

# 康氏木霉 AS 3.4001 纤维素酶系的研究

那 安 崔福绵 马建华 张树政

(中国科学院微生物研究所,北京)

康氏木霉白色变异株 AS 3.4001 的纤维素酶系经系列分离纯化,获得 6 个聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的组分(组分 I—V 及  $\beta$ -葡萄糖苷酶)。

组分 I 能单独作用于天然纤维素棉花,水解不溶性纤维素,如滤纸、纤维素粉及磷酸膨胀纤维素较可溶性纤维素羧甲基纤维素钠(CMC-Na)更为容易,水解产物为纤维二糖及痕迹量葡萄糖。

组分 II—V 性质十分相近,均不能作用于棉花,但可不同程度地水解上述几种不溶性纤维素。对 CMC-Na 有较强的水解能力。但作用方式的随机性不同。

$\beta$ -葡萄糖苷酶能水解多种类型的  $\beta$ -葡萄糖苷。

在水解不溶性纤维素,特别是天然纤维素棉花时,组分 I 与其它组分表现明显的协同效应。

**关键词** 纤维素酶;康氏木霉 AS 3.4001

目前对绿色木霉和康氏木霉纤维素酶系的分离纯化及各组分性质的研究虽有较多报道,但对各组分性质的比较研究则较少,特别是对某些组分在天然纤维素水解过程中的作用方式尚无详细的研究结果<sup>[1-7]</sup>。

本文报道康氏木霉纤维素酶系的系列分离纯化程序,纯化组分的一般性质、底物特异性的比较研究,并对组分 I 的作用方式进行了某些探讨。

## 材 料 和 方 法

### (一) 底物

纤维素粉(Carl Schleicher & Schull 公司生产型号 No. 123)。滤纸(新华一号)。磷酸膨胀纤维素,制备见参考文献[8]。CMC-Na(上海长虹塑料厂生产)。2-硝基酚- $\beta$ -葡萄糖苷、水杨苷(B. D. H. 公司出品)。苦杏仁素(E. Merck 公司出品)。纤维二糖(新中化学厂出品)。

### (二) 菌种及酶制剂

康氏木霉(*Trichoderma koningii*)白色变异株

AS 3.4001 粗酶制剂制备方法,见参考文献[9]。

### (三) 水解产物分析

还原糖用 Somogyi 法[10]测定。葡萄糖测定见参考文献[8]。纸层析选用 Whatman 1 号滤纸,溶剂系统为正丁醇:醋酸:水(4:1:1),上行法重复二次。显色液为苯胺-二苯胺-磷酸系统。

### (四) 最适作用条件

温度、pH、热稳定性、pH 稳定性、分子量测定及各组分活力测定见参考文献[9,11]。

### (五) 蛋白质测定

按 Lowry 的方法<sup>[12]</sup>进行。

### (六) 扫描电子显微镜观察

将预先用不同组分(浓度 1mg/ml)处理(pH 5.0, 37°C, 3天)的棉花纤维用清水漂洗,用滤纸吸干表面水份,经 2.5% 戊二醛在室温(20°C)固定一小时。用一系列浓度的乙醇(50、70、90、95、100%)及醋酸异戊酯脱水,用二氧化碳临界点干燥法干燥。表面镀金后在 DX-3 型(科学仪器厂生产)扫描电子显微镜下进行观察。

本文于 1984 年 2 月 28 日收到。

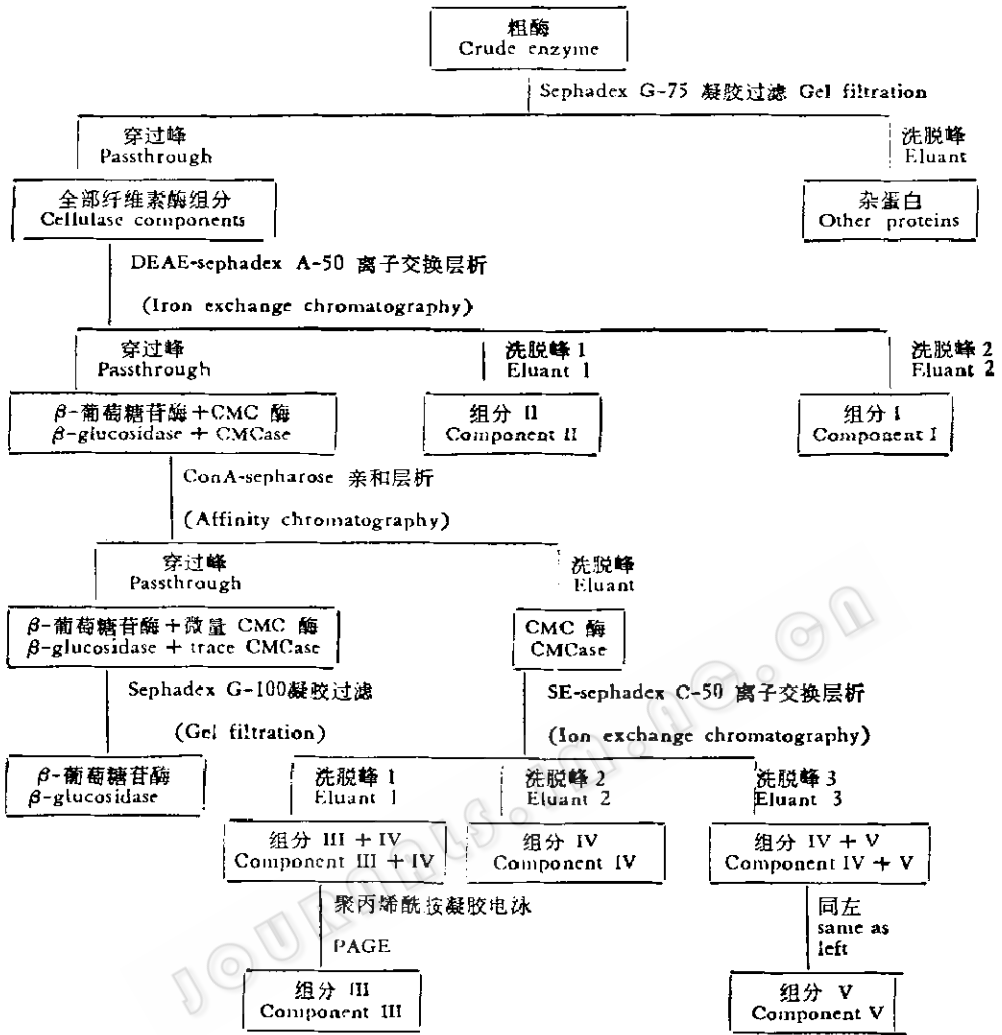


图 1 AS 3.4001 纤维素酶的系列分离纯化程序

Fig. 1 Scheme of consecutive fractionation of cellulase system from *T. koningii* AS 3. 4001

### 结 果

#### (一) 纤维素酶的系列分离纯化程序 (见图 1)

图 1 中组分 I—V (前文中称  $C_1$ 、 $C_{21}$ — $C_{24}$ ) 的分离步骤已有报道<sup>[9,11]</sup>。β-葡萄糖苷酶是将 ConA-Sepharose 下柱的峰 I 合并, 冷冻干燥, 溶于 5ml 蒸馏水中, 上到预先用 0.02M, pH5.0 醋酸缓冲液平衡的 Sephadex G-100 柱 (1.5 × 200cm) 上, 用起始缓冲液洗脱, 收集具有 β-葡萄糖苷酶

活力部分, 冷冻干燥, 重复两次即可获得聚丙烯酰胺凝胶电泳均一样品。

#### (二) 各组分在酶系总蛋白中所占比例 (见表 1)

由表 1 可见组分 I 占酶系总蛋白量 80% 以上, 虽然该组分较易于分离, 蛋白量损失较其它组分少, 根据数据仍可说明组分 I 是酶系的主要构成组分。

#### (三) 各组分一般性质的比较 (见表 2)

由表 2 可见组分 I 具有较高的 pH 稳

表 1 各组分占酶系总蛋白的百分比

Table 1 The percentage of various components in the total proteins of cellulase system

组分 Component	I	II	III	IV	V	$\beta$ -葡萄糖苷酶 $\beta$ -glucosidase	酶系总蛋白 Total protein
蛋白质 (mg) Protein	55.2	2.2	1.8	2.0	1.1	1.9	64.2
%	85.9	4.0	3.2	3.7	2.0	2.9	100

表 2 酶系中各组分一般性质的比较

Table 2 The comparison of some properties of various components in cellulase system

组分 Component	性质 Property	分子量 M	最适温度 ( $^{\circ}$ C) Optimum temp.	最适 pH Optimum pH	*pH 稳定范围 The stable range of pH	**热稳定性( $^{\circ}$ C) Heat stability	
						a	b
I		55,000	45	4.0	2.2-10.0	75	100
II		44,500	50	5.0	4.0-9.0	60	80
III		34,000	60	5.5	4.0-9.0	70	80
IV		34,000	60	5.5	4.0-9.0	70	80
V		34,000	55	5.5	4.0-9.0	65	80
$\beta$ -葡萄糖苷酶 $\beta$ -glucosidase		77,000	60	5.0	4.0-9.0	65	75

\* 20 $^{\circ}$ C 处理酶 48 小时,活力无明显下降的 pH 范围

No obvious loss of enzyme activity was observed at 20 $^{\circ}$ C for 48h

\*\* a. 为在 pH5.0 热处理酶 30 分钟,酶活力下降一半时的温度

The temperature that 50% of the enzyme activity at pH5.0 for 30 min was lost

b. 为同样条件下酶活力全部丧失的温度,但组分 I 在 100 $^{\circ}$ C 处理 30 分钟仍残存活力 25%

The temperature that all of the enzyme activity at pH 5.0 for 30min was lost, but 25% of component I activity under the same conditions was retained

定性及耐热性,组分 II—V 的一般性质十分相近。

(四) 各组分的底物特异性 (见表 3、表 4)

由表 3 可见组分 I 是酶系中唯一能微弱水解天然纤维素棉花和产生还原糖的组分。它水解不溶性纤维素(纤维素粉、滤纸及磷酸膨胀纤维素)似较水解可溶性纤维素更为容易。水解产物中含微量葡萄糖。

组分 II—V 均不能水解棉花,但可不同程度水解其它几种不溶性纤维素,对 CMC-Na 均有较强的糖化力和一定的液化

力。水解产物中葡萄糖所占比例较组分 I 中的大。

由表 4 可见  $\beta$ -葡萄糖苷酶可以水解醇糖苷、酚苷、氰苷等多种  $\beta$ -葡萄糖苷,以及  $\beta$ -半乳糖等。

(五) 组分 I 水解产物分析 (见图 2)

由图 2 可见组分 I 水解上述几种底物,产物主要为纤维二糖及痕迹量葡萄糖。

(六) 被不同组分作用后棉花纤维的电镜观察

结果见图版 I-1。

表 3 各组分的底物特异性

Table 3 Substrate specificities of various components

底物 Substrate	CMC-Na		磷酸膨胀纤维素 Phosphoric acid swollen-cellulose	滤纸 Filter paper		纤维素粉 Cellulose powder		脱脂棉花 Absorbent cotton	
	作用时间 Reaction time	CMC-Na		作用时间 Reaction time	滤纸 Filter paper	作用时间 Reaction time	纤维素粉 Cellulose powder	作用时间 Reaction time	脱脂棉花 Absorbent cotton
水解糖 (μg) Hydrolyzed sugar	30 min	还原糖 Reducing sugar	10 min	6h	48h	48h	48h	3天 (day)	
	葡萄糖 Glucose	比粘度 <sup>*</sup> η <sub>sp</sub>							
组分 I Component I		1.5	0	13.5	14.0	0	13.0	2.0	0
		47.0	0.19	1.0	5.0	0	2.5	0	0
组分 II Component II		73.5	0.67	19.0	9.0	2.0	6.0	0	0
		72.5	0.59	20.0	11.0	0.5	11.0	0	0
组分 III Component III		25.0	0.39	4.0	0	0	1.5	0	0
		2.0							

$$* \eta_{sp} = \frac{t_0 - t}{t_0}$$

表 4  $\beta$ -葡萄糖苷酶的底物特异性  
Table 4 Substrate specificity of  $\beta$ -glucosidase

底 物 Substrate	纤维二糖 Celluliose	水杨苷 Salicin	苦杏仁苷 Amygdalin	2-硝基酚- $\beta$ -葡萄糖苷 2-nitrophenyl- $\beta$ - glucosidase	$\beta$ -乳糖 $\beta$ -lactose
还原糖 ( $\mu$ g) Reducing sugar	124	80	76	69	104

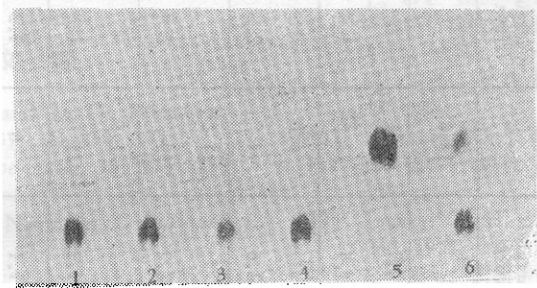


图 2 组分 I 水解不同底物时水解产物的纸层析图谱  
Fig. 2 Paper chromatogram of the products hydrolyzed by component I from different substrates

1. 磷酸膨胀纤维素 Phosphoric acid swollen-cellulose
2. 滤纸 Filter paper
3. 纤维素粉 Cellulose powder
4. 标准纤维二糖 Standard celluliose
5. 标准葡萄糖 Standard glucose
6. 葡萄糖+纤维二糖 Glucose+celluliose

由图版 I-1 可见组分 I 处理后的棉花纤维, 表面上出现明显的裂痕及破损。组分 II—V 处理后的棉花纤维则无明显变化。

(七) 酶系中各组分的协同效应 (见表 5)

由表 5 可见对于可溶性纤维素 CMC-Na 组分之间的各种组合协同倍数大体都为 1, 说明对该底物组分之间几乎不显示协同效应。对于不溶性纤维素, 组分 I 与其它任一组分之间的协同倍数均大于 1, 说明存在着协同效应。组分 II—V 之间的这种效应并不明显。当全部组分混合时可观察到最强的协同效应, 特别是对天然纤维素棉花的水解, 协同倍数可高达 5.5 倍。以上结果说明组分 I 在不溶性纤维素水解

过程中起重要作用。但天然纤维素的有效水解是各组分协同作用的结果。

## 讨 论

Pettersson、wood 等人报道<sup>[6,7]</sup> 在天然纤维素水解中起重要作用的  $C_1$  酶, 实际上是一外切型  $\beta$ -1, 4 葡聚糖纤维二糖水解酶, 因此, 提出天然纤维素的水解是由内切型的  $\beta$ -1, 4 葡聚糖酶 ( $C_x$  酶) 开始的, 但至今尚无直接证据说明后者的这一作用。

Ogawa 等人<sup>[5]</sup> 认为酶系中的组分可分为两类。类型 I 水解可溶性纤维素较水解不溶性纤维素更为容易。类型 II 则相反, 后者在天然纤维素的水解中起主要作用。各组分的作用方式都是随机的, 区别仅在

表 5 酶系中各组分的协同效应  
Table 5 Synergistic effect among various components

底物 Substrate	CMC-Na		磷酸腺苷纤维紊 Phosphoric acid swollen-cellulose		滤纸 Filter paper		纤维素粉 Cellulose powder		脱脂棉花 Absorbent cotton	
	μg	协同效应 (倍数) Factor of synergistic effect	μg	协同效应 (倍数) Factor of synergistic effect	μg	协同效应 (倍数) Factor of synergistic effect	μg	协同效应 (倍数) Factor of synergistic effect	μg	协同效应 (倍数) Factor of synergistic effect
还原糖 Reducing sugar	I	1.5	13.5		14.0		13.0		2.0	
	II	47.0	1.0		5.0		2.5		0	
	I+II (1:1)	51.5	0.9	16.0	1.1	29.0	1.5	23.5	2.5	1.3
	III	73.5		19.0		9.1		6.0	0	
	I+III (1:1)	76.0	1.0	34.0	1.0	57.0	2.6	44	2.5	1.3
	IV	72.5		20.0		11.0		11.0	0	
	I+IV (1:1)	77.0	1.0	42.0	1.2	53.0	2.2	59	2.5	1.3
	V	25.0		4.0		0		1.5	0	
	I+V (1:1)	24.0	0.9	24.0	1.4	19.5	1.2	21	2.4	1.2
	II+III+IV+V (II-V) (0.25:0.25:0.25:0.25)	60.0	1.1	13.0		8	1.1	6	0	
	I+II-V (1:1:1)	61.0	1.0	49.5	1.7	60	2.5	63	5	2.5
	β-葡萄糖苷酶 (β-galactosidase)	0		0		0		0	0	
	I+β-葡萄糖苷酶 (1:1:1)	1.5	1.0	16.5	1.2	25	1.9	20	4.0	2
	II-V+β-葡萄糖苷酶 (1:1:1)	64.0	1.1	15.0	1.1	9	1.1	8	0	
	I+II-V+β-葡萄糖苷酶 (1:1:1)	65	1.0		2.0	86	4.1	98	11	5.5

于内切、外切能力所占的比例不同。

本工作研究结果表明,组分 I 与 Ogawa 等人报道的纤维素酶类型 II 近似。组分 II—V 是一组内、外切混合型的纤维素酶。为避免与 Wood 等人定义的  $C_1$ 、 $C_x$  酶相混淆,本文将前文称为  $C_1$ 、 $C_{x1}$ — $C_{x2}$  的组分顺序改称为组分 I—V。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Berghem, L. E. R. and L. G. Pettersson: *Eur. J. Biochem.*, 37: 21—30, 1973.  
 [ 2 ] Eriksson, K. E.: *Experientia*, 38: 156—159, 1982.  
 [ 3 ] Okada, G. and K. Nisizawa. *J. Biochem.*, 78: 297—230, 1975.  
 [ 4 ] Halliwell, G and R. Vincent: *Biochem. J.*,

- 199: 409—417, 1981.  
 [ 5 ] Ogawa, K., Toyama, H. and N. Toyama: *J. Ferment. Technol.*, 60: 349—355, 1982.  
 [ 6 ] Pettersson, L. G., Axio-Fredriksson, U.B. and L. E. R. Berghem: Proceedings of the IVth international fermentation symposium: Fermentation technology today, Society of fermentation technology, Japan, p. 727—729, 1972.  
 [ 7 ] Wood, T. M. and S. I. McCrae: *Biochem. J.*, 171: 161—172, 1978.  
 [ 8 ] 中国科学院微生物研究所纤维素酶组: *微生物学报*, 16(3): 240—248, 1976.  
 [ 9 ] 那 安等: *微生物学报*, 21(3): 334—338, 1981.  
 [ 10 ] Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 195: 19, 1952.  
 [ 11 ] 那 安等: *微生物学报*, 22(4): 333—338, 1982.  
 [ 12 ] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.  
 [ 13 ] 那 安等: *真菌学报*, 2(1): 50—58, 1983.

## CELLULASE SYSTEM OF *TRICHODERMA KONINGII* AS 3.4001

Na An Cui Fumian Ma Jianhua Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Six components were isolated and purified from a crude cellulase preparation by consecutive fractionation. The purified components included component I—V and  $\beta$ -glucosidase. Component I was an essential enzyme in the cellulase system. It was the unique component attacking native cellulose, hydrolyzing insoluble cellulose such as cellulose powder, filter paper, and phosphoric acid swollen-cellulose more easily than soluble cellulose CMC-Na. Its reaction products consisted of cellubiose and trace of glucose. In contrast with component I, component II—V did not attack native cellulose but were able to hydrolyze other insoluble celluloses in different de-

gree. They showed stronger saccharifying and liquefying power toward CMC-Na. The recombination of component I with each of the other components showed marked synergistic effect on hydrolysis of insoluble celluloses. This effect was not obvious among components II—V. The strongest synergistic effect was found when all of the components were mixed together. The results indicated that component I played an important role in hydrolysis of insoluble celluloses, especially native cellulose.

### Key words

*Trichoderma koningii* AS 3.4001;  
Cellulase