

嗜热毛壳菌内切 β -葡聚糖酶的分离纯化及特性*

路 梅 李多川** 张成省

(山东农业大学环境生物系 泰安 271018)

摘 要 探讨了液体发酵嗜热毛壳菌(*Chaetomium thermophile*)产生的内切 β -葡聚糖酶的分离纯化及特性。粗酶液经硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子层析、Phenyl-Sepharose 疏水层析、Sephacryl S-100 分子筛层析等步骤便可获得凝胶电泳均一的内切 β -葡聚糖酶。经 12.5% SDS-PAGE 和凝胶过滤层析法分别测得所分离纯化酶蛋白的分子量约为 67.8kD 和 69.8kD。该酶反应的最适温度和 pH 分别为 60℃ 和 4.0~4.5 在 pH5.0 条件下,该酶在 60℃ 下稳定,70℃ 保温 1h 后,仍保留 30% 的活性,在 80℃ 的半衰期为 25min。金属离子对内切 β -葡聚糖酶的活性影响较大,其中 Na^+ 对酶有激活作用; Fe^{2+} 、 Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 等对酶有抑制作用。该酶对结晶纤维素没有水解能力。

关键词 嗜热真菌,嗜热毛壳菌,内切 β -葡聚糖酶,纯化与性质

中图分类号:Q555 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)04-0471-06

纤维素酶是一组能降解纤维素的酶的总称。其中内切 β -葡聚糖酶(endo-1,4- β -D-glucanase, EC 3.2.1.4)随机作用于纤维素分子的葡萄糖苷键,产生大量非还原末端的小分子纤维素,在纤维素的分解过程中起重要的作用^[1~3]。该酶广泛存在于各种微生物中,如细菌、真菌、放线菌^[4,5]等,此外,在动物中也发现该酶的存在^[6]。但到目前为止,对该酶的研究仍多以中温好气性木霉(*Trichoderma*)为主。但木霉具有产酶慢,酶系比活力不高等缺点。因此,为了提高纤维素酶的产率和加速对纤维素酶降解纤维素机制的研究,一些极端条件下高活性的纤维素分解菌已逐步引起科研工作者的重视,尤其是对嗜热真菌(thermophilic fungi)的研究。嗜热真菌具有产酶快而且量大、分解纤维素效率高等特性,是一类非常具有开发潜力的纤维素分解菌。研究发现嗜热真菌 *Sporotrichum thermophile* 降解纤维素的速度是常温真菌(mesophilic fungi) *Trichoderma reesei* 的 5 倍^[7]。

嗜热毛壳菌(*C. thermophile*)是一种土壤腐生菌,分布很广。该菌的最适生长温度为 45℃~55℃,而绝大多数的真核生物若长期暴露在 40℃~45℃ 下将不能存活^[8]。以前,人们主要研究其在分解腐机质、堆肥及生防中的作用,对 *C. thermophile* 产生的纤维素酶的分离纯化研究不多。本研究探讨了从中国分离到的嗜热毛壳菌内切 β -葡聚糖酶的分离纯化和性质。

1 材料和方法

1.1 菌种、培养基及培养条件

1.1.1 菌种 嗜热毛壳菌(*C. thermophile*)由本实验室分离得到。

* 国家自然科学基金(30170013)资助

** 通信人,Email: lldc20@sdau.edu.cn

作者简介 路梅(1976-)女,山东日照人,在读硕士研究生,主要从事嗜热真菌的研究。

收稿日期 2001-08-04,修回日期 2001-12-15 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.1.2 培养基 固体培养基: YpSs 琼脂培养基^[9]和 PDA 培养基。液体培养基(由本实验室获得最佳配方): 1000mL 培养基含: 20g 微晶纤维素; 10g 淀粉; 4g 酵母; 750mL 蒸馏水; 250mL 自来水; Vogel's 微量元素 0.1mL。用浓盐酸调 pH 到 6.0, 103.5kPa 下灭菌 20min。

1.1.3 培养条件 将菌种接种到含固体培养基 PDA 的培养皿中, 50℃ 培养 2.5d 后, 取 30 块直径 1cm 的菌块接种到含 50mL 液体培养基的 250mL 摇瓶中, 共 20 瓶。在水浴恒温摇床(120r/min, 50℃)上培养 7d 后, 过滤, 5000r/min 离心 10min, 上清液即为粗酶液。

1.2 酶活性测定

酶活性测定基本采用 Ghose 法^[10]。将 0.2mL 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液、0.1mL 适当稀释的酶液、0.1mL 0.4mol/L pH5.0 醋酸缓冲液混合后, 50℃ 下保温 30min, 用 DNS 法测产生的还原糖。一个酶活力单位(U)定义为每分钟水解纤维素产生 1 μ mol 葡萄糖所需酶蛋白量。

1.3 酶的分离纯化

将提取的粗酶液用 70% 饱和硫酸铵沉淀 3h 后, 5000r/min 离心 10min, 收集沉淀, 用适量的缓冲液 A (50mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH8.0) 溶解, 并在相同缓冲液中透析 24h, 8000r/min 离心 30min, 取上清液。将上清液施于经缓冲液 A 平衡的 DEAE-Sepharose 柱 (1.0cm \times 20cm, 凝胶为 Pharmacia 产品) 酶蛋白先用 5 倍床体积的缓冲液 A 洗脱至 A_{280} 不变后, 再用 100mL 缓冲液 A 和 100mL 含 0.3mol/L NaCl 的相同缓冲液进行线性梯度洗脱, 流速为 2.4mL/min, 2.5min 收集 1 管。将收集酶液加固体硫酸铵至饱和度为 50% 后, 立即施于经含 50% 饱和硫酸铵的缓冲液 A 平衡的 Phenyl-Sepharose 疏水柱 (1.0cm \times 20cm, 凝胶为 Pharmacia 产品) 进行疏水层析, 酶蛋白先用 5 倍床体积的含 50% 饱和硫酸铵的缓冲液 A 洗脱至 A_{280} 不变, 再用 100mL 含 50% 饱和硫酸铵的缓冲液 A 和 100mL 不含硫酸铵的同一缓冲液进行梯度洗脱, 最后有 200mL 缓冲液 A 洗脱, 流速为 2.5mL/min, 2min 收集 1 管。收集具酶活性部分酶液, 并浓缩至 2mL, 进行 Sephacryl S-100 分子筛层析 (1.0cm \times 100cm, 凝胶为 Pharmacia 产品), 用缓冲液 A 洗脱, 流速为 0.3mL/min, 4min 收集 1 管, 对收集的活性部分酶液用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳确认纯度。

1.4 蛋白质分子量测定

采用 12.5% SDS-PAGE 和凝胶过滤层析法^[11], 标准蛋白为 Pharmacia 生产的小分子量标准蛋白。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中蛋白质用考马斯亮蓝 R-250 染色; 凝胶过滤层析采用 Sephacryl S-100。

1.5 糖染色

采用过碱酸-Schiff 试剂染色^[12]。

1.6 蛋白质含量测定

蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[13], 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

2 结果

2.1 酶的纯化及鉴定

2.1.1 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析 850mL 粗酶液经 70% 硫酸铵沉淀、透析后得到 50mL 酶液, 进行 DEAE-Sepharose 层析, 结果如图 1 所示。共有 4 个蛋白峰, 其中前

3 个峰均有内切 β -葡聚糖酶活性,但峰 I-1 为杂蛋白峰,峰 I-3 酶的活性较低,故对峰 I-2 进行进一步的纯化(约 65mL)。

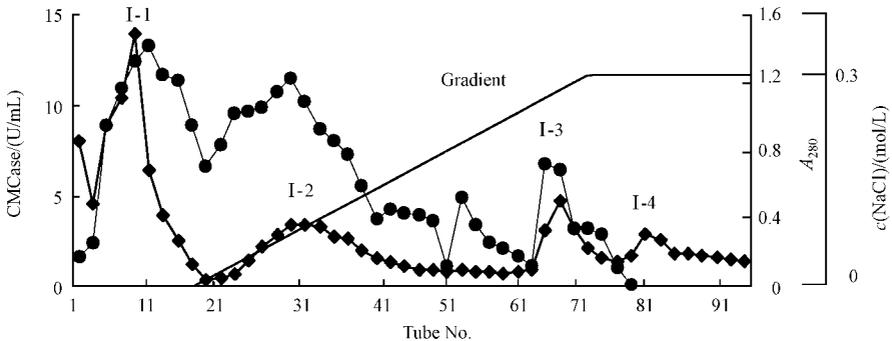


图 1 DEAE-Sephacose Fast Flow 层析图谱

Fig.1 Chromatography of endocellulase on DEAE-Sephacose Fast Flow

(◆) A_{280} (●) CMCase.

2.1.2 Phenyl-Sephacose 层析 经 Phenyl-Sephacose 层析后,得 3 个蛋白峰,如图 2 所示。峰 II-1 和 II-3 的洗脱液不具酶活性,收集峰 II-2 中含酶活性部分酶液(约 40mL),进一步纯化。

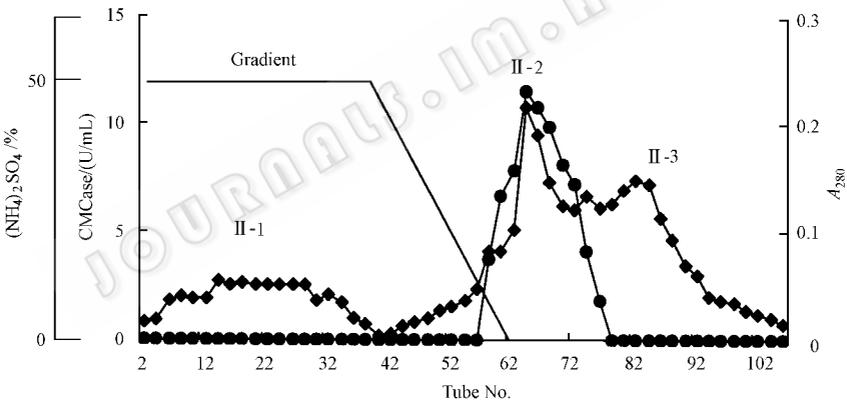


图 2 Phenyl-Sephacose 层析图谱

Fig.2 Chromatography of endocellulase on Phenyl-Sephacose Fast Flow

(◆) A_{280} (●) CMCase.

表 1 *C. thermophile* 内切 β -葡聚糖酶的纯化

Table 1 Purification of endocellulase from *C. thermophile*

Step	Total volume /mL	Total protein /mg	SA (U/mg)	Total activity /U	Yield /%	Purification folds
Crude extract	850.00	609.45	5.33	3248.37	100.00	1.00
70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50.00	45.25	12.64	568.80	17.51	2.37
DEAE-Sephacose	65.00	9.75	49.25	480.19	14.78	9.41
Phenyl-Sephacose	40.00	4.00	63.80	255.2	7.86	11.97
Sephacryl S-100	10.8	3.20	89.50	140.30	4.32	16.79

2.1.3 Sephacryl S-100 分子筛层析:层析后得 2 个洗脱峰,经酶活测定峰 III-1 为酶蛋白峰,峰 III-2 为其它蛋白峰。对收集约 10.8mL 酶液进行活性测定、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳确认为均一的内切 β -葡聚糖酶。整个纯化过程见表 1。内切 β -葡聚糖酶相对于粗酶液纯化 16.79 倍,酶比活力由 5.33U/mg 高到 89.50U/mg,酶回收率为 4.32%。分子筛层析如图 3 所示。

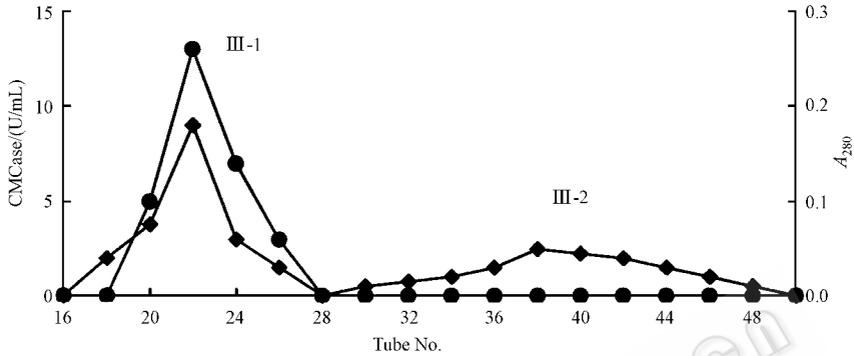


图 3 Sephacryl S-100 分子筛层析图谱

Fig.3 Chromatography of endocellulase on Sephacryl S-100

(◆) A₂₈₀ (●) CMCase.

2.2 酶的一般性质

2.2.1 酶的分子量:采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定酶的分子量,如图 4-A 所示,该酶的分子量约为 67.8kD;采用凝胶过滤层析法测得该酶的分子量为 69.8kD,说明该酶为单聚体,分子量介于 67.8kD ~ 69.8kD 之间。如图 4-B 所示,该酶是一种糖蛋白酶。

2.2.2 反应最适温度:在不同温度下测定酶活性,如图 5-A。酶反应的最适温度为 60℃。

2.2.3 反应最适 pH:在不同 pH 的醋酸缓冲液、磷酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲液中测定酶的活性,结果如图 5-B 所示。酶反应的最适 pH 为 4.0 ~ 4.5。

2.2.4 酶的热稳定性:将酶液与 0.4mol/L pH5.0 醋酸缓冲液在不同的温度下分别保温不同的时间后,立即在 0℃ 冰箱中冷却,然后在 50℃ 下测酶活,以未经保温处理的酶活为 100%,结果如图 6-A。*C. thermophile* 内切 β -葡聚糖酶具有较高的热稳定性,在 60℃ 条件下是稳定的,80℃ 的半衰期为 25min,90℃ 保温

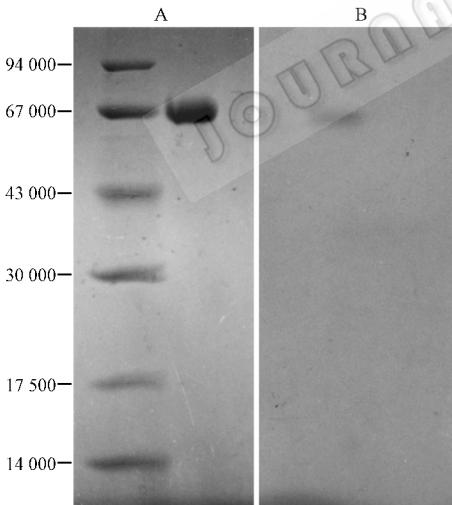


图 4 内切 β -葡萄糖酶的 SDS-PAGE 和糖染色图谱

Fig.4 SDS-PAGE pattern of endocellulase and pattern of glycoprotein staining

A. SDA-PAGE Coomassie Brilliant Blue staining.
Lift. Molecular weight markers;
Right. Purified endocellulase;
B. Glycoprotein staining of protein.

20min 还有 15% 的原酶活性。

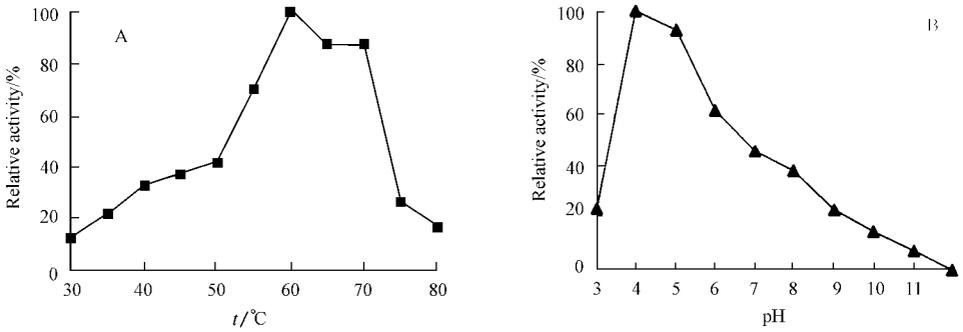


图 5 温度(A)和 pH(B)对 *C. thermophile* 内切 β -葡聚糖酶活性的影响

Fig.5 Effect of temperature(A) and pH(B) on the activity of endocellulase from *C. thermophile*

2.2.5 酶的 pH 稳定性 将适量酶液与不同 pH 缓冲液在 50°C 下预处理 1 小时后,调整 pH 为 5.0 标准条件下测酶活,结果如图 6-B。在 pH4.0~5.0 之间 *C. thermophile* 内切 β -葡聚糖酶较稳定,在 pH8 时,剩余酶活为 20%,说明该酶耐酸性。

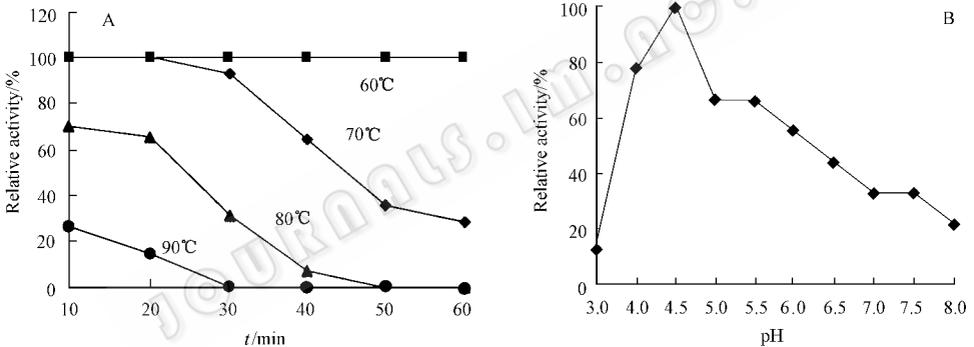


图 6 *C. thermophile* 内切 β -葡聚糖酶的热稳定性(A)和 pH 值稳定性(B)

Fig.6 Kinetics of thermostability(A) and pH(B) of endocellulase from *C. thermophile*

2.2.6 不同金属离子对酶活性的影响 在酶与底物反应的条件下,加入不同的金属离子,使其终浓度为 0.05mol/L,以不加金属离子的酶活为 100% 测定其酶活,结果见表 2。 Na^+ 对酶有激活作用; Fe^{2+} 、 Ag^+ 对酶有显著的抑制作用; Ca^{2+} 对酶活的影响不大。

表 2 各种金属离子对 *C. thermophile* 内切 β -葡聚糖酶活性的影响

Table 2 Effect of different metallic ions on endocellulase activity from *C. thermophile*

Metallic ion	Relative activity/%	Metallic ion	Relative activity/%
Cu^{2+}	10.0	Zn^{2+}	19.5
Ca^{2+}	80.5	Ba^{2+}	38.3
Mn^{2+}	46.3	K^+	47.3
Mg^{2+}	12.2	Ag^+	1.00
Fe^{2+}	0.00	Na^+	119.5

表 3 *C. thermophile* 内切 β -葡聚糖酶的底物特异性

Table 3 Substrate specificities of endocellulase from *C. thermophile*

Substrate	Activity/ OD_{540}
CMC-Na	0.91
Salicylic acid	0.03
Filter paper	0.51
Crystalline cellulose	0.00
Dewaxed cotton	0.12

2.2.7 酶的底物特异性:在标准条件下,用1%的不同底物与酶液反应。结果如表3所示,内切 β -葡聚糖酶对羧甲基纤维素钠的活性最高,滤纸次之,对脱脂棉有一定的水解作用,而对结晶纤维素没有水解能力。

3 讨论

嗜热真菌同中温真菌(mesophilic fungi)一样,产生的纤维素酶也具有多样性^[7],如嗜热真菌 *Humicola insolens*^[14,15]和 *Talaromyces emersonii*^[16]产生的内切 β -葡聚糖酶就分别具有2和4种不同组分。从纯化过程中(图1)可以发现,*C. thermophile*分泌的内切 β -葡聚糖酶至少包含3种组分。本研究经过硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析、Phenyl-Sepharose 疏水层析、Sephacryl S-100 分子筛层析等,分离纯化了 *C. thermophile*分泌的内切 β -葡聚糖酶的一个主要组分(其它组分因含量较少,在相同的实验条件下未能纯化)。

Gauju 等首次从 *C. thermophile* 中分离纯化到的一个内切 β -葡聚糖酶组分,其纯化倍数为25,回收率为2.6%,但整个纯化步骤较复杂^[17]。本研究得到的内切 β -葡聚糖酶组分,纯化倍数为16.79,回收率为4.32%,比较而言,纯化倍数较低,但纯化步骤简单易行。将这两个由不同实验室按不同方法分离纯化的内切 β -葡聚糖酶组分进行比较,发现其主要性质有很大的差异。前者的分子量为67.8kD~69.8kD,最适反应pH为4.0~4.5;后者相应的为36kD和6。由此可见,它们是 *C. thermophile* 分泌产生的内切 β -葡聚糖酶的两个不同组分。

由图4可知,所纯化的内切 β -葡聚糖酶,与 *Trichoderma viride* A10^[18]产生的内切 β -葡聚糖酶一样,都是糖蛋白。此外,该酶对结晶纤维素没有活力,这与严岩等认为纯的内切 β -葡聚糖酶对晶体纤维素没有水解能力的观点相符,这就进一步证明该酶为内切 β -葡聚糖酶。

该酶的反应最适温度为60℃,位于嗜热真菌内切 β -葡聚糖酶的反应最适温度为55℃~80℃的范围内,与Gauju 等报道的结果一致,但高于来自嗜热真菌 *H. insolens*^[14,15]和中温真菌 *Trichoderma viride* 1431^[19]的内切 β -葡聚糖酶,低于嗜热真菌 *T. emersonii*^[15]和 *Thermoascus saurantiacus* 产生的内切 β -葡聚糖酶。

本研究分离纯化的内切 β -葡聚糖酶具有较高的热稳定性和耐酸性,高温强酸条件下可以长时间保存,活力损失很少。如在90℃下保温20min还有15%的活性。预示着该酶有稳定的蛋白质高级结构,将是研究蛋白耐热机制的良好材料,同时也是进行纤维素酶作用机制研究和纤维素酶工业化生产的最佳材料之一。关于基因克隆方面,目前,已有对其他嗜热真菌纤维素酶相关工作的报道^[17,20],但尚未见有关 *C. thermophile* 内切 β -葡聚糖酶基因克隆的报道。本实验室下一步将开展这方面的研究。

参 考 文 献

- [1] Coughlan M P, Ljungdahl L G. FEMS Symp. 43. London Academic Press, 1988. 11~30.
- [2] 阎伯旭,高培基.生命科学,1995,7(5):22~25.
- [3] Beguin P. Annu Rev Microbiol, 1990, 44: 219~248. 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [4] Cheorl H K. *Applied and Environment Microbiology* ,1995 **61**(3) 959 ~ 965.
- [5] Saad J , Aldeen T , Wedad N J. *Micol Res* ,1992 **96**(1) :14 ~ 18.
- [6] Scrivener A M , Zhao L. *Arp Biochem Physicol* ,1997 **118B**(4) 837 ~ 843.
- [7] Bhat K M , Maheshwari R. *Biotechnol Adv* ,1987 **15** 583 ~ 620.
- [8] Maheshwari R , Bharadwaj G , Mahalingshwara K B. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* ,2000 **64**(3) 461 ~ 488.
- [9] Cooney D G , Emerson R. *Thermophilic Fungi* . San Francisco :W H Freeman ,1964. 27 ~ 42.
- [10] Ghose T K. *Pure and Appl Chem* ,1987 **59**(2) 257 ~ 268.
- [11] 李如亮 ,王延枝 ,张楚富 ,等 .生物化学实验 .武汉 :武汉大学出版社 ,1998. 79 ~ 84.
- [12] Hartmut G , David M N J. *J Biol Chem* ,1971 **246**(20) 6339 ~ 6340.
- [13] Bradford M M. *Am Biochem* ,1976 **72** :1105 ~ 1112.
- [14] Hayashida S , Ohta K , Mo K. *Methods Enzymol* **160** 323 ~ 332.
- [15] Rao U S , Murthy S K. *Indian J Biochem Biophy* ,1988 **25** 687 ~ 694.
- [16] Coughlan M P , McHale A. *Methods Enzymol* ,1988 **160** 437 ~ 443.
- [17] Ganju R K , Murthy S K , Vithayathil P J. *Carbohydr Res* ,1990 **197** 247 ~ 255.
- [18] 周 津 阮 宏 孙连魁 .西北大学学报(自然科学版) ,1994 **24**(5) :465 ~ 469.
- [19] 曾家豫 ,冯克宽 ,马永录 ,等 .兰州大学学报(自然科学版) ,1999 **35**(1) :190 ~ 193.
- [20] Sakka K , Shinji F , Kyo S. *Agric Bio Chem* ,1989 **53**(4) 905 ~ 910.

Purification and Properties of An Endocellulase from The Thermophilic Fungus *Chaetomium thermophile*

Lu Mei Li Duochuan Zhang Chengsheng

(Department of Environmental Biology , Shandong Agricultural University , Taian 271018 , China)

Abstract : An endocellulase from culture supernatant of a thermophilic fungus *Chaetomium thermophile* was purified to homogeneity , by using ammonium sulfate fraction , DEAE-Sepharose Fast-flow chromatography , Phenyl-Sepharose Fast Flow chromatography and Sephacryl S-100 chromatography . The enzyme was a glycoprotein with an apparent molecular weight of 67 800 and 69 800 , as determined by 12.5% SDS-PAGE and gel filtration respectively . The endocellulase was optimally active at pH 4.0 ~ 4.5 and 60°C . It was thermostable at 60°C and retained 30% activity after 60min at 70°C . The half life time of the enzyme at 80°C was 25min . Different metal ions showed different effects on the endocellulase activity . Na⁺ enhanced the enzyme activity , whereas Fe²⁺ , Ag⁺ , Cu²⁺ , Ba²⁺ and Zn²⁺ cause obvious inhibition . But it didn't work on crystalline cellulose .

Key words : Thermophilic fungi , *Chaetomium thermophile* , Endocellulase , Purification and properties