

木霉纤维素酶的诱导形成及其调节*

I. 槐糖对木霉 EA₃-867 纤维素酶形成的诱导作用

朱雨生 谭 常

(中国科学院植物生理研究所纤维素酶组, 上海)

在槐豆荚提取液中分离到白色针状的槐糖结晶, 该糖对拟康氏木霉 (*Trichoderma pseudokoningii* Rafai) EA₃-867 的纤维素酶 (C₁ 和 C_x) 有强力的诱导作用。在纤维素酶活力, 尤其是产酶速度上明显超过纤维素的诱导作用。槐糖的诱导作用与添加槐糖的时间和菌种有关, 并受甘油强烈阻遏。在以纤维二糖 (0.5%) 为碳源培养时, 木霉 EA₃-867 也能较迅速地形成纤维素酶, 但在 EA₃-867 的甘油培养物中加入纤维二糖 ($5 \times 10^{-4} M$) 并不能诱导 C_x 酶。槐糖和纤维素对纤维素酶的诱导作用, 无论在诱导胞外和胞内纤维素酶的成分上或从凝胶电泳图上, 都十分相似。作者认为木霉 EA₃-867 的纤维素酶形成同时受诱导-阻遏机制调节, 并对组成型和诱导型的纤维素酶的作用, 以及固体纤维素对纤维素酶可能的诱导机制作了推测。

酶的诱导形成是生物学上的重要现象。研究原核生物诱导酶形成的调节及遗传控制, 导致了 Jacob-Monod 操纵子学说的创立和分子遗传学的飞跃发展^[1]。变废纤维为葡萄糖的纤维素酶即典型的诱导酶^[2,3,4], 其中真菌木霉属是迄今所知形成和分泌胞外纤维素酶系成分最全面、活力最高的一个属^[2,3]。对纤维素酶的诱导, 若干作者已有过一些报道^[2,3], 但对于固体纤维素如何诱导纤维素酶形成的机制的解释, 仍缺乏系统和完整的概念。我组从野生型拟康氏木霉 1096 和木₃ 分别诱变得到的二株纤维素酶活力较高的菌株 EA₃-867 和 N₂-78^[5,6]。从 1973 年开始, 我们对该二株菌纤维素酶的诱导形成及其调节机制做了一些初步的研究。我们认为, 阐明纤维素酶诱导形成的机制和调节控制的原理, 不仅有着理论上的意义, 而且将为改变培养条件提高纤维素酶产量, 设计筛选模型选育高产菌种, 提供新的线索和手段。

材料和方法

(一) 菌种

EA₃-867。

(二) 试剂

纤维素粉 (No. 123): 层析用, Carl Schleicher & Schüll, Dassel 公司产品。滤纸纤维素: Whatman No. 1 滤纸, 烘干, 磨成粉。脱脂棉: 国产医用, 烘干, 磨成粉。CMC(羧甲基纤维素钠盐): 粘度 300—600 厘泊, 上海长虹塑料厂产品。纤维二糖: B. D.H 公司产品。多聚半乳糖醛酸: Light 公司产品。葡萄糖: 上海葡萄糖厂生产的口服葡萄糖, 经活性炭吸附, 水洗脱, 再结晶得到的纯葡萄糖。槐糖: 槐豆荚中提取。

(三) 槐糖的提取、纯化、结晶和鉴定

参考 Clancy 的方法^[7], 并作了修改。称取 750 克洗净晾干的槐豆荚 (*Sophora japonica* L.), 加 2 升热蒸馏水浸泡, 用组织捣碎机打碎, 于沸水浴中搅拌提取 20 分钟, 纱布过滤, 二次滤液合

本文于 1977 年 8 月 2 日收到。

* 本工作得到沈善炯同志的帮助和指导, 表示感谢。

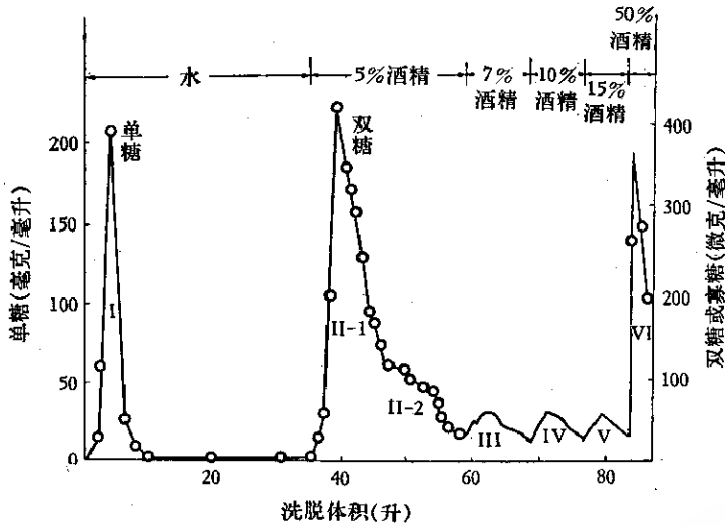


图 1 槐豆荚提取液活性炭层析图

并,4000转/分离心 20 分钟,取清液薄膜浓缩 (16 mmHg, 70℃, 以下同) 至 400 毫升淡黄色糖浆。滴加 4 升无水酒精,过夜,以沉淀蛋白和聚多糖。再加 500 毫升乙醚进一步去多糖,过滤或离心,取清液,薄膜浓缩至 250 毫升糖浆。加 8 升 H_2SO_4 溶液 (22.5mM), 于 100℃ 沸水浴中煮沸 1 小时,以水解槐糖苷。趁热加 40 毫升 $Ba(OH)_2$ 饱和溶液,以中和至 pH6.0 左右。过滤,滤液再薄膜浓缩至 400 毫升左右,即可作活性炭分离纯化。活性炭型号 769,预先于 150℃ 左右加热活化 4 小时,悬浮于蒸馏水中装柱,装柱量 540 克 (40×6 厘米)。糖浆入柱后,先用 35 升蒸馏水洗脱,以除去单糖,以酚-硫酸法测定,不再有糖洗下为止。接着,用 7% 酒精约 12 升洗脱,流速 500 毫升/小时,基本上可将槐糖全部洗下。酒精洗脱液薄膜浓缩至干,加 80% 甲醇结晶,再用冰冷的无水甲醇洗涤结晶多次,抽干,60℃ 烘干,即得白色槐糖结晶制品,于干燥器中保藏。

槐豆荚提取液经活性炭吸附和洗脱后,洗脱液中糖份的分布见图 1。水洗脱得到峰 I,以 5%、7%、10%、15% 和 50% 酒精洗脱分别得到峰 II (分峰尖 II-1 和峰肩 II-2)、III、IV、V 和 VI。其中峰 I、II-1、II-2、III、IV 和 V 的得糖量分别为 105、2.46、0.91、0.42、0.36 和 0.27 克。峰 VI 中混有大量被洗下的色素。根据预备试验表明,769 活性炭上用水洗脱下来的为单糖,5—10% 酒

精洗脱部分主要为双糖,10% 以上酒精洗脱下的为叁糖和寡糖。将峰 I—VI 分别浓缩,进行纸层析分离,用苯胺-二苯胺试剂显色,并与标准糖进行比较 (图 2)。可看到,水洗脱液中主要含单糖,

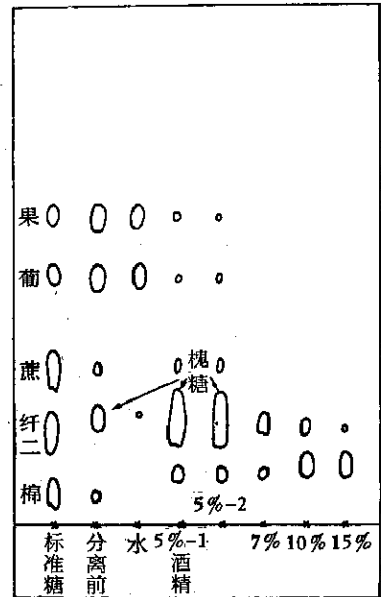


图 2 槐豆荚提取液经活性炭层析分离后各洗脱部分的纸层析图

5% 和 7% 酒精洗脱液中含有大量的未知双糖 (位置在蔗糖和纤维二糖之间, R_F 约 0.33)。随着酒精洗脱浓度的增加,未知双糖的含量逐渐减少,而未

知寡糖的含量逐渐增多。未知双糖用苯胺-二苯胺试剂显色时,在纸谱上显出特殊的棕黄色,用 AgNO_3 试剂显色时呈咖啡色,而用三苯基四唑化氯试剂显色时,颜色几乎看不出;而且峰 II 和峰 III 的糖只能用酚-硫酸法检出,与 DNS 试剂却不起反应,这说明,此未知双糖是非还原糖。将峰 II 和峰 III 洗脱液合并,浓缩,在 80% 甲醇中能析出白色针状结晶,得率为 0.24% (对槐豆荚鲜重),用显微熔点测定仪测得晶体熔点为 192—195℃,而且,对木霉洗涤菌丝体的纤维素酶形成有强烈的诱导作用(待发表)。总之,从以上未知双糖在活性炭上的吸附洗脱行为,纸层析位置和显色情况、结晶的颜色、形状和熔点,以及诱导活性等等,与文献上记载的槐糖特性相符,说明从槐豆荚中提取分离到的双糖结晶就是 2-O- β -D 葡萄糖吡喃糖基-D-葡萄糖,即槐糖。

(四) 液体培养方法

种子斜面培养基(%): 土豆汁 20, 纤维素粉 2, 琼脂 2; 或蛋白胨 0.2, 酵母膏 0.1, 琼脂 2。

甘油无机盐培养基成分(%)^[1]: 甘油 0.6, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.14, KH_2PO_4 0.2, 尿素 0.03, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, CaCl_2 0.03, 蛋白胨 0.1。每升含微量元素 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 毫克, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.56 毫克, ZnCl_2 1.67 毫克, CoCl_2 2.0 毫克, pH 5.3。在不同碳源试验中,用各种碳源(0.5%)代替上述甘油,其他培养基成分相同。培养中途加槐糖或甘油等的试验中,槐糖和甘油等均先分别灭菌,无菌操作加入。500 毫升三角瓶中装入 100 毫升培养基,孢子悬浮液接种,每 100 毫升培养基中约接入 10^6 个左右的孢子,在往复式摇床(108 次/分)上 30℃ 震荡培养,至所需时间,取培养滤液测定酶活力。

(五) 酶活力测定

1. 酶液制备

(1) 胞外酶: 用 3 号砂蕊漏斗抽滤培养液,抽滤液为胞外酶。

(2) 胞内酶: 未滤去之菌丝体用 100 毫升磷酸盐缓冲液(0.01M, pH5)洗涤,抽干,再悬浮在 15 毫升同样的缓冲液中,用超声波(M.S.E)破碎,20 KC, 破碎 5 分钟,得到胞内酶。

2. 酶活力测定方法

(1) CMC 酶活(C_x): 0.5 毫升适当稀释的

酶液,加 2.0 毫升 pH5 的 0.625% CMC 溶液(1000 毫升 1% CMC, 加 200 毫升 0.05M 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液和 400 毫升水配成),于 40℃ 水浴中保温半小时,加 2.5 毫升 DNS 试剂^[8]终止反应,于沸水浴中煮沸 5 分钟,在 540 毫微米波长比色,要求光密度读数在 0.5 毫克葡萄糖左右。按 Mandels 早期定单位的方法^[12],规定在上述反应条件下,每产生 0.5 毫克还原糖,为 1 个 C_x 活力单位*。

(2) 滤纸酶活(F.D): 50 毫升容量瓶内投入二张 Whatman No.1 滤纸(1×1 厘米),加 4 毫升酶液和 1 毫升醋酸缓冲液(0.1M, pH 4.6),于瓦氏呼吸器振荡机上 40℃ 恒温振荡(100 次/分,振幅 5 厘米)观察滤纸全部崩溃成粉状所需的时间(分钟),依下面公式计算活力单位(u)。

活力单位/毫升 = 250/崩溃时间(分钟)

(3) 纤维二糖酶: 0.5 毫升酶液,加 2 毫升纤维二糖溶液(10^{-3} M; 溶于 0.02M 醋酸缓冲液中, pH 5.0),于 40℃ 水浴中保温 2 小时,用 DNS 法测定还原糖的增加。单位定法同 C_x 。

(4) 淀粉酶: 0.5 毫升酶液,加 2 毫升 1% 淀粉溶液(溶于 0.02M, pH 4.8 醋酸缓冲液中),于 30℃ 保温半小时,用 DNS 法测定形成的还原糖。单位定法同 C_x 。

(5) 果胶酶: 2 毫升适当稀释的酶液,加 0.5 毫升多聚半乳糖醛酸溶液(0.5%, 溶于 0.1M, pH 4.5 醋酸缓冲液中),30℃ 反应半小时,用 DNS 法测定形成的半乳糖醛酸,每产生 0.5 毫克半乳糖醛酸为 1 个单位。

(6) 半纤维素酶^[12]: 以玉米芯提取的半纤维素为底物,用甲基间苯二酚法测定酶解形成的木糖。在规定条件下形成 0.5 毫克木糖为 1 个单位。

(7) 蛋白酶^[12]: 以酪蛋白为底物,测定酶解产生的酪氨酸,规定形成 1 个微克的酪氨酸为 1 个单位。

(六) 糖、甘油和生长的测定

用酚-硫酸法^[13]测定还原糖或非还原糖。用

* 关于纤维素酶 C_1 , C_x 的概念,近年来有不少争论和变化^[9-11]。本文中的 C_x , C_1 仍沿用 Reese 的概念,以分解 CMC 的酶代表 C_x , 分解脱脂棉的酶代表含 C_1 。

过磷酸钠氧化甘油, 亚砷酸钠终止反应, 变色酸显色, 在 570 毫微米比色测定甘油^[14]。生长测定是将液体培养之菌丝体用 3 号砂芯漏斗抽滤, 80°C 烘干至恒重, 称重。

(七) 糖的纸上层析

Whatman No. 1 滤纸, 溶剂为正丁醇: 醋酸: 水 (4:1:5)。30°C 左右下行约 7 天。用苯胺-二苯胺试剂, 硝酸银试剂或三苯基四唑化氯试剂^[15]显色。

(八) 酶组分的凝胶电泳分离法

1. 酶制剂制备: 胞外或胞内酶液冷冻, 缓缓加入 3 倍体积冷却至 0°C 以下的丙酮, 以沉淀酶蛋白, 冷冻离心 (-5°C 以下, 3000 转/分, 20 分钟), 收集沉淀, 用无水丙酮脱水, 抽滤, 真空干燥, 即得酶粉。

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 基本上按照 Davis^[16]的方法。在 10×0.5 厘米玻璃管中制备聚丙烯酰胺凝胶, 每管中注入 1% 酶制剂 (配在 40% 蔗糖溶液中) 0.04 毫升 (相当于蛋白质 200 微克左右), 在 Tris-甘氨酸 (pH 8.3) 缓冲液中电泳 1 小时半, 每管电流 2 毫安, 酶蛋白用氨基黑染色, 并在 7% 醋酸中退去底色。

结 果

一、不同碳源中生长和纤维素酶形成的比较

木霉 EA₃-867 在各种碳源中生长时, 只有在纤维素或纤维素衍生物中才能产酶, 因而是诱导酶 (图 3)。在各种碳源中生长速度不同: 一般在单糖中培养 48 小时, 单糖基本上耗完, 菌丝体重达到 200—400 毫克/100 毫升, 在甘油中达到 550 毫克/100 毫升; 对双糖的利用较差, 培养 48 小时, 只有部分双糖被利用, 菌丝体一般在 30 毫克/100 毫升以下; 在纤维素或纤维二糖 (0.5%) 中培养时, 生长较慢, 在培养 2—3 天之后出现纤维素酶活力, 以后随着时间而逐渐上升, 在纤维素粉中甚至到第 8 天还在继续上升。以槐糖为碳源进行培养时, 生长不到 1 天 (18 小时) 便明显出现活

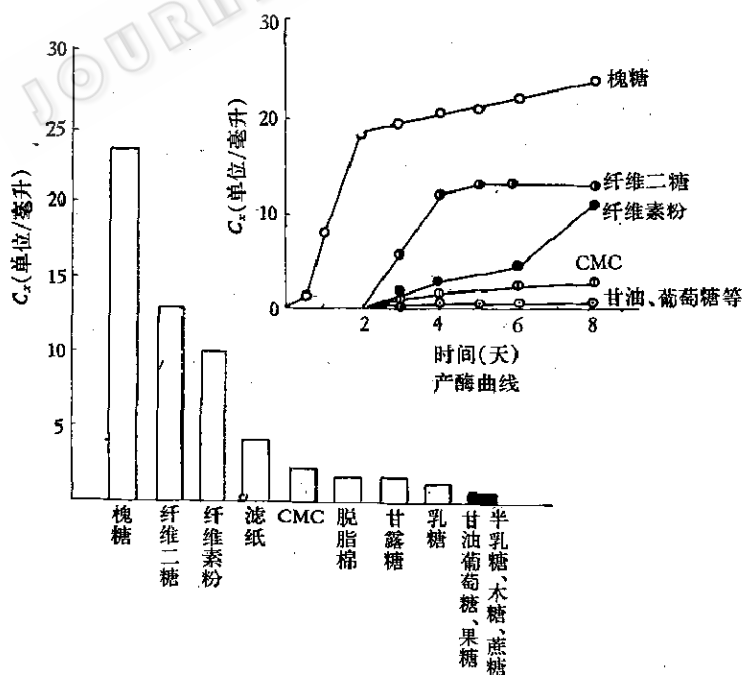


图 3 木霉 EA₃-867 在不同碳源中培养 8 天的纤维素酶活力比较

500 毫升三角瓶中含 100 毫升各种碳源 (0.5%) 培养基 (配方见方法部分), 30°C 振荡培养, 不同时间取样测定。

力,第二天即达到相当高的水平,以后活力上升不多,因为2天左右槐糖已被消耗光。

EA₃-867 在上述不同碳源中培养时的生长产酶情况大致可分三类。第一类槐糖,它是强力诱导剂,培养特点是产酶早,活力高,生长也较快;第二类是纤维素、纤维素衍生物或纤维素分解产物,如纤维素粉、滤纸、脱脂棉、CMC 和纤维二糖。在这些碳源中培养,虽能不同程度的产生纤维素酶,但大部分生长慢,产酶也较槐糖中培养的慢,其中纤维二糖诱导产酶较纤维素粉诱导为快;第三类主要是与纤维素结构无直接关系(葡萄糖除外)的碳源,如甘油、果糖、木糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖等。在这些碳源中(除双糖外)培养,一般生长很快,但纤维素酶活力极低,而且不随培养时间而变化。有些作者报道过甘露糖和乳糖能诱导纤维素酶^[17,18]。

二、槐糖、纤维二糖和纤维素粉对木霉 EA₃-867 甘油培养物纤维素酶形成的影响

(一) 在甘油培养基中生长、甘油利用和 pH 的变化

EA₃-867 孢子悬浮液接种在甘油无机盐培养基中液体振荡培养 7—8 小时,在显微镜下可见到孢子开始膨胀萌发,12 小时有少量菌丝长出,24 小时明显长出肉眼可见的菌丝,36 小时开始生孢子,48 小时后培养液开始转淡绿,生长基本上停止,以后菌丝体自溶减少,至第 7 天,残存的菌丝体已极少(图4)。上述 EA₃-867 的生长曲线可分为延迟期(12 小时前)、对数期(12—48 小时)和稳定及自溶期(48 小时以后)。

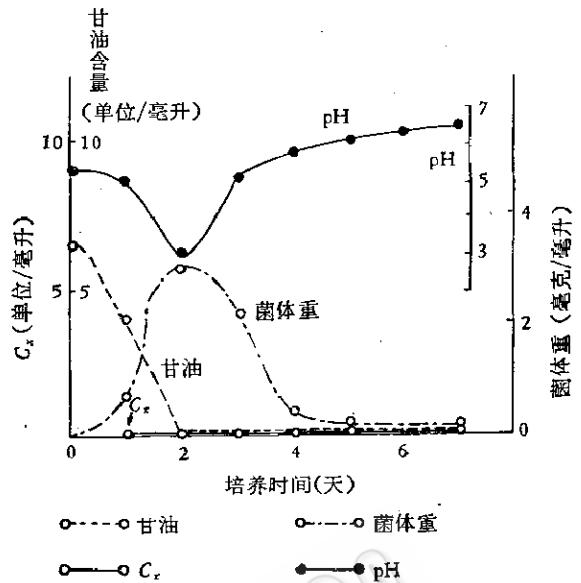


图4 木霉 EA₃-867 在甘油无机盐培养基中液体培养不同时间甘油,菌体重, C_x 和培养液 pH 的变化培养基 50 毫升, 30—32℃ 振荡培养

(二) 甘油培养物中加槐糖、纤维二糖和纤维素对纤维素酶形成的影响

EA₃-867 在甘油无机盐培养基中培养,纤维素酶活力极微弱。添加纤维二糖($5 \times 10^{-4} M$) 不能诱导 C_x 酶产生。但如添加 0.5% 纤维素粉或低浓度槐糖($5 \times 10^{-4} M$), 则纤维素酶能大量产生(图5)。但以纤维素为诱导剂时,产酶至少要有三天以上的延迟期;而槐糖可使产酶延迟期缩短为数小时,不论在产酶速度或活力方面均远远超过纤维素。

槐糖诱导纤维素酶合成的能力,与添加槐糖的时间有关;但是产酶的时间,与添加槐糖的时间无关(图6)。培养 48 小时加槐糖,诱导产酶最高,24 小时,尤其在开始培养时(0 小时)加入槐糖,产酶会大大减弱;不论槐糖加入的时间多早,纤维素酶均在培养 48 小时后才产生。这些现象可能归因于生长稳定期前甘油对酶形成的阻遏

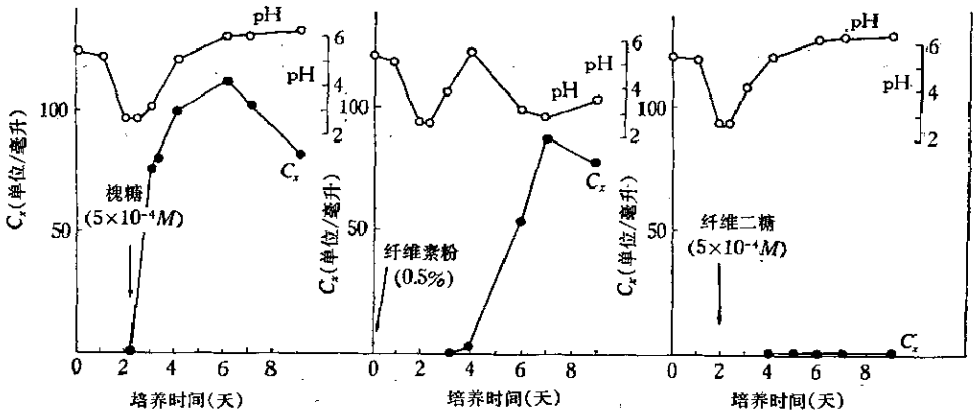


图5 木霉 EA₃-867 在甘油无机盐培养基中加槐糖, 纤维素粉和纤维二糖后, 纤维素酶诱导形成和 PH 的变化

50 毫升培养基, 孢子悬浮液接种后, 于 29°C 振荡培养, 纤维素粉在 0 小时加入, 槐糖和纤维二糖在 48 小时加入, 测定不同培养时间培养滤液 C_x 和 pH 的变化

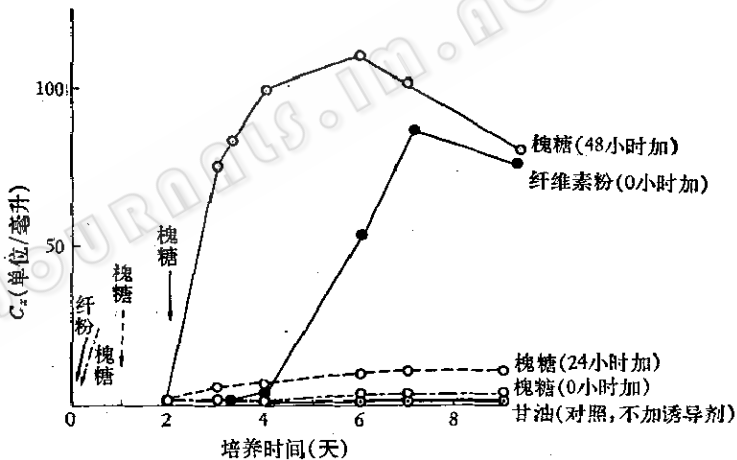


图6 木霉 EA₃-867 在甘油无机盐培养基中培养不同时间加入槐糖和纤维素粉对纤维素酶形成的诱导作用

培养基 5 毫升, 槐糖浓度 $5 \times 10^{-4} M$, 纤维素粉 0.5%, 29°C, 振荡培养

作用和槐糖本身在培养过程中被消耗, 此可以从洗涤菌丝体的诱导试验(待发表)和图7的试验中得到证明。从图7中可以看到, EA₃-867 甘油培养物在 48 小时加入槐糖, 隔 12 小时便明显出现酶活力, 24 小时后达到高峰, 48 小时后(即培养第 4 天)C_x 活力开始下降, 此时, 用酚-硫酸法测定,

培养液中槐糖已用光。若此时再次补加槐糖, 则纤维素酶又恢复合成。但在 48 小时菌龄的甘油培养物中若同时加入槐糖和甘油, 则酶的产生便明显受阻, 而且到培养第 4 天, 即使再补加槐糖, 纤维素酶也不再继续合成。

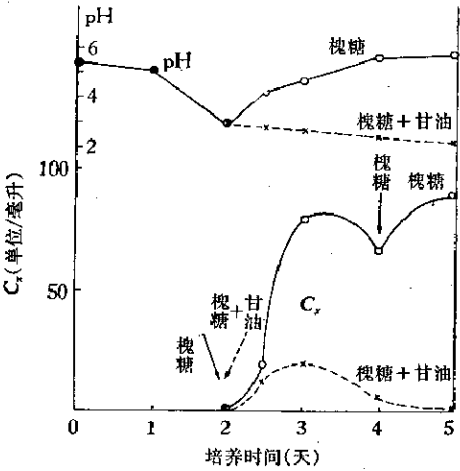


图7 甘油对槐糖诱导木霉EA₃-867纤维素酶形成的阻遏作用
培养基5毫升, 29℃振荡培养48小时加入槐糖($5 \times 10^{-4}M$), 或槐糖($5 \times 10^{-4}M$)和甘油(0.6%)同时加。在培养第4天, 再次补加槐糖($5 \times 10^{-4}M$)

三、槐糖和纤维素粉对不同菌种甘油培养物形成纤维素酶的影响

图8比较了槐糖和纤维素粉对不同菌

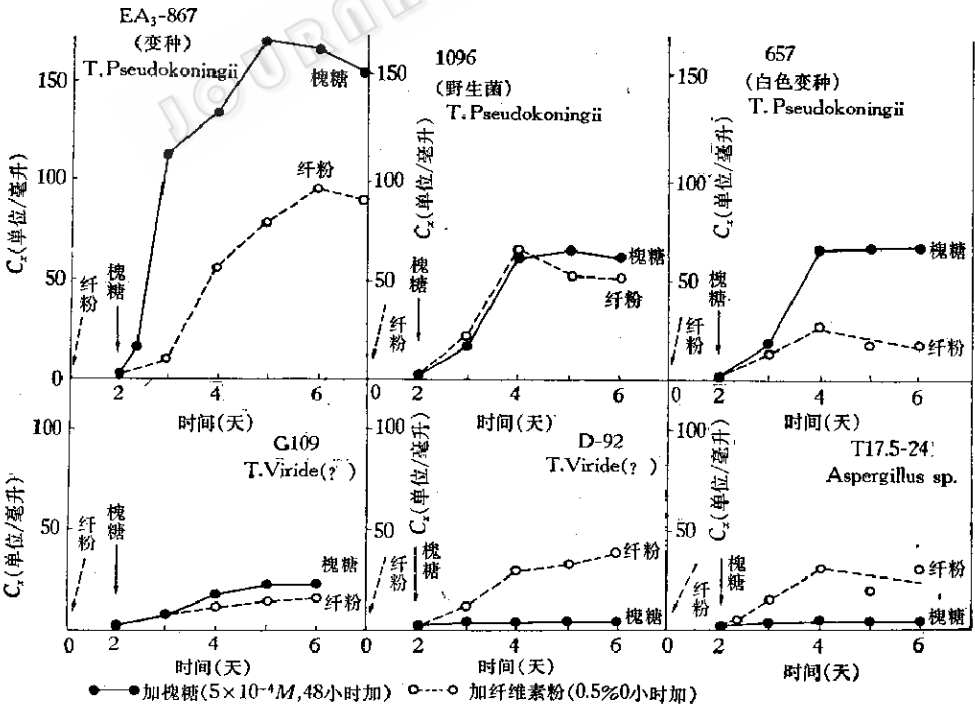


图8 槐糖和纤维素粉对不同菌种纤维素酶诱导形成的影响
甘油无机盐培养基5毫升, 29.5℃振荡培养

种纤维素酶的诱导效应。1096, EA₃-867和657是拟康氏木霉, 1096是野生型, EA₃-867和657是诱变种, 其中657是白色孢子型。G109和D-92是取自湖北省微生物所的绿色木霉野生型菌株, T17.5-24是能产纤维素酶的曲霉。不同菌种的孢子悬浮液接种在甘油无机盐培养基中, 于摇床29.5℃振荡培养。纤维素粉在0小时加入, 槐糖在培养48小时加入。可以看出, 拟康氏木霉的三个菌株的C_x酶均能被槐糖所诱导, 白色变异株657, 尤其是高产变异株EA₃-867的产酶速度和活力远远超过以纤维素粉诱导的结果。G109被槐糖诱导的酶活很低, D-92和T17.5-24几乎不被槐糖所诱导。滤纸崩溃活力的测定也有同样的趋势。这些结果说明不同菌种对槐糖的反应是不同的, 同一菌种经诱变后, 对槐糖的敏感性也可能不同。

四、槐糖和纤维素粉诱导的纤维素酶组份的比较

槐糖对 EA₃-867 不同的酶组份具有同样的诱导能力。图 9 是 EA₃-867 甘油培养物中加入槐糖和纤维素粉后, C_x 和滤纸崩溃活力 (F.D.) 的变化。在加入槐糖后, C_x 和 F.D. 活力立即同时被诱导出来, 并远远超过纤维素粉的诱导结果。在另一批试验中证明, 槐糖诱导的纤维素酶能分解脱脂棉, 产生葡萄糖, 其活力也超过纤维素的诱导结果, 表明槐糖同纤维素一样, 也能诱导 C₁ 酶

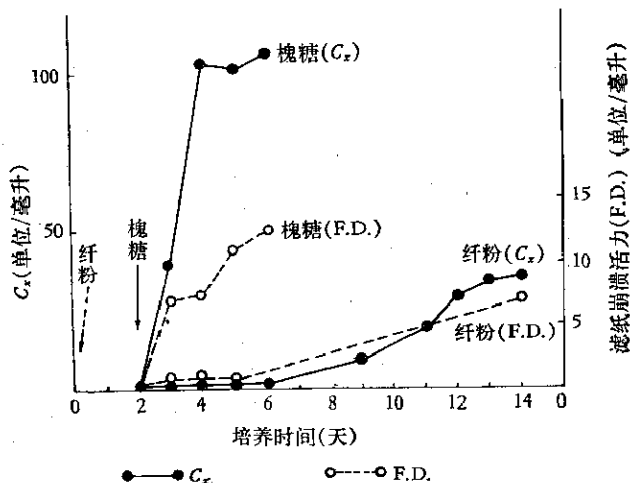


图 9 木霉 EA₃-867 在甘油无机盐培养基中加纤维素粉或槐糖诱导的 C_x 酶和滤纸崩溃活力 (F.D.) 的变化
100 毫升培养基, 30℃ 振荡培养, 纤维素粉 (0.5%) 在 0 小时加入, 槐糖在培养 48 小时加入 (10⁻⁴M)

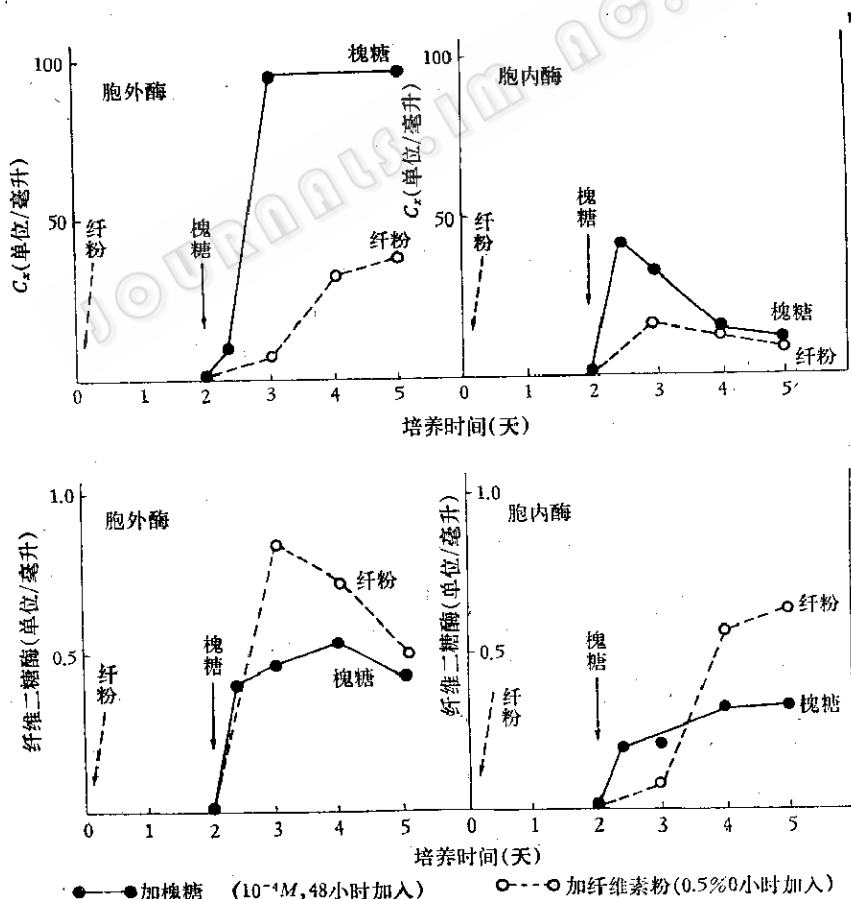


图 10 木霉 EA₃-867 在甘油无机盐培养基中加槐糖或纤维素粉所诱导的 C_x 酶和纤维二糖酶在胞内胞外分布的比较
50 毫升培养基, 在 30—32℃ 培养

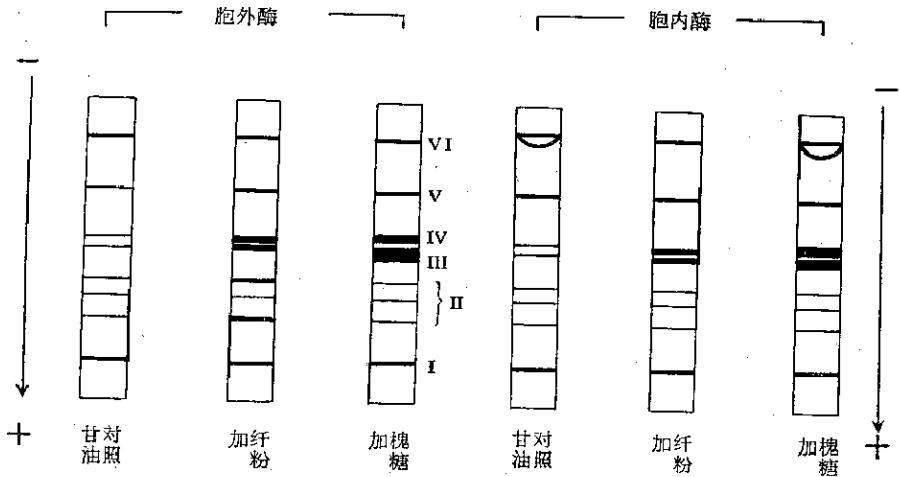


图 11 纤维素粉和槐糖诱导的木霉 EA₃-867 纤维素酶(胞内、胞外)的凝胶电泳图

50 毫升甘油无机盐培养基,孢子接种后,于 32—33℃ 振荡培养,分甘油对照(不加诱导剂),0 小时加纤维素粉(0.5%)和 48 小时加槐糖($10^{-4}M$)三组,在 C_x 活力达高峰时,分别取出,制备胞内、胞外酶制剂,配成 1% 浓度(溶于 40% 蔗糖溶液),进行凝胶电泳,每管加酶 400 微克,电流 24 毫安,电泳时间 1 小时半,用氨基黑染色。

的形成。此外,二者对 C_x 酶和纤维二糖酶的胞内胞外部分都有诱导作用(图10)。而且胞外的 C_x 酶明显高于胞内,可能意味着进入细胞的槐糖,先诱导胞内的 C_x 酶合成,之后立即分泌到胞外。纤维二糖酶在胞内胞外的分布较均匀。Suzuki 等认为,在萤光假单胞菌中槐糖诱导的 C_x 是胞外酶,纤维二糖酶的主要是胞内酶^[19]。

EA₃-867 孢子接种在甘油无机盐培养基中,分甘油对照(即不加任何诱导剂),加纤维素粉(0.5%, 0 小时加入)和加槐糖($10^{-4}M$, 48 小时加入)三组样品,于 32—

33℃ 振荡培养,在 C_x 活力达高峰(槐糖组是 6 天,纤维素粉组是 12 天,甘油对照是 6 天)时,分别取出,制备胞外、胞内酶制剂,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(图 11)。

三组凝胶电泳图大致都可分为主要的六条蛋白区带(I—VI),在加入纤维素粉或槐糖后,蛋白带 III、IV 和 V 明显加深,尤其是加槐糖后,III 和 IV 最深。据凝胶分段切割测定,蛋白带 III 主要含 C_i 酶(测棉花糖),IV 代表 C_x 酶,V 代表 β -葡萄糖苷酶。在甘油对照中同样有这些蛋白带,但量极微。

表 纤维素粉和槐糖诱导的酶制剂活力比较*

诱 导 剂	C _x (单位/毫升)	滤 纸 活 力		纤维二糖酶 (单位/毫升)	果 胶 酶 (单位/毫升)	淀 粉 酶 (单位/毫升)	半纤维素酶 (单位/毫升)	蛋 白 酶 (单位/毫升)	凝 胶 电 泳 峰
		崩溃时间 (分钟)	(单位/毫升)						
纤维素粉 (1%)	86	68	7.4	1.0	0.9	0.9	0	0	I—VI
槐 糖 ($5 \times 10^{-4}M$)	700	15	33.4	0.7	1.0	1.1	0	0	I—VI

* 100 毫升甘油无机盐培养基,孢子悬浮液(EA₃-867)接种, 30℃ 振荡培养,纤维素粉在 0 小时加入(1%),槐糖在培养 48 小时加入($10^{-4}M$)。在纤维素粉中培养 14 天(产酶高峰)和槐糖中培养 5 天(产酶高峰)的培养滤液制成丙酮粉,均配成 1% 浓度,进行各种酶活力的测定比较。凝胶电泳的条件同图 11。

表中所列是另一次试验中纤维素粉和槐糖诱导的酶制剂中各种酶活力测定的结果。纤维素粉和槐糖只诱导纤维素酶。果胶酶和淀粉酶——可能是组成酶,量极微,不能诱导半纤维素酶和蛋白酶。凝胶电泳的蛋白带也相似。

讨 论

研究真核细胞的基因表达,酶蛋白诱导合成的调节控制,是当今分子遗传学的研究方向之一^[20]。纤维分解真菌——木霉能产生诱导性纤维素酶,又是真核生物中最简单的一种,加上取材容易、培养方便、产酶迅速、酶活稳定、测定简便、有实用价值,因而是研究酶诱导形成的良好材料,也是研究真核细胞基因表达的理想课题。同时,随着纤维素酶研究的逐步深入,直接关系到酶产量的纤维素酶的诱导现象正受到人们的重视。早期, Mandels 等发现在不同碳源中只有纤维素、纤维二糖、乳糖和试剂级葡萄糖对纤维素酶有诱导作用^[18],后认为纤维素分解产物纤维二糖可能是真正的天然诱导剂^[21]。但是,纤维二糖的诱导活力很低,在采用高浓度纤维二糖(1%或更高)及降低代谢速度,或添加表面活性剂,才能得到较高的纤维素酶活力^[22-25]。因此,纤维二糖是否是真正的诱导剂,看法是混乱的^[24,25]。另一方面,迄今所知,槐糖是诱导木霉和个别纤维分解细菌纤维素酶活力最强的诱导剂^[19,24,25]。大多作者认为纤维素酶的形成受特殊的诱导剂诱导。但 Hulme 等在研究漆斑霉纤维素酶形成时,认为该菌的纤维素酶不是诱导酶,各种不同碳源,只要控制利用速度,解除降解物阻遏,都能产生纤维素酶^[27]。

我们从槐豆荚提取分离到的槐糖结晶,对拟康氏木霉的胞内胞外纤维素酶以及纤维素酶的不同组份都有强力的诱导作

用。槐糖诱导的纤维素酶与纤维素诱导的相比,只表现出量(速度和活力高低)的差异,在质上没有什么差别,即二者诱导的酶类、组份或凝胶电泳图谱都十分相似,是否可认为二类诱导剂诱导纤维素酶形成的途径和机制相同。二者间的桥梁的纤维素的分解产物——纤维二糖。后者(β , 1-4 连结)同槐糖(β , 1-2 连结)是结构颇为相似的双糖。但纤维二糖加入木霉的甘油培养物中不能诱导纤维素酶的形成,洗涤菌丝体的试验也证明这点(待发表),除非以较高浓度的纤维二糖(0.5%)作为碳源进行生长培养才能迅速产酶,速度恰好介于槐糖和纤维素之间。这似乎只能解释为纤维二糖本身对纤维素酶(如 C_x)并不是真正的诱导剂,而是它在生长培养过程中的转化产物才是真正的诱导剂。这种代谢转化,包括转化成槐糖或其类似物在其他微生物中已得到证实^[21,28,29]。据此,我们推测,纤维素对木霉纤维素酶形成的诱导作用可能是通过其分解产物纤维二糖转化为槐糖或其类似物,这种转化需要一个过程,因此纤维素的诱导比槐糖慢(纤维二糖介于二者之间),而二者诱导的方式却类似。

木霉 EA₃-867 在非纤维素类的碳源如甘油、单糖和双糖中生长,能分泌微量的不随时间变化的纤维素酶到介质中去,其凝胶电泳图也表明存在微量的 C_1 和 C_x 酶,说明木霉纤维素酶除了诱导酶(占主要)外,还有一类不受诱导剂影响的组成酶。它们可能是纤维分解菌所固有的遗传特性,分布在细胞表面或分泌到介质中去,它们在识别环境中的纤维素,从而将信息传递给细胞以合成纤维素酶时,可能起着“信号受体”的重要角色。因为纤维素废物是不溶于水的大分子,无法进入细胞。细胞表面或介质中的纤维素酶,一俟遇到纤维素时,便将后者分解为纤维二糖,进入细胞,

进一步通过某种机制,形成槐糖或其类似的强力诱导剂,从而去阻遏,诱导纤维素酶形成并分泌到胞外分解纤维素,供生长繁殖用。

本试验指出,木霉 EA₃-867 纤维素酶的形成同时受诱导-阻遏系统的调节,此现象在其他真菌、细菌中也见到^[4,19,31,32]。纤维素酶的诱导形成是微生物适应环境的重要方式。另一方面,当培养基中同时存在难分解的纤维素和易利用的碳源(如葡萄糖、甘油等)时,木霉首先利用后者,并借降解物阻遏机制,关闭指导合成纤维素酶的基因,以避免不必要的浪费,直至易利用的碳源用光,降解物阻遏解除,纤维素酶才诱导形成,再分解纤维素为葡萄糖供生长利用。所以,降解物阻遏的调节机制同诱导机制一样,同样是微生物细胞经济而有效地合成酶的一种调节方式。

参 考 文 献

- [1] Jacob, F., and Monod, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 318, 1961.
- [2] Mandels, M., and Weber, J.: *Adv. Chem. Ser.*, 95: 391, 1969.
- [3] Pathak, A. N., and Ghose, T. K.: *Process biochemistry*, 8(4): 35, 1973.
- [4] Horton, J. C., and Keen, N. T.: *Canad. J. Microbiol.*, 12 (2): 209, 1966.
- [5] 上海化纤六厂、上海酒精二厂、上海植物生理研究所纤维素酶组: 微生物育种学术讨论会文集, 科学出版社, p. 89, 1975.
- [6] 上海植物生理研究所、上海酒精二厂: 微生物学报, 18 (1): 27, 1978.
- [7] Clancy, M. J.: *J. Chem. Society*, 11: 4213, 1960.
- [8] Summer, J. B.: *Laboratory Experiments in Biological Chemistry*, Acad. Press, New York, p. 38, 1949.
- [9] 中国科学院微生物所纤维素酶组: 微生物学报, 16 (3): 240, 1976.
- [10] Wood, T. M.: *Proc. IV. IFS. Ferment. Technol. Today*, p. 711, 1972.
- [11] Reese, E. T.: *Biotechnol. and Bioengineering Symp. No. 5*, p. 77, 1975.
- [12] 北京大学制药厂编: 微生物学和酶学基本知识, 科学出版社, 1971.
- [13] Michel Dubois, et al.: *Anal. Chem.*, 28: 350, 1956.
- [14] Lambert, M., and Neish, A. C.: *Canad. J. Res.*, 28: 83, 1950.
- [15] Trevelyan, W. E., et al.: *Nature*, 166: 444, 1950.
- [16] Davis, B. J.: *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404, 1964.
- [17] Yamane, K., et al.: *J. Biochem.*, 67 (1): 9, 1970.
- [18] Mandels, M., and Reese, E. T.: *J. Bact.*, 73: 269, 1957.
- [19] Suzuki, H., Yamane, K., and Nisizawa, K.: *Adv. Chem. Ser.*, 95: 60, 1969.
- [20] 堀内忠郎尾辻望: 化学增刊, 42: 61, 1970.
- [21] Mandels, M., and Reese, E. T.: *J. Bact.*, 79: 816, 1960.
- [22] Reese, E. T., and Maguire, A.: *Developments in industrial Microbiol.*, 12: 212, 1971.
- [23] Reese, E. T., and Mandels, M.: "Cellulose and Cellulose Derivatives" ed. by Norbert M. Bikales, Part V. p. 1079, 1971.
- [24] Mandels, M., and Sternberg, D.: *J. Ferment. Technol.*, 54(4): 267, 1976.
- [25] Mandels, M., Sternberg, D., and Andreotti, R. E.: *Symp. On Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*. Aulanko, Finland, 12—14, March, 1975. ed. by M. Bailey, T-M. Enari, M. Linko, Helsinki, p. 81, 1975.
- [26] Ghose, T. K., Pathak, A. N., and Bisaria, V. S.: *Ibid.* p. 111, 1975.
- [27] Hulme, M. A., and Stranks, D. W.: *Nature*, 226 (5244): 469, 1970.
- [28] Bustin, H. W., and Jabbar, A.: *Biochem. Biophys. Acta*, 15: 543, 1954.
- [29] Satoko teda, et al.: *J. Ferment. Technol.*, 46: 711, 1968.
- [30] Mandels, M., and Reese, E. T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1: 338, 1959.
- [31] Stewart, B., and Leatherwood, J. M.: *J. Bact.*, 128 (2): 609, 1976.
- [32] Nisizawa, T., et al.: *J. Biochem.*, 71 (6): 999, 1972.

INDUCTION AND REGULATION OF CELLULASE FORMATION IN *TRICHODERMA*

I. THE INDUCTION OF CELLULASE FORMATION IN *TRICHODERMA* EA₃-867 BY SOPHOROSE

Zhu Yu-sheng and Tan Chang

(Cellulase Laboratory, Shanghai Institute of Plant Physiology, Shanghai)

A series of investigations on cellulase formation and its regulation in *Trichoderma* have been conducted. In this paper we report the strong induction of cellulase by sophorose in EA₃-867, a strain of *Trichoderma pseudokonigii* Rifai. Sophorose, a white needle-shaped crystal, was obtained from the extract of the pods of *Sophora japonica* L. The cellulase activities (C_1 , C_x and cellobiase) induced by sophorose, especially its initial rate of increase, were considerably higher than those induced by cellulose. The induction of cellulase by sophorose depended upon the time of addition and the organisms used, and was repressed strongly by glycerol. EA₃-867 produced cellulase on a medium with cellobiose (0.5%) faster than with cellulose, but slower than with sophorose, in the last case cellulase was produced in the medium being cultured only for 18 hours. Cellobiose was, presumably, not a true inducer itself. The induction of cellulase by sophorose and cellulose was quite similar both in the extracellular or intracellular components and in the patterns of polyacrylamide gel electrophore-

sis of cellulase preparations induced by them. On a medium containing rapidly utilizable carbon source such as glycerol or glucose, which were not inducers, *Trichoderma* EA₃-867 produced only a trace of cellulase, which ought to be a constitutive cellulase. On glycerol-mineral nutrients supplemented with cellulose or sophorose, EA₃-867 also produced a small amount of pectinase and amylase, which seem to be constitutive enzymes also. The constitutive cellulase, present on cell surface or released into the medium, hydrolyzes cellulose to cellobiose. The latter might be converted into sophorose or its analogues through some mechanisms unknown in the cell. The sophorose or its analogues thus produced is a powerful inducer for cellulase. The constitutive cellulase may thus play a role in the conversion of the insoluble cellulose into a soluble and hence recognizable "signal" molecule. There have been considerable evidences which indicates that the cellulase formation in *Trichoderma* EA₃-867 was regulated by the induction mechanism and by the catabolite repression mechanism as well.