

# 嗜热毛壳菌外切葡聚糖纤维二糖水解酶的纯化和部分性质研究

李亚玲 李多川\* 滕芳超

(山东农业大学植物保护学院环境生物系 泰安 271018)

**摘 要** :研究液体发酵嗜热毛壳菌(*Chaetomium thermophilum*)产生的一种外切葡聚糖纤维二糖水解酶的分离纯化及特性。粗酶液经硫酸铵沉淀、DEAE-Sephacryl Fast Flow 阴离子层析、Sephacryl S-100 分子筛层析、Q Sepharose Fast Flow 强阴离子层析等步骤后获得凝胶电泳均一的外切葡聚糖纤维二糖水解酶。经 12.5% SDS-PAGE 和凝胶过滤层析方法测得该酶的分子量大小约为 66.3kDa 和 67.1kDa。该酶反应的最适温度和 pH 值分别为 65℃ 和 5.0。在 60℃ 以下酶比较稳定,在 70℃ 酶的半衰期为 1h,在 80℃ 下保温 20min 仍具有 20% 的活性,该酶的热稳定性较中温真菌的同类酶高,与国外报道的嗜热真菌的同类酶热稳定性接近。以 pNPC 为底物的  $K_m$  值为 0.956mmol/L。

**关键词** :嗜热毛壳菌;外切葡聚糖纤维二糖水解酶;特性

中图分类号 :Q814 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2006)01-0143-04

纤维素酶是生物转化纤维素过程中的一类复合酶系,包括 3 类不同的互补酶:外切葡聚糖纤维二糖水解酶(1- $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolase 或 exo-1- $\beta$ -D-glucanase, EC3.2.1.91)、内切葡聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[1]</sup>。在水解纤维素过程中,外切葡聚糖纤维二糖水解酶主要作用于纤维素线性分子非还原末端,水解  $\beta$ -1,4-糖苷键,每次切下一个纤维二糖分子<sup>[2]</sup>,使结晶纤维素成为易溶解的非结晶纤维素,与其他酶组分具有很强的协同作用,是水解天然纤维素必不可少的一类重要酶,具有较高的应用研究价值。

到目前为止,外切葡聚糖纤维二糖水解酶在真菌上的研究仍多以中温真菌为主,嗜热真菌(*Thermophilic fungi*)上的研究很少。本实验室分离并鉴定的嗜热毛壳菌(*Chaetomium thermophilum* CT2)是一种分布广泛的嗜热真菌,最适生长温度为 45℃~55℃。该嗜热真菌产生的纤维素酶比中温真菌产生的纤维素酶具更高的热稳定性,本实验室已经从嗜热毛壳菌 *Chaetomium thermophilum* CT2 上分离纯化内切葡聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[3,4]</sup>,国外从另一嗜热毛壳菌变种 *C. thermophile* var. *coprophile* 上纯化了两种外切葡聚糖纤维二糖水解酶<sup>[5]</sup>,但嗜热毛壳菌 *Chaetomium thermophilum* CT2 的外切葡聚糖纤维二糖水解酶的分离纯化至今未见报道。本文以该菌为研究对象,从其发酵液中纯化了一种热稳定性高的外切葡聚糖纤维二糖水解酶,并对酶的主要性质进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种** :嗜热毛壳菌(*Chaetomium thermophilum*)CT2 由本实验室分离得到。

**1.1.2 培养基** :PDA 培养基<sup>[6]</sup>、微晶纤维素固体培养基(PDA 培养基中用微晶纤维素代替葡萄糖,其它成分与 PDA 培养基相同)、含微晶纤维素液体培养基:每升含 10g 微晶纤维素、1.4g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.3g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.3g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1g 蛋白胨、0.5g 酵母浸膏、1L 吐温 80、微量元素 1mL/L<sup>[7]</sup>。

**1.1.3 试剂** :DEAE-Sephacryl S-100、Q Sepharose Fast Flow 凝胶和低分子量标准蛋白均为 Pharmacia 产品。Yeast extract 为 Oxoid LTD 产品,pNPC、SDS、Tris、TEMED、丙稀酰胺均购自 Sigma 公司,微晶纤维素购自上海恒信化学试剂有限公司(原上海试剂二厂),考马斯亮蓝 R-250 购自北京鼎国生物技术发展中心。

### 1.2 培养条件

将菌种接种到含固体 PDA 培养基的培养皿中,50℃ 下培养 3~4d 后,转到含微晶纤维素固体培养基的培养皿中,50℃ 下诱导培养 3~4d 后,取 20 块直径 1cm 的菌块接种到含有 50mL 液体培养基的摇瓶中,共 20 瓶。在水浴恒温摇床(120r/min,50℃)上培养 7d,用纱布过滤,将滤液于 8000r/min 离心 10min,得上清液即为粗酶液。

### 1.3 酶活性测定

酶活性测定采用 pNPC 法。将 0.8mL 2.5mmol/L pNPC 溶液、0.2mL 适当稀释的酶液、0.1mL 0.05mol/L 的醋酸缓冲液(pH 为 5.0)混合后,50℃ 下保温 30min,用 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1mL 终止反应,410nm 比色,以对硝基酚的生成量表示酶活力<sup>[8]</sup>。一个酶活力单位(U)定义为每分钟水解 pNPC 产生 1mg 对硝基酚所需的酶蛋白量。

基金项目 :国家自然科学基金(30270013,30170013);国家 863 计划(2003AA241162)

\* 通讯作者。Tel 86-538-8249071 E-mail lide20@sdau.edu.cn

作者简介 :李亚玲(1978-),女,山东招远人,博士研究生,主要从事嗜热酶学研究。E-mail yalingli@163.com

收稿日期 2005-05-30 接受日期 2005-06-30 修回日期 2005-09-23

## 1.4 酶的分选纯化

将提取的粗酶液用 85% 饱和度的硫酸铵沉淀 24h 后, 8000r/min 离心 20min, 收集沉淀, 用适量的缓冲液 A (50mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 值为 8.0) 回溶, 并在相同的缓冲液中透析 24h, 8000r/min 离心 10min, 取上清液。将上清液施于经缓冲液 A 平衡好的 DEAE-Sepharose 柱 (1.0cm × 20cm), 酶蛋白先用 5 倍柱床体积的缓冲液溶液 A 洗脱至  $A_{280}$  不变后, 再用 100mL 缓冲液 A 和 100mL 含 0.3mol/mL NaCl 的相同缓冲液进行线性梯度洗脱, 流速为 2.0mL/min, 1.5min 收集 1 管。将每管进行活性测定, 收集有外切酶活性的酶液。用聚乙二醇包埋浓缩至 2mL, 进行 Sephacryl S-100 分子筛层析 (1.0cm × 100cm), 用缓冲液 A 洗脱, 流速为 0.4mL/min, 2.5min 收集 1 管, 将每管进行活性测定, 收集有外切酶活性的部分酶液, 继续进行 Q Sepharose Fast Flow 强阴离子交换柱层析 (0.5cm × 10cm), 酶蛋白先用 5 倍柱床体积的缓冲液溶液 A 洗脱至  $A_{280}$  不变后, 再用 80mL 缓冲液 A 和 80mL 含 0.3mol/mL NaCl 的相同缓冲液进行线性梯度洗脱, 流速为 2.0mL/min, 1.5min 收集 1 管。将每管进行活性测定, 收集活性部分, 最后对收集的具有活性的酶液用 SDS-PAGE 确认其纯度。

## 1.5 蛋白质分子量测定

采用 12.5% SDS-PAGE 和凝胶过滤层析法, 蛋白质用考马斯亮蓝 R-250 染色, 凝胶过滤层析采用 Sephacryl S-100。

## 1.6 蛋白质含量测定

蛋白质含量测定采用 Bradford 法<sup>[9]</sup>, 以牛血清蛋白为标

准蛋白测定。

## 2 结果和分析

### 2.1 酶的分选纯化

**2.1.1 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱层析** 将收集的 800mL 粗酶液经硫酸铵沉淀, A 缓冲液回溶并透析后得到约 60mL 酶液, 上柱到缓冲液平衡的 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱进行阴离子交换层析, 共得到 3 个蛋白峰, 一个外切酶活性峰, 外切酶活力主要集中于第二个蛋白峰 (图 1-A)。收集此峰活性较高的酶液 (约 36mL) 进行下一步的纯化。

**2.1.2 Sephacryl S-100 分子筛层析** 将 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱层析后酶活性高的管收集, 用聚乙二醇浓缩至约 2mL 进行分子筛层析, 得到 5 个蛋白峰, 两个外切酶活性峰, 外切酶活力主要集中于第二个和第三个蛋白峰 (图 1-B)。收集第二个酶蛋白峰活性较高的酶液 (约 21mL) 进行进一步的纯化。

**2.1.3 Q Sepharose Fast Flow 强阴离子交换柱层析** 将分子筛层析后收集的第二个酶蛋白峰的酶液, 进行 Q Sepharose Fast Flow 强阴离子交换柱层析, 得到一个主蛋白峰, 经外切酶活性测定此峰为酶蛋白峰 (图 1-C)。

对收集到的约 18mL 酶液进行活性测定, 经 SDS-PAGE 确认为提纯的外切葡聚糖纤维二糖水解酶。纯化过程见表 1。外切葡聚糖纤维二糖水解酶相对于粗酶液纯化了 12.3 倍, 酶比活力为 1.45U/mg, 酶的回收率为 5.25%。

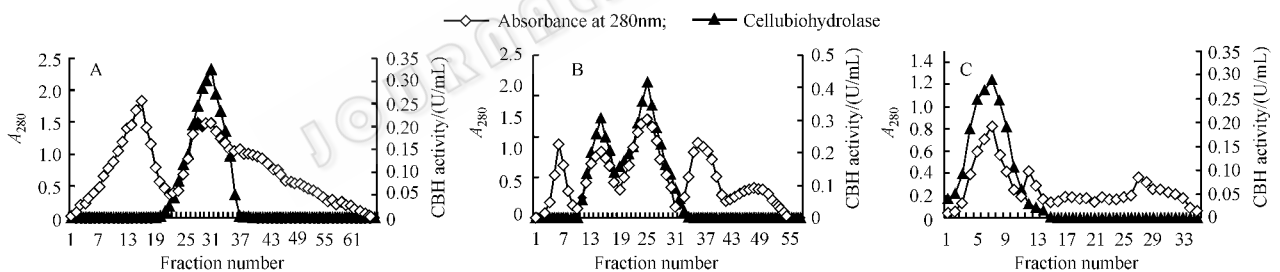


图 1 (A) DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱层析图谱 (B) Sephacryl S-100 分子筛层析图谱; (C) Q Sepharose Fast Flow 强阴离子交换柱层析图谱

Fig. 1 (A) Chromatography of cellulbiohydrolase on DEAE-Sepharose Fast Flow (B) Chromatography of cellulbiohydrolase on Sephacryl S-100 (C) Chromatography of cellulbiohydrolase on Q Sepharose Fast Flow

Chromatographic conditions (A) buffer A, a linear gradient (0 ~ 0.3mol/mL) NaCl was used. Flow rate: 2.0mL/min (B) buffer A, Flow rate: 0.4mL/min (C) buffer A, a linear gradient (0 ~ 0.3mol/mL) NaCl was used. Flow rate: 2.0mL/min.

表 1 *C. thermophilum* 产生的外切葡聚糖纤维二糖水解酶的分选纯化

Table 1 Purification of cellulbiohydrolase from *C. thermophilum*

Steps	Total volume /mL	Total protein /mg	Total activity /U	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield /%
Crude extract	800	592	69.856	0.118	1	100
85% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60	52.164	18.153	0.348	2.95	25.99
DEAE Sepharose	36	18.032	15.66	0.868	7.35	22.42
Sephacryl S-100	21	4.9	6.468	1.32	11.18	9.26
Q Sepharose	18	2.52	3.67	1.45	12.3	5.25

## 2.2 酶的一般性质

**2.2.1 酶的分子量** 采用 SDS-PAGE 方法测得分子大小约为

66.3kDa (图 2), 用凝胶过滤层析法测得该酶的分子量为 67.1kDa, 说明该酶为单聚体。

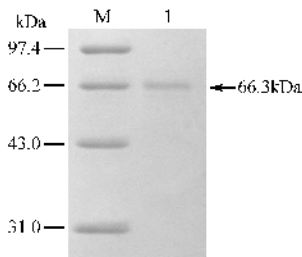


图2 *C. thermophilum* 外切葡聚糖纤维二糖水解酶 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the purified cellulohydrolase from *C. thermophilum*

M. Molecular weight markers ; 1. Purified cellulohydrolase.

2.2.2 酶的反应最适温度:在不同温度(30~80℃)下测定酶活性。该酶反应的最适温度为65℃。

2.2.3 酶的反应最适 pH 值:在不同 pH 值(pH 范围 3~10)的磷酸、醋酸、Tris-HCl 缓冲液中测定酶的活性,得出该酶反应的最适 pH 值为 5.0。

2.2.4 酶的 pH 值稳定性:将适量酶液与不同 pH 值的缓冲液在 50℃ 下预处理 1h 后,标准条件下测酶活性。该酶在酸性环境即 pH 值在 4.0~6.0 之间较为稳定。

2.2.5 酶的热稳定性:将适量酶液与 0.05mol/L, pH 值为 5.0 的 HAc-NaAc 的缓冲液在不同的温度下(50~90℃)分别保温不同时间后,立即在 0℃ 冰箱中冷却,然后在 50℃ 下测酶的活性,以未经过保温处理的酶活性作为评价热稳定性的指标。结果显示,在 60℃ 以下酶比较稳定,在 70℃ 酶的半衰期为 1h,在 80℃ 下酶的半衰期约为 12min,保温 20min 仍具有高于 20% 的活性,在 90℃ 下保温 10min 仍具有 10% 的活性。

2.2.6 酶的反应动力学曲线:纯化的外切葡聚糖纤维二糖水解酶液与不同浓度的底物反应,在标准条件下测定酶活力。底物浓度依次为 0.25、0.33、0.5、1.0、2.0mmol/L,以浓度的倒数  $1/[S]$  为横坐标,反应速率的倒数  $1/V$  为纵坐标作 Lineweaver-Burk 图(图 3)。外切葡聚糖纤维二糖水解酶的  $K_m$  为 0.956mmol/L。

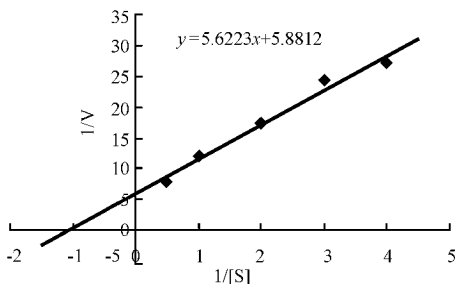


图3 *C. thermophilum* 外切葡聚糖纤维二糖水解酶的 Lineweaver-Burk 图

Fig.3 Lineweaver-Burk plot of cellulohydrolase from *C. thermophilum*

### 3 讨论

纤维素是地球上最丰富的可再生资源,纤维素酶是降解纤维素生成葡萄糖的重要酶系,应用范围广泛,尤其在工业

上具有巨大的应用潜力。近年来,我国纤维素酶的应用研究十分活跃,从不同的中温真菌中已经分离纯化出多种纤维素酶<sup>[10-13]</sup>。但是对于嗜热真菌的利用还不是很多。从嗜热极端微生物中分离出来的酶具有极高的热稳定性。其催化功能优于目前在各种工业生产中应用的酶<sup>[14]</sup>。本实验选用嗜热毛壳菌作为实验材料所纯化的外切葡聚糖纤维二糖水解酶,其最适反应温度为 65℃,在 80℃ 下保温 20min 仍具有 20% 的活性。充分显示了其独特的热稳定性。

纤维素酶是诱导酶,其合成受诱导和分解产物阻遏作用的调节。据报道,纤维素是最好的诱导剂<sup>[15]</sup>。为了使外切纤维素酶基因获得较高水平的表达,本实验采用先在微晶纤维素固体培养基诱导培养后,再转入液体发酵培养。从一定程度上减少了培养基中葡萄糖的含量,降低了产物的阻遏作用。培养 7d 时菌体发生自溶,检测收集的发酵液酶活性最高,这基本上也符合多数水解酶类的合成特点<sup>[16]</sup>。

纯化的外切葡聚糖纤维二糖水解酶反应最适 pH 值为 5.0,并且在酸性环境下稳定,说明该酶是酸性纤维素酶,有比较好的耐酸性,与丝状真菌产生的纤维素酶一般在酸性或中性偏酸条件下水解纤维素底物的结论也基本一致<sup>[17]</sup>。该酶的分子量约为 66.3kDa,与本实验室最近从该菌中克隆到的外切葡聚糖纤维二糖水解酶基因在毕赤酵母中表达的产物分子量基本一致(GenBank 基因登陆号 AY861348),与国外已报道的另一株嗜热毛壳菌 *C. thermophile* var. *coprophile* 的外切葡聚糖纤维二糖水解酶分子量相近<sup>[5]</sup>。

基于以上对纯化的外切葡聚糖纤维二糖水解酶的特性研究和讨论,表明该酶应该具有比较稳定的蛋白质结构,其功能也较目前常见应用酶优良,显示出巨大应用价值,可以作为研究蛋白质耐热机制的材料,更可以将该酶作为设计和构建工业上新特性蛋白质的模型,在工业和农业领域有广泛应用前景。另外,嗜热毛壳菌产纤维素酶系比较齐全,本实验室已经从该菌上分离纯化内切葡聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[3,4]</sup>。这预示着该菌株可以用来进行开发和改造新的纤维素酶工业生产菌株。

### 参 考 文 献

- [1] Bhat MK, Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol Adv*, 1997, **15**: 583-620.
- [2] Teeri TT. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Tibtech*, 1997, **15**: 160-167.
- [3] 路梅,李多川,张成省.嗜热毛壳菌内切葡聚糖酶的分纯化及特性. *微生物学报*, 2002, **42**(4): 471-477.
- [4] 楚春雪,李多川,郭润芳.一株嗜热毛壳菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶的分纯化及特性. *菌物学报*, 2004, **23**(3): 397-402.
- [5] Ramesh K, Ganju SK. Purification and characterization of two cellobiohydrolases from *Chaetomium thermophile* var. *coprophile*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1989, **993**: 266-274.
- [6] Stevens RB. *Mycology Guide Book*. Seattle and London: University Washington Press, 1981: 712.

- [ 7 ] Hong J, Tamaki H, Yamamoto K, et al. Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. *Appl Microbiol and Biotechnol*, 2003, **63** :42 – 50.
- [ 8 ] Desphaude MV. An assay for selective determination of exo-1  $\beta$ -glucanase in a mixture of cellulolytic enzyme. *Anal Biochem*, 1984, **138** :481 – 487.
- [ 9 ] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** :248 – 254.
- [ 10 ] 洪 洞, 黄秀梨. 黑曲霉变种 2281-C 纤维素酶的纯化和性质. 北京师范大学学报(自然科学版), 1998, **34**(3) :403 – 408.
- [ 11 ] 曾家豫, 冯克宽, 马永录, 等. 木霉 4131 菌株纤维素酶的分离纯化和部分性质研究. 兰州大学学报(自然科学版), 1999, **35**(1) :190 – 193.
- [ 12 ] 潘 锋, 杨树林, 史小丽, 等. 黑曲霉纤维素酶的纯化及酶学性质研究. 生物技术, 2001, **11**(3) :7 – 9.
- [ 13 ] 杜宗军, 陈冠军, 高培基, 等. 黑色葡萄状穗霉纤维素酶的纯化和性质. 青岛海洋大学学报, 2002, **32**(1) :79 – 84.
- [ 14 ] 唐雪明, 王正祥, 诸葛健. 具有工业应用价值的高热稳定性极端酶. 食品与发酵工业, 2001, **27**(5) :65 – 70.
- [ 15 ] Sternberg D, Mandels GR. Induction of cellulolytic enzymes in *T. viride* by sophorose. *J Bacteriol*, 1979, **139** :7.
- [ 16 ] 高培基, 曲音波, 钱新民, 等. 微生物生长与发酵过程. 济南: 山东大学出版社, 1990, 86 – 106.
- [ 17 ] 肖春玲, 徐常新. 微生物纤维素酶的应用研究. 微生物学杂志, 2002, **22**(2) :33 – 35.

## Purification and characterization of a cellobiohydrolase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* CT2

LI Ya-ling, LI Duo-chuan\*, TENG Fang-chao

(Department of Environmental Biology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract**: *Chaetomium thermophilum* CT2 was a cellulolytic fungus. It was a widely-existing saprophyte, which grew rapidly in soil. The cellulases synthesized by *C. thermophilum* CT2 was overall, consisting of three principal types of enzymes. The cellobiohydrolase was one of these three cellulases, which was associated with the endo- $\beta$ -1,4-glucanase and  $\beta$ -glucosidase activities. *C. thermophilum* CT2 produced cellobiohydrolase availablely at 50°C, when grown on ferment liquid substrate, containing 1% Avicel, 0.14% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.03% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.03% MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% peptone, 0.05% yeast extract, 0.1% Tween 80 and trace element solution at 1mL/L, containing 18mmol/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6.6mmol/L MnSO<sub>4</sub>, 4.8mmol/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 15mmol/L COCl<sub>2</sub>. A cellobiohydrolase was purified to homogeneity by an inexpensive and straightforward method for extraction of the enzyme involving fractional ammonium sulphate precipitation, ion-exchange chromatography on DEAE-Sephacryl S-100 and ion-exchange chromatography on Q Sepharose Fast Flow. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 66.3kDa by 12.5% SDS-PAGE and was to be 67.1kDa by gel filtration on Sephacryl S-100 respectively. Kinetic studies of the purified cellobiohydrolase of *C. thermophilum* CT2 showed that the  $K_m$  for p-NPC (p-trophenyl- $\beta$ -D-cellobioside) was 0.956mmol/L as determined from a Lineweaver-Bark plot. Optimum enzyme activity was at 65°C and pH5.0. It was thermostable at 60°C and remained 20% activity after 20min at 80°C. The half life time of the enzyme at 70°C was 1h. It indicated that the cellobiohydrolase possessed of excellent acid stability and thermostable property. The properties of the cellobiohydrolase make it possible to be good material in scientific researches of protein thermostable mechanism and good model for designing and constructing a new type protein in industry. The enzyme may also provide instructive insight on the diversity and mechanism of cellulose degradation by *C. thermophilum* CT2. As a thermophilic fungus *C. thermophilum* CT2 is an attractive potential source of cellulases. It indicates that *C. thermophilum* CT2 may be a new excellent industrialized fungus for producing cellulases through molecule biology means.

**Keywords**: *Chaetomium thermophilum*; Cellobiohydrolase; Characterization

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation(30270013, 30170013); Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2003AA241162)

\* Corresponding author. Tel 86-538-8249071 E-mail jldc20@sdau.edu.cn

Received 30 May 2005/Accepted 30 June 2005/Revised 23 September 2005