

# Trichoderma reesei 纖維分解酵素的生產條件與分離純化

陳 乃 菁

## 摘 要

Trichoderma reesei ATCC 13631 所生產纖維素分解酵素，可利用於畜牧業做為飼料添加劑之用；藉以提高飼料效率、促進生長率。本試驗之目的即是在探討 T. reesei 纖維分解酵素的最佳生產條件，並分離純化，且初步探討酵素之特性。

T. reesei 之纖維分解酵素為胞外酵素；其中以 endoglucanase (CMCase) 活性為最高，其次依序為濾紙分解活性 (Filterase)、Cellobiohydrolase (Avicelase)、纖維二醣 (Cellobiase) 之活性；但皆不高。利用四種不同的誘導劑，包括 Avicel、Cellulose、CMC、Filter，添加於酵素生產之培養基中，發現 Avicel 及 Cellulose 能誘發產生較高的酵素活性，其用量以 1% 為最佳。最適酵素生產之菌絲培養條件，以 90rpm、25°C 的培養條件最適。當培養基的最初 pH 值在 3~6 之間時，經八天之培養，培養後之 pH 值均下降至 2.75，但並不影響酵素的產生；但當培養基的最初 pH 值為 7、8、9 時，最後的 pH 值並未達 2.7，pH 值分別為 3.6、6.4、7.9，而酵素之生成則受到抑制。

## 一. 前 言：

纖維分解酵素 (Cellulase)，並非一種單純的酵素；而是一群酵素之組成，分別作用於不同型態的纖維素，最後使纖維素達到完全之水解。此些纖維酵素群包括：(1) Endo- $\beta$ -1,4-glucanase 或稱為  $\beta$ -1,4-glucan glucanohydrolase (E.C.3.2.1.4)，簡稱為 CMCase 或 Cx cellulase。(2) Exo- $\beta$ -1,4-glucanase 或稱為  $\beta$ -1,4-glucan cellobiohydrolase (E.C.3.2.1.91)，簡稱為 Avicelase 或 C1 cellulase。(3)  $\beta$ -1,4-glucosidase 或稱為 cellobiase (E.C.3.2.1.21)。(4)  $\beta$ -1,4-glucohydrolase。

以微生物生產酵素，會受培養基組成、pH值、振盪培養的速度、溫度等諸因子所影響。使用一些糖類，諸如Glucose、Sorbitol、Cellobiose、Lactose，添加在Mandel's-Reese培養基中，對 *T. reesei* QM 9414 雖能促進菌體生長，卻會抑制纖維素分解酵素的合成 (Shin et al., 1978; Sahoo et al., 1986 and Bisaria et al., 1986)。並且較易代謝的誘導劑，可提供菌體迅速的生長，卻無較高的酵素生產力；但是較不易代謝的誘導劑，無法迅速提供菌體的生長，卻能提高酵素生產力 (Coughlan, 1985)。通常，纖維素已經被定論為 *T. reesei* 生產酵素的最佳誘導劑 (Ryu and Mandels, 1980; Bisaria and Mishra, 1989)。本試驗使用四種不同形式的纖維素當做誘導劑，配合原料成本的考量，並且探討其使用濃度、pH值、振盪培養的速度，期能在最佳的條件下，可達最高的酵素生產量。

## 二. 材料與方法：

### (一) 材料：

菌株乃採 *Trichoderma reesei* ATCC 13631 係購自新竹食品工業發展研究所菌種中心。更新用培養基為 PDA (Difco) 或 Mandels-Reese 標準培養液 (Mandels and Reese, 1957)。誘導劑來源包括 Avicel (Fluka. A. G.)、Filter paper (Whatman No. 1)、Cellulose (J. Rettenmaier & Sohne)、CMC (carboxymethyl cellulose; Wako)。

### (二) 試驗方法：

將保存菌株移接至更新用培養基 (即 PDA 培養基)，於 25°C 下，培養 5~7 天以供液體培養之用，原保存菌株則每二個月移接一次，並置於 4°C 之冰箱中。再將上述培養之菌落，接種於液體培養基，於 25°C 下振盪培養。進行纖維分解酵素生產最佳條件之探討，包括最適誘導劑之選擇、培養基之最初 pH 值、培養時培養箱之轉速。

### (三) 纖維素分解酵素活性之測定：

#### 1. 濾紙分解活性 (Filter paper activity; FPA)：

取 1ml 經適當稀釋之酵素液及 1ml 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) 加入試管中，再加入 50mg 濾紙 (Whatman No. 1 1×6 cm)，於 50°C 下作用一小時後，以 Somogi-Nelson 法測定還原糖產生量。Filterase 活性乃以每分鐘產生 1  $\mu$  mole 之還原糖為一活性單位。

## 2. Cx 活性 (Cx activity):

取 1ml 經適當稀釋之酵素液加入 0.5ml 1% CMC 溶液 (配製於 pH4.9、0.05M acetate buffer), 於 55°C 下作用 15 分鐘後, 以 Somogi-Nelson 法測定還原糖產生量。CMCase 活性乃以每分鐘產生 1  $\mu$  mole 之還原糖為一活性單位。

## 3. C1 活性 (C1 activity):

取 1ml 經適當稀釋之酵素液添加 2ml 1% Avicel 溶液 (配製於 pH5.0, 0.1M 之醋酸緩衝液), 於 50°C 下作用 10 分鐘, 並加以振盪, 經 500 $\times$ g 離心 5 分鐘, 取得上清液 1.5 ml, 同上法測其還原糖量。Avicelase 活性乃以每分鐘產生 1  $\mu$  mole 之還原糖為一活性單位。

## 4. $\beta$ -glucosidase 活性 ( $\beta$ -glucosidase activity):

以 1% Cellobiose (配於 0.1M pH5.9 之醋酸緩衝液) 1ml, 添加適量之酵素液, 於 40°C 下作用 2 小時後, 加熱以中止反應, 以 Glucostat Kit 測定葡萄糖釋出量。纖維二糖之活性乃以每分鐘產生 1  $\mu$  mole 之葡萄糖為一活性單位。

### (四) 可溶性蛋白質 (soluble protein) 之測定:

以 Lowry method 測定之。並以 bovin serum albumin 作為標準蛋白質。

### (五) 菌絲蛋白質 (mycelial protein) 之測定:

將菌絲烘乾稱重後, 浸漬於 5ml 蒸餾水中, 室溫下放置 24hr., 再以 1M NaOH 於 100°C 下作用 5 分鐘, 離心後 (3,000 $\times$ g, 10min), 取得上清液, 於 A 280 下測其吸光值。並以 bovin serum albumin 作為標準蛋白質。

## 四. 結果與討論:

### (一) *Trichoderma reesei* 纖維素分解酵素的生產:

於 Mandels-Reese 培養基中添加 1% Avicel, 其酵素之生產量, 隨著培養天數的增加, 酵素活性隨之增加, 於第八天, 其酵素活性漸趨穩定。至於比活性, 培養初期, 由於培養液中可溶性蛋白質的量很低, 導致酵素比活性很高; 而後漸趨降低, 一直到第七、八天才漸趨穩定。第十天後, 培養液中的酵素活性並未增加, 但其可溶性蛋白質量卻增加, 致使比活性又漸趨下降。

於培養之過程中, 除各種酵素的產生穩定隨之增加外, 菌絲蛋白質、

可溶性蛋白質亦呈現相同趨勢的增加。而培養基中pH值的變化，於培養至第四天後，即顯著下降至pH2.75，爾後即維持穩定之pH值，此些現象可由圖一顯示。由於纖維酵素之生產環境為酸性，因此為一酸穩定之酵素。

## (二) 不同誘導劑對酵素生產之影響：

*T. reesei* QM 9414 在培養基中，絕大多數之菌絲均吸附在纖維素上而形成pellet狀，且進一步由掃描式電子顯微鏡照相顯示菌絲吸附在纖維素表面 (Chiang, 1983)。菌絲對纖維素之吸附現象是一種物理過程 (physical process)，並且這種吸附現象是誘導菌體生產纖維素分解酵素所必須的 (Binder and Ghose, 1978)。

本實驗在 Mandels-Reese 培養基中添加不同形態的纖維素當做誘導劑，結果發現 Avicel 及 Cellulose 能誘發產生較高量的酵素，尤其是 CMCase 之活性 (圖二)。

## (三) 誘導劑濃度對酵素活性之影響：

菌絲和纖維素的吸附現象，決定於細胞和纖維素之濃度，而此吸附現象卻是生產酵素所必須的 (Binder and Ghose, 1978)。其次，以 oxidized cellulose 當做 *T. reesei* QM 9414 的誘導劑，發現當誘導劑濃度為 0.1-0.65% 時，能刺激酵素的生成，無法促進菌體的生長；而大於 1% 後，對菌體生長和酵素產生都有抑制的作用 (Kubicek et al., 1990)。

本實驗在 Mandels-Reese 培養基中各添加不同濃度的 Cellulose 和 Avicel，結果發現以 Cellulose 和 Avicel，結果發現以 Cellulose 和 Avicel 當做誘導劑，其用量都是以 1% 為最佳 (圖三、圖四)。

## (四) 振盪培養速度對酵素活性之影響：

振盪培養的速度，會改變培養基的溶氧量，至於溶氧量的適當濃度，取決於菌株的特性。本實驗在 Mandels-Reese 培養基中分別添加不同濃度的 Cellulose 和 Avicel，以不同的迴旋振盪速度來培養，結果發現不論是以 Avicel 或 Cellulose 當做誘導劑，其振盪培養的速度，均以 90rpm 最佳、160rpm 次之、60rpm 最差 (圖五、六)。*T. reesei* 是一株好氣性菌，當振盪培養速度為 60rpm 時，可能由於溶氧量不足，導致影響菌體的生長；但是為 160rpm 時，亦會因轉速太快，致使酵素的生成受到抑制。

## (五) 培養液 pH 值對酵素活性之影響：

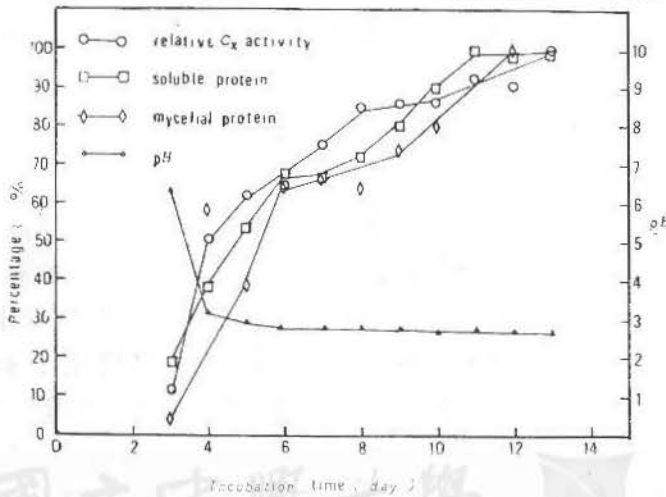
*T. reesei* 的酵素為對酸較穩定的酵素，於培養末期，培養基偏酸性

。當使用葡萄糖當 *T. reesei* QM 9414 生產酵素的誘導劑時，是因 pH 值受到改變而影響酵素的生成 (Chiang, 1983)。本實驗將培養基分別調至不同 pH 值，經培養八天後，發現當培養基的初 pH 值在 3-6 之間時，其最後的 pH 值都約為 2.75，且不會影響酵素的生成，但當培養基的初 pH 值在 7、8、9 時，最後的 pH 值並未達 2.7，pH 值分別為 3.6、6.4、7.9，而酵素之生成則受到抑制 (表一)。

表一 培養液 pH 值對 *T. reesei* 生產 CMCase 之影響

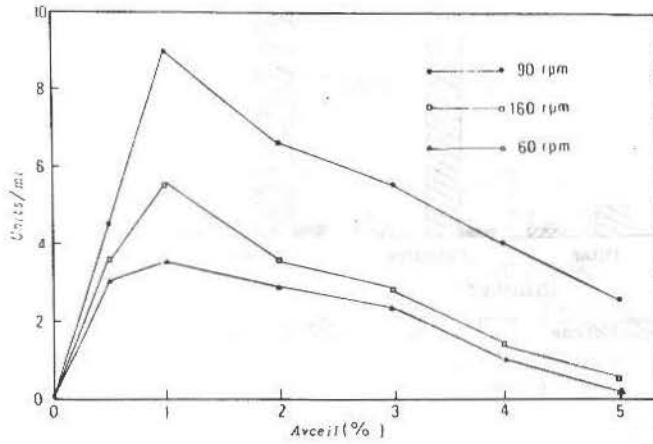
Tab.1 Effect of pH on Cx activity of *T. reesei*

培養基 pH 值		CMC Activity (unit/ml)
培養前	培養後	
3	2.72	8.14
4	2.71	8.88
5	2.78	8.75
control 5.17	2.78	8.98
6	2.79	9.05
7	3.63	7.37
8	6.43	7.94
9	7.94	1.38



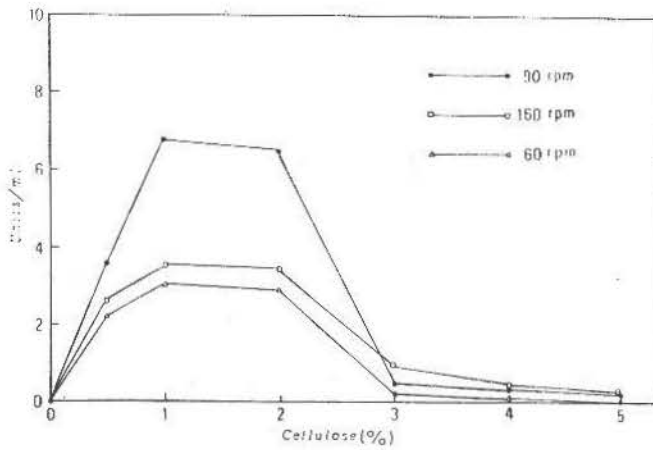
圖一 以 Avceill 培養 *Trichoderma reesei* 生產纖維素分解酵素之過程中，培養液內各成分之變化

Fig 1 Variations of components in culture broth during cellulase fermentation from Avceill by *Trichoderma reesei*.



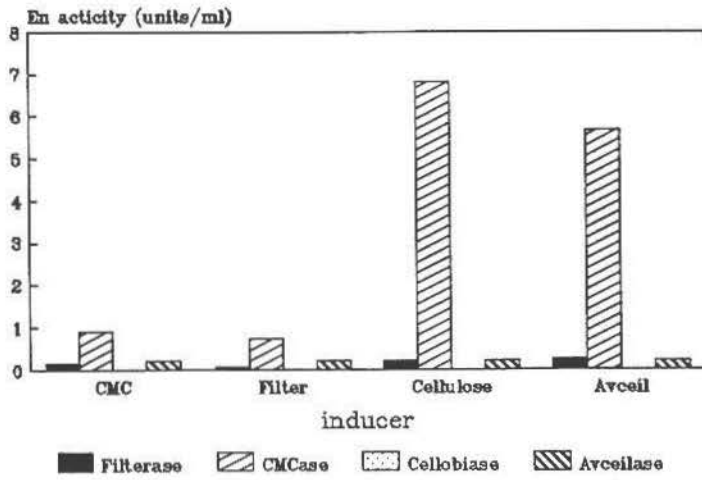
圖五 添加Avicel培養基中，不同振盪速度對Cx活性之影響

Fig.5 Effect of speed of rotation on Cx activity in Avicel broth by T. reesei



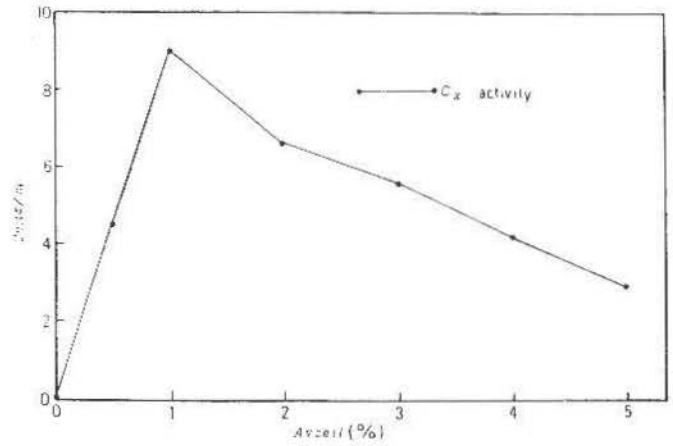
圖六 添加Cellulose培養基中，不同振盪速度對Cx活性之影響

Fig.6 Effect of speed of rotation on Cx activity in Cellulose broth by T. reesei



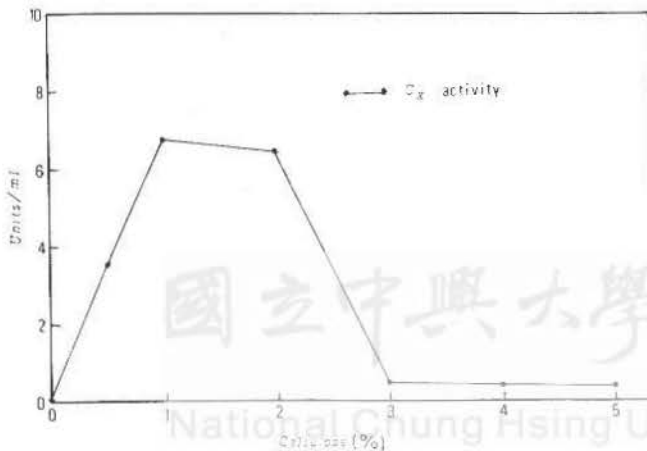
圖二 不同誘導劑對 *T. reesei* 酵素活性之影響

Fig.2 Effect of variation of inducer on cellulase activity of *T. reesei*



圖三 Avceil濃度對 *T. reesei* 酵素活性之影響

Fig.3 Effect of concentration of Avceil on cellulase activity of *T. reesei*



圖四 Cellulose濃度對 *T. reesei* 酵素活性之影響

Fig.4 Effect of concentration of Cellulose on cellulase activity of *T. reesei*

## 五.參考文獻

- 1.江晃榮,1983。由纖維質碳水化合物之生物轉化生產液態燃料之研究。博士論文國立臺灣大學。
- 2.Binder,A.and T.K.Ghose,1978.Adsorption of cellulose by *Trichoderma viride*. *Bitech. Bioeng.* 20:1187-1199.
- 3.Kubicek, E. M., M.Steiner, and C. P.Kubicek,1990. Stimulatory effect of oxidized cellulose on cellulase formation by *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiology Letters.* 68:273-278.
- 4.Lowry, O. H.,N.J.Rosebrough,A. L. Farr,and R.J.Randall,1951. Protein measurement with the folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 193:265-272.
- 5.Mandels, M. and E. T. Reese,1957.Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influence by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.* 73:269-278.
- 6.Sahoo, D. K., S. Mishra, and V. S. Bisaria,1986.Influence of L-sorbose on growth and enzyme synthesis of *Trichoderma reesei* C-5. *J. General Microbial.* 132:973-978.
- 7.Shin, S.B., Y.Kitagawa,K.Ichikawa,1978.Cellulase biosynthesis by *Trichoderma viride* on soluble substrates. *J. Ferment. Technol.* 56:396-402.
- 8.Wood, T.M.and S.I. McCreae,1978. The cellulase of *Trichoderma Koningii* : Purification and properties of some endoglucanase components with special references to their action on cellulose when acting alone and in synergism with cellobiohydrolase. *Biochem. J.* 171:61-72.

國立中興大學



National Chung Hsing University