

叶 锦, 张静茹, 覃益民, 等. 一种康氏木霉内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化及酶学性质[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 995-1000.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.008

一种康氏木霉内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化及酶学性质

叶 锦, 张静茹, 覃益民, 刘幽燕

(广西大学化学化工学院, 广西 南宁 530004)

摘要: 为获得康氏木霉(*Trichoderma koningii*)内切 β -葡聚糖苷酶组分,并研究其酶学性质,通过硫酸铵盐析、DEAE Sepharose FF 阴离子交换层析和 Sephadex G-75 凝胶过滤层析对康氏木霉 GIMP3.444 纤维素酶主要组分进行分离纯化,SDS-PAGE 电泳检测蛋白质纯度和分子量,MALDI-TOFMS 鉴定蛋白质种类。结果显示,从康氏木霉所产的纤维素酶系中分离纯化获得一种内切 β -葡聚糖苷酶组分,相对分子质量为44 600,酶的比活力为 19.65 U/mg。该内切酶的最适反应 pH 值为 4.5,最适反应温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 。以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为底物时,酶的米氏常数(K_m)为 7.22 mg/ml。不同金属离子对酶活性影响不同,其中 Ca^{2+} (0.3 mmol/L)对酶的抑制作用较强,抑制了近 35% 的活力。通过 MALDI-TOFMS 鉴定及数据库分析,确定该酶为一种新的内切 β -葡聚糖苷酶组分。

关键词: 康氏木霉; 内切 β -葡聚糖苷酶; 分离纯化; 酶学性质

中图分类号: Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)05-0995-06

Purification of a new endo- β -glucanase from *Trichoderma koningii* and its characterization

YE Jin, ZHANG Jing-ru, QIN Yi-min, LIU You-yan

(School of Chemistry & Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: To identify the composition of cellulase produced by *Trichoderma koningii*, ammonium sulfate precipitation, DEAE-sepharose FF anion exchange chromatography and sephadex G-75 gel filtration chromatography were used for purification of the cellulase. The molecular weight and purity were determined by SDS-PAGE, and the protein was identified by MALDI-TOFMS. A new endo- β -glucanase was identified with its molecular weight of 44 600 and the specific activity of 19.65 U/mg. The optimum pH and temperature for the endo- β -glucanase were 4.5 and 55 $^{\circ}\text{C}$. The K_m value was 7.22 mg/ml (CMC-Na). Ca^{2+} (0.3 mmol/L) could inhibit the enzymatic activity significantly by 35%. The enzymatic properties of the new endo- β -glucanase was distinct from other endo- β -glucanase. It could be used to analyze the synergetic mechanism of cellulases.

Key words: *Trichoderma koningii*; endo- β -glucanase; isolation and purification; enzymatic property

收稿日期:2015-02-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(21276053);广西生物炼制重点实验室培育基地开放课题(GXBF11-04)

作者简介: 叶 锦(1990-),女,河南信阳人,硕士,研究方向为生物化工。(Tel)15578445453;(E-mail)469157531@qq.com

通讯作者: 覃益民,(E-mail) qym6289@sina.com

纤维素是葡萄糖以 β -1,4 糖苷键组成的大分子多糖,是最丰富的天然可再生生物资源^[1-3]。纤维素可通过纤维素酶水解转化为可发酵性糖,继而转化为燃料乙醇及相关化学品^[4]。

纤维素酶是多组分酶系,主要由内切 β -葡聚糖苷酶(EG)、外切 β -葡聚糖苷酶(CBH)和 β -葡萄糖苷酶3个主要成分组成^[5]。尽管大量研究结果已表明,只有在这3个主要成分酶的协同作用下,纤维素分子最终才能被降解成葡萄糖。但由于纤维素酶的多样性及不易分离纯化,致使人们对纤维素酶的结构、功能,特别是降解纤维素的作用机制还缺乏足够的了解,对纤维素酶各成分是如何协同起作用的,学者们的看法还不尽相同^[6],近年来人们还发现了一些不具有纤维素酶活性的蛋白质也能与纤维素酶起协同作用,并最终能促进纤维素的降解^[7-8]。因此,开展对相关纤维素酶组分的分离纯化及其酶学性质研究,无论是对纤维素酶系各成分酶的协同作用机理还是对纤维素酶系与其他非酶蛋白质的协同增效作用的更深入了解,都将提供重要的方法和理论基础。

康氏木霉 GIMP 3.444 是 1 株产纤维素酶系的真菌菌株,覃益民等最近从该菌株中分离纯化出一种纤维素酶协同增效蛋白质^[9]。本研究对康氏木霉 GIMP 3.444 菌株产的纤维素酶系各组分酶进行分离纯化,并对其中 1 种内切 β -葡聚糖苷酶学性质进行研究,为纤维素酶的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养条件

康氏木霉 (*Trichoderma koningii*) GIMP3.444 购于广东省微生物菌种保藏中心,现保藏于广西大学化学化工学院生物化工实验室。

斜面活化培养基:马铃薯 200.0 g、葡萄糖 20.0 g、 KH_2PO_4 3.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g、琼脂粉 20.0 g,加自来水至 1 000 ml,调 pH 6.0,121 °C 灭菌 20 min。

摇瓶种子培养基:马铃薯 200.0 g、葡萄糖 20.0 g、 KH_2PO_4 3.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g,加自来水至 1 000 ml,调 pH 6.0,121 °C 灭菌 20 min。

液体发酵培养基:甘蔗渣(过 80 目筛)15.0 g、麦麸粉 8.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0 g、 KH_2PO_4 3.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g,加自来水至 1 000 ml,调 pH 6.0,121 °C 灭菌 20 min。

取保藏的康氏木霉接种于斜面活化培养基,28 °C 条件下活化培养 3~7 d,刮取平面孢子,用无菌

水制成孢子悬浮液,按 1% (体积比)接种至种子培养液中,于 180 r/min、28 °C 下培养 30~36 h。将摇瓶种子按 5% (体积比)接种量接种至装有 150 ml 发酵培养基的 500 ml 三角瓶中,于 180 r/min、28 °C 下培养 120 h。

1.2 粗酶的预处理

发酵液在 4 °C、8 000 r/min 下离心 20 min,收集上清液,经过 10 000 滤膜压滤,将滤液用超滤膜浓缩,得到粗酶液。粗酶液用 20% 饱和度的硫酸铵沉淀,4 °C 下静置过夜后,于 8 000 r/min 离心 20 min,取上清液继续加入硫酸铵至饱和度为 85%,4 °C 下静置过夜,离心弃上清液,收集沉淀,加入少量 0.1 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液复溶,再次离心除去不溶的杂质,浓缩酶液于 4 °C 下充分透析后保存。

1.3 纤维素酶的纯化

1.3.1 DEAE Sepharose FF 离子交换层析 粗酶液先用 DEAE Sepharose FF 离子交换层析法进行初步分离,分离柱规格为 1.6 cm×40.0 cm,用 NaCl 浓度梯度从 0 mol/L 到 0.8 mol/L 的 Tris-HCl (0.1 mol/L、pH 8.0) 缓冲液分步洗脱收集,测定各峰纤维素内切酶活力,收集有酶活力的峰,4 °C 保存。所有的操作都在 4 °C 下进行。

1.3.2 Sephadex G-75 凝胶过滤层析 用 G75 凝胶过滤层析法进一步分离 DEAE Sepharose FF 离子交换层析得到的目标峰,采用 AKTA pure 层析系统,用 pH 4.8、0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液洗脱,收集每个峰,测定内切 β -葡聚糖酶活力,收集有酶活力的洗脱峰,4 °C 保存。所有的操作都在 4 °C 下进行。

1.4 测定方法

1.4.1 蛋白质浓度的测定^[10] 以牛血清白蛋白质为标准,用考马斯亮蓝 G-250 法测蛋白质浓度。

1.4.2 内切 β -葡聚糖苷酶活力测定 采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定内切酶活性^[11]。向试管中各加入 1.5 ml 1% (质量体积比)的羧甲基纤维素钠柠檬酸-柠檬酸钠溶液(0.1 mol/L, pH 4.8)及 0.5 ml 酶液,在 50 °C 水浴中保温 30 min,取出后,加入 3.0 ml DNS 试剂终止反应,再沸水浴 5 min 后,取出流水冷却,定容至 25 ml,在 540 nm 波长处测定吸光度。以 1 ml 酶液每 30 min 催化底物产生出相当于 1 mg 葡萄糖的还原糖量为 1 个酶活力单位,以 U/ml 表示。

1.4.3 蛋白质纯度鉴定及相对分子量测定 采用 SDS-PAGE 法测定蛋白质纯度。聚丙烯酰胺凝胶质量分数 12%, 蛋白质标准品的相对分子质量范围 14 400 ~ 97 400。

1.5 MALDI-TOFMS 分析

蛋白质的鉴定和肽段分析采用 MALDI-TOFMS 方法^[12]。将目标电泳条带切下, 37 °C 用胰蛋白酶处理过夜后, 将生物大分子电离后检测。肽段的信息在 NCBI 数据库中搜索。

1.6 最适 pH 值和温度

最适反应 pH 值: 取纯酶液在 pH 3.0 ~ 7.5 条件下 (pH 3.0 ~ 6.0 为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、pH 6.5 ~ 7.5 为磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液), 50 °C 保温 30 min, 分别测定内切 β -葡聚糖苷酶活力, 确定酶的最适反应 pH 值。

最适反应温度: 取纯酶液在温度 35 ~ 70 °C 条件下, pH 4.8 保温 30 min, 分别测定内切 β -葡聚糖苷酶活力, 确定酶的最适反应温度。

1.7 底物动力学参数测定

分别配制浓度为 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.7%、1.0%、1.5%、2.0% 和 2.5% 的羧甲基纤维素钠悬浮液 (pH 4.8), 与内切酶在 50 °C 水浴中保温 30 min, DNS 法测定不同浓度底物产生的还原糖, 然后按照 Lineweaver-Burk 双倒数作图法作图, 得出该酶作用于羧甲基纤维素钠时的 K_m 值。

1.8 金属离子对酶活性的影响

取不同的金属离子 0.3 mmol/L 与纤维素酶在 pH 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 在 30 °C 水浴保温 30 min 后, 50 °C 下反应 30 min, 测量有金属离子作用下的酶活性, 以不加金属离子的酶活性为 100%。

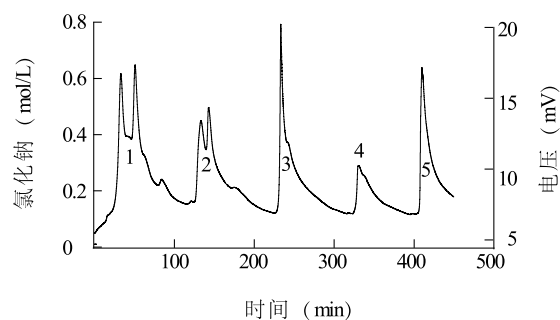
2 结果与分析

2.1 酶的分离纯化

将 20% ~ 85% 硫酸铵沉淀和透析后获得的粗蛋白质经 DEAE Sepharose FF 离子交换层析后, 出现 5 个峰 (图 1)。经测定, 峰 2 和峰 3 均有内切 β -葡聚糖苷酶活力, 其中峰 3 内切 β -葡聚糖苷酶比活力较高, 这说明康氏木霉的发酵液中至少含有 2 种内切 β -葡聚糖苷酶。

将离子交换层析得到的蛋白质峰 3 经过 Sepha-

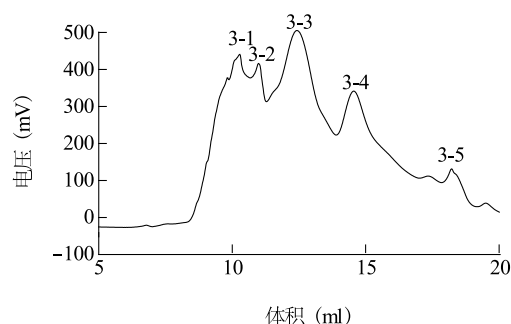
dex G-75 凝胶过滤层析, 得到 5 个峰 (图 2)。经测定, 峰 3-4 为主要的内切酶组分。



1: 0 mol/L NaCl 洗脱峰; 2: 0.1 mol/L NaCl 洗脱峰; 3: 0.2 mol/L NaCl 洗脱峰; 4: 0.3 mol/L NaCl 洗脱峰; 5: 0.8 mol/L NaCl 洗脱峰。

图 1 总蛋白质 DEAE Sepharose FF 离子交换层析洗脱曲线

Fig. 1 Elution profile of the total protein on DEAE Sepharose FF



3-1: 峰 3 的第 1 个洗脱峰; 3-2: 峰 3 的第 2 个洗脱峰; 3-3: 峰 3 的第 3 个洗脱峰; 3-4: 峰 3 的第 4 个洗脱峰; 3-5: 峰 3 的第 5 个洗脱峰。

图 2 Sephadex-G75 凝胶过滤层析曲线

Fig. 2 Filtration profile of peak 3 of the protein on Sephadex-G75

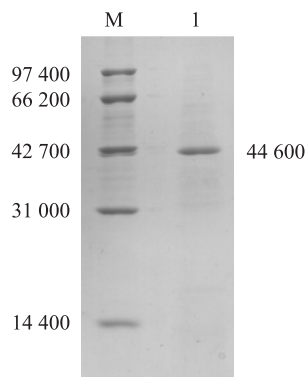
内切 β -葡聚糖苷酶的整个分离纯化过程结果如表 1。最终得到的这种内切酶组分比活力达到 19.65 U/mg, 与粗酶液相比, 提高了 3.65 倍, 回收率为 2.83%。

2.2 内切 β -葡聚糖苷酶纯度、分子量测定及其蛋白质种类鉴定

纯化的内切 β -葡聚糖苷酶组分经 SDS-PAGE 电泳, 发现只有 1 条带 (图 3), 表明该组分已达电泳纯。经凝胶成像系统分析, 该酶的相对分子量约为 44 600。

表 1 内切 β -葡聚糖苷酶的纯化结果Table 1 Purification of endo- β -glucanase

纯化过程	总蛋白质 (mg)	总酶活力 (U/ml)	比活力 (U/mg)	回收率 (%)	纯化倍数
粗酶液	291.81	1 569.94	5.38	100.00	—
20% ~ 85% 盐析	164.74	1 416.76	8.60	90.24	1.60
DEAE Sepharose FF	30.16	542.88	18.00	34.58	3.35
Sephadex G-75	2.26	44.41	19.65	2.83	3.65



M: 蛋白 Marker; 1: 内切 β -葡聚糖苷酶。

图 3 内切 β -葡聚糖苷酶 SDS-PAGE 电泳图谱Fig. 3 Identification of endo- β -glucanase by SDS-PAGE

将该酶进行质谱分析和数据库检索, 只有当蛋白质得分大于 65 和得分可信度大于 95% 时, 才能说明 2 种蛋白质可能匹配。但从质谱结果发现 Mascot 得分最高的前 5 个蛋白质得分也分别只有 62、59、55、55、55 分, 得分可信度都为 0。两项数值与我们分离得到的酶匹配度都很低。另外, 从数据库搜索出的结果中并没有关于纤维素酶的信息, 表明此酶是一种在数据库中没有登记的未知蛋白质, 也说明本试验中分离到的内切酶是一种新的内切 β -葡聚糖苷酶组分。

2.3 内切 β -葡聚糖苷酶的酶学性质

2.3.1 最适 pH 值和温度 pH 值和温度对内切酶活力影响结果见图 4、图 5。结果 (图 4) 显示, 该酶催化反应的最适 pH 值为 4.5 (柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液), pH 值在 4.0 到 5.0 之间酶活力较好, 当 pH 值上升到 6.0 后, 酶活力下降比较快。

图 5 显示, 该酶的最适反应温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 时, 酶活力达到 99%, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 时, 酶活力仍有 98%, 说明该酶在 50 $^{\circ}\text{C}$ 到 60 $^{\circ}\text{C}$ 之间的稳定性好。

超过 60 $^{\circ}\text{C}$ 之后, 酶活力下降很快, 说明该酶对热比较敏感。

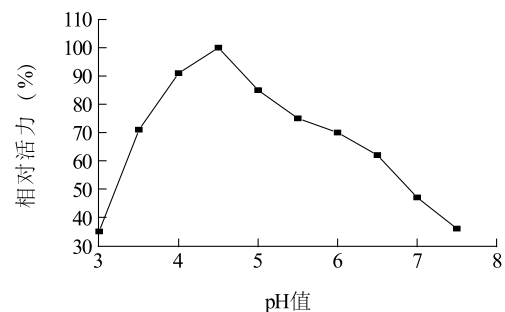


图 4 pH 值-酶活力曲线图

Fig. 4 The relationship between pH value and enzymatic activities

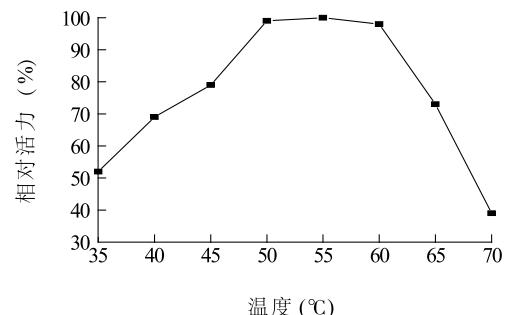


图 5 温度-酶活力曲线图

Fig. 5 The relationship between temperature and enzymatic activities

2.3.2 金属离子和试剂对酶活力的影响及动力学参数 金属离子和其他试剂对酶活力的影响如表 2 所示, 从加入不同离子后的酶活力可以看出, 乙二胺四乙酸 (EDTA)、镁离子 (Mg^{2+})、铜离子 (Cu^{2+}) 和锌离子 (Zn^{2+}) 基本对酶活力没有影响, 而钙离子 (Ca^{2+}) 对酶的抑制作用较强, 抑制了近 35% 的酶活力。二价铁离子 (Fe^{2+})、锰离子 (Mn^{2+})、铅离子 (Pb^{2+})、铵离子 (NH_4^+) 则都有不同程度的抑制作用。

表2 金属离子和试剂对酶活力的影响

Table 2 Effect of chemical reagent and ions on activities of endo- β -glucanase

试剂及离子	浓度 (mmol/L)	酶活力 (%)
乙二醇四乙酸	0.3	101.7
钙离子	0.3	65.5
铜离子	0.3	100.0
二价铁离子	0.3	89.7
镁离子	0.3	101.6
锰离子	0.3	75.9
锌离子	0.3	100.0
铅离子	0.3	86.2
铵离子	0.3	93.1

以羧甲基纤维素钠作为底物,在 pH 4.8、50 ℃ 条件下测定酶活力,根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法作图,根据回归曲线得出反应速率 v 与底物浓度 $[S]$ 的标准方程为: $1/v = 8.6339 (1/[S]) + 1.1958$ 。进而求得以羧甲基纤维素钠为底物时,内切 β -葡聚糖苷酶的米氏常数 K_m 值为 7.22 mg/ml。最大反应速率 V_{max} 为 3.72 mg/(min · ml)。

3 讨论

由于微生物来源的纤维素酶是多组分酶系,且各组分酶之间的分子量和等电点等相差不大,要将内切 β -葡聚糖苷酶组分从纤维素酶系中分离纯化出来较为困难。本试验从康氏木霉 GIMP3.444 菌种的发酵产物中,通过 $(NH_4)_2SO_4$ 分级沉淀、DEAE Sepharose FF 阴离子交换层析、Sephadex G-75 凝胶过滤层析等方法分离纯化出一种内切 β -葡聚糖苷酶组分,电泳检测仪显示 1 条蛋白质条带,说明该方法比较适宜该菌株内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化。

本试验分离得到的新内切 β -葡聚糖苷酶的相对分子质量为 44 600,比活力为 19.65 U/mg,最适反应 pH 值和最适反应温度分别为 4.5 和 55 ℃, Ca^{2+} 对酶有较强抑制作用,抑制了近 35% 的酶活力。以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为底物时,酶的米氏常数(K_m)为 7.22 mg/ml。该酶的质谱分析和数据库检索结果表明,分离到的内切酶蛋白质是一种在数据库中没有登记的未知蛋白质,即一种新的内切酶组分。与文献报道的内切 β -葡聚糖苷酶相比,该酶在分子量及一些酶学性质上存在着差异,且这些

差异不仅存在于不同来源微生物的酶中,还存在于相同来源微生物的酶中。由于这些差异的存在,就要求我们在研究和利用这些酶的过程中必须明确其酶学性质,才能更好地发挥酶活性。正是由于纤维素酶系的复杂性,导致到目前为止对纤维素酶水解作用的机理尚未完全研究清楚,而这种新的纤维素酶组分的发现也能够加深我们对纤维素酶系的组成及其在水解过程中的作用的了解。

从目前的研究看,真菌产生的纤维素酶普遍具有多样性,如 Wood 等^[13]、朱年青等^[14] 和陈冠军等^[15] 分别从康氏木霉 *Trichoderma koningi*、里氏木霉 *Trichoderma reesei* 和棘孢曲霉 *Aspergillus aculeatus* 中纯化出了 3 种、2 种和 5 种内切 β -葡聚糖酶,分子量和酶学性质也各不相同。同样从本试验的分离纯化过程中也发现,康氏木霉 GIMP3.444 除了分泌本试验得到的新内切 β -葡聚糖酶外,至少还分泌另外 1 种内切 β -葡聚糖酶组分。因此,在研究纤维素酶系各成分酶的协同作用机理或研究纤维素酶系与其他非酶蛋白质的协同增效作用时,需考虑这种同工酶存在的影响。

参考文献:

- [1] 廖瀚峰,周礼红,潘肇仪,等.除臭效果菌株中具有分解纤维素能力菌株的筛选及鉴定[J].江苏农业科学,2014,42(12): 386-388.
- [2] 郭彦,杨洪双,张翠,等.大豆根瘤突变体连作土壤中纤维素酶和蔗糖酶活性的变化[J].江苏农业科学,2014,42(7): 83-84.
- [3] 范晓娟,朱红梅,韩士群,等.白腐菌对水葫芦木质纤维素的降解及对厌氧发酵的影响[J].江苏农业学报,2013,29(5): 1043-1050.
- [4] DANG P H, HU H N, WENSHAN G. A mini review on renewable sources for biofuel[J]. Bioresource Technology, 2014, 169: 742-749.
- [5] YOU J L, BOK K, BO H L, et al. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(2): 378-386.
- [6] DYK V J S, PLETSCHE B I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy[J]. Biotechnology Advances, 2012(30): 1458-1480.
- [7] KIM E S, LEE H J, BANG W G, et al. Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 102(5): 1342-1352.

- [8] HAN Y H, CHEN H Z. Synergism between hydrophobic proteins of corn stover and cellulase in lignocellulose hydrolysis[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 48(2): 218-224.
- [9] 覃益民,高进,刘幽燕,等. 一种来源于康氏木霉的纤维素酶增效蛋白的分离纯化[J]. 化工学报, 2011, 62(10): 2893-2897.
- [10] MARION M B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [11] EVELEIGH D E, MANDELS M, ANDREOTTI R, et al. Measurement of saccharifying cellulose[J]. Biotechnology for Biofuels, 2009, 2: 21.
- [12] SHEVCHENKO A, WILM M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained[J]. Analytical Biochemistry, 1996, 68(5): 850.
- [13] WOOD T M, MCCRAE S I. The cellulase of *Trichoderma koningi*. purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase[J]. Biochemical Journal, 1978, 171(1): 61-72.
- [14] 朱年青,夏文静,勇强. 里氏木霉纤维素酶的分离纯化及酶学性质[J]. 生物加工过程, 2010(3): 40-43.
- [15] 陈冠军,杜娟,庄蕾,等. 脱墨用棘孢曲霉 SM-L22 纤维素酶系中内切酶的纯化及性质[J]. 微生物学报, 2001(4): 469-475.

(责任编辑:袁伟)