

康氏木霉 C_1 酶的简捷提纯法及酶性质的研究

那 安 马建华 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

康氏木霉 (*Trichoderma Koningii*) 白色变异菌株 AS 3.4001 的粗酶制剂, 经 Sephadex G-75 凝胶过滤柱脱盐并除去大量杂蛋白, 然后通过 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析, 用 0—0.5M NaCl 梯度洗脱即得 C_1 酶纯品。全程序仅需二天时间。经聚丙烯酰胺凝胶电泳及 SDS 电泳鉴定均为单一带。此酶的分子量用 SDS 电泳及凝胶过滤法测定分别为 58,000 和 52,000, 用电聚焦测其等电点为 pH4.0。作用最适 pH 也为 4.0。此酶有较好的稳定性, 在酸性 pH (2.2)、碱性 pH (8.0) 及中性(水)中均能保持较长时间而不丧失活力。

C_1 酶是纤维素酶系中的主要酶, 在分解天然纤维素的过程中起主导作用。目前对 C_1 酶的性质了解还不够, 因此也影响对纤维素酶作用机制的完全了解。为了研究 C_1 酶, 首先必须获得酶的纯品。我所过去也曾做过 C_1 酶的分离纯化工作^[1], 但是程序比较繁琐(四步), 所耗时间也较长(一周以上), 不利于研究工作的开展。本文报道一个快速、简便的分离纯化 C_1 酶的方法和此酶性质的初步研究结果。

材 料 与 方 法

(一) 材料

1. 菌种及酶制剂: 菌种采用康氏木霉白色变异菌株 AS 3.4001, 按参考文献[2]的方法培养, 然后将菌的发酵液用 80% 饱和度硫酸铵沉淀, 离心除去上清液, 将沉淀物风干即得粗酶粉。

2. 试剂: Sephadex G-75 (粒度 40—120 微米), DEAE-Sephadex A-50 (粒度 40—120 μ), Sephadex G 100 (粒度 40—120 μ)。均为瑞典 Pharmacia 公司出品。Ampholin pH4—6, 瑞典 LKB 公司出品。丙烯酰胺, 天津市化学试剂一厂出品。甲叉双丙烯酰胺, 北京化工厂出品。

(二) 方法

1. 酶活力测定方法

(1) C_1 酶活力: 取 0.05 毫升待测液, 加入 0.5 毫升磷酸膨胀纤维素 (1 毫克/毫升 0.1M pH4.6 醋酸缓冲液中)。磷酸膨胀纤维素是按 Walseth^[3] 方法制备的。37℃ 保温 5 小时, 按 Somogyi 法^[4]测定还原糖。以在实验条件下水解出的还原糖在 660 毫微米的吸光度 (A) 表示 C_1 酶活力。

(2) C_x 酶活力: 取 0.05 毫升稀释 10 倍之待测液, 加入 0.5 毫升 0.5% CMC-Na (溶于 0.1M pH4.6 醋酸缓冲液中)。45℃ 保温 30 分钟, 用 Somogyi 法测定还原糖。以在实验条件下水解出的还原糖在 660 毫微米的吸光度 (A) 表示 C_x 酶的活力。

(3) β -葡萄糖苷酶活力: 取 0.05 毫升待测液, 加入 0.5 毫升 0.5% 的水杨苷 (溶于 0.1M pH4.6 醋酸缓冲液中)。45℃ 保温 30 分钟, 用 Somogyi 法测定还原糖。以在实验条件下水解出的还原糖在 660 毫微米的吸光度 (A) 表示 β -葡萄糖苷酶活力。

2. 凝胶电泳: 基本按 Davies 的方法, 具体条件见参考文献[1]。

3. 分子量的测定

(1) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 基本上按 Weber^[5] 的方法进行。

本文于 1980 年 3 月 17 日收到。

(2) 凝胶过滤测定分子量: 基本上按照 Whitaker^[6] 的方法进行。

4. 等电聚焦法测定 C_1 酶等电点: 基本按照 Vesterberg^[7] 的方法, 在瑞典 LKB 公司制造的等电聚焦仪上进行。

结 果

(一) 酶的提纯

1. Sephadex G-75 柱凝胶过滤: 称取 2.5 克粗酶粉, 溶在 20 毫升蒸馏水中, 4℃ 离心 (7500 转/分), 将离心上清液加到预先用 0.33M pH5.6 琥珀酸缓冲液平衡好的 Sephadex G-75 柱上 (2.5 × 55 厘米)。用同样的缓冲液洗脱, 主要的纤维素酶活力均包括在峰 I 中, 峰 II 带有少量 C_x 酶活力, 峰 III 则是大量没有纤维素酶活力的杂蛋白及色素。见图 1。

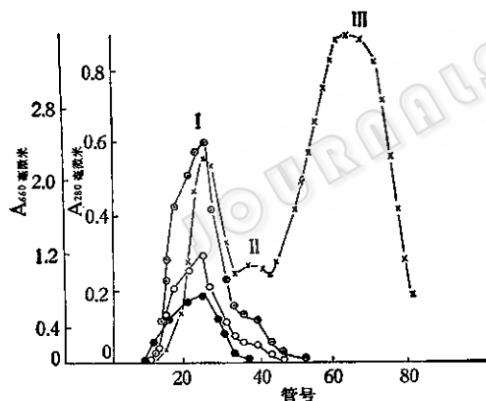


图1 C_1 酶在 Sephadex G-75 柱上的洗脱图

○—○ 为 C_1 酶活力, ○—○ 为 C_x 酶活力
●—● 为 β -葡萄糖苷酶活力 ×—× 为蛋白质在 280 毫微米的吸光度 层析温度: 7—10℃; 流速: 28 毫升/小时, 每管收集体积: 7 毫升。

2. DEAE-Sephadex A-50 柱离子交换层析

将 G-75 柱洗脱峰 I 合并, 共 60 毫升, 上到预先用 0.33M pH5.6 琥珀酸缓冲液平衡好的 DEAE-Sephadex A-50 柱上 (2.2 × 47 厘米)。先用起始缓冲液洗脱, 待

峰 I-1 流完之后, 改用 0—0.5M NaCl (配在 0.33M pH5.6 琥珀酸缓冲液中) 盐梯度洗脱, 峰 I-2 即为 C_1 酶纯品。结果见图 2。

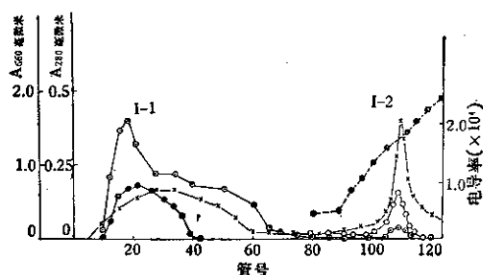


图2 C_1 酶在 DEAE-Sephadex A-50 柱上的洗脱图

○—○ 为 C_1 酶活力 ○—○ 为 C_x 酶活力
●—● 为 β -葡萄糖苷酶活力 ×—× 为蛋白质在 280 毫微米的吸光度 ●—● 盐梯度曲线 层析温度: 7—10℃ 流速: 20 毫升/小时。每管收集体积: 5 毫升。

3. C_1 酶在提纯过程中活力的变化及回收率见表 1。

(二) 纯度鉴定

1. 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 纯化的 C_1 酶用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一带。见图 3。

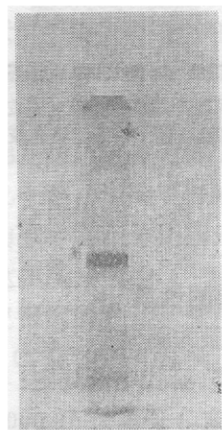


图3 C_1 酶聚丙烯酰胺凝胶电泳图

样品体积: 10 微升; 每管电流: 4 毫安 电泳时间: 2.5 小时 分离胶浓度: 7% 染色液: 0.05% 考玛氏亮蓝

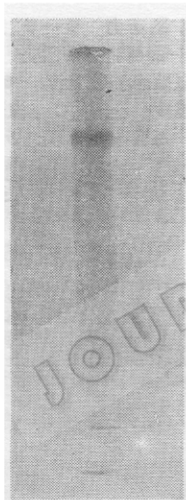
表 1 C_1 酶在纯化过程中活力变化及回收率

提 纯 步 骤	总蛋白* (毫克)	总活力** (A660 毫微米)	比 活 力 A660 毫微米/毫克	回 收 率 (%)
粗 酶	882	3040	3.4	100
Sephadex G-75	189.6	2016	10.6	66.3
DEAE-Sephadex A-50 峰 I-1 ($C_x + \beta$ -葡萄糖苷酶)	36	23.4	0.65	0.77
峰 I-2 (C_1 酶)	75.2	28.8	0.38	0.94
峰 I-1 + I-2***	111.2	1512	14	49.7

* 蛋白是用样品在 280 毫微米及 260 毫微米的光吸收通过公式 $(1.45 \times A_{280\text{毫微米}} - 0.74 \times A_{260\text{毫微米}})$ 计算所得结果。

** 活力数据均为以 5 毫克脱脂棉为底物,加 0.5 毫升适当稀释的酶液与 2 毫升 pH4.6, 0.1M 醋酸缓冲液, 37℃ 保温 24 小时,取 1 毫升保温液用 Somogyi 法定糖,在 660 毫微米比色的结果。

*** 纤维素酶作用天然纤维素是酶系中各组分协同作用的结果,故纯化的 C_1 酶单独作用棉花的能力很低,必须与 C_x 酶、 β -葡萄糖苷酶一起测定对棉花的作用能力。具体测定方法为,取 DEAE-Sephadex 柱下柱液峰 I 合并液与峰 II 合并液各 0.25 毫升,适当稀释后用同上方方法测定。

图 4 C_1 酶 SDS 电泳图

样品体积: 25 微升,每管电流: 8 毫安 电泳时间:
4 小时,分离胶浓度: 10% 染色液: 0.1 考玛氏
亮蓝

2. SDS 电泳: 纯化的 C_1 酶用 SDS 电泳鉴定为单一带。见图 4。

(三) 酶的性质

1. 分子量的测定

(1) SDS 凝胶电泳测定: C_1 酶用 SDS 凝胶电泳测定分子量为 58,000。见图 5。

2. Sephadex G-100 凝胶过滤柱测定: C_1 酶用 Sephadex G-100 柱测定分子量为 52000。见图 6。

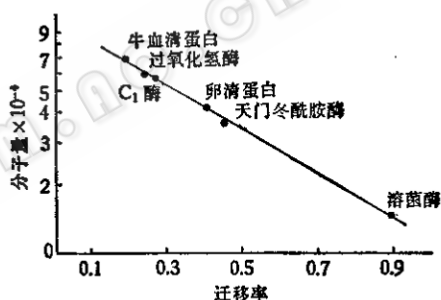


图 5 几种标准蛋白的电泳迁移率与其分子量的关系图
图中蛋白质的分子量如下: 牛血清蛋白 70,000、过氧化氢酶 60,000、卵清蛋白 43,000、天门冬酰胺酶 37,000、溶菌酶 14,500。

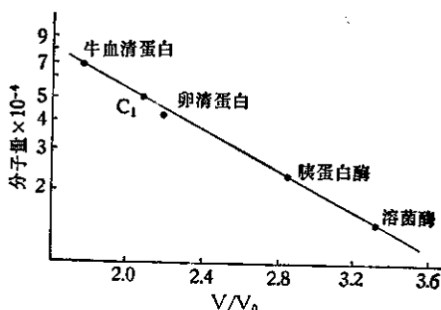


图 6 几种标准蛋白的 V/V_0 与其分子量的关系
柱体积: 1.8×61 厘米, 蛋白浓度: 2 毫克/毫升, 上柱样品体积: 1 毫升。图中蛋白质分子量如下: 牛血清蛋白 70,000, 卵清蛋白 43,000, 胃蛋白酶 35,000, 胰蛋白酶 23,500, 溶菌酶 14,500。

表 2 C_1 酶的 pH 稳定性

* A_{600} 毫微米 条 件	时间 (小时)											
	8	12	24	48	72	96	120	144	192	240	360	408
pH2.2	0.64	0.53	0.58	0.59	0.66	0.61	0.58	0.61	0.62	0.51	0.50	0.52
pH8.0	0.68	0.51	0.56	0.64	0.61	0.61	0.54	0.63	0.69	0.60	0.60	0.54
水	0.63	0.64	0.57	0.64	0.50	0.69	0.62	0.64	0.64	0.55	0.55	0.49

* 测定方法为取三份 0.5 毫升 C_1 酶, 分别加入 0.5 毫升水、pH2.2 以及 pH8.0 的缓冲液 (0.1M 柠檬酸—0.2M Na_2HPO_4 系统)。各自在 7℃ 冰箱放置 8、12、24、48、72... 小时之后, 取出 0.025 毫升混合液, 加入 0.5 毫升 pH4.0 的同样缓冲液及 0.5 毫升磷酸膨胀纤维素 37℃ 保温 5 小时, 比较它们的活力变化。

2. 等电点: C_1 酶的等电点用等电聚焦仪测定为 pH4.0。

3. 最适作用 pH: C_1 酶的作用最适 pH 为 4.0。见图 7。

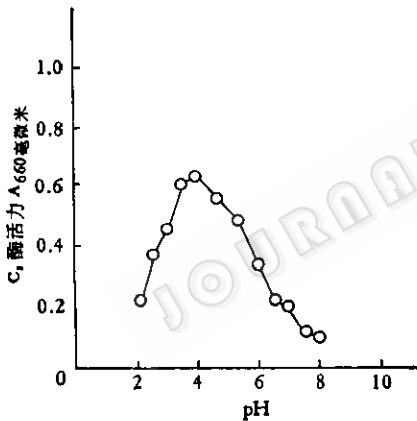


图 7 C_1 酶作用 pH 示意图

图中数据为取 0.025 毫升 C_1 酶液加入 0.5 毫升磷酸膨胀纤维素, 1 毫升不同 pH 的缓冲液 (0.1M 柠檬酸—0.2M Na_2HPO_4 缓冲系统), 保温 5 小时用 Somogyi 法测定还原糖所得结果。

4. C_1 酶的 pH 稳定性: C_1 酶在酸性 (pH2.2)、碱性 (pH8.0) 及蒸馏水中可以保持长时间而几乎不丧失活性。见表 2。

讨 论

我们通过简单的两步纯化方法, 从康氏木霉的纤维素酶系中提纯了 C_1 酶。第一步通过 Sephadex G-75 柱凝胶过滤, 有效

地除去了大量低分子量的杂质。第二步通过 DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱, 在所用的条件下, 选择性地吸附了 C_1 酶, 然后通过氯化钠梯度洗脱使其很容易从柱上洗脱下来。即得到纯化的 C_1 酶。所用的两步中采用同样离子性质、pH、离子强度的缓冲液系统 (0.33M pH5.6 琥珀酸-NaOH 缓冲液), 避免了在柱层析过程中经常需要的透析、冷冻干燥、调正 pH 或调正离子强度等步骤, 不仅操作较为简便, 而且收率也较高。一次上柱 2.5 克粗酶粉 (含 882 毫克蛋白), 即可得 75.2 毫克 C_1 酶。

此纯化的 C_1 酶对 CMC 也有微弱的分解活力。但是对 β -葡萄糖苷酶不作用, 其单独作用于天然纤维素棉花的能力很微弱。但是当它与 DEAE-Sephadex A-50 下柱的峰 1 (即 C_x 和 β -葡萄糖苷酶活力部分) 协同作用于棉花时, 其作用能力比单独作用时可提高几十倍, 说明了纤维素酶作用于纤维素是酶系中各组分协同作用的结果。

我们这里所报道的 C_1 酶分离纯化方法与国外已报道的方法^[8-12] 相比都更为简便, 从而为 C_1 酶的研究提供了更有利的条件。

参 考 文 献

[1] 中国科学院微生物研究所纤维素酶组: 微生物学报, 16(3):240—248, 1976。

- [2] 中国科学院微生物研究所纤维素酶组: 微生物学通报, 6(3):16—21, 1979.
- [3] Walseth, C. S.: *Technical association of the pulp and paper industry*, 35: 288, 1952.
- [4] Somogyi, M. J.: *Biol. Chem.*, 195: 19, 1952.
- [5] Weber, K. J.: *Biol. Chem.*, 244: 4406, 1969.
- [6] Whitaker, J. R.: *Anal. Chem.*, 35: 1950, 1963.
- [7] Vesterberg, O.: *Isoelectric Focusing of Protein, Methods in Enzymology* (ed. by William, B. J.), Vol. 22, Academic press, New York and London, 1971, p. 389.
- [8] Wood, T. M. and S. I. McCrae: *Biochem. J.*, 128: 1183, 1972.
- [9] Wood, T. M. and S. I. McCrae: *Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, Bailey, M., Enari, T.-M., Linko, M., Eds.; The Finnish National Fund for Research and Development (SITRA): Helsinki, 1975, p. 231.
- [10] Berghem, E. R. and G. Pettersson: *Eur. J. Biochem.*, 37: 21, 1973.
- [11] Tomita, Y. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 52: 233, 1974.
- [12] Halliwell, G. and M. Griffin, *Biochem. J.*, 135: 587, 1973.

PURIFICATION OF THE CELLULASE C₁ FROM *TRICHODERMA KONINGII* BY A SIMPLIFIED METHOD AND SOME PROPERTIES OF THE ENZYME

Na An Ma Jianhua Zhang Shuzheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica Beijing*)

The C₁ component of cellulase was isolated and purified from the crude extract of *Trichoderma koningii* (a white mutant strain AS. 3.4001) by gel filtration on Sephadex G-75 and ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50, eluted with 0.5 M NaCl salt gradient. The whole process needed only two days.

Purified C₁ enzyme showed a single band on both polyacrylamide gel Disc

electrophoresis and SDS electrophoresis. Its molecular weight was 58,000 and 52,000 as measured by SDS electrophoresis and gel filtration respectively. The isoelectric point was 4.0 and the optimum pH was 4.0.

The enzyme possessed relatively high stability as no activity loss was observed after being kept for a long time in acidic (pH 2.2), basic (pH 8.0) and water solution.