

文章编号:1673-1689(2006)02-0024-04

内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化及酶学性质

孟广荣, 杨树林*, 曾亮亮, 李新柱, 蔡凤

(南京理工大学生物工程研究所, 江苏南京 210094)

摘要: 利用 ÄKTA UPC-900 快速蛋白液相色谱系统(FPLC)从黑曲霉发酵粉中分离纯化出内切 β -葡聚糖苷酶。分离纯化后的酶比活力提高了 8.1 倍, 回收率为 7.5%。经 SDS-PAGE 电泳分析该内切酶的相对分子质量为 26 400。酶学试验研究表明: 该酶的最适反应温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, 最适 pH 为 4.8, Lineweaver-Burk 法求得动力学参数, K_m 和 V_{max} 分别为 6.838×10^{-3} mg/mL、 2.906×10^{-2} (mL \cdot min)/mg。并确定了 FPLC 层析缓冲液的离子强度为 4.8 mmol/L 时分离效果达到最佳。

关键词: 黑曲霉; 纤维素酶; 内切 β -葡聚糖苷酶; 分离纯化; 酶学性质; 动力学

中图分类号: Q 814.1

文献标识码: A

Purification and Properties of an Endo- β -glucanase

MENG Guang-rong, YANG Shu-lin*, ZENG Liang-liang, LI Xin-zhu, CAI Feng

(Biotechnology Institute, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract: An endo- β -glucanase was isolated and purified from a commercial preparation of *Aspergillus niger* by means of FPLC (ÄKTA UPC-900). The specific activity of the endoglucanase increased 8.1-fold, and recovery coefficient reached 7.5%. The molecular weight was estimated as 26 400 by SDS-PAGE. The optimal reaction temperature and pH of the endoglucanase 55 $^{\circ}\text{C}$ and 4.8, respectively. The values of K_m and V_{max} calculated from Lineweaver-Burk plots were 6.838×10^{-3} mg/ml and 2.906×10^{-2} (ml min)/mg, respectively. The endoglucanase was purified effectively under the buffer ionic strength of 4.8 mmol/L.

Key words: *Aspergillus niger*; cellulase; endoglucanase; purification; enzyme property; kinetics

纤维素酶是起协同作用的多组分酶系, 可广泛应用于医药、食品、纺织、酿酒等领域^[1]。纤维素酶的来源广泛, 组分复杂, 不同菌株, 甚至同一菌株在不同培养条件下, 发酵所产纤维素酶系的组成以及酶学性质也有很大差别, 这就增大了纤维素酶分离纯化的困难和纤维素酶动力学性质研究的复杂性^[2]。因此纤维素酶的分离纯化非常重要, 是全面

了解纤维素酶的组成、性质及各组分间的协同关系的前提。目前已从曲霉、木霉等发酵产物中分离出纤维素酶的多种成分^[3-5], 张志强等^[6]从黑曲霉发酵粉中分离纯化出了一种内切 β -葡聚糖苷酶, Henning Jørgensen 等^[7]由一株青霉菌 IBT 20888 中分离纯化出了 3 种内切酶, József Medve 等^[8]从一种霉菌的纤维素酶中分离纯化出了一种内切酶, 并对

收稿日期: 2005-10-13; 修回日期: 2005-12-20.

基金项目: 国家“十五”科技攻关专项项目(2001BA706B-18); 南京市科学技术局项目(2003010145).

作者简介: 孟广荣(1975-), 女, 山东德州人, 生物化学博士研究生; * 为通讯作者.

其酶学性质进行了试验研究。作者探索了利用ÅKTA快速蛋白液相色谱系统(FPLC)从市售黑曲霉发酵粉提取内切 β -葡聚糖苷酶的纯化条件,并对纯化后内切酶的酶学性质进行了试验研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

黑曲霉发酵粉(南京林通生物技术公司),Sephadex G100(Amersham Biosciences, Sweden),HiTrap™ 1 mL DEAE FF 弱阴离子交换预装柱(Amersham Biosciences, Sweden)。电泳所用试剂及标准相对分子质量蛋白质为BBI原装产品,其它试剂为国产分析纯。

1.2 仪 器

ÅKTA UPC-900 FPLC(Amersham Biosciences, Sweden)、4300 pro 紫外可见分光光度计(Amersham Biosciences, Sweden)、Primo R 高速冷冻离心机(Heraeus Biofuge, German)、PROTEAN II 电泳仪(BIO-RAD, America)、RVC 2-18 离心浓缩仪(Christ, German)、凝胶成像系统(BIO-RAD, America)。

1.3 试验方法

1.3.1 纤维素酶活力测定 内切 β -葡聚糖苷酶活力的测定参照文献[4],外切 β -葡聚糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶活力的测定参照文献[9]。以0.5 mol酶溶液在50℃条件下反应30 min分解羧甲基纤维纳产生1 mg还原糖为1个酶的活力单位U。

1.3.2 蛋白质质量测定 酶蛋白测定参照文献[7]。

1.3.3 盐析条件 20 g酶粉溶于200 mL Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液中,4℃浸泡12 h,8 500 r/min离心20 min(4℃),收集上清液。分成7等份,分别用20~80%相对饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 于4℃盐析12 h,8 500 r/min 4℃离心20 min,收集沉淀物。重复上述过程两次,分别用pH 4.0,5.0,6.0的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液将三次过程所收集的沉淀物复溶至原体积,在 A_{550} 与 A_{280} 条件下分别测定其内切酶活力及蛋白质质量。

1.3.4 Sephadex G100 柱层析 取最佳相对饱和度区间内盐析沉淀物,溶解于pH 5.0的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液中至20 mL,取5 mL上Sephadex G100凝胶柱(D 2.2 cm \times 70 cm)。柱压力34 cm H_2O ,洗脱速度为1.0 mL/min,每管收集7.5 mL。

1.3.5 DEAE FF 弱阴离子交换柱层析 将经过Sephadex G100柱层析的内切酶峰值溶液用0.22 μm 微孔滤膜过滤,取0.1 mL上DEAE FF 1 mL

阴离子交换柱,快速蛋白液相色谱系统(FPLC)记录分离结果。pH 4.0 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液平衡,含1 mol/L NaCl的上述平衡液进行梯度洗脱,洗脱速度为1 mL/min,5个柱体积(5CV)平衡,20 min内洗脱液的浓度从0达到100%,分步收集器自动收集,每管1 mL。过柱前平衡液、洗脱液均需经0.22 μm 微孔滤膜过滤。

1.3.6 SDS-PAGE 不连续垂直平板电泳 分离胶浓度为12 g/dL,浓缩电压和分离电压分别为80 V和100 V。考马斯亮蓝R250染色,采用凝胶成像系统的工作站BIO-RAD, Quantity one-4.5.2软件确定相对分子质量。

2 结果与讨论

2.1 最佳盐析条件的确定

图1和图2表明:在30~50%相对饱和度区间内,随 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的增加而明显增多,在50~80%相对饱和度区间内数值比较相近,而图2显示:pH 4.0~6.0的3条曲线几乎重合。因此可判断: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析的最佳相对饱和度区间为30~50%,缓冲液的pH对盐析影响很小。

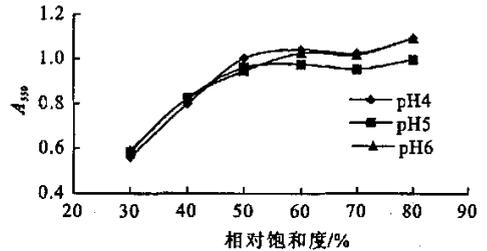


图1 内切酶活力与相对饱和度关系曲线

Fig. 1 The relation of the endoglycosidase activity and the relative saturation

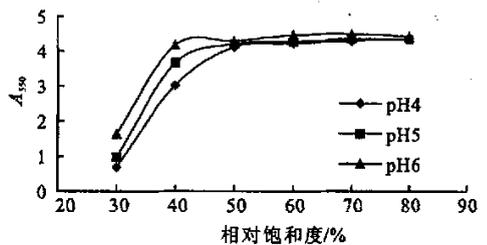


图2 蛋白质含量与相对饱和度关系曲线

Fig. 2 The relation of the protein content and the relative saturation

2.2 Sephadex G100 凝胶柱层析

测各收集管中酶液的蛋白 A_{280} 及内切酶活力 A_{550} 。结果如图3所示。蛋白曲线呈现3个峰,而内切酶组分主要集中在第二个蛋白峰内。经Seph-

adex G100 柱层析后,说明已去除了一部分高相对分子质量蛋白和低相对分子质量蛋白。

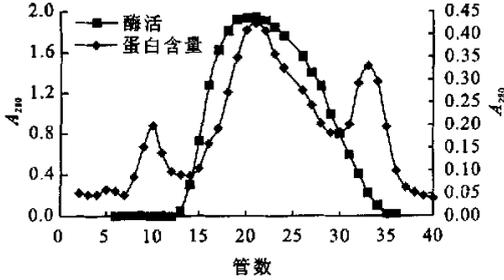


图3 Sephadex G100 凝胶过滤

Fig.3 Gel filtration chromatogram of Sephadex G100

2.3 DEAE FF 弱阴离子交换柱层析

取 2.2 中第二个峰酶液 0.1 mL 进行阴离子交换柱层析,结果如图 4 所示。经测定表明第二个峰为内切 β -葡聚糖苷酶活力峰^[6]。

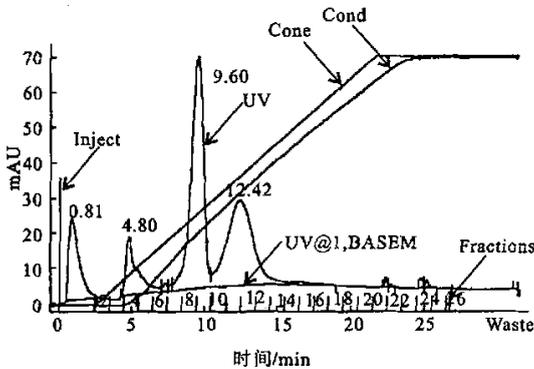


图4 DEAE FF 离子交换柱层析

Fig.4 Anion exchange chromatogram of DEAE FF

试验中发现,缓冲液中 Na_2HPO_4 浓度为 10 mmol/L 时仍干扰蛋白的吸附,在浓度降为 4.8 mmol/L 后,分离效果大为改善,洗脱阶段的蛋白峰可有效地分开,并避免了脱尾现象。平衡液中的离子可减弱被分离蛋白与离子交换介质的亲和力,从而影响蛋白的吸附,本试验中平衡液中离子浓度低于文献中离子强度^[7-8,10-11]。推测本试验中蛋白与离子交换介质的亲和力较弱,从而蛋白的吸附受离子强度的影响较大,所以需要更低的离子强度以降低其对离子交换层析吸附能力的抑制作用。

粗酶液经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析、Sephadex G100 及 DEAE FF 阴离子交换层析后,内切 β -葡聚糖苷酶的比活力提高了 8.1 倍,回收率为 7.5%。回收率高于文献值^[5,12]。各步分离纯化结果如表 1 所示。

2.4 内切酶的相对分子质量

对阴离子交换柱层析的峰 2 收集液浓缩,进行 SDS-PAGE 不连续垂直平板电泳。BIO-RAD 凝胶成像系统记录电泳结果^[13],采用该系统的 Quantity

one-4.5.2 程序标定出纯化所得内切 β -葡聚糖苷酶相对分子质量为 26 400(图 5)。

表 1 内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化结果

Tab.1 The results of isolation and purification of the endoglucanase

纯化步骤	总蛋白/mg	内切酶总活力/U	比活/U	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	285.7	1924.8	6.7	1	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析	97.6	902.7	9.2	1.4	46.9
Sephadex G100	28.9	619.1	21.4	3.2	32.2
DEAE FF	2.7	144.3	54.2	8.1	7.5

图5 SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 Electrophoresis of SDS-PAGE

2.5 内切酶最适反应温度、最适 pH 值

在不同反应温度下,测定内切酶水解 CMC-Na 的能力。图 6 显示在 30~50 $^{\circ}\text{C}$,内切酶活力随温度升高而增加,基本呈线性关系,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 酶活力达到峰值,说明内切酶的最适反应温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 。由于温度的升高,酶的反应速度和酶失活的速度均随之增加,两种因素综合作用的结果产生了该酶的最适温度。

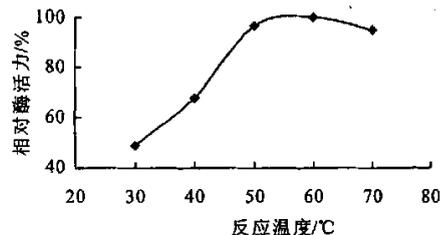


图6 反应温度对内切酶活力的影响

Fig.6 Effect of reaction temperature on the relative activity of endoglucanase

以不同 pH Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液配制的 CMC-Na 溶液为底物,在最适反应温度(55 $^{\circ}\text{C}$)测定内切酶活力,结果表明缓冲液的 pH 显著影响内切酶活力,最适 pH 为 4.8。在 pH 3.0 及 pH 7.0 时

酶活力仅为最大值的44%和21%。

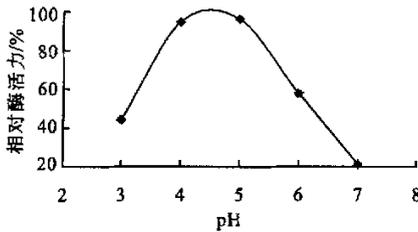


图7 pH对内切酶活力的影响

Fig. 7 Effect of pH on the relative activity of endoglucanase

2.6 动力学常数 K_m 和 V_{max}

用 pH 5.0 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液配制质量浓度分别为 0.0025, 0.00625, 0.001, 0.001375, 0.00175 mg/mL 的 CMC-Na 溶液, 测定与不同浓度底物反应时的内切酶活力, 根据葡萄糖标准曲线得到还原糖含量, 对还原糖含量-时间曲线进行二次拟合, 得反应初速度 V_0 , L-B 法^[14] 作图求得动力学参数, K_m 和 V_{max} 分别为 6.838×10^{-3} g/mL, 2.906×10^{-2} mg/(mL · min)。

参考文献:

- [1] Mawadza C, Hatti-Kaul R, Zvauya R, et al. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains [J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 83: 177-187.
- [2] Ortega N, Busto M D, Perez-Mateos M. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2001, 47: 7-14.
- [3] Iger C, Salam N. Partitioning of industrial cellulase in aqueous two-phase systems from *Trichoderma viride* QM9414 [J]. *Process Biochemistry*, 2001, 36: 1075-1080.
- [4] Amritkar N, Kamat M, Lali A. Expanded bed affinity purification of bacterial α -amylase and cellulase on composite substrate analogue - cellulose matrices [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 565-570.
- [5] Yang T C, Mo J C, Cheng J A. Purification and some properties of cellulase from *Odontotermes formosanus* (Isoptera: termitidae) [J]. *Entomologia sinica*, 2004, 11(1): 1-10.
- [6] 张志强, 郭春腾, 林佳任, 等. 从黑曲霉发酵粉中分离纯化一种内切 β -葡聚糖苷酶 [J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2002, 30(5): 636-640.
- [7] Jørgensen H, Eriksson T, Börjesson J, et al. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888 [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32: 851-861.
- [8] Medve J, Lee D, Tjerneld F. Ion-exchange chromatographic purification and quantitative analysis of *Trichoderma reesei* cellulases cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II by fast protein liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 808: 153-165.
- [9] 时祥柱, 郭春腾, 周建武, 等. 纤维素酶的二步分离纯化新工艺 [J]. 色谱, 2002, 20(4): 308-312.
- [10] Farag A M, Hassan M A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34: 85-93.
- [11] Str mberg P, Rotticci-Mulder J, Bj rnestedt R, et al. Preparative parallel protein purification (P4) [J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, 818: 11-18.
- [12] Saha B C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides* [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 1871-1876.
- [13] Kr lov B. Electrophoretic methods for the isolation and characterization of enzymes [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 383: 109-117.
- [14] Coughlan M P. The mechanism of degrading cellulose by bacteria and fungus [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1991, 32: 77-100.

(责任编辑: 杨萌)