

纤维素酶解过程的分析和测定

高培基 曲音波 王祖农

(山东大学微生物研究所, 济南)

用多元回归法定量分析了绿色木霉 *Trichoderma viride* 纤维素酶系的三类组分及其协同效应在纤维素粉酶解中的作用。结果表明, 纤维素的溶解由 CBH 组分和 EG 组分的协同作用所决定, 任一单一组分或其它组分间协同作用的效应都很微弱。而还原糖的生成则主要是在此基础上由纤维二糖酶所促进的。当纤维素粉分解近 70% 时, X 光衍射分析表明, 其无定形区酶解 73.6%, 结晶区酶解 66.6%, 两者几乎同时被分解。由此, 提出了一个同时测定纤维素酶系的纤维溶解活力和糖化活力的方法。

关键词 纤维素酶; 纤维溶解活力; 纤维糖化活力

纤维废物的利用具有重要的经济意义。但通过纤维素酶酶解途径利用纤维废物, 目前还未达到实用阶段。其主要原因之一在于天然纤维素为一不溶性聚合物, 是难于被酶解的物质^[1]。为改进纤维素的酶解工艺, 近年来主要开展了提高纤维材料的酶解感受性和酶生产效率等方面的研究。而怎样测定一纤维素酶系的酶活力, 则是上述研究中遇到的问题^[2]。微生物的纤维素酶是由多个组分组成的酶系。真菌纤维素酶系主要包括 β -1,4-葡聚糖纤维二糖水解酶 (CBH, EC 3. 2. 1. 91)、内切 β -1,4-葡聚糖酶 (EG, EC 3. 2. 1. 4) 和纤维二糖酶 (CB, EC 3. 2. 1. 21) 三类组分^[3,4]。除 CB 的活力测定易于标准化外^[5], 其它两类酶的活力测定至今还不得不沿用经验性方法 (包括为国内外所广泛应用的滤纸酶活和 CMC 酶活测定方法^[6,7]), 试验结果的准确性和可比性都不够令人满意^[8,9]。本文报道用多元回归法分析纤维素粉的酶解过程, 并由此提出测定纤维素酶系纤维溶解活力和糖化活力的方法。

材料和方法

(一) 纤维素酶

绿色木霉 *Trichoderma viride* 菌株固体培养物的浸提液经酒精沉淀得粗酶粉, 依前文^[10]方法分离纯化, 得到 1 个 CBH 组分, 4 个 EG 组分和 1 个 CB 组分。聚丙烯酰胺圆盘电泳分析^[10]表明, 上述 6 个组分均为单一区带。为便于试验设计和检验各类组分间的协同作用, 把上述 4 个 EG 组分依其在原酶液中所占的比例, 重新组成为 1 个 EG 组分。

(二) 纤维性材料和纤维素酶活力测定

将 Whatman CF11 纤维素粉按 Nummi 等方法^[11]湿法球磨 48h 后, 加到 0.05mol/L pH4.8 醋酸缓冲液中, 配成浓度为 1000 μ g/ml 的悬浮液。球磨前后及酶解后的样品用 X 光衍射法测定其结晶度。

本文于 1987 年 9 月 3 日收到。

上海纺织科学院测试中心黄锦星同志进行 X 光衍射分析, 特此致谢。

酶解过程中纤维素粉的溶解量由其悬液浊度的降低值来推算^[11]，浊度测定使用上海第四分析仪器厂生产的722型光栅分光光度计，在550nm下测透光率T值。用Somogyi法测还原糖生成量^[9]。

(三) 多元线性回归分析

用多元线性回归法^[12]分析绿色木霉纤维素酶系中上述三类组分在纤维素酶解中的作用。测定数据拟合下列多元回归模型：

$$\hat{Y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5 + b_6x_6 + b_7x_7$$

式中，因变量 \hat{Y} 代表纤维素的溶解量或还原糖的生成量。 b_0 为回归常数。 b_i 为偏回归系数，数值上等于在其它自变量固定时， x_i 每改变1个单位所导致 \hat{Y} 的增减值。 x_i 为自变量， x_1 代表CBH组分， x_2 为EG组分， x_3 为CB组分。 x_4-x_7 分别代表组分间的协同作用。 $x_4 = x_1 + x_2$ ，即CBH和EG间的协同作用。 $x_5 = x_1 + x_3$ ， $x_6 = x_2 + x_3$ ， $x_7 = x_1 + x_2 + x_3$ 。

回归方程的拟合采用日本富士通公司的大型统计分析软件包ANALYST，用逐步回归子程序，在M-340中型计算机上进行^[13]。自变量进入回归方程或删除时的F值均为2.0。当 x_1 ， x_2 和 x_3 组合中的任一自变量为零时，其协同效应均为零，即不生成新的变量。

结果和讨论

(一) 纤维素粉酶解过程曲线的测定

1. 酶解过程曲线：5 ml CF11 纤维素粉悬液 (100 μ g/ml)，加 0.5ml 纤维素酶液 (含CBH组分50 μ g，EG组分100 μ g，CB组分25 μ g)，50 $^{\circ}$ C分别酶解不同时间。测纤维素溶解量和还原糖生成量。结果见

图1 (数据为三次试验均值，下同)。由图1可见，在酶解过程中，纤维素粉的溶解和还原糖的生成是相继进行的二个反应。

2. 纤维二糖酶对酶解过程的影响：试验条件同上，只是分为加与不加纤维二糖酶的两组，酶解至28h为止。

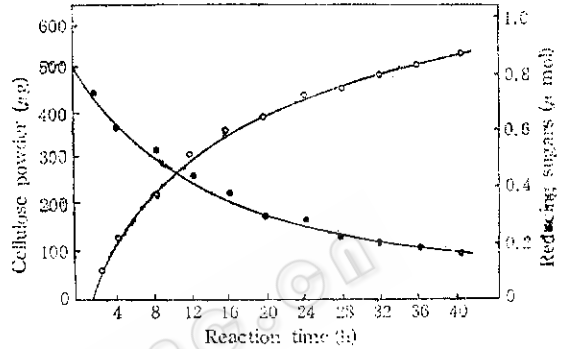


图1 纤维素粉的酶解过程曲线

Fig. 1 Reaction curves of enzymatic hydrolysis of cellulose powder

- — 纤维素粉 Cellulose powder
- - - 还原糖 Reducing sugar

由图2可见，纤维素粉的溶解主要反映了CBH组分和EG组分的协同作用，纤维二糖酶的加入仅使此作用增强约8%，但对还原糖的生成则有决定性的作用。

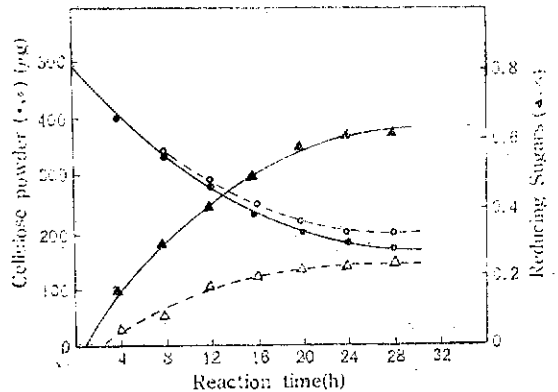


图2 纤维二糖酶对纤维素粉酶解过程的影响

Fig. 2 The effect of cellobiase on the enzymatic hydrolysis of cellulose powder

- 加纤维素二糖酶 Cellobiase added
- 不加纤维素二糖酶 Without cellobiase

上述试验初步阐明了纤维素酶三类组分在纤维素酶解中的作用, 与已报道的结果相似^[3,4], 但同样不能定量地分析纤维素酶系中各组分, 特别是其协同效应的作用。

(二) 用多元回归法研究纤维素酶各组分在酶解中的作用

CBH组分选用 0, 40 μ g和80 μ g三种用

量, EG组分选用 0, 100 μ g和 200 μ g 三种用量, 纤维二糖酶选用 0 和 50 μ g 二种用量, 组成 3 \times 3 \times 2 的 3 因素全组合试验^[12], 共 18 个处理。50 $^{\circ}$ C 酶解 12h 后, 分别测定纤维素粉溶解量和还原糖生成量。在 M-340 计算机上, 用 ANALYST 软件包进行多元回归分析。结果见表 1。

结果表明, 对同一试验结果, 分别以

表 1 纤维素酶组分在纤维素酶解中作用的回归分析

Table 1 Summary table of regression analysis for identifying the action of cellulase fractions in hydrolysis of cellulose powder

	选入的变量 Variable entered	标准回归系数 Standard coefficient	偏回归系数 Partial coefficient	T 值 T value	偏相关系数 Partial corre
还原糖的生成 Reducing sugar production	EG	0.1603	0.0029	2.19*	0.519
	CBH+ EG	0.6094	0.0032	8.00**	0.911
	EG+ CB	0.1073	0.0010	1.46	0.37
	CBH+ EG+ CB	1.0063	0.0049	13.22**	0.96
纤维素的溶解 Cellulose solubilization	CBH+ EG	0.7144	0.6311	8.76**	0.930
	CBH+ EG+ CB	0.7460	0.5430	7.34**	0.910

还原糖的生成或纤维素的溶解为目标函数时, 选入回归方程的自变量的种类及其回归系数值是不同的。前者的回归方程 (以标准回归系数表示) 为:

$$\hat{Y} = 0.16EG + 0.609(CBH + EG) + 0.11(EG + CB) + 1.006(CBH + EG + CB) + b_0$$

由于标准回归系数为无因次项, 其绝对值可代表该自变量对 \hat{Y} 影响的大小^[12]。由此可看出, 对还原糖的生成来说, CBH组分与 EG 组分的协同效应是显著的, 而CB组分的加入又可使此作用提高约40%。单一EG组分及其与CB的协同都作用较小。而单一的CBH或CB及二者的协同作用都很微弱, 因而未能进入回归方程。

以纤维素溶解量为目标函数时, 所得的回归方程为:

$$\hat{Y} = 0.714(CBH + EG) + 0.746(CBH + EG + CB) + b_0$$

这表明, 对纤维素的溶解来说, CBH组分和EG组分的协同作用同样具有决定性的作用, 但CB组分对此的促进作用则很小, 其它组分单独或协同的作用均很微弱, 都未能进入方程。

上述结果清楚地反映了在纤维素酶解过程中, 纤维素的溶解和还原糖的生成是由纤维素酶系中三类组分, 以不同的协同方式进行的二个相继反应过程。这一认识对于我们研究纤维素的酶解机制, 探讨优化纤维废物的酶解工艺, 都会有所帮助。

计算机同时输出的数据还显示, 回归

效果是显著的 ($F \gg F_{0.01}$)。由两个回归方程(使用偏回归系数)分别代入18个试验处理自变量值所得的预测值 \hat{Y} , 与实测数据相比,除个别外,其相差均在试验的2倍标准差之内。

(三) 纤维素样品的 X光衍射结构分析

CF11 纤维素粉经湿法球磨前后及酶解后的样品, 以及作为参照的 Whatman 1号滤纸的 X光衍射分析结果列入表2。

表 2 纤维素样品的X光衍射分析结果
Table 2 X-ray diffraction analysis of cellulose samples

样 品 Sample	无定形区 Amorphous region (%)	结晶区 Crystalline region (%)
CF11 纤维素粉 CF11 (contrast)	33.90	66.09
球磨后的CF 11 Ball milled CF11	48.57	51.42
酶解后的球磨 CF11 Ball milled CF11 after enzymolysis	42.73	57.23
滤 纸 Whatman No.1 FP	38.83	61.17

表2表明,经湿法球磨48h后,纤维素粉的结晶度降低约15%,无定形区的比例相应提高。这与已报道的结果相近^[14]。其结晶区较常用的Whatman 1号滤纸约低10%。经酶解40h,约70%溶解后,剩余样品的结晶区比例增加了5.8%,无定形区相应减少。由此可推算出,其结晶区酶解了66.6%,而无定形区酶解了73.6%,两者是近于同时被酶解的。

(四) 纤维溶解活力和糖化活力的测定

以不溶性的纤维素类物质为底物测定纤维素酶活力时,由于底物不溶性的限制,所得单位酶液的活力总是随用酶量的

增大而递减^[2,8]。这给酶活力测定带来很大困难。为进一步探索此问题,我们把上述三类组分组成比例不同的4种酶液,各取25—300 μ l,加入5ml纤维素粉悬液,50 $^{\circ}$ C酶解12h后,测定纤维素粉溶解量和还原糖生成量。结果表明,当用酶量增加2倍时,反应量近于增加1.25倍,即酶活力正比于酶量的立方根(图3)。这与Nisizawa等人的研究结果相近^[15],很可能是纤维素酶分子在不溶性底物上吸附特性的一种反映。考虑到在实际工作中的适用性,用酶量的立方根对反应量拟合一元

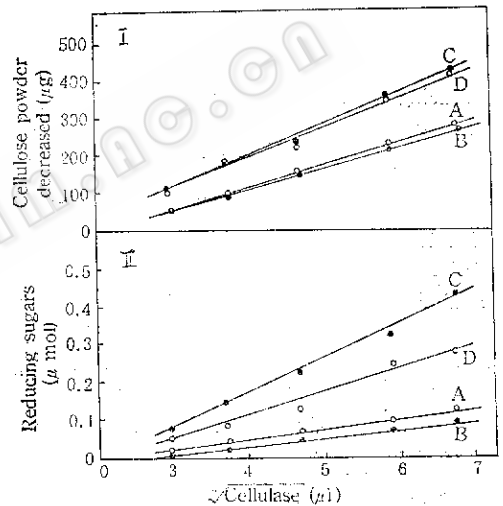


图3 纤维素酶浓度和组成对纤维溶解活力(I)和纤维糖化活力(II)的影响

Fig. 3 Effects of cellulase concentration and composition on the solubilization (I) and saccharification (II) of cellulose powder

- A. CBH:EG:CB = 0.2:2.0:0.2;
- B. CBH:EG:CB = 0.2:2.0:0.02;
- C. CBH:EG:CB = 1.0:0.5:1.0;
- D. CBH:EG:CB = 1.0:0.5:0.1

$$I: \hat{Y}_A = 59.9X - 112.2$$

$$\hat{Y}_B = 56.6X - 106.8$$

$$\hat{Y}_C = 87.0X - 134.4$$

$$\hat{Y}_D = 83.8X - 131.4$$

$$II: \hat{Y}_A = 0.028X - 0.064$$

$$\hat{Y}_B = 0.023X - 0.063$$

$$\hat{Y}_C = 0.097X - 0.21$$

$$\hat{Y}_D = 0.064X - 0.15$$

线性回归方程, 可在较大酶浓度变化范围内准确测得酶活力。

由图 3 还可看出, 酶液中 CBH 和 EG 的比值会显著影响纤维溶解活力(曲线斜率)。纤维二糖酶的加入与否对此影响不大, 但对纤维糖化活力来说, 则有显著作用。与前述结果相一致。

根据上述结果可以认为, 对于一纤维素酶制剂而言, 由于所含各酶组分恒定, 可用不同浓度的酶液测定酶作用曲线, 由拟合的一元线性回归方程来确定酶液的活力。但对不同种类的纤维素酶制剂, 可能由于条件变化, 使纤维素酶系中各组分的比值有变化时, 酶浓度曲线的斜率将不

同, 失去了可比性。而曲线斜率的大小, 则能间接地反映出这种变化, 可作为不同纤维素酶系活力特性的一个参考值。

总之, 本文提出的同时测定纤维溶解活力和糖化活力的方法, 可分别反映出 CBH、EG 和 CB 间的协同作用, 相对比率和酶活力(曲线斜率), 还可用于不同来源纤维素酶活力的比较。这为菌种选育中估价遗传进展, 酶生产中选择优化培养条件等提供了定量分析的依据。CF11 纤维素粉是常用材料, 制备和测定方法也易于标准化。因此, 本方法将有利于纤维素酶研究工作的开展。

参 考 文 献

- [1] Lee, Y.H. and Fan, L.T., *Adv. Biochem. Eng.*, 17:101, 1980.
- [2] 高培基: 工业微生物, (6):5, 1985.
- [3] 那安等: 微生物学报, 25 (1):31, 1985.
- [4] Halliwell, G. and Vincent, R., *Biochem. J.*, 199 (3):409, 1981.
- [5] Gao Peiji, *Biotechnol. Bioeng.*, 29 (7):903, 1987.
- [6] Mandels, M. et al., *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 6:21, 1976.
- [7] Ghose, T.K., *Pure & Appl. Chem.*, 59 (2): 257, 1987.
- [8] 张振清: 植物生理学通讯, (3):69, 1980.
- [9] 高培基: 植物生理学通讯, (2):46, 1986.
- [10] 袁崇实: 生物化学与生物物理学进展, (1):50, 1980.
- [11] Nummi, M. et al.: *Anal. Biochem.*, 116 (1):113, 1981.
- [12] Gomez, K.A. and Gomez, A.A.: *Statistical procedures for agricultural research*, 2nd, John & Sons, New York, p. 357, 1983.
- [13] 黄因敏: ANALYST 统计分析软件包, 北京医科大学分析计算中心, p.227, 1986.
- [14] Lee, S.B. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 25 (1):33, 1983.
- [15] Nisizawa, K., *J. Ferment. Technol.*, 51:267, 1973.

ANALYSIS AND ESTIMATION OF CELLULOSE HYDROLYSIS

Gao Peiji · Qu Yinbo · Wang Zunong

(*Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan*)

Six pure cellulase components (one CBH, four endo-glucanase and one cellobiase) from a cellulase preparation of *Trichoderma viride* were separated and purified by gel filtration and ion-exchange chromatography. The multiple regression analysis was successfully used for estimating the action pattern of cellulase fractions, alone or in combination, in hydrolysis of cellulose powder. The results shown that the synergism between the CBH and endo-glucanase plays a significant role in the solubilization of cellulose powder, and the effects of other fractions are minimal. The saccharification of cellulose powder as represented by the formation of reducing sugars is a sequential reaction with cellulolytic solubilization, which can be obviously increased by the addition of cellobiase. The X-ray diffraction analysis indicated that, as the cellulose powder was decomposed to about 70%, the hydrolysis of both amorphous and crystalline regions was simultaneous. An assay which can simultaneously determine the cellulolytic solubilization and saccharification has been proposed.

Key words

Cellulolytic solubilization, cellulolytic saccharification, cellulase, *Trichoderma viride*