

文蛤纤维素酶分离纯化及性质

王婷婷, 宋星, 李燕*

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 采用缓冲液提取、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析和 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 疏水层析, 从文蛤 (*Meretrix meretrix* L) 中分离纯化出一种纤维素酶。结果显示: 纯化后的纤维素酶比活力达到 40.33 U/mg, 纯化倍数为 13.12; SDS-PAGE 检测其亚基相对分子质量为 59 700; 文蛤纤维素酶的最适 pH 为 5.2, 最适反应温度为 45 °C, 该酶在 pH 4~6 和 4~50 °C 范围内有较好的稳定; 在最适条件下, 以羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 为底物测得其 K_m 值为 0.111 mmol/L。

关键词: 文蛤; 纤维素酶; 分离; 纯化; 性质

中图分类号: TQ 925.9 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)12-1324-06

Isolation, Purification and Characterization of Cellulase from *Meretrix meretrix* L

WANG Tingting, SONG Xing, LI Yan*

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Electrophoresis-purity cellulase from *Meretrix meretrix* L was obtained through buffer solution extraction, ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sepharose ion exchange chromatography and Phenyl Sepharose 6 Fast Flow hydrophobic chromatography. The specific activity of purified cellulase was 40.33 U/mg with purification fold of 13.12. SDS-PAGE results revealed the molecular weights of the enzyme was 59 700. Its optimum temperature and pH were 45 °C and 5.2, respectively. The cellulase was relatively stable in the range of 4~50 °C and pH 4~6. Furthermore, its K_m value was 0.111 mmol/L under the optimal conditions. The study laid a foundation for studying the composition and structure of endogenous cellulase from animals.

Keywords: *Meretrix meretrix* L, cellulase, isolation, purification, characterization

纤维素是植物细胞壁的主要成分,也是地球上最为丰富的可再生资源,其在纤维素酶的催化下可降解为单糖,进而可以发酵生产乙醇、菌体蛋白等有用物质,所以它的利用和转化对于人类而言意义

重大^[1-2]。

纤维素酶是世界上第三大工业酶,在食品、酿酒、造纸、纺织、饲料、中药提取等产业中均有较为广泛的应用^[3-5]。纤维素酶是一种多组分的复合酶

收稿日期: 2016-01-25

* 通信作者: 李燕(1965—),女,天津人,工学硕士,教授,硕士研究生导师,主要从事天然产物分离纯化方面的研究。E-mail: liyan@shou.edu.cn

引用本文: 王婷婷,宋星,李燕,等. 文蛤纤维素酶分离纯化及性质[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(12):1324-1330.

系,包括多种水解酶,一般认为主要包括3类具有协同作用的酶组分,即内切型葡聚糖苷酶、外切型葡聚糖苷酶和纤维二糖酶^[6]。纤维素酶主要来源于微生物,然而纤维素酶生产菌产酶能力低下、 K_m 值较大且酶系组分不均衡等问题,大大限制了纤维素酶的应用^[7-8]。因此获得一种活力高且稳定的纤维素酶,成为该领域最关键的问题。近些年来,动物源纤维素酶越来越受到关注,研究者在植物、动物包括(贻贝、白蚁、海胆、福寿螺、松线虫、蚯蚓、小龙虾等)中均发现内源纤维素酶的存在^[9-11]。这为纤维素酶的应用提供了重要的纤维素酶基因来源,因此动物纤维素酶的研究具有重要的理论价值和现实意义。

文蛤是一种重要的经济贝类,在水中主要以浮游植物为食,所以可能体内含有纤维素酶,值得对其进行探究。作者利用均质、盐析、透析、离子层析和疏水层析等技术,首次从文蛤中分离纯化出一种内切纤维素酶,并对其酶学性质进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 文蛤:购于上海浦东新区泥城镇大润发超市。

1.1.2 实验仪器 高速冷冻离心机:德国 Thermo Fisher scientific 公司;SS250-E 组织捣碎机:方胜电器实业有限公司;UNICO UV-2000 紫外分光光度计:北京普析通用仪器有限公司;DYY-6C 电泳仪:北京六一仪器厂。

1.1.3 主要试剂 DEAE Sepharose Fast Flow、Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 层析填料:美国 GE Healthcare 公司;低相对分子质量标准蛋白质:上海国药集团;DNS 试剂(3,5-二硝基水杨酸):国药;其他试剂:均为国产分析纯或化学纯。

1.2 方法

1.2.1 CMC-Na 酶活测定方法 取 1 mL 的酶液于 45 °C 水浴预热 3 min,加入已预热的 1% CMC-Na 溶液(由 pH 5.0、0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液配制)1.0 mL,混匀,45 °C 反应 30 min,立即加入 1 mL 的 2.0 mol/L NaOH 溶液终止反应。取上述混合液 1 mL,加入 1.5 mL 的 DNS 试剂,沸水浴中显色 5 min,流水冷却后定容至 25 mL,测定其在 490 nm 处的吸光度值(OD_{490})。CMC-Na 酶活定义:将每分钟生成相当于 1 μ g 葡萄糖的还原糖所需要的酶量定

义为一个酶活力单位。

1.2.2 蛋白质测定方法 蛋白含量测定采用 Lowry 法^[12]和紫外分光光度法测定。

1.2.3 粗酶液制备 文蛤于冰上去壳,取内容物,以 1:3 质量体积比与 pH 4.8、0.025 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液混合,用组织捣碎机捣碎,置于 4 °C 提取 4 h,10 000 r/min 离心 30 min,得上清液即为粗酶液。

1.2.4 纤维素酶的纯化

1)硫酸铵分级沉淀:分别取粗酶液 10 mL,分装至 9 支试管中,在冰浴条件下慢慢加入硫酸铵固体,使 9 支试管的硫酸铵饱和度分别为 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%。4 °C 静置过夜,冷冻离心,分别测上清液中剩余酶的活性,由此确定最佳硫酸铵分级沉淀条件。

2)DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析:硫酸铵分级沉淀所得酶液经透析除盐,上样于已用 pH 8.1、25 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液平衡后的 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱(1 cm $\times$ 24 cm)。采用梯度洗脱,先后分别用含 0.05、0.3 mol/L 的 NaCl 的缓冲液洗脱,流速 1 mL/min,每 3 min 收集一管。测定每管的酶活力和蛋白质含量,收集有酶活的洗脱峰。

3)苯基低取代疏水层析:离子层析所得酶液加入硫酸铵使其最终浓度为 1 mol/L,过 0.45 μ m 滤膜得清液上样于苯基疏水层析柱(1.6 cm $\times$ 20 cm)。先用含 1 mol/L 硫酸铵的 pH 7.5、25 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱不结合的蛋白质,然后分别用含 0.5、0 mol/L 硫酸铵的 25 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液进行梯度洗脱。流速为 1 mL/min,3 min 收集一管。检测洗脱液的蛋白质含量和酶活力,绘制洗脱图谱,合并活力峰。

4)SDS-PAGE:用 SDS-PAGE 测定酶分子亚基相对分子质量。采用 4%的浓缩胶,12%的分离胶,浓缩胶稳流是 10 mA,分离胶稳流 20 mA,电泳结束后用 1%考马斯亮蓝 R-250 染色。以标准蛋白质(14 400~97 400)作为参照。

1.2.5 文蛤纤维素酶酶学性质

1)最适 pH 和 pH 稳定性的测定:在 40 °C 恒温下,pH 3~8 缓冲体系中测定相应的酶活力。以酶活力对 pH 作图,探讨 pH 对酶活的影响。

pH 稳定性试验:酶液与等量不同 pH 的缓冲溶

液混合,置于4℃下孵育20 h后测定酶活力。

2)最适温度和热稳定性的测定:在pH 5.2的缓冲体系中,在10~70℃范围内,探究温度与酶活力的关系。

酶的热稳定性实验:将酶液放置在不同温度中孵育1 h,迅速冷却到室温,45℃测定剩余酶活力。

3)酶催化CMC-Na水解的动力学参数 K_m 的测定:在最适反应条件下,改变底物(CMC-Na)的浓度 $[s]$,测定酶促反应的初速度 v_0 ,采用Lineweaver-Burk双倒数法作图,以 $1/v$ 对 $1/[s]$ 作图,从直线的截距求得该酶催化CMC-Na水解的米氏常数 K_m 和最大速度 V_{max} 。

2 结果与讨论

2.1 纤维素酶的分离纯化

2.1.1 硫酸铵饱和度区间确定 由图1可知:硫酸铵饱和度在0~20%之间,上清液中的纤维素酶活力基本不变,但蛋白质含量一直在减少,说明绝大多数的酶仍在在上清液中,沉淀了一部分的杂蛋白质;当硫酸铵的饱和度达到70%时,上清液中的酶活力基本不再减少,说明大部分的酶已经被沉淀了,剩余的基本大多是杂蛋白质了。综合酶活和回收率两方面考虑,收集20%~70%的纤维素酶沉淀,将沉淀复溶解后置于透析袋中,4℃透析过夜。

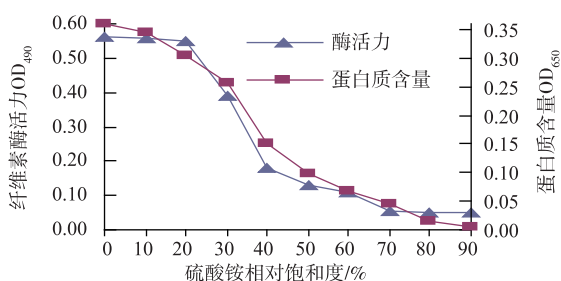


图1 硫酸铵分级沉淀结果

Fig. 1 Results of ammonium sulfate precipitation

2.1.2 DEAE-Sephacrose Fast Flow 阴离子交换层析 由图2可以看出,洗脱过程共出现3个蛋白质峰,经酶活检测发现峰II蛋白质含量最低,但酶活力最高,而峰III虽有酶活性但比活力较低,故只收集峰II组分,除掉了大量杂蛋白质,有利于下一步的分离纯化。

2.1.3 Phenyl-Sephacrose 疏水层析 从图3可以看

出,第四个蛋白质峰酶活力高,蛋白质含量低,蛋白质的比活力较高,而峰1和峰3中虽然存在酶活性,但比酶活极低,故收集峰4的酶液,进一步通过SDS-PAGE电泳检测其纯度。

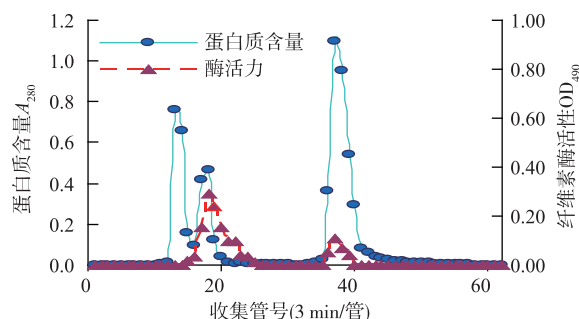


图2 文蛤纤维素酶经DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析洗脱图谱

Fig. 2 DEAE-FF column chromatography of cellulase from *Meretrix meretrix* L

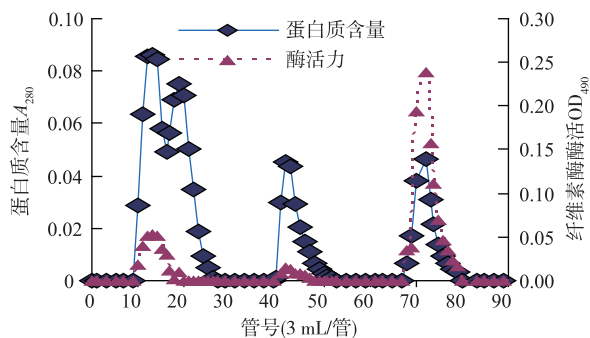
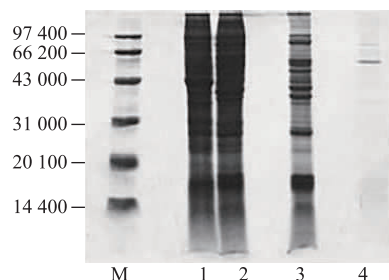


图3 Phenyl Sepharose 疏水作用层析洗脱图谱

Fig. 3 Phenyl sepharose column chromatography

2.2 纯化结果

2.2.1 SDS-PAGE 结果 用SDS-PAGE对各纯化阶段所得酶液进行纯度分析,结果见图4。由标准蛋白质的相对分子质量的对数 $\lg M_w$ 与其迁移率 R_f 的线性关系,求得文蛤纤维素酶的亚基相对分子质量为59 700。孙长乐^[13]等从九孔鲍中提取到的纤维素酶的相对分子质量为55 000;日本海胆^[14]纤维素酶的相对分子质量为54 000;从小龙虾^[15]中分离到的两种纤维素酶的相对分子质量分别为47 800与50 300。从福寿螺^[16]中分离到的纤维素酶的相对分子质量为42 000,从贻贝^[17]中提取到的纤维素酶相对分子质量更小,仅为19 700,可见纤维素酶分子质量大小会因种族及其生活环境差异而各不相同。



M: 标准蛋白质;1:粗酶液;2:硫酸铵沉淀后酶液;3:DEAE-阴离子层析后酶液;4:苯基疏水层析后酶液。

图4 纯化过程的SDS-PAGE图谱

Fig. 4 SDS-PAGE of Cellulase from *Meretrix meretrix* L

表1 文蛤纤维素酶的纯化结果(以CMC-Na酶活表示)

Table 1 Purification of *Meretrix meretrix* L cellulase (CMCase)

纯化步骤	总体积/mL	总蛋白质质量/mg	总活力/U	比活力/(U/mg)	纯化倍数	酶回收率/%
粗酶液	120	683.04	2100	3.07	1	100
硫酸铵分级沉淀	60	216	1200	5.56	1.81	57.14
DEAE Sepharose Fast Flow	50	35	320	9.14	2.97	15.24
Phenyl Sepharose 疏水层析	3	2.51	101.4	40.33	13.12	4.82

2.3 酶学性质分析

2.3.1 最适反应 pH 及 pH 稳定性 在 pH 2.6~8 范围内,文蛤纤维素酶的最适反应 pH 为 5.2,缓冲液 pH 对纤维素酶活有显著影响,见图 5。pH 在 4 以下和 9 以上极不稳定,酶活力损失严重,剩余酶活力不到 20%。在 pH 4~6 范围内具有较好的稳定性,于 4 °C 静置 24 h 后相对酶活力仍在 70% 以上,见图 6。

2.3.2 最适反应温度及温度稳定性 在 10~45 °C 范围内,随着温度的升高,文蛤纤维素酶活力升高,45 °C 以后酶活力逐渐降低,所以最适反应温度为 45 °C,见图 7。由图 8 可知,在 4~50 °C 范围内热稳定性良好,剩余酶活力都在 80% 以上。高于此温度,酶活力迅速下降,在 60 °C 保温 1 h 相对酶活力仅剩

2.2.2 文蛤纤维素酶纯化结果 从表 1 可以看出,作者对文蛤纤维素酶进行了 3 步纯化:硫酸铵分级沉淀、DEAE-阴离子交换层析、苯基疏水层析后,最终纤维素酶的纯化倍数为 13.12 倍,其比活力为 40 330 U/g,回收率为 4.82%。其中,硫酸铵沉淀步骤的纯化倍数很低,可能是由于为了避免在初步分离纯化阶段目标酶的损失,选择的沉淀区间较宽造成的。DEAE-阴离子交换层析的纯化效果比盐析略好,回收率很低,结合图 4 分析,离子交换层析虽去掉了大量的杂蛋白质,但可能因为层析的缓冲环境(pH 8.1)远远偏离最适 pH,所以酶活力损失较大。

余 27.7%,在 70 °C 保温 1 h,仅剩 14% 的酶活力,热稳定性差。

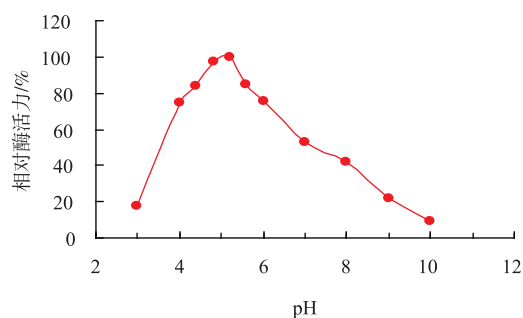


图6 文蛤纤维素酶的 pH 稳定性

Fig. 6 pH stability of the EGase from *Meretrix meretrix* L

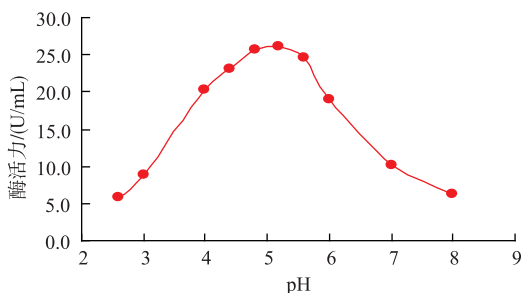


图5 pH 对酶催化 CMC-Na 活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on cellulase activity

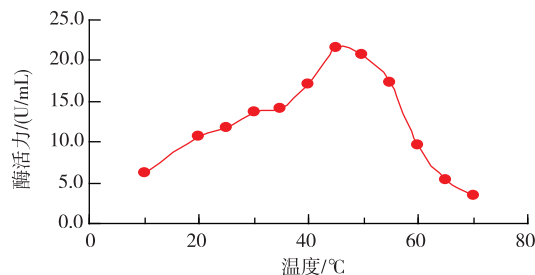


图7 温度对酶催化 CMC-Na 活力的影响

Fig. 7 Effect of temperature on cellulase activity

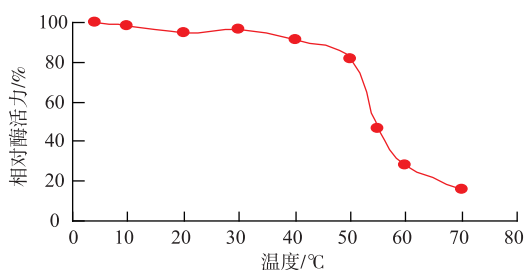


图 8 文蛤纤维素酶的温度稳定性

Fig. 8 Thermal stability of the cellulase from *Meretrix meretrix* L

2.3.3 动力学常数 K_m 和 V_{max} 由图 9 得到的双倒数方程为 $y=0.3406x+12.64$, 从而计算出以 CMC-Na 为底物, 文蛤纤维素酶的 K_m 值为 0.111 mmol/L, V_{max} 为 0.327 mmol/(L·min)。贺刚^[18]等从草鱼肠道筛选出一个产纤维素酶的菌株, 其 K_m 值为 4.212 mmol/L; 胡亚东^[19]等从参环毛蚯蚓中分离出的能降解 CMC-Na 的纤维素酶的 K_m 值为 1.193 mmol/L; 朱文青^[20]等人从里氏木霉发酵液分离纯化出两种纤维素酶, 以 CMC-Na 为底物时, 其 K_m 值分别为 9.085、13.958 mmol/L。相比较而言, 本研究纯化所得的纤维素酶的 K_m 值远远低于上述文献报道数据, 所以该酶较其他来源的纤维素酶有更好的水解纤维素的能力, 这为寻求高活力的工业纤维素酶提供了良好的基因来源。

3 结 语

文蛤纤维素酶粗酶液经过硫酸铵分级沉淀、透

参考文献:

- [1] WU Linzhi. Research progress of cellulose and its applications[J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2013, 41(26): 10570-10574. (in Chinese)
- [2] ZHANG Yu, XU Jingliang, YUAN Zhenhong, et al. Industrialization progress in cellulosic fuel-ethanol around the world[J]. *Contemporary Chemical Industry*, 2014, 43(2): 198-201. (in Chinese)
- [3] ZHAO Qi, LI Yalan, CHEN Zixin, et al. The recent application progress cellulase [J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2014, 42(6): 21-23. (in Chinese)
- [4] DONG Dan, CHE Zhenming, GUAN Tongwei. Screening of cellulose-producing strains and enzyme activity characteristic detection in distiller's grains[J]. *China Brewing*, 2015, 34(8): 44-45. (in Chinese)
- [5] HE Ai, LI Weiguo, DOU Zhihao, et al. Cellulase-assisted extraction and antioxidant activity of flavonoids from aloes leaves[J]. *Food Science and Technology*, 2015, 5: 233-237. (in Chinese)
- [6] LIU Meng, ZHAN Li, MA Hongxia, et al. Advances in research of cellulase and the genetic engineering of cellulose [J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2011, 39(16): 95-105. (in Chinese)
- [7] MAWADZA C, HATTI K R, ZVAUYA R, et al. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains [J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 83(3): 177-187.
- [8] SINGH V K, KUMAR A. Production and purification of an extracellular cellulase from *Bacillus brevis* VS-1 [J].

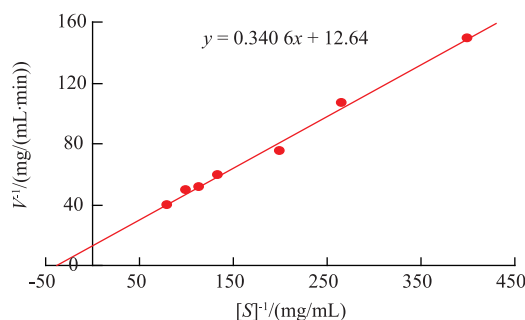


图 9 pH 5.2 的测活体系下, 纤维素酶催化 CMC-Na 水解反应的双倒数图

Fig. 9 Lineweaver-Burk plot for determination of K_m at pH 5.2

析、DEAE Sepharose FF 阴离子交换层析、苯基疏水层析分离纯化后, 得到一种相对分子质量为 59 700 的纤维素酶组分。比活力由 3.07 U/mL 增加到 40.33 U/mL, 纯化效果显著, 纯化倍数为 13.12, 回收率为 4.82%。该酶的最适反应温度为 45 °C, 最适反应 pH 为 5.2, 该酶在 50 °C 以下和 pH 4.0~7.0 之间稳定性好。以 CMC-Na 为底物时的 K_m 值为 0.111 mmol/L。作者分离所得的纤维素酶 K_m 值较小, 对底物的亲和性较高, 可以为工业纤维素酶提供较好的基因来源。此外, 分离的主要是内切纤维素酶组分, 可能文蛤中还存在同工酶或其他纤维素酶组分, 有待进一步的研究和探索。

- Biochemistry and Molecular Biology International**, 1998, 45(3):443-452.
- [9] LI Yanhong, ZHAO Fukun. Advances in cellulase research [J]. **Chinese Bulletin of Life Science**, 2005, 17 (5):392-397. (in Chinese)
- [10] SUZUKI K, OJIMA T, NISHITA K. Purification and cDNA cloning of a cellulase from abalone *Haliotis discus hannai*[J]. **Eur J Biochem**, 2003, 270(4):771-778.
- [11] 安刚. 白蚁纤维素酶的分离纯化及性质研究[D]. 厦门:厦门大学, 2008.
- [12] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. **Biol Chem**, 1951, 193(1):265-275.
- [13] SUN Lechang, WU Zhaohua, CAI Qiufeng, et al. Isolation, purification and characterization analysis of a cellulase from abalone (*Haliotis diversicolor*)[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2010, 10(3):76-82. (in Chinese)
- [14] NISHIA Y, SUZUKI K, KUMAGAI Y, et al. Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*[J]. **Biochimie**, 2007, 89(8):1001-1011.
- [15] ALLISON C CRAWFORD, NEIL R R, et al. Comparative study of cellulase and xylanase activity in freshwater crayfish and marine prawns[J]. **Aquaculture Research**, 2005, 36:586-592.
- [16] 吴海洪. 福寿螺纤维素酶的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2006.
- [17] XU B, HELLMAN U, ERSSON B, et al. Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo-beta-1, 4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*[J]. **Eur J Biochem**, 2000, 267(16):4970-4977.
- [18] HU Yadong, XIE Chunfang, ZHANG Yan, et al. Separation, purification and Enzymatic properties of endogenous cellulase from the gut of *Pheretima aspergillum*[J]. **Journal of JINAN University: Natural Science & Medicine Edition**, 2010, 31(1):89-94. (in Chinese)
- [19] HE Gang, HE Li, XIE Congxin, et al. Purification and properties of a cellulase produced by a strain from the intestinal of grass carp[J]. **Journal of Hydroecology**, 2008, 1(2):107-109. (in Chinese)
- [20] ZHU Nianqing, XIA Wenjing, YONG Qiang. Purification and characterization of cellulase from *Trichoderma reesei*[J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2010, 8(3):40-43. (in Chinese)

会 议 消 息

第七届农业科学与食品工程国际研讨会 (ASFE 2019)

会议时间: 2019-03-23 至 2019-03-25

会议地点: 陕西西安

主办单位: Engineering Information Institute

联系人: 张老师

电话: 15071343477

Email: cfp_engii@126.com

会议规模: 100 人以上

官方网址: <http://www.engii.org/conference/ASFE2019/>

邮箱投稿: ic_vicky@163.com

会议简介: 第七届农业科学与食品工程国际研讨会 (ASFE 2019) 将于 2019 年 3 月 23-25 日在西安举行。本届大会将继续遵循学术性、国际性的原则, 特邀国内外农业科学与食品工程领域内的学者专家前来参会, 并做出精彩的报告。本次大会旨在为行业内专家和学者分享技术进步和业务经验, 聚焦相关领域的前沿研究, 提供一个交流的平台。