

# 绿色木霉 MJ1 产内切 $\beta$ -葡聚糖苷酶的分 离纯化及酶学性质\*

杨树林<sup>1</sup> 孟广荣<sup>1</sup> 李校堃<sup>2</sup> 曾亮亮<sup>1</sup> 富国平<sup>1</sup>

(南京理工大学生物工程研究所 南京 210094)<sup>1</sup>

(吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程中心 长春 130118)<sup>2</sup>

**摘要:** 利用 ÄKTA UPC-900 快速蛋白液相色谱系统 (FPLC) 从绿色木霉 MJ1 固体发酵产物中分离纯化出内切  $\beta$ -葡聚糖苷酶。分离纯化后酶的比活力提高了 28.6 倍, 回收率为 19.7%。SDS-PAGE 后经 BIO-RAD 凝胶成像系统分析该内切酶的分子量为 64.7kD。酶学试验研究表明: 该酶的最适反应温度 53℃, 最适 pH 为 4.2, Lineweaver-Burk 法求得动力学参数,  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为  $1.230 \times 10^{-2}$  g/mL、 $2.396 \times 10^{-2}$  mg/(mL·min)。并确定了 FPLC 层析缓冲液的离子强度为 2.2mmol/L 时分离效果达到最佳。

**关键词:** 绿色木霉, 纤维素酶, 内切  $\beta$ -葡聚糖苷酶, 分离纯化, 酶学性质, 动力学

**中图分类号:** Q814.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0075-05

## Purification and Properties of an Endo- $\beta$ -glucanase from *Trichoderma viride* MJ1\*

YANG Shu-Lin<sup>1</sup> MENG Guang-Rong<sup>1</sup> LI Xiao-Kun<sup>2</sup> ZENG Liang-Liang<sup>1</sup> FU Guo-Ping<sup>1</sup>

(Biotechnology Institute of Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094)<sup>1</sup>

(Engineering Center of Ministry of Education of Bioractor and Medicinal T&D of Jilin  
Agricultural University, Changchun 130118)<sup>2</sup>

**Abstract:** An endo- $\beta$ -glucanase was isolated and purified from the leavening of *Trichoderma viride* called MJ1 by means of FPLC (ÄKTA UPC-900). The specific activity of the endoglucanase increased 28.6 fold, and coefficient of recovery was 19.7%. The molecular mass was 64.7kD determined by gel imaging system after SDS-PAGE. The optimal reaction temperature of the endoglucanase was 53℃, and the optimal pH was 4.2. The values of  $K_m$  and  $V_{max}$  calculated from Lineweaver-Burk plots were  $1.230 \times 10^{-2}$  g/mL and  $2.396 \times 10^{-2}$  mg/(mL·min) respectively. The endoglucanase was purified effectively when the ionic strength of the buffer was 2.2mmol/L.

**Key words:** *Trichoderma viride*, Cellulase, Endoglucanase, Purification, Property, Kinetics

纤维素酶是多组分酶系, 其中内切酶和外切酶的分子量和等电点均相差很小, 所以对纤维素酶的分离纯化十分困难。但是要研究酶蛋白的结构与性能的关系, 就必须从多组分的纤维素酶系中分离纯化出单一纯酶, 才能了解其组成、性质及相互关系。并可根据纤维素酶的不同理化性质, 开展纤维素降解机理研究, 为纤维素酶分子结构研究、酶基因克隆、新酶分子的构建、体外定点诱变和酶的化学修饰等提供依据。因此对纤维素酶的分离纯化及酶学性质的研究一直受到关注<sup>[1-3]</sup>。Yang 等<sup>[1]</sup>用阴离子交换法从白蚁中分离纯化出一种分子量为 80kD 的内切酶, Saha<sup>[4]</sup>通过离子交换和凝胶过滤从筛选出的一株真菌的发酵产物中分离纯化出一种分子量为 27kD 的内切酶, Medve

\* 国家高技术研究发展计划项目 (“863”项目) (No. 2004AA2Z3C60)

国家十五科技攻关项目 (No. 2001BA706B-18)

通讯作者 Tel: 025-84315945, E-mail: yshulin@mail.njust.edu.cn

收稿日期: 2005-12-28, 修回日期: 2006-03-06

等<sup>[3]</sup>利用快速蛋白液相色谱系统(FPLC)从一种木霉产的纤维素酶中分离纯化出两种纤维二糖水解酶和一种内切酶,并对其酶学性质进行研究。本文利用从自然界中筛选得到的绿色木霉MJ1,采用固体发酵,从发酵产物中分离纯化出内切 $\beta$ -葡聚糖苷酶,同时探讨了利用FPLC纯化该酶的最佳条件。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 绿色木霉MJ1:本实验室从紫金山土壤中筛选,由本实验室保藏。

1.1.2 发酵培养基:稻草4.0g,麸皮1.0g,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 营养液( $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  2.06%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01%) 12.5mL, pH5.0。

1.1.3 试剂:Sephadex G100 (Amersham Biosciences, Sweden), HiTrap<sup>TM</sup> 1mL DEAE FF弱阴离子交换预装柱 (Amersham Biosciences, Sweden), 电泳所用试剂及标准分子量蛋白 (Biotechnology Department Bio Basic Inc. Canada), 其它试剂为国产分析纯。

### 1.2 仪 器

KTÄ UPC-900 FPLC快速蛋白液相色谱系统 (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), RVC 2-18离心浓缩仪 (Christ, German), PROTEAN II电泳仪 (BIO-RAD, America), 凝胶成像系统 (BIO-RAD, America)。

### 1.3 方 法

1.3.1 纤维素酶活力测定:内切 $\beta$ -葡聚糖苷酶活力的测定参照文献[5],外切 $\beta$ -葡聚糖苷酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的测定参照文献[6]。

1.3.2 蛋白含量测定:酶蛋白测定参照文献[7]。

1.3.3 盐析条件: MJ1 30℃固态发酵5d后,加pH4.0的柠檬酸缓冲液100mL,30℃保温1h,纱布过滤后,8,500r/min离心20min(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12h,8,500r/min 4℃离心20min,收集沉淀物。改用pH5.0和6.0的柠檬酸缓冲液溶解固体发酵产物,重复上述过程2次,分别用相应pH的柠檬酸缓冲液将3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含量。

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pH6.0的柠檬酸缓冲溶液中至20mL,取2.5mL上Sephadex G100凝胶柱( $\Phi$  2.2cm $\times$ 70cm)。柱压力34cmH<sub>2</sub>O,洗脱速度约为1.0mL/min,每管收集5mL。

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 $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取0.1mL上DEAE FF 1mL阴离子交换柱,快速蛋白液相色谱系统(FPLC)记录分离结果。pH4.0柠檬酸缓冲液平衡,含1mol/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,分段梯度洗脱:18min内洗脱液的浓度从0达到65%,2min内洗脱液浓度达到100%,分步收集器自动收集,每管1mL。过柱前平衡液、洗脱液均需经0.22 $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。

1.3.6 不连续垂直平板SDS-PAGE:分离胶浓度为12.5%,浓缩电压和分离电压分别为40V和60V。考马斯亮蓝R250染色。

## 2 结果与讨论

### 2.1 最佳盐析条件的确定

在40%~60%相对饱和度区间内,盐析所得沉淀的内切酶活力和蛋白含量均随 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的增加而明显增大;当相对饱和度超过60%后,内切酶活力基本不再增加,而蛋白含量仍在增大,说明杂蛋白继续沉淀出。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析最佳相对饱和度区间为40%~60%。在此区间内,用pH6柠檬酸缓冲液溶解沉淀所得酶液的内切酶活力和蛋白含量增加最大。因此取40%~60%相对饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析所得沉淀,用pH6柠檬酸缓冲液溶解(图1,图2)。

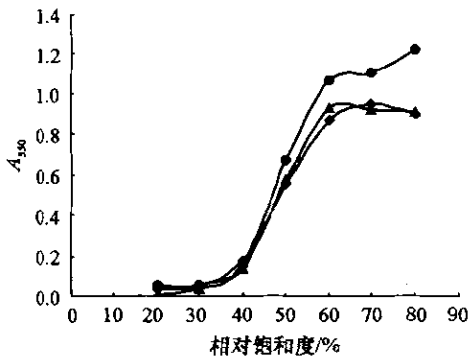


图1 内切酶活力与相对饱和度关系曲线

◆ pH4, ▲ pH5, ● pH6

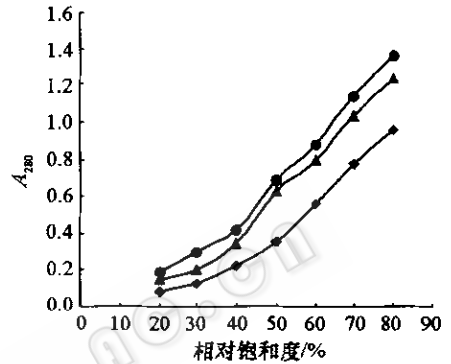


图2 蛋白含量与相对饱和度关系曲线

◆ pH4, ▲ pH5, ● pH6

### 2.2 Sephadex G100 凝胶柱层析

测所收集酶液的蛋白含量 $A_{280}$ 及内切酶活力 $A_{550}$ 。结果如图3。蛋白曲线呈现3个峰,而内切酶组分主要集中在第2个蛋白峰内。说明经Sephadex G100柱层析后,已去除了一部分高分子量蛋白和低分子量蛋白。

### 2.3 DEAE FF 弱阴离子交换柱层析

取2.2中第2个峰酶液0.1mL进行阴离子交换柱层析,结果如图4所示。测定表明第2个峰为内切 $\beta$ -葡聚糖苷酶活力峰<sup>[6]</sup>。

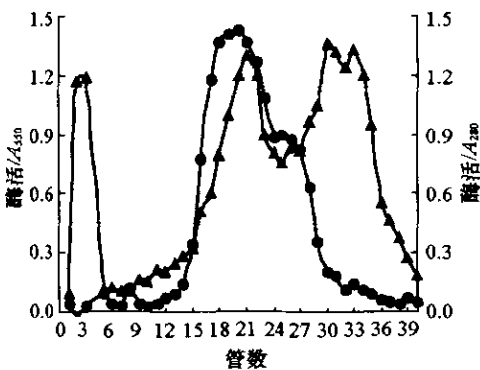


图3 Sephadex G100 凝胶过滤

● 酶活, ▲ 蛋白含量

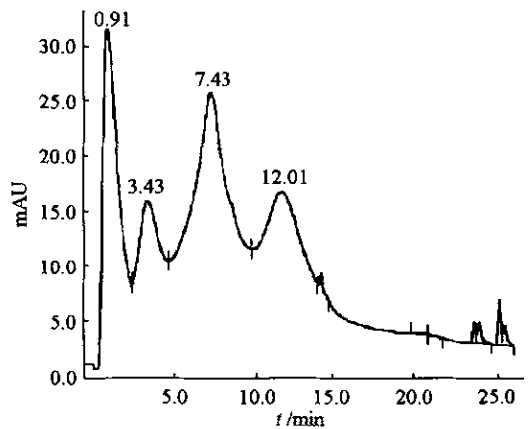


图4 DEAE FF 离子交换柱层析

试验中发现：缓冲液中柠檬酸钠浓度为 10mmol/L 时仍干扰蛋白的吸附，在浓度降为 2.2mmol/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<sup>[3,7-9]</sup>。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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 28.6 倍，回收率为 19.7%。回收率高于文献[4, 6] 值。各步分离纯化结果如表 1 所示。

表 1 内切 β-葡聚糖苷酶的分纯化结果

纯化步骤	总蛋白	内切酶总活力	比活	纯化倍数	回收率 (%)
粗酶液	579.5	377.2	0.65	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 盐析	117.8	344.7	2.93	4.5	91.4
Sephadex G100	41.0	165.5	4.04	6.2	43.9
DEAE FF	4.0	74.5	18.61	28.6	19.7

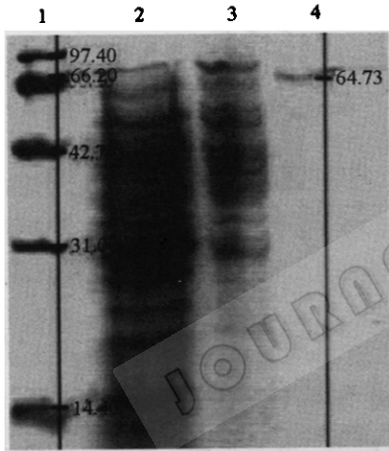


图 5 SDS-PAGE

1 标准蛋白, 2 盐析沉淀, 3 Sephadex G100 活力峰, 4 FPLC 活力峰

### 2.4 内切酶的分子量

对阴离子交换柱层析的峰 2 收集液浓缩，进行不连续垂直平板 SDS-PAGE。BIO-RAD 凝胶成像系统记录电泳结果<sup>[10]</sup>，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 64.7kD (图 5)。

### 2.5 内切酶最适反应温度、最适 pH

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℃，内切酶活力随温度升高而增加，在 53℃ 酶活力达到峰值，说明内切酶的最适反应温度为 53℃。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。

以不同 pH 柠檬酸缓冲液配制的 CMC-Na 溶液为底物，在最适反应温度 (53℃) 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 4.2。在 pH3.0 及 pH6.6 时酶活力仅为最大值的 78% 和 72% (图 7)。

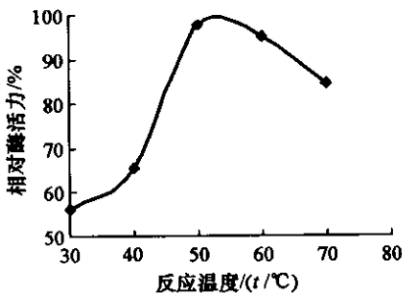


图 6 反应温度对内切酶活力的影响

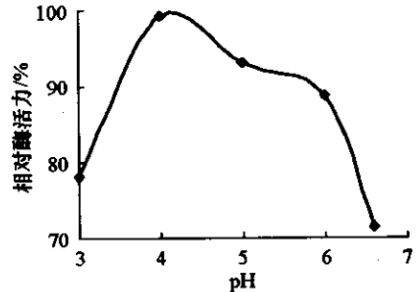


图 7 pH 对内切酶活力的影响

## 2.6 动力学常数 $K_m$ 和 $V_{max}$

用 pH5.0 的柠檬酸缓冲溶液配制浓度分别为 0.250%、0.625%、1.000%、1.375%、1.750% g/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  $V_0$ , Lineweaver-Burk 法<sup>[11]</sup>作图求得动力学参数,  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为  $1.230 \times 10^{-2}$  g/mL、 $2.396 \times 10^{-2}$  mg/(mL·min)。

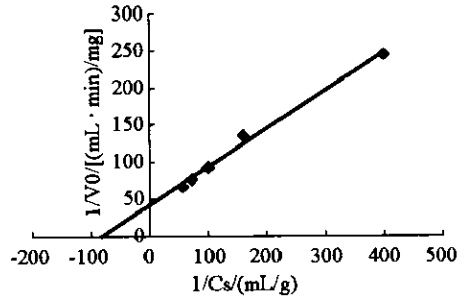


图8 双倒数作图

## 3 结论

绿色木霉 MJ1 固体发酵, 粗酶液经  $(NH_4)_2SO_4$  盐析、Sephadex G100 脱盐并初步分离、利用快速蛋白液相色谱系统 (FPLC) 分离纯化得到内切  $\beta$ -葡聚糖苷酶, SDS-PAGE 测定其分子量为 64.7 kD。比活力提高 28.6 倍, 回收率为 19.7%。

平衡液和洗脱液的 pH 值和离子强度是影响离子交换柱层析效果的两个重要因素。在 pH 4.0 时分离效果较好, pH 3.0 时几乎失去分离能力, 而大于 4.0 时洗脱阶段的峰未能完全分开且脱尾严重。经多次摸索离子交换柱层析参数, 在平衡液为 pH4.0 柠檬酸缓冲液, 其中柠檬酸钠浓度为 2.2 mmol/L 时分离效果最佳。FPLC 系统在 25min 内即可完成阴离子交换柱层析, 快速准确自动化程度高, 且重复性好。

内切酶最适反应温度、最适 pH 分别为 53℃ 和 4.2, L-B 法求得动力学参数  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为  $1.230 \times 10^{-2}$  g/mL、 $2.396 \times 10^{-2}$  mg/(mL·min)。

## 参考文献

- [1] Yang T C, Mo J C, Cheng J A. *Entomologia sinica*, 2004, **11** (1): 1~10.
- [2] Ortega N, Busto M D, Perez-Mateos M. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2001, **47**: 7~14.
- [3] Medve J, Lee D, Tjerneld F. *Journal of Chromatography A*, 1998, **808**: 153~165.
- [4] Saha B C. *Process Biochemistry*, 2004, **39**: 1871~1876.
- [5] Amritkar N, Kamat M, Lali A. *Process Biochemistry*, 2004, **39**: 565~570.
- [6] 时祥柱, 郭春腾, 周建武, 等. *色谱*, 2002, **20** (4): 308~312.
- [7] Jørgensen H, Eriksson T, Börjesson J, et al. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, **32**: 851~861.
- [8] Farag A M, Hassan M A. 2004, **34**: 85~93.
- [9] Strömberg P, Rotticci-Mulder J, Björnstedt R, et al. *Journal of Chromatography B*, 2005, **818**: 11~18.
- [10] Králová B. *Analytica Chimica Acta*, 1999, **383**: 109~117.
- [11] Coughlan M P. *Animal Feed Science and Technology*, 1991, **32**: 77~100.