	116	110	138	17
$C_1 + C_x$	30	50	50	200	188	370	286	118	16
协同效果		8 倍							

* 棉花及微晶纤维素用量均为 5 毫克，保温 2 周后进行测定。磷酸膨胀纤维素保温 18 小时后进行测定。CMC 和纤维二糖按前述方法进行测定。

** C_x 酶为纤维粉柱第一洗脱峰，不含 C_1 酶的纤维素酶系，即第 5—9 管合并液经透析、冷冻干燥所得酶粉。

C_1 酶 (部分 II) 分子量为 56,000 (图 3 中部分 I 用此胶浓度测得分子量为 110,000)，

见图 10。

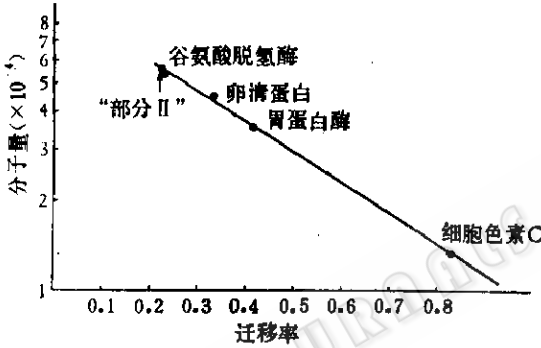


图 9 几种标准蛋白的电泳迁移率与其分子量的关系

图中标准蛋白分子量如下：谷氨酸脱氢酶 53,000、卵清蛋白 45,000、胃蛋白酶 35,000、细胞色素 C 13,000。

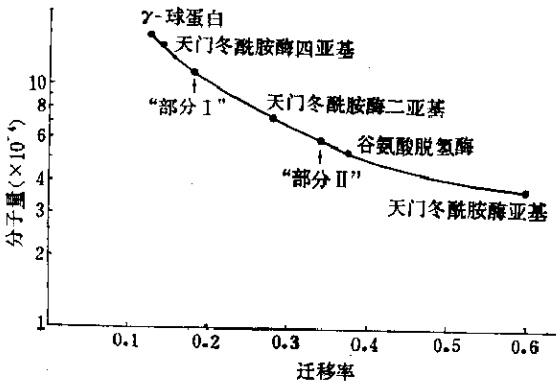


图 10 几种标准蛋白的电泳迁移率与其分子量的关系
图中标准蛋白分子量如下： γ -球蛋白 15,400 天门冬酰胺酶四亚基 14,100、天门冬酰胺酶二亚基 71,000、谷氨酸脱氢酶 53,000、天门冬酰胺酶亚基 36,000。

讨 论

C_1 酶是纤维素酶系中主要的酶，在分解天然纤维素过程中起主导作用。但到目前为止，纤维素酶的降解机制还不十分清楚，其主要原因之一就是对于 C_1 酶的性质了解得不够。目前对 C_1 酶性质的不同看法主要和 C_1 酶的纯度有关。如夹杂了微量纤维素酶系中其它酶，则 C_1 酶就表现出其它酶活性。我们所提纯的 C_1 酶不含 CMC 酶、 β -葡萄糖苷酶活性。微量的杂质 (纤维素酶系中的其它组分) 往往对 C_1 酶性质的研究有很大影响。

我们对 C_1 酶的提纯主要分四个步骤：

1. Sephadex G-50 除盐及低分子量杂质。
2. 用纤维素粉柱将 C_1 酶吸附。
3. Sephadex G-100 分子筛凝胶过滤。
4. DEAE-Sephadex A-50 柱最后提纯。这四步中以纤维素粉柱提纯效果最为明显。由于纤维素粉柱选择吸附 C_1 酶，大量非 C_1 酶的杂质可与 C_1 酶分开。但吸附上去的 C_1 酶洗脱比较困难，需用大量中性蒸馏水 (用 NaOH 调至 pH7.0)。洗脱液中的 C_1 酶浓度较低，需要经过硫酸铵沉淀、脱盐和冷冻干燥进行浓缩。此初步纯化之 C_1 酶再经过 Sephadex

G-100 及 DEAE-Sephadex A-50 柱进一步提纯, 即可得到聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的 C₁ 酶。

在全部提纯过程中, 没有作比活及回收率的计算。这是由 C₁ 酶的特异性质决定的, C₁ 酶的纯度越高, 单独作用于特异底物时活力反而越低。

由表 1 可看出 C₁ 酶与 C_x 酶(包括 CMC 酶和纤维二糖酶等)的协同作用。越是结构排列紧密的天然纤维素, 协同效果表现得越显著。棉花协同效果为 8 倍, 微晶纤维素为 3.4 倍, 而磷酸膨胀纤维素则为 1.7 倍。不过无论单独的 C₁ 或 C_x 对用化学方法处理过的磷酸膨胀纤维素, 都有相当显著的活力。因此协同效果不太显著。

我们提纯的 C₁ 酶作用于棉花、微晶纤维素及磷酸膨胀纤维素, 其产物主要为纤维二糖, 并有少量的葡萄糖。其比例约为 20:1。这个结果与国外报道的相一致^[3-5]。从图 4 中可以看出, 随着水解时间的延长, 纤维二糖和葡萄糖按比例增长。因此葡萄糖的产生似乎是直接由纤维素水解得到的, 而不是来自纤维二糖。鉴于产物中有少量的葡萄糖, 富田等人^[5]则主张与其说 C₁ 酶是 β -1, 4-葡聚糖纤维二糖水解酶, 还不如说是任意程度较少的 β -1, 4-葡聚糖水解释酶。但是富田所提纯的酶(他称之为 Avicelase)对 CMC 钠盐具有活性, 其水解产物几乎是等量的葡萄糖和纤维二糖, 并有少量的纤维寡糖。我们提纯的 C₁ 酶在以 0.5 毫克/毫升酶浓度为测定样品的实验条件下, 未测出对 CMC 钠盐的活性, 产物中也未发现纤维寡糖。这与富田提纯的 Avicelase 不完全一致。

目前对于 C₁ 酶分子量的报道不一致, Berghem 等^[4]和富田等^[5]都是从 Onosuka

(一种从木霉制取的商品纤维素酶)提纯 C₁ 酶, 测其分子量。前者测得为 46,000, 而后者测得为 53,000。这可能与他们所用的方法不同有关。我们用 S. D. S. 凝胶电泳和凝胶过滤两种方法测得其分子量为 54,000—55,000, 基本上与富田的结果一致。

提纯的 C₁ 酶(部分 II)经电泳鉴定为均一的, 但冷冻干燥后放置一星期左右, 再进行电泳, 则在其原来区带的上方又出现一新的区带。新区带的位置与部分 I 的位置相同。随着放置时间的延长, 在新区带的上方又出现另一新的区带。因此 C₁ 酶似乎有聚集作用。聚集后用 8M 尿素处理亦不能使其解聚。Halliwell^[6]曾用有机汞抑制了 C₁ 酶的活性从而说明了 C₁ 酶中巯基的存在及其重要性。我们推测这种聚合作用可能和巯基的存在有关。

参 考 资 料

- [1] Selby, K. and Maitland, C. C.: *Biochem. J.*, **94**: 578, 1965.
- [2] Selby, K. and Maitland, C. C.: *ibid*, **104**: 716, 1967.
- [3] Wood, T. M. and McCrae, S. I.: *ibid*, **128**: 1183, 1972.
- [4] Berghem, E. B. and Petterssong G.: *Eur. J. Biochem.*, **37**: 21, 1973.
- [5] Tomita, Y. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **52**: 233, 1974.
- [6] Halliwell, G. and Griffin, M.: *Biochem. J.*, **135**: 587, 1973.
- [7] Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**: 19, 1952.
- [8] Walseth, C. S.: *Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, **35**: 288, 1952.
- [9] 张树政, 王扬声: 化学通报, 第一期, 30 页, 1973.
- [10] Whitaker, J. R.: *Anal. Chem.*, **35**: 1950, 1963.
- [11] Weber, K.: *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406, 1969.

**PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF C₁ ENZYME
(β -1,4 GLUCAN CELLOBIOSE HYDROLYTIC ENZYME)
FROM *TRICHODERMA VIRIDE***

CELLULOSE RESEARCH GROUP, INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, ACADEMIA SINICA
(Beijing)

A cellulolytic enzyme (C₁ enzyme) has been isolated from Koji extract of *Trichoderma viride* X₁-85. The purified enzyme is homogeneous as shown by polyacrylamide gel disc electrophoresis and ultracentrifugation. The purified enzyme shows no activity towards carboxymethylcellulose or β -glucoside (cellobiose) under our assay conditions. Crystalline cellulose, phosphoric acid-swollen cellulose

and dewaxed cotton can be degraded by the enzyme to cellobiose as a main product. The molecular weight of the enzyme was determined to be 54,000 and 55,000 by Sephadex G-100 gel filtration and by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis respectively. The sedimentation coefficient of the enzyme was found to be 4.18.