

# 金属离子对纤维素酶活力影响的研究

李德莹 龚大春 田毅红 余 燕

(三峡大学化学与生命科学学院,湖北 宜昌 443002)

**摘要:** 对10种金属离子对绿色木霉所产纤维素酶活力的影响进行研究。结果表明,  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  离子浓度在一定范围内,对纤维素酶活力有激活作用; $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  等离子浓度在一定范围内,对纤维素酶有抑制作用,其中  $\text{Fe}^{3+}$  激活作用明显,  $\text{Cu}^{2+}$  抑制作用明显。 $\text{Ca}^{2+}$  在实验浓度范围内对酶活影响不大。添加  $\text{Fe}^{3+}$  使纤维素酶对乙醇的耐受力提高,并可加快纤维素酶的吸附速度,提高水解效率。

**关键词:** 燃料乙醇; 金属离子; 纤维素酶; 抑制; 激活

中图分类号:TS262.2;TQ920;Q55

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2009)06-0040-03

## Study on the Effects of Metal Ions on Cellulase Activity

LI De-ying, GONG Da-chun, TIAN Yi-hong and Yu Yan

(College of Chemistry and Life Science, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

**Abstract:** The effects of ten kinds of metal ions on cellulase activity (cellulase produced by *Trichoderma viride*) were studied in the paper. The results were as following: cellulase activity improved by  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$ , and among them  $\text{Fe}^{3+}$  had the strongest activation effects; cellulase activity decreased by  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ , and among them  $\text{Cu}^{2+}$  had the strongest inhibition effects. The addition of  $\text{Fe}^{3+}$  could effectively improve the ethanol tolerance capability of cellulase, accelerate the absorption rate of cellulase, and increase the hydrolysis rate.

**Key words:** fuel alcohol; metal ions; cellulase; inhibition; activation

生物燃料的原料来源是生物燃料可持续发展的重要解决问题。在我国限制使用玉米加工生物燃料之后,目前一些企业和研究机构正在致力于将非粮食类或废弃生物质如秸秆等转化为乙醇,以帮助解决原料供应问题,其中以木质纤维素为原料生产生物乙醇是技术开发的焦点。木质纤维素来源于农业废弃物,如麦草、玉米秸秆、玉米芯等;工业废弃物如制浆和造纸厂的纤维渣;林业废弃物和城市废弃物如废纸、包装纸等。但工业规模利用纤维质原料生产燃料存在一些障碍:酶解成本过高、缺乏经济可行的发酵技术等。因此,技术路线的优化组合问题、生产过程中成本降低的问题需要解决<sup>[1]</sup>。其中,纤维素的水解过程中存在的问题主要为纤维素酶活力低,水解纤维素酶用量大,且纤维素水解速率随时间延长而下降。为了得到一个较好的糖化效果,寻找一种可有效提高酶活的方法显得至关重要。

金属离子是微生物生长必不可少的一类营养物质。在木霉菌丝体的生长及产酶过程中,一些含金属离子的盐类是其生长和产酶所必需的营养物质<sup>[2]</sup>。因此设想考察添加不同种类金属离子以及金属离子的浓度对纤维素

酶活力的影响,以期能得到较好的酶的应用效果。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

汽爆麦草:中粮集团提供;绿色木霉:购于中国工业微生物菌种保藏中心。

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 绿色木霉培养

取斜面菌种3~4环接入三角瓶种子培养液,置于摇床,100 r/min,28℃培养48 h。

取15 mL种子液,加入固体培养基里混匀,28℃培养箱培养5~7 d。

种子培养基:葡萄糖6 g;磷酸二氢钾0.4 g;硫酸铵0.6 g;硫酸镁0.04 g;蒸馏水60 mL。

固体培养基:麦草25 g;麦麸6 g;磷酸二氢钾0.4 g;硫酸铵0.5 g;硫酸镁0.4 g;蒸馏水60 mL。

##### 1.2.2 纤维素酶的制备<sup>[3]</sup>

取纤维素酶固体曲5 g,加pH4.8醋酸-醋酸钠缓冲液75 mL,30℃摇床振荡1 h。4000 r/min离心15 min,取

基金项目:木质纤维素酒精的生物转化工艺研究(A2007103-1)、纤维素乙醇的相关技术研究(SDHZ2008099)。

收稿日期:2009-02-11

作者简介:李德莹(1973-),女,湖北宜昌人,讲师,硕士,从事生物化工教学和生物质研究。

上清酶液即为粗酶液。

### 1.2.3 金属离子的影响

#### 1.2.3.1 金属离子对酶活力的影响

取粗酶液 10 mL, 添加不同种类、浓度的金属离子, 40 °C 保温 30 min, 按酶活测定方法分别测定滤纸酶活、CMC 酶活、 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力, 不添加金属离子的酶活力设定为 100 %。

#### 1.2.3.2 金属离子对纤维素酶耐受乙醇浓度的影响

选择对酶活促进作用最明显的离子, 在体系中加入 0.1 %、3 %、5 %、7 % 浓度的乙醇, 研究添加金属离子对纤维素酶耐受乙醇浓度的影响。

#### 1.2.3.3 金属离子对酶与底物吸附的影响

取 10 g 汽爆麦草、酶液(75FPA/g 纤维素), 液体总体积 100 mL, 添加金属离子置于 50 °C 摇床进行酶水解, 每 2 h 测定纤维素酶的吸附情况以及水解情况。

### 1.3 测定方法

#### 1.3.1 还原糖的测定

采用 DNS 法测定还原糖<sup>[4]</sup>。

#### 1.3.2 纤维素酶活测定<sup>[5]</sup>

本文采用的酶活力单位定义如下:

滤纸酶活: pH4.8、50 °C, 1 mL 纤维素酶液在 1 h 内水解滤纸, 生成 1 mg 的葡萄糖, 为一个滤纸酶活单位(FPA)。

CMC 酶活: pH4.8、50 °C, 1 mL 纤维素酶液在 1 h 内水解 CMC 生成 1 mg 的葡萄糖, 为一个 CMC 酶活单位。

$\beta$ -葡萄糖苷酶活: pH4.8、50 °C, 1 mL 纤维素酶液在 1 h 内水解水杨素生成 1 mg 的葡萄糖, 为一个  $\beta$ -葡萄糖苷酶活单位( $\beta$ G)。

#### 1.3.3 蛋白质含量测定

采用紫外分光光度法<sup>[4]</sup>。

所有的数据测定做 2 个平行样, 取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 纤维素酶的激活

在本文研究的金属离子中,  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  对纤维素酶活力有激活作用。结果见图 1、图 2 和图 3。

由图 1 可知,  $\text{Fe}^{3+}$  对滤纸酶活、 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力激活作用明显, 随着离子浓度增大, 相对酶活也越高, 最佳离子浓度为 1.2 mg/mL, 相对酶活分别达到了 3.56、15.16。而  $\text{Fe}^{3+}$  对 CMC 酶活则影响不大。这种现象可能是由于  $\text{Fe}^{3+}$  的存在促进了底物与酶的活性中心的结合, 从而使酶活力得到提高。由图 2 可知,  $\text{Co}^{2+}$  在低剂量时对滤纸酶活、CMC 酶活、葡萄糖苷酶活力均有一定的激活作用, 但在高浓度作用下表现为抑制效应, 在 0.2 mg/mL

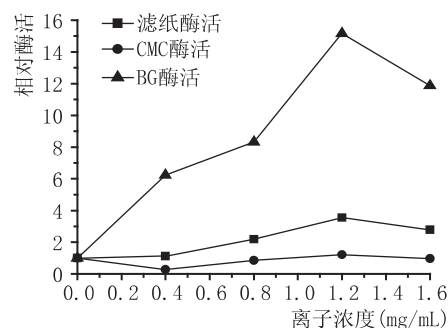


图 1  $\text{Fe}^{3+}$  对纤维素酶活力的影响

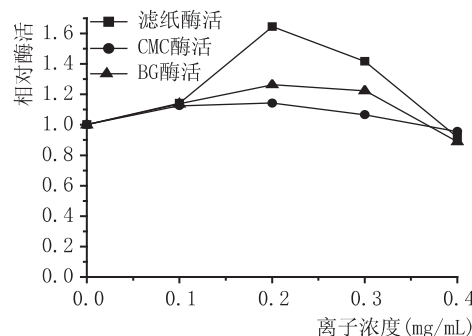


图 2  $\text{Co}^{2+}$  对纤维素酶活力的影响

时, 酶活力达到峰值, 然后随浓度升高而下降。

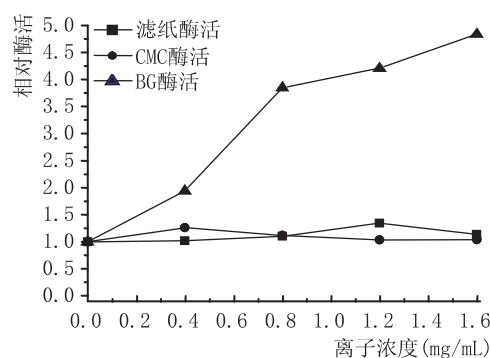


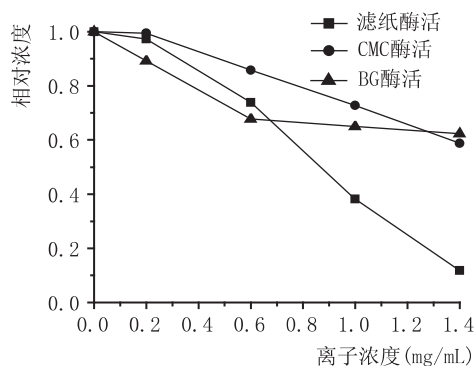
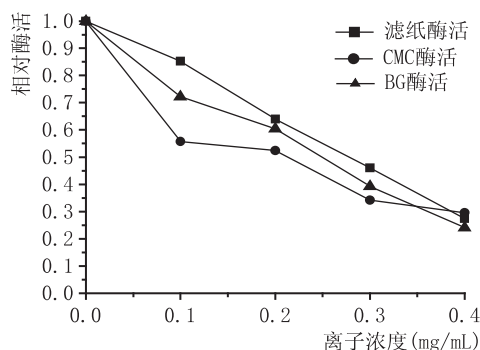
图 3  $\text{Mg}^{2+}$  对纤维素酶活力的影响

由图 3 可知,  $\text{Mg}^{2+}$  对总酶活在离子浓度为 1.2 mg/mL 时有激活作用, FPA 相对酶活为 1.34, 随后由于  $\text{Mg}^{2+}$  浓度逐渐升高, 对滤纸酶活的激活作用开始下降。而对 CMC 酶活激活或抑制作用都不大, 对 BG 则激活作用明显, 在离子浓度为 1.6 mg/mL 时, 相对酶活达到 4.83。

### 2.2 纤维素酶的抑制

$\text{Cu}^{2+}$  对纤维素酶活力的影响结果见图 4,  $\text{Hg}^{2+}$  对纤维素酶活力的影响结果见图 5。

由图 4 可知,  $\text{Cu}^{2+}$  对纤维素酶活力起抑制作用, 离子浓度越大, 抑制作用越明显。其中, 对滤纸酶活抑制作用最为明显, 相对酶活下降幅度最大, 当  $\text{Cu}^{2+}$  离子浓度为 1.4 mg/mL 时, 相对酶活只有 0.118。而对 CMC 酶活抑制作用相对滤纸酶活较弱。在离子浓度为 0.6~1.4 mg/mL

图4  $\text{Cu}^{2+}$  对纤维素酶活力的影响图5  $\text{Hg}^{2+}$  对纤维素酶活力的影响

时,对BG酶活作用不明显。这种现象是由于铜离子的重金属作用,重金属离子会对微生物起毒害作用,可使蛋白质变性,且毒害作用在重金属离子过量时尤为明显,所以铜离子浓度越高,毒害作用越严重,使酶几乎失活。由图5可知, $\text{Hg}^{2+}$ 对纤维素酶活力同样起抑制作用,随着离子浓度的增大,抑制作用越强,相对酶活下降幅度很大。

本文还考察了 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 对纤维素酶活的影响。其中, $\text{Fe}^{2+}$ 对纤维素酶活有激活作用, $\text{Ca}^{2+}$ 对酶活的抑制或激活作用都不大,而 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 对纤维素酶活力在一定程度上起抑制作用。

### 2.3 金属离子对纤维素酶耐受乙醇浓度的影响

生物乙醇发酵过程由于存在底物抑制,常采用SSF同步糖化发酵的方式,但其产物乙醇也会在一定程度上抑制纤维素酶的活力,影响酶水解的效果<sup>[6]</sup>。因此,采用纤维素生产乙醇的过程中,应削弱这种抑制作用。乙醇浓度对酶活力的影响结果见图6。

由图6可知,乙醇对纤维素酶活力有抑制作用,且乙醇浓度越高,酶活力越低。其主要原因是乙醇的存在使得发酵培养基的极性改变,导致酶的构象和活性位点发生变化,从而降低了酶活。但在体系中添加铁离子,纤维素酶活力降低的幅度比未添加铁离子的酶活力降低幅度要小,说明铁离子对酶耐受乙醇的能力有一定的促进作用,推测可能是由于一定浓度的乙醇对纤维素酶的影响主要是改变其非催化位点而使其立体构型发生变化,这个过

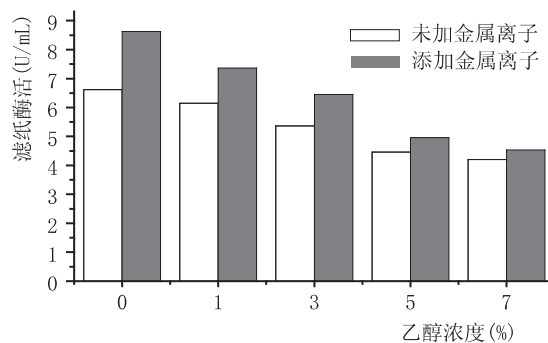


图6 乙醇浓度对酶活力的影响

程是可逆的,而 $\text{Fe}^{3+}$ 的存在能够促进纤维素酶和底物汽爆麦草的结合,使酶更稳定,减小了酶失活的程度。

### 2.4 金属离子对酶与底物吸附的影响

纤维素的酶水解过程是一个非均相反应,纤维素酶首先扩散到底物纤维素的表面被吸附,然后将纤维素水解为可发酵糖。对酶水解溶液中的纤维素酶浓度以及酶活进行测定,结果见图7、图8。

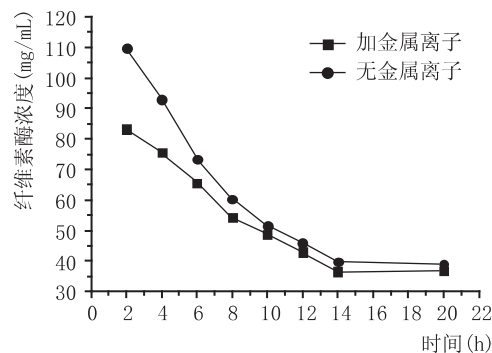


图7 酶反应液中纤维素酶浓度与时间的关系

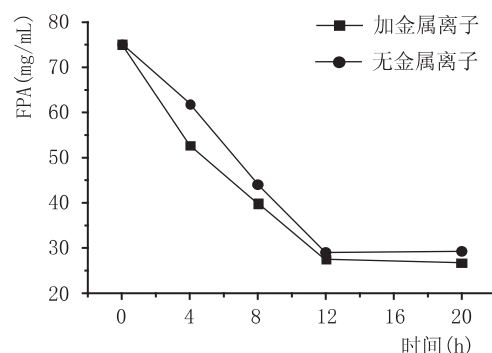


图8 酶反应液中纤维素酶活力与时间关系

由图7可以看出,随着酶水解反应的进行,溶液中纤维素酶浓度逐渐减小,表明越来越多的纤维素酶吸附于纤维素,在14h后溶液中的酶浓度几乎不变,达到了吸附平衡。添加金属离子 $\text{Fe}^{3+}$ ,加快了纤维素酶的吸附速度。图8中溶液内的纤维素酶活力随反应时间降低,并且金属离子的存在使其活力值更低,说明 $\text{Fe}^{3+}$ 对纤维素酶

(下转第46页)

### 3 结论

3.1 通过发酵培养基组成的单因素试验得出,以 20 g/L 的玉米淀粉作为碳源时的菌株产酶效果最好,2.5 g/L 的酵母膏与 2.5 g/L 的蛋白胨组合作为氮源时的菌株产酶效果最好,生物素(VH)对菌株 SDE 生长有最明显的促进作用,其菌数最高,可视为最佳生长因子,矿质元素  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mmol/L)对菌株 SDE 产生淀粉酶有最佳激活作用。

3.2 通过正交试验优化得出,该菌株产酶最佳发酵培养基组成为:玉米淀粉 20 g,蛋白胨 2.5 g,酵母膏 2.5 g, VH 2 mg,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{CaCl}_2$  1.5 mmol,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g, KCl 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL。

3.3 该最佳发酵培养基培养 SDS 菌株产酶活力最高为 194.9 U/mL,比优化前提高了 10.4 %。

#### 参考文献:

- [1] 方善康,朱明田.无蒸煮生淀粉酒精发酵研究[J].食品与发酵工业,1988,(2):13-19.
- [2] 诸葛斌,姚惠源,姚卫蓉.生淀粉糖化酶的结构和作用机理[J].工业微生物,2001,31(1):49-51.

- [3] Jeang CL, Chen LS, Shiau RJ. Cloning of a gene encoding raw-starch digesting amylase from *Cytophaga* sp. and its expression in *E. coli*[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 3651-3654.
- [4] Kim TU, Gu BG, Jeong JY, Byun SM, Shin YC. Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline  $\alpha$ -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain, GM8901[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 3105-112.
- [5] Nidhi Goyal, J.K. Gupta, S.K. Soni. A novel raw starch digesting thermostable-amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37: 723-734.
- [6] 李凤玲,张璐,刘连成,等.生淀粉糖化酶产生菌 *Cellulosimicrobium* SP. SDE 的分离鉴定及酶学性质研究[J]. 工业微生物, 2008, 38(5): 45-49.
- [7] 范秀容. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1989.
- [8] Michael J. Pelczar, J. r. Laboratory exercises in Microbiology[M]. New York, 1977.
- [9] 诸葛斌,姚惠源,诸葛健.生淀粉糖化酶高产菌的选育[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 60-64.

(上接第 42 页)

的吸附具有促进作用<sup>[7]</sup>。实验中发现添加  $\text{Fe}^{3+}$ , 纤维素酶水解的水解率提高约 3 %, 且水解率在反应 14 h 后达到峰值, 较之未添加  $\text{Fe}^{3+}$  的出现时间提前。

### 3 结论

3.1 通过实验发现:  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  对酶活力都有不同程度的促进作用, 其中以  $\text{Fe}^{3+}$  最高;  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  对酶活力有抑制作用, 以  $\text{Cu}^{2+}$  最强; 而  $\text{Ca}^{2+}$  则对酶活力影响不大。

3.2 纤维素酶对纤维素的吸附在 14 h 后接近平衡, 加入  $\text{Fe}^{3+}$  对纤维素酶的吸附具有促进作用, 吸附速度提高, 吸附量增加, 因此可推测金属离子对酶活力不同程度的促进作用是由于使底物更有利于同酶的活性部位相结合而加速反应进行, 提高水解效率, 金属离子在其中起了某种搭桥作用。 $\text{Fe}^{3+}$  的存在还可提高纤维素酶对乙醇的耐受能力, 这个结果在一定程度上可以改善同步糖化发酵过程中产物乙醇对纤维素酶活力的抑制问题。纤维素酶活力的发挥与其酶系协同作用密切相关<sup>[8]</sup>,  $\text{Fe}^{3+}$  对于绿色木霉系  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力激活作用显著, 对于更有效地应用纤维素酶值得进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Henning Jorgensen, Jan Bach Kristensen. Claus Enzymatic conversion of Felbylignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities [J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 2007, (1): 119-134.
- [2] 董义伟. 绿色木霉固态发酵降解纤维素的研究[D]. 成都: 四川大学, 2006.
- [3] 周津, 阮宏, 孙连魁. 绿色木霉 A10 纤维素酶的分离纯化及理化性质研究[J]. 西北大学学报, 1994, 24(5): 465-466.
- [4] 董晓燕. 生物化学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [5] 赵晶. 玉米芯酶法糖化生产乙醇的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [6] M. Ballesteros, J.M. Oliva, M.J. Negro, etc. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875[J]. Process Biochemistry, 2004, (39): 1843-1848.
- [7] 曾晶, 叶媛, 龚大春, 等. 表面活性剂对纤维素酶水解过程的影响[J]. 酿酒科技, 2008, (12): 38-43.
- [8] Alex Berlin, Vera Maximenko, Neil Gilkes, etc. Optimization of Enzyme Complexes for Lignocellulose Hydrolysis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, (97): 287-296.

欢 迎 订 阅 《 酿 酒 科 技 》