

脱墨用棘孢曲霉 SM-L22 纤维素酶系中内切酶的纯化及性质*

陈冠军 杜娟 庄蕾 高培基

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要:通过 Bio-Gel P-60 分子筛和 DEAE-与 Q-sepharose 离子交换层析等手段,分离纯化了棘孢曲霉 SM-L22 纤维素酶系中五种内切酶组分 EG II-1、EG II-2、EG III-1、EG III-2 和 EG IV,并且对这五种内切酶组分的基本性质进行了研究。通过 SDS-PAGE 和 IEF 电泳测得其分子量分别为 38.7、34.4、31.4、36.9 和 23.7kD,等电点分别为 $\text{pH} < 3.5$ 、 < 3.5 、4.9、4.5 和 5.0。5 个酶组分均属酸性纤维素酶,最适 pH 在 3.5~4.0 之间;最适温度分别为 55℃、60℃、(60~70)℃、(60~70)℃ 和 60℃。各酶组分有较宽的 pH 稳定性;温度稳定性表现为 $\text{EG II-1} > \text{EG II-2} > \text{EG III-1} > \text{EG III-2} > \text{EG IV}$ 。EG II-1 和 EG II-2 有较高的底物专一性,而 EG III-1、EG III-2 和 EG IV 对木聚糖有交叉活性。 Fe^{2+} 对除 EG IV 以外的四种酶组分都有激活作用,尤其是对 EG III-2 有强烈的激活作用。动力学分析表明各纤维素酶组分对底物亲和力的大小与酶的催化率之间并无相关性。

关键词:棘孢曲霉,内切葡萄糖苷酶,分离纯化,酶学性质

中图分类号:Q55 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 04-0469-06

近年来发展起来的酶法脱墨工艺由于其对废纸适应性强,对环境污染少等特点,越来越得到人们的重视。酶法脱墨除少数使用果胶酶^[1]、漆酶^[1]、淀粉酶^[2]和半纤维素酶^[3]外,大都使用纤维素酶^[3-6]。根据国内外已有的纤维素酶用于脱墨的报道可知,无论是初始纤维还是二次纤维,纤维素酶的处理都会改善纸浆的滤水性能^[7]。内切酶活性的存在是提高二次纤维滤水性能的先决条件^[8]。山东轻工业学院秦梦华等人^[9]通过对不同纤维素酶对废新闻纸脱墨性能和物理性能的影响比较表明,内切酶活性的存在是提高脱墨浆白度和改善纸浆滤水性能的主要原因,内切酶和外切酶的协同作用,可不同程度地促进这种作用。但若外切酶活性较高则会降低纸浆的强度。

由山东大学微生物系筛选得到一株棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)SM-L22,所产纤维素酶具有外切酶活很低,而内切酶活较高的特点,符合酶法脱墨的基本要求(CMC/FPAase 的值越大越好)。为了探讨纤维素酶的脱墨机理,使这一技术更好地应用于工业大生产,我们对其主要的内切酶组分进行了分离纯化,并研究了其基本酶学性质。

1 材料和方法

1.1 菌株

棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)SM-122,由山东大学微生物系筛选所得。

* 国家自然科学基金(30070180)与山东大学微生物技术国家重点实验室开放项目资助

作者简介:陈冠军(1957-),男,山东滕州市人,山东大学生命学院与微生物技术国家重点实验室教授,博士,1984 年曾赴美国犹他州立大学研修,现主要从事微生物生理生化与酶学的研究。

收稿日期:2000-09-01, **修回日期:**2000-11-01

1.2 主要试剂

Bio-Gel P-60, Bio-Rad 公司生产; DEAE-Sepharose Fast Flow 和 Q-Sepharose Fast Flow 由 Pharmacia 公司生产; 羧甲基纤维素钠(CMC)和燕麦木聚糖, Sigma 公司生产; 水杨素(D(-)-Salicin), Fluka 进口分装; 纤维素粉 CF-11 和 Whatman No.1 滤纸, 由 Whatman 公司生产。

1.3 内切酶的分离纯化

1.3.1 粗酶液的预处理: 棘孢曲霉 SM-L22 固体发酵成熟后, 以 1:20 的比例加入蒸馏水浸泡提取, 过滤, 滤液经 6000r/min 离心 20min, 上清液用 5000NMWL 的聚醚砜超滤膜(Millipore 公司生产)超滤浓缩 20 倍即为分子筛柱层析上样样品。

1.3.2 分子筛柱层析: 聚丙烯酰胺凝胶 Bio-Gel P-60 充分溶胀, 装柱($\Phi 1.6\text{cm} \times 90\text{cm}$), 用 0.02mol/L, pH7.0 磷酸缓冲液平衡, 上样量为 2.0mL, 流速 0.2mL/min, 每 20min 收集一管。

1.3.3 离子交换柱层析: 将弱阴离子琼脂糖凝胶 DEAE-Sepharose Fast Flow 或强阴离子琼脂糖凝胶 Q-Sepharose Fast Flow 装柱($\Phi 1.0\text{cm} \times 10\text{cm}$), 用不同 pH 的缓冲液(DEAE-Sepharose Fast Flow 用 0.02mol/L, pH7.0 磷酸缓冲液; Q-Sepharose Fast Flow 用 0.025mol/L, pH9.0 Tris-HCl 缓冲液), 充分平衡后上样。用 0.5mol/L NaCl 线性梯度洗脱, 收集活性蛋白峰。

1.4 分析方法

1.4.1 纤维素酶内切酶(CMC 酶)活力测定^[10]: 以 1.0mL 用 0.04mol/L, pH4.8 的醋酸缓冲液配制的 1% 羧甲基纤维素钠溶液作底物, 再加入 1.0mL 适当稀释的酶液, 50℃ 反应 15min, 用 DNS 法测定还原糖。

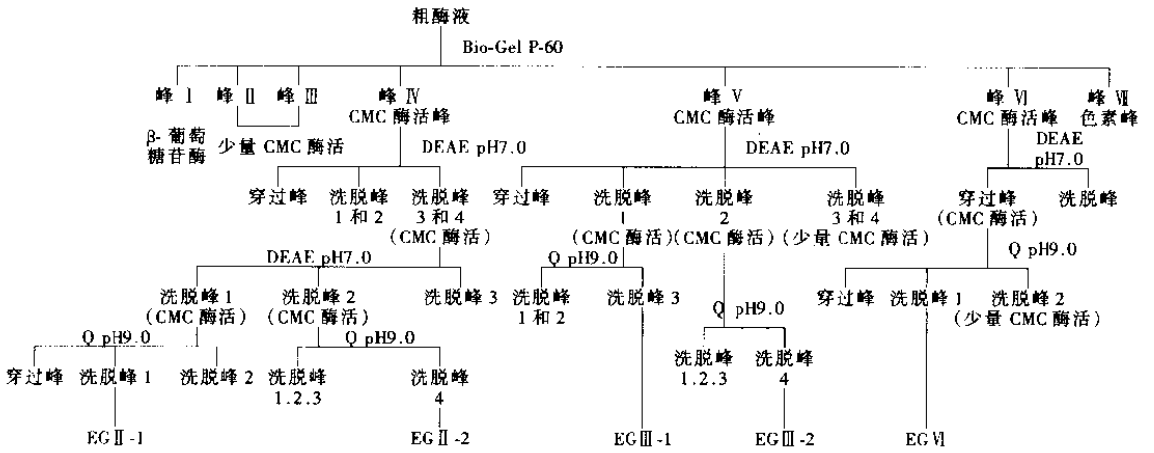
1.4.2 SDS-PAGE: 参照文献[11], 分离胶浓度为 10%, 标准蛋白为 GIBICO 公司生产。

1.4.3 IEF 电泳: 参照文献[12], 预制等电聚焦凝胶板和等电点标准蛋白(pI 范围 3.5 ~ 10.0)均购自 Pharmacia 公司。

2 结果和讨论

2.1 纤维素酶系中内切酶的系列分离纯化

分离纯化程序如下:



(注: DEAE 代表 DEAE-Sepharose 离子交换层析; Q 代表 Q-Sepharose 离子交换层析)

在分子筛层析过程中共得到 6 个蛋白峰, 其中峰 IV、峰 V 和峰 VI 为主要的 CMC 酶活

力蛋白峰,将这 3 个活力蛋白峰进行多次离子交换层析后,共得到 5 个纤维素酶内切酶 (CMC 酶)组分,即 EG II -1、EG II -2、E III -1、EG III -2 和 EG IV。

2.2 酶的基本性质

2.2.1 分子量和等电点测定:对以上分离纯化的内切酶各组分样品进行电泳分析表明,在 SDS-PAGE 和 IEF 胶上均形成单一蛋白带(图 1),说明各组分已达电泳纯。经与标准蛋白的比较与计算,各组分的分子量、等电点如表 1。

表 1 内切酶各组分的分子量和等电点

Table 1 The molecular weight and isoelectric points of the components of endoglucanases					
Components	EGII-1	EGII-2	EGIII-1	EGIII-2	EGIV
Property					
Molecular weight/kD	38.7	34.4	31.4	36.9	23.7
Isoelectric points/pI	<3.5	<3.5	4.9	4.4	5.0

2.2.2 pH 对酶活性的影响:在 pH2.5~8.0 的范围内,测定各酶组分在不同 pH 条件下对 CMC 的水解活力。同时将酶液在不同 pH 的 0.05mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 大于 8.0 的缓冲液由甘氨酸-NaOH 配制)中室温保存 24h,调回 pH 至 4.8 后检测残存酶活力,测定其 pH 的稳定范围。最适 pH 测定结果见图 2,EG II -1、EG II -2、EG III -1、EG III -2 和 EG IV 的最适 pH 分别为 3.5、4.0、4.0、3.5~4.0,和 4.0,由此可知棘孢曲霉的纤维素酶系中的主要内切纤维素酶组分均为酸性纤维素酶。图 3 显示各酶组分的 pH 稳定性是不相同的,若以相对酶活力保持在 80% 以上作为酶的 pH 稳定范围,则 5 个组分的 pH 稳定范围分别为 2.5~9.0、4.0~9.0、2.5~9.0、2.5~8.0 和 2.5~7.0。

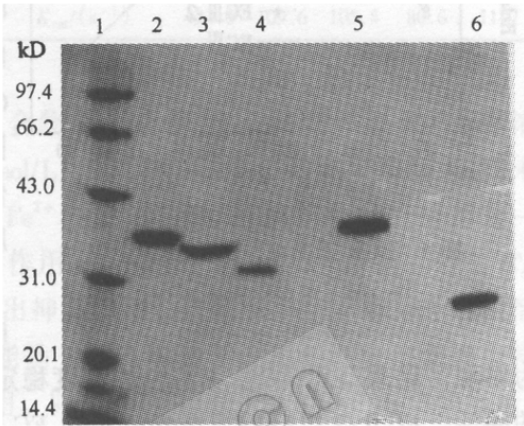


图 1 各内切酶组分的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 The SDS-PAGE of the components of endoglucanases 1:Protein marker;2~6: components of endoglucanases EG II -1、EG II -2、EG III -1、EG III -2、EG IV .

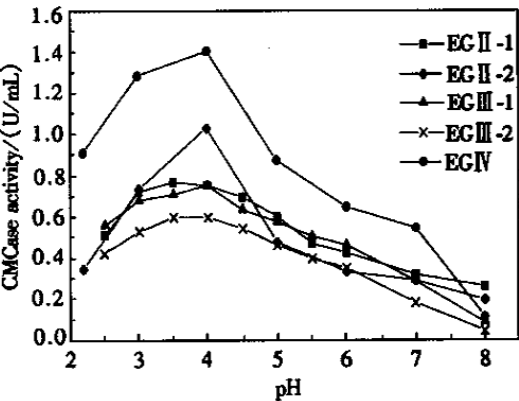


图 2 pH 对各内切酶组分活性的影响
Fig.2 The optimal pH for the activities of the CMCcase components

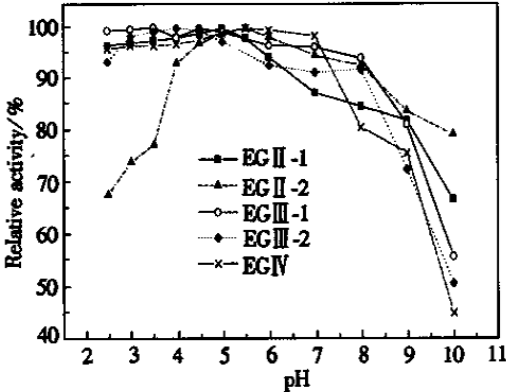


图 3 各内切酶组分的 pH 稳定性
Fig.3 The pH stabilities of CMCcase components

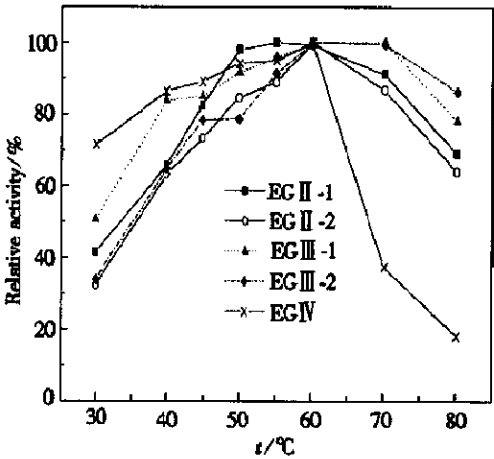


图 4 反应温度对各酶组分的影响

Fig.4 The effects of temperature on the activities of CMCase components

2.2.3 温度对酶活性的影响:在 30℃~85℃范围内,测定各酶组分对 CMC 的水解活力。图 4 显示了各酶组分的最适酶活反应温度。EG II-1 的最适反应温度为 55℃;EG II-2 的最适反应温度为 60℃;EG III-1 与 EG III-2 在 60℃~70℃范围内达到最大反应速度,并且在 40℃~80℃范围内一直保持较高的反应速度(约 80% 的最大反应速度);EG IV 的反应最适温度为 60℃,但其温度曲线与其他四种内切酶组分不同的是其在较低的温度下保持较高的反应活性,而在高于 60℃时,随温度升高酶反应速度急剧下降。

将酶液分别在 40℃、50℃和 60℃保温不同

时间后测定残存活力,以冰箱 4℃保存的酶液作

为对照。结果显示 EG II-1 组分的温度稳定性最好,在 60℃保温 8h 以后仍然保存了 80% 的酶活。EG II-2 组分的温度稳定性比 EG II-1 组分略低,在 50℃和 60℃时保温 8h 后,分别下降至原酶活的 70%和 60%。EG III-1 和 EG III-2 两组分在低于 50℃时是稳定的,在 60℃保温 8h 后,仅保留 20%左右的酶活。EG IV 组分仅在低于 40℃时才稳定,在 50℃和 60℃保温 8h 后仅保留原有酶活的 30%和不到 10%。从总的情况看,各酶组分的温度稳定性表现为 EG II-1>EG II-2>EG III-1>EG III-2>EG IV。

2.2.4 底物专一性:将不同底物用 0.05mol/L,pH4.8 的醋酸缓冲液配制成 1% 的浓度,测定各酶组分对这些底物的作用(表 2)。EG II-1 和 EG II-2 这两个内切酶组分只对像 CMC-Na 和磷酸膨胀纤维素这样的两种无定型纤维素底物有作用,专一性较强。而内切酶 EG III-1、EG III-2 和 EG IV 除对 CMC-Na 和磷酸膨胀纤维素有作用外,对滤纸也有微弱作用,对木聚糖也有交叉作用,专一性不是很强。

表 2 各内切酶组分的底物专一性

Table 2 The Substrate specificities of various endoglucanases components

Substrates	EG II-1 /(IU/mg)	EG II-2 /(IU/mg)	EG III-1 /(IU/mg)	EG III-2 /(IU/mg)	EG IV /(IU/mg)
Filter paper	0	0.0	0.59	0.33	0.05
CMC-Na	51.2	19.5	15.2	4.7	2.18
PS-CF	21.2	8.74	5.95	2.3	1.56
Contton	0	0	0	0	0
Avicel	0	0	0	0	0
Xylan	0	0	25.2	10.9	1.18
Salicin	0	0	0	0	0

2.2.5 各内切酶组分的动力学性质:参照文献[13],用 0.4%~2% 的 CMC-Na 做底物测定对酶反应的影响,按照 Lineweaver-Burk 作图法,求得酶动力学常数 K_m 、 V_{max} 和 K_{cat} 值,测定结果见表 3,五种内切酶对底物 CMC-Na 的 K_m 值都较高。从 K_m 值和 K_{cat} 值的比较来看,对底物

亲和力大小与酶的催化效率之间并无相关性。如 EGIV 的 K_m 值比 EG II -1 的低,说明其对底物的亲和性比 EG II -1 大小,但其催化效率却大大低于 EG II -1(相差 36 倍),甚至比亲和力最小的 EG III -2 还要低许多。对可溶性底物作用能力的不同,也反映出这些组分在对不溶性底物的降解中起着不同的作用。

2.2.6 不同化合物对酶活力的影响:将各种化合物与酶液混合(金属离子和 EDTA 终浓度为 1.0mmol/L,SDS 为 10mmol/L,尿素为 1.0mmol/L),50℃保温 15min 后测定酶活力,以未加化合物的酶活力为 100%,实验结果见表 4。 Fe^{2+} 对除 EG IV 以外的四种酶组分都有一定的激活作用,尤其是对 EG III -2 有强烈的激活作用,可使酶活提高 120% 以上。但 EDTA 除对 EG IV 有弱的抑制外,并不对其它组分表现出抑制作用。这说明 Fe^{2+} 对酶分子的激活并不是由于 Fe^{2+} 参与酶分子的活性部位,而可能是 Fe^{2+} 与酶分子表面的结合引起表面构像的变化,更有利于酶分子与底物的结合与作用。同时 EG III -2 还受 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 的激活。此外, Ca^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对不同的酶组分表现出不同的抑制作用;SDS 对所有的酶组分都有明显的抑制作用。

表 4 金属离子及部分化合物对各内切酶活力的影响

Table 4 Effects of various metallic ions and some chemicals on activities of various endoglucanases components

Enzyme components		EG II -1	EG II -2	EG III -1	EG III -2	EG IV
Chemicals						
Control		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
ZnCl ₂		98.2	97.5	102.6	104.6	88.2
BaCl ₂		93.3	105.6	94.9	105.1	93.3
CaCl ₂		74.1	107.6	83.1	103.8	102.4
CuSO ₄		92.2	108.1	97.0	139.5	102.4
PbAc ₂		86.1	63.6	85	100	90.7
FeSO ₄		119.5	160.2	154.3	226.6	100.6
MgSO ₄		68.9	87.9	92.1	108.1	87.8
MnSO ₄		109.0	75.7	104.3	119.9	95.7
EDTA		100.0	100.0	100.0	100.0	84.1
Urea		89.8	89.4	89.7	102.7	84.1
SDS		49.4	56.8	66.4	48.1	55.6

参 考 文 献

[1] Putz H J, Remer K, Göttsching L, et al. Enzymatic deinking in comparison with conventional of offset news. 1994 Tappi Pulping conference. Atlanta: Tappi Press, 1994. 877 ~ 884.

[2] Zollner H K, Schroeder L R. *Tappi J*, 1998, 81(3): 166 ~ 170.

[3] Gitebitz G M, Mansfield S D, Boehm B, et al. *J Biotechnol*, 1998, 65(2 ~ 3): 209 ~ 215.

[4] Jeffries T W, Klungness J H, Sykes M S, et al. *Tappi J*, 1994, 77(4): 173 ~ 179.

[5] Gitebitz G M, Mansfield S D, Boehm B, et al. *J Biotechnol*, 1998, 65(2 ~ 3): 209 ~ 215.

[6] Park J W, Park K N. *Biotechnol. Technol*, 1999, 13: 49 ~ 53.

- [7] Jackson L S, Heitmann J A, Joyce T W. *Tappi J*, 1993, 76(3): 147 ~ 154.
- [8] Mansfield S D, Dejong E, Stephens R S, *et al.* *J Biotechnol*, 1997, 57: 205 ~ 216.
- [9] 秦梦华, 高培基, 邵志勇, 等. 中国造纸, 2000, 4: 7 ~ 13.
- [10] Wood T M, Mahalingeshwara K, *Methods in Enzymology*, 1989, 160: 87 ~ 112.
- [11] 李建武, 萧能惠, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法, 第一版. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [12] Benkerroum N, Chouati Y, Sandine W E, *et al.* *Appl Microbiol*, 1993, 17(2): 78 ~ 81.
- [14] 孙志贤, 汲言山, 王启升, 等. 现代生物化学理论和研究技术, 北京: 军事医学科学出版社, 1997.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF ENDOGLUCANASES FROM *ASPERGILLUS ACULEATUS* SM-L22 *

Chen Guanjun Du Juan Zhuang Lei Gao Peiji

(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250010, China)

Abstract: The five endoglucanases (CMCase) components from *Aspergillus aculeatus* SM-L22 were separated and purified by exclusion chromatography and ion-exchange chromatography. Five components (EG II -1, EG II -2, EG III -1, EG III -2 and EG IV) had molecular weights of 38.7, 34.4, 31.4, 36.9 and 23.7 kD by SDS-PAGE, respectively, and IEF showed their pI were pH < 3.5, < 3.5, 4.9, 4.4 and 5.0, respectively. All of them have maximum reactive activities at pH 3.5 ~ 4.0; and the optimum temperatures were 55 °C, 60 °C, 60 °C ~ 70 °C, 60 °C ~ 70 °C and 60 °C, respectively. EG II -1 and EG II -2 can only act such morphological substrates as CMC or phosphated cellulose, but EG III -1, EG III -2 and EG IV can active xylan also. The activities of all components were stimulated by Fe^{2+} except EG IV, EG III -2 was activated mostly by Fe^{2+} . The kinetics' showed that there were no relatives between the affectivity of cellulases and its K_m .

Key words: *Aspergillus aculeatus*, Endoglucanases, Purification, Enzymatic properties

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(30070180)