



镰刀菌 Q7-31T 内切葡聚糖酶 Egn21 的分离纯化及酶学性质

常鑫园, 谢占玲*, 张凤梅, 雷洁琼, 崔荣伟, 聂守一

青海大学生态环境工程学院, 国家重点实验室培育基地青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室,
青海 西宁 810016

摘要:【目的】为进一步研究镰刀菌 Q7-31T 产生的植物细胞壁降解酶的酶系信息。【方法】以 1% (W/V) 蛋白胨为氮源, 0.5% (W/V) 燕麦秸秆为碳源, 20 °C、120 r/min 振荡培养 3 d, 诱导发酵培养菌株, 获得的粗酶液经过 Sephacry S-100 凝胶柱层析和 DEAE 琼脂糖弱阴离子交换柱层析, 最终得到纯化的内切葡聚糖酶, 并对其酶学性质分析及串联质谱鉴定。【结果】研究表明: Egn21 的分子质量为 44.25 kDa, 等电点为 4.91; 酶学特性研究显示: Egn21 降解羧甲基纤维素的最适反应温度为 40 °C, 在 45 °C 以下比较稳定。该酶最适 pH 为 6.0, 在 pH 为 5.0–8.0 条件之间比较稳定。Co²⁺、Zn²⁺和 Mg²⁺对其没有明显作用, 而 Fe²⁺、Ca²⁺、K⁺、Na⁺和 Mn²⁺对酶活性有抑制作用, Hg²⁺会使酶失去活性。【结论】从 Q7-31T 中分离纯化得到的内切葡聚糖酶 Egn21, 经过酶学特性与串联质谱鉴定结果显示其属于 GH5 家族。

关键词: 镰刀菌, 内切葡聚糖酶, 分离纯化, 鉴定, 酶学特性

真菌作为自然界分布最广, 种类最多的分解者, 是降解天然纤维素的重要成员, 其具有很强的分泌纤维素及半纤维素酶的能力。纤维素是高等植物细胞壁的主要成分, 占植物总干重的 30%–50%, 是地球上分布最广、含量最丰富的可再生性碳源化合物, 占地球总生物量的 40%^[1]。据统计, 植物每年通过光合作用使光能转化成生物能的生成量大约有 1000 亿吨, 每年作物秸秆、稻梗等含纤维素较丰富的物质就有 5 亿吨之多, 其中有 89% 能源未被人们利用^[2–3]。大量的秸秆含丰富的纤

维素物质, 但其利用率很低, 大多采用燃烧的方法来处理, 这样就造成了环境污染, 破坏了土壤的理化性质和丧失了有机质成分。所以, 纤维素的充分利用与有效的转化对于解决当前的能源危机, 粮食短缺, 环境污染等具有重大的意义^[1]。

天然的纤维素由排列整齐而规则的结晶区和相对不规则、松散的无定形区组成。纤维素链之间存在着氢键, 通过氢键的缔合作用, 形成纤维束, 分子密度大的区域, 成平行排列, 形成结晶区; 分子密度小的区域, 分子间隙小, 定向差,

基金项目: 国家自然科学基金(31560028); 青海省科技厅资助项目(2014-zj-903)

*通信作者。Fax: +86-971-5310086; E-mail: xiezhanling2012@126.com

收稿日期: 2016-04-11; 修回日期: 2016-06-20; 网络出版日期: 2016-07-19

形成无定形区^[4]。在自然界,纤维素分子一般均包埋或嵌合在半纤维素和木质素里,三者以复合体形式存在,并且木质素包围着纤维素且和半纤维素有着共价关系,共同形成较复杂的网状结构。

根据纤维素酶降解底物时不同的作用方式可将其分成3类:(1)内切纤维素酶又称之为内切葡聚糖酶(EG);(2)外切纤维素酶又称之为纤维二糖水解酶(CBH);(3) β -葡萄糖苷酶(BGL)。根据蛋白质结构域中氨基酸序列的相似性,将不同物种来源的碳水化合物活性酶类分成不同的蛋白质家族。其中糖苷水解酶现已有131个家族,纤维素酶类分布在至少17个GH家族中,是糖苷水解酶数据库中家族数目最多的一类水解酶类^[5]。从其家族分布来看,内切纤维素酶分布最广,外切纤维素酶分布于内切纤维素酶家族之中, β -葡萄糖苷酶仅在GH5和GH9家族与内切/外切纤维素酶相关家族有交叠^[6]。

镰刀菌属(*Fusarium*)为真菌中较大的一属。它广泛分布于自然界中,兼寄生或腐生生活。它是人类发现的最重要的植物病原菌之一^[6]。田飞等发现,从青藏高原分离鉴定1株具有降解植物细胞壁的镰刀菌Q7-31T,提取其发酵液的胞外蛋白,经双向电泳和串联质谱鉴定,确定了6个超家族的葡萄糖苷水解酶(GH5, GH7, GH10, GH13, GH18和PL1),它们都参与了植物细胞壁的降解^[7]。所有鉴定的酶中,内切葡聚糖酶是被鉴定频率最高的功能蛋白。鉴定的蛋白大部分为内切葡聚糖酶,包括GH10、GH7和GH5^[6]。GH7家族主要的内切葡聚糖酶Egn20的相关信息已被研究^[5]。本研究是以镰刀菌Q7-31T为实验材料,分离纯化鉴定了GH5家族的内切葡聚糖酶Egn21并研究其酶学性质。丰富和完善了Q7-31T对植物细胞壁降

解酶组分的内容;对研究其降解机理具有重要的理论意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:镰刀菌Q7-31T由青海大学微生物实验室于2007年5月从青海湖地区分离得到现保藏在中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC, No. 3.17610)。

1.1.2 试剂:木聚糖(Birch Xylan)、木糖(Xylose)、羧甲基纤维素(CMC)、蛋白胨、十二烷基硫酸钠(SDS)购自Sigma公司,三羟甲基氨基甲烷(Tris)、低分子量蛋白Marker购自北京索莱宝科技有限公司, Sephacry S-100、DEAE-Sepharose Fast Flow购自Pharmacia公司。

1.1.3 仪器设备:数显恒温水浴锅HH-M8(上海赫田科学仪器有限公司);TS-200恒温培养摇床(上海仪纯实业有限公司);250D光照培养箱(吉特实验仪器厂);LDZX-40II立式自动压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);UGP-VCY-1000-WxDxH生物超净工作台(统钜净化设备上海有限公司);Adventurer TM天平(奥豪斯国际贸易(上海)有限公司);UV-9200紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);TDL-40B型台式低速离心机(上海安亭仪器厂);MD44透析袋(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 菌株培养

从液体石蜡封存的菌种中挑取直径0.5 cm的琼脂块,接种到PDA平板培养基(马铃薯200 g,蔗糖20 g,琼脂15–20 g,蒸馏水1000 mL)中心,25 °C恒温培养箱中活化5 d;从菌落边缘切下直

径 1 cm 的琼脂块, 转接至液体种子培养基(葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 3 g/L, Mendels 营养盐: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g/L、 KH_2PO_4 2.0 g/L、尿素 0.3 g/L、 CaCl_2 0.3 g/L、 MgSO_4 0.3 g/L、 FeSO_4 5.0 mg/L、 MnSO_4 1.6 mg/L、 ZnSO_4 1.4 mg/L、 CoCl_2 2.0 mg/L, pH 自然, 装液量 60 mL/150 mL), 60 r/min 摇床培养 72 h; 将液体种子培养基按 10% 的量接种至产酶液体发酵培养基(燕麦秸秆 5 g/L、蛋白胨 7 g/L、Mendels 营养盐, pH 自然, 三角瓶装液量 100 mL/250 mL), 20 °C、120 r/min 摇床培养 72 h。发酵液经 8 层无菌纱布过滤, 得到粗酶液, 4 °C 保存备用。

1.3 内切葡聚糖酶活力的测定

采用 DNS 法(3',5'-二硝基水杨酸法)测定内切葡聚糖酶的活力及还原性糖的产量^[8]。底物采用 0.5% 羧甲基纤维素(CMC), 反应时间为 30 min、40 °C; 在 40 °C 下每分钟产生 1 μmol 还原糖所需的酶液量为一个酶活力单位(U)。

1.4 蛋白含量的测定

蛋白含量的测定采用 Bradford 法^[9], 标准曲线是以牛血清白蛋白为标准绘制。在 1.5 mL 离心管中加入适当稀释的牛血清白蛋白 200 μL , 在加入 1 mL G-250 考马斯亮蓝染液 5–30 min 内在 595 nm 下测定光吸收值。

1.5 分离纯化内切葡聚糖酶

1.5.1 硫酸铵分级沉淀: 将固体硫酸铵研磨细, 缓慢加入粗酶液中, 调节饱和度到 10%–50%, 充分混匀后, 4 °C 静置 2 h, 随后 4 °C、12000 \times g 离心 20 min 收集沉淀; 沉淀以 pH 6.5 的 Tris-HCl 缓冲液重悬, 重悬液经透析袋(MD 透析袋, 北京索莱宝科技有限公司, 截留分子量为 10 kDa)脱盐, 4 °C 备用。

1.5.2 Sephacry S-100 葡聚糖凝胶层析: 硫酸铵分级沉淀后的样品加入到 Sephacry S-100 葡聚糖凝胶层析柱(26 mm \times 700 mm)^[10], 以 Tris-HCl 缓冲液(0.02 mol/L、pH 7.5)洗脱、流速为 1.5 mL/min, 用核酸蛋白检测仪检测蛋白的分布, DNS 法测定酶的分布(方法如前面所描述)。

1.5.3 DEAE 弱阴离子交换层析: 取凝胶层析柱收集的内切葡聚糖酶活性部分, 添加到 DEAE 琼脂糖凝胶弱阴离子交换柱(15 mm \times 50 mm)上, 用含有 NaCl (0.02–1.00 mol/L, pH 7.5)的缓冲液进行线性梯度洗脱(1.8 mL/min), 用核酸蛋白检测仪检测蛋白分布; 样品经 MD44 透析袋透析脱盐后, 检测内切葡聚糖酶的分布(方法如前所述)。

1.6 SDS-PAGE

用 SDS-PAGE 法检测每一步实验蛋白质分子量和分离纯化过程中蛋白纯度^[11]。分离胶的浓度是 10%, 电泳电压是 120 V; 浓缩胶的浓度是 3%, 电泳电压是 80 V^[12]。

1.7 酶学性质研究

1.7.1 最适温度、pH 及稳定性测定: 最适温度测定: 将底物处于 pH 7.0 的缓冲溶液中, 在 20–70 °C ($\Delta t=5$ °C)进行酶促反应, 之后测定 CMC 酶的最适反应温度; 在同上温度温水浴 30 min 后测定酶的稳定性; 最适 pH 测定: 将底物处于不同 pH 的缓冲液 pH 1–14 ($\Delta t=1$) 40 °C 条件下反应, 然后测定 CMC 酶活力, 确定最适反应 pH; 将样品分别在同上 pH 处理 30 min, 40 °C, 最适 pH 条件下测定酶的 pH 稳定性。

1.7.2 底物特异性测定: 分别采取浓度均为 0.5% 的羧甲基纤维素钠、桦木木聚糖、可溶性淀粉、燕麦秸秆粉、麸皮、滤纸和果胶作为底物, 酶活力测定方法参考上述内容。

1.7.3 米氏常数的测定：米氏常数 K_m 用 Michaelis-Menten 方程计算出固定酶的浓度，在酶量不变的情况下确定酶反应速度与 CMC 底物浓度之间的定量关系。

1.7.4 金属离子对酶活力的影响：酶液中分别加入各种金属离子化合物： Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} ，各种金属离子在反应体系中的终浓度达到 4 mmol/L。40 °C 作用 30 min 后测定 CMC 酶活力。没有加入金属离子的酶活力作为 100%。

1.8 蛋白鉴定

蛋白鉴定是由北京华大基因完成，具体实验方法参照田飞等的研究^[5,13]。

1.9 数据处理与误差分析

采用 SPSS 19.0 数据处理软件进行误差分析：采用两样本(测定管与对照管)平均数 t 检验法进行显著性检验 ($P < 0.01$ ，线性相关性极显著； $0.05 > P > 0.01$ ，线性相关性显著； $P > 0.05$ ，线性相关性不显著)^[14]。

2 结果和分析

2.1 内切葡聚糖酶分离纯化

发酵液经 8 层无菌纱布过滤，得到粗酶液。内切葡聚糖酶活性的蛋白样品在硫酸铵为 10%–50% 的饱和度条件下沉淀下来，蛋白样品在 Tris-HCl (0.02 mol/L, pH 7.5) 缓冲液中重悬，脱盐，取 20 mL 重悬液加入到 SephacryS-100 葡聚糖凝胶柱进行分级分离。对具有内切葡聚糖酶的酶活力的蛋白样品收集起来浓缩后上样到 DEAE 琼脂糖凝胶弱阴离子交换柱上进行二次分离纯化，洗脱图谱如图 1 所示，有一个穿透峰 P1 和一个洗脱峰 P2，酶活力检测发现有明显内切葡聚糖酶活力的酶样品主要集中在 P2 处，P1 处蛋白样品无明显酶活力。分别对粗酶液、硫酸铵沉淀后重悬液、经过葡聚糖凝胶柱后及 DEAE 琼脂糖凝胶弱阴离子交换柱的蛋白进行 SDS-PAGE 检测。最终得到单一条带，经凝胶成像系统分析，分子量为 44 kDa 左右，将该蛋白命名为 Egn21 (图 2)。

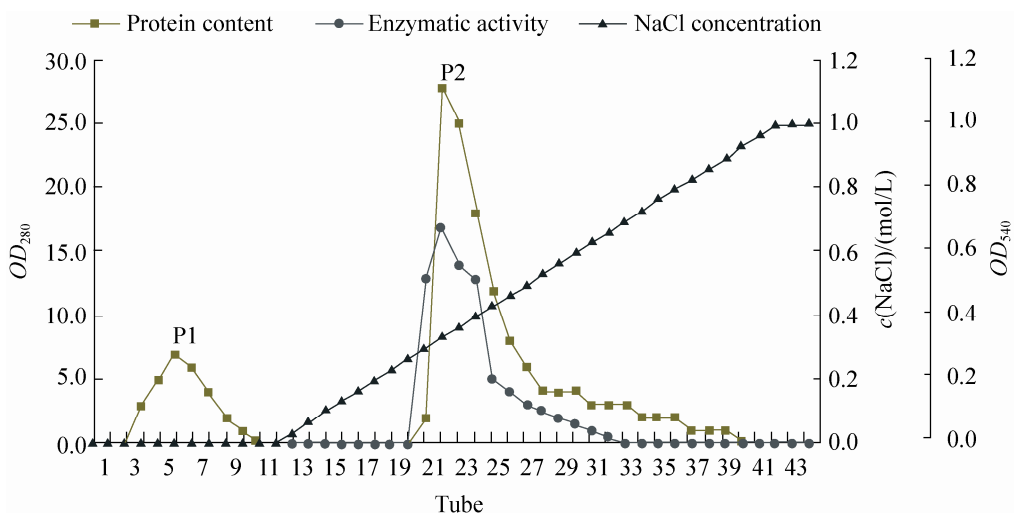


图 1. DEAE 弱阴离子交换层析洗脱图谱

Figure 1. Elution profile of the DEAE ion-exchange column chromatography. p1, p2, protein peaks.

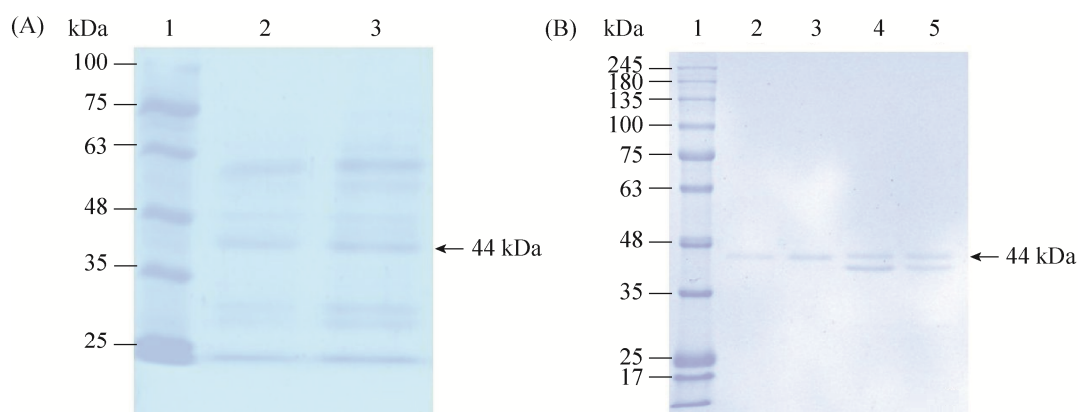


图 2. 分离纯化蛋白过程的 SDS-PAGE 电泳图

Figure 2. SDS-PAGE of protein samples during separation and purification. A: lane 1: protein marker; lane 2: ammonium sulphate precipitation; lane 3: crude extract. B: lane 1: protein marker; lane 2, 3: protein samples after ion exchange chromatography; lane 4, 5: protein samples after gel filtration.

以 600 mL 发酵液开始, 内切葡聚糖酶 Egn21 从粗酶液到最后的纯化产物共纯化了 11.8 倍, 回收率为 5%, 酶纯化后的比活力为 127.3 U/mg, 分离纯化结果如表 1 所示。

2.2 酶学性质分析

2.2.1 最适温度、pH 及稳定性测定: Egn21 的最适反应温度、pH 及其稳定性情况如图 3、4 所示。该酶的最适反应温度是 40 °C, 最适 pH 是 6; 纯

表 1. 内切葡聚糖酶的纯化
Table 1. Purification of Egn21

Purification step	Total protein/mg	Total activity/U	Specific activity/(U/mg)	Purification (fold)	Yield/%
Crude extract	26.70	288.0	10.8	1.0	100
Ammonium sulphate precipitation	5.20	145.0	27.9	2.6	50
Sephacryl S-100 gel filtration	0.33	32.1	106.7	10.0	11
DEAE-sepharose ion-exchange column Chromatography	0.11	14.0	127.3	11.8	5

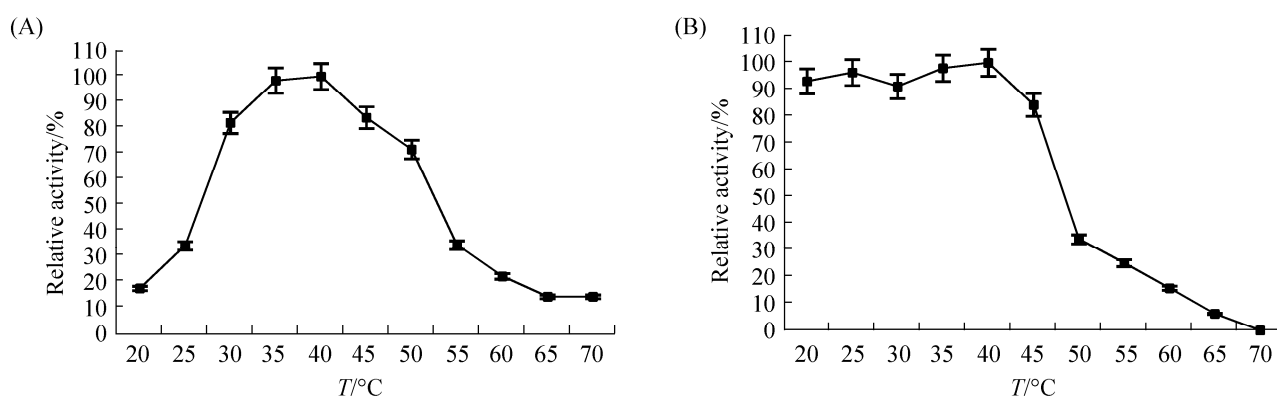


图 3. Egn21 最适温度和温度稳定性检测

Figure 3. Effects of temperature on the activity and stability of Egn21. A: enzyme activity; B: thermal stability.

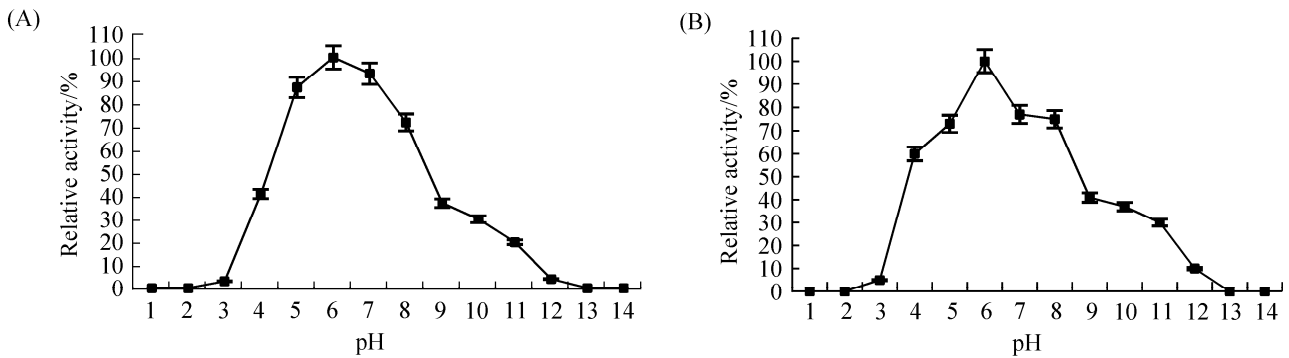


图 4. Egn21 最适 pH 和 pH 耐受性检测

Figure 4. Effects of pH on the activity and stability of Egn21. A: enzyme activity; B: pH stability.

化的该酶在温度为 45 °C 以下恒温水浴 30 min 仍然可以保持原有酶活力的 80%以上,温度高于 40% 酶活开始降低;该酶在 pH 5.0–8.0 范围内酶活力可以保持 70%以上,与相关文献研究结果类似^[15–16]。

2.2.2 底物特异性检测: 该酶对降解羧甲基纤维素钠具有较高酶活力,对于降解木聚糖、燕麦秸秆、滤纸和果胶具有不明显酶活力,对于淀粉和麸皮没有降解活力,结果如表 2 所示。

表 2. Egn21 底物特异性检测

Table 2. Substrate specificity test of Egn21

Substrates	Specific activity/(U/mg protein)
Carboxymethylcellulose	105.95
Xylan	8.75
Starch	0
Pectin	0
Filter paper	0.42
Oat straw	1.83
Bran	0.64

2.2.3 Egn21 米氏常数测定: 经过双倒数法计算, Egn21 降解 CMC 的 K_m 值为 13.79 mg/mL, V_{max} 为 14.03 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ 。

2.2.4 金属离子对酶活力影响的测定: 对金属离

子检测结果显示: Co^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶活力没有明显影响,有研究表明 Co^{2+} 可能对稳定酶蛋白结构起到一定作用^[17],其他金属离子对 Egn21 酶活性有着不同程度的抑制作用,与相关文献结果类似^[18](图 5)。

2.3 Egn21 的鉴定

首先对 Egn21 的蛋白样品进行双向电泳检测结果显示: Egn21 的分子量为 44.25 kDa、等电点为 4.91(电泳图未给出);进行串联质谱分析先通过一级质谱获得蛋白的肽指纹图谱(PMF),再选取有代表性的肽段,进一步破碎后进行二级质谱检测,质谱图如图 6 所示,二级质谱获得 1 段多肽序列: KGAYAIIDPHNYGR。二级质谱结果结合母离子信息和 PMF 的结果进行搜库(NCBI)比较,经 Mascot 搜索引擎检索, Egn21 对应结果为 GH5 家族内切葡聚糖酶,与 Rosellinianecatrix (Sequence ID:dbj|GAP83786.1) 93%相似。该蛋白的分子量和等电点与双向电泳检测显示的 Egn21 分子量和等电点有一定差异;根据其酶学性质与报道的内切葡聚糖酶不同^[22]、质谱信息与 GH5 家族的内切葡聚糖酶相似,分子量和等电点与质谱结果对应的蛋白存在明显差异,综合上述研究结果,我们将 Egn21 鉴定为一种新型的 GH5 家族的内切葡聚糖酶。

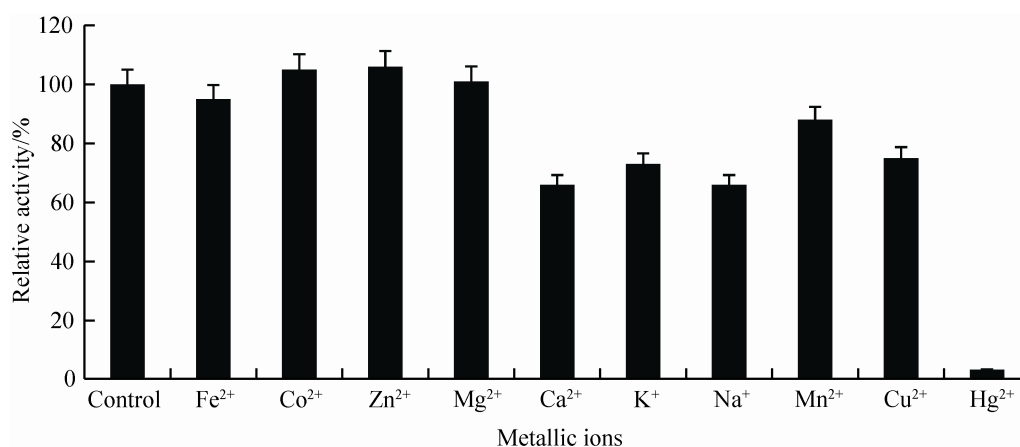


图 5. 金属离子对 Egn21 的 CMC 酶活力的影响

Figure 5. Effect of metal ions on CMCase activity of Egn21, each value in the panel represents the means ($n=3$).

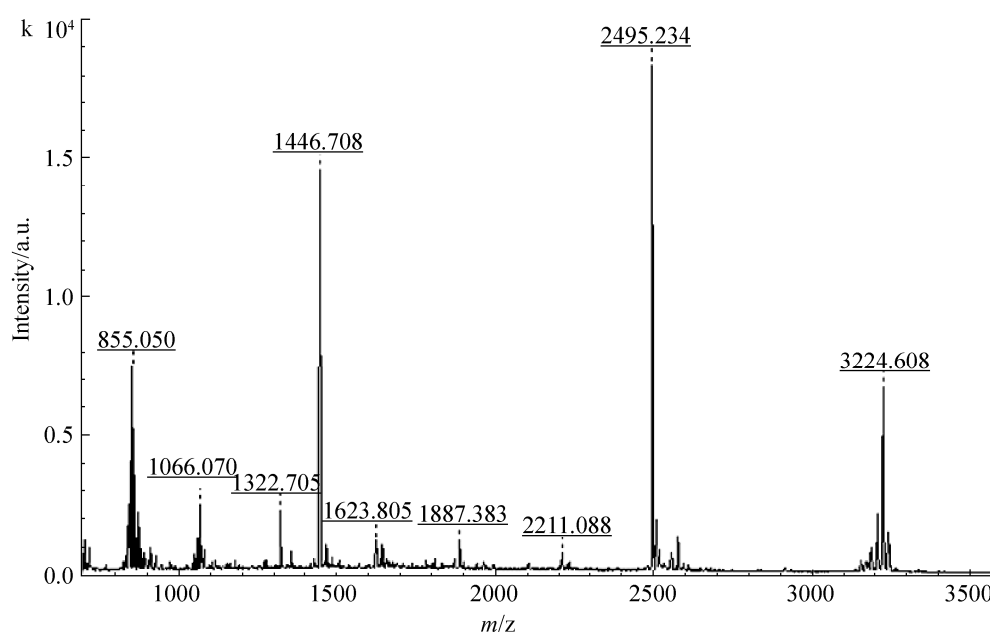


图 6. Egn21 质谱鉴定图谱

Figure 6. Identification of Egn21 by MADIL-TOF-TOF.

3 讨论

国内外已经报道了许多关于来源不同的纤维素酶分离、纯化及酶学特性的研究,但是对于镰刀菌的研究大多局限于其致病性的防治或对病虫害的防治方面^[19],而对利用镰刀菌产酶方面的研究甚少。镰刀菌侵染植物首先分泌各种酶破

坏细胞壁,前期实验发现与其他产植物细胞壁降解酶的镰刀菌相比,菌株 Q7-31T 粗酶液降解植物细胞壁的能力最高^[18]。实验室早前进行了比较蛋白组学研究,2015 年本团队发现胞外酶系主要为糖苷水解酶类,占到整个胞外蛋白分泌量的 40%,其中 GH5 家族的内切葡聚糖酶占到了 13%,在降解植物细胞壁时起到了重要的作用^[7];

Marx 等研究发现 GH5 家族, 在纤维素酶、半纤维素酶、碳水化合物转移酶等不同酶类家族中占核心地位^[20]。

田飞等在研究镰刀菌 Q7-31T 所产的纤维素酶系统中发现, 内切葡聚糖酶主要有两大家族 GH5 和 GH7。GH7 家族主要的酶为 Egn20^[14], 其产酶培养基蛋白浓度为 0.3%。在我们前期研究中发现不同蛋白浓度的培养基中产酶组分和活性都有明显的差异, 因此, 本研究我们选用 1%蛋白浓度培养基来研究不同纤维素酶组分, 并且分离纯化到 GH7 家族的 Egn21(本研究的工作)。

两种酶是存在差异的: Egn20 发酵培养基蛋白质浓度是 0.3%, 分级硫酸铵浓度 40%–90%; Egn21 发酵培养基蛋白质浓度是 1%; 分级硫酸铵浓度是 10%–50%。酶学性质分析, Egn20 与 Egn21 最适温度、pH 及稳定性相同; 纯化的两种酶对于羧甲基纤维素(CMC)有较高的降解活力, 对于其他底物有不明显的降解活力, Egn20 与 Egn21 均可以降解天然燕麦秸秆粉, 并最终产生还原性糖, 这与天然混合底物中存在两种酶特异性识别的底物位点而糖苷酶的专一性普遍不高有着必然的联系^[21]。经双倒数法计算, Egn21 与 Egn20 降解 CMC 的 K_m 值分别为 13.79 mg/mL 和 16.35 mg/mL, Egn21 在降解 CMC 时吸附底物的能力强于 Egn20, 田飞等研究蛋白组学时发现 GH5 家族内切酶的分泌量是 Egn20 的 2 倍^[7]。由此推断, 在降解植物细胞壁时 GH5 家族的内切葡聚糖酶起到关键作用, 这与刘晶晶等在木酶属中蛋白组学研究结果一致^[16]。

纯化的 Egn21 在高于 50 °C 时, 降解羧甲基纤维素钠的酶活力不足原有酶活力 40%, 温度耐力低, 对于工业应用比较不利。其原因是 Q7-31T 在海拔 3200 m 的青海湖生长, 年均温度 0.3–11.0 °C

之间, 所以培养出不耐高温的菌株。纯化的 Egn21 可以降解天然混合底物产生还原性糖, 并且对木聚糖也存在较弱的降解活力, 这可能与天然混合底物中存在 Egn21 特异性识别的底物位点以及糖苷酶的专一性普遍不高有关^[17]。

Egn21 的二级质谱鉴定对应结果为与注册号为 gi | 345566250 的糖苷水解酶相似, 得分为 36。根据 Mascot 的鉴定结果显示得分大于 45 才能说明为同一个蛋白 ($P < 0.05$), 此外, 其分子量 (44.25 kDa) 和等电点 (4.91) 与质谱结果对应的蛋白的分子量 (45.41 kDa) 和等电点 (6.91) 存在一定差异, 根据上述推测它们的序列相似但并不完全一致。Egn21 的酶学性质与报道的内切葡聚糖酶一致、质谱信息与 GH5 家族的内切葡聚糖酶相似, 而分子量和等电点与质谱结果对应的蛋白存在一定差异, 综合上述研究结果, 我们将 Egn21 鉴定为一种新的 GH5 家族的内切葡聚糖酶。

参考文献

- [1] Gao HY, Xie ZL, Tang YL, Wang H. Synergistic and antagonistic effects of fungi mixed cultivation from four different genus strains on degradability towards oat straw degradation. *Journal of Qinghai Normal University (Natural Science Edition)*, 2011, (1): 57–62. (in Chinese)
高海燕, 谢占玲, 汤易兰, 王欢. 混菌发酵降解燕麦秸秆及不同属真菌间的协同和拮抗作用研究. *青海师范大学学报 (自然科学版)*, 2011, (1): 57–62.
- [2] Zhang PP, Liu XH. Current situation and progress of biodegradation of cellulose. *Journal of Tianjin Agricultural College*, 2004, 11(3): 48–54. (in Chinese)
张平平, 刘宪华. 纤维素生物降解的研究现状与进展. *天津农学院学报*, 2004, 11(3): 48–54.
- [3] Wang WY, Zhu JH, Wu SY. Research progress of cellulose science and cellulase. *Journal of Jiangsu University of Science and Technology*, 1998, 19(3): 20–28. (in Chinese)
汪维云, 朱金华, 吴守一. 纤维素科学及纤维素酶的研究进展. *江苏理工大学学报*, 1998, 19(3): 20–28.

- [4] Gu FY, Chen ZY, Shi JJ, Qian SJ. Advances in cellulase and its development tendency. *Journal of Microbiology*, 2008, 28(1): 83–87. (in Chinese)
顾方媛, 陈朝银, 石家骥, 钱世均. 纤维素酶的研究进展与发展趋势. *微生物学杂志*, 2008, 28(1): 83–87.
- [5] Tian F, Xie ZL, Guo J, Zhao LZ, Han XB, Chang XY. Purification, identification and characterization of an endoglucanase Egn20 from *Fusarium* sp. Q7-31T. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(8): 1042–1049. (in Chinese)
田飞, 谢占玲, 郭璟, 赵联正, 韩兴宝, 常鑫园. 镰刀菌 Q7-31T 内切葡聚糖酶 Egn20 的分离纯化鉴定及酶学特性. *微生物学报*, 2015, 55(8): 1042–1049.
- [6] 田飞. 镰刀菌 Q7-31T 植物细胞壁降解酶协同作用研究. 青海大学硕士学位论文, 2015.
- [7] Tian F, Xie ZL, Zhao LZ, Guo J, Han XB, Xie LF, Wang Y, Chang XY. Comparative secretome analysis of *Fusarium* sp. Q7-31T during liquid fermentation using oat straw as a carbon source. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(4): 2131–2140.
- [8] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426–428.
- [9] Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation//Walker JM. The Protein Protocols Handbook. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1996: 15–20.
- [10] Chandra M, Kalra A, Sangwan NS, Sangwan RS. Biochemical and proteomic characterization of a novel extracellular β -glucosidase from *Trichoderma citrinoviride*. *Molecular Biotechnology*, 2013, 53(3): 289–299.
- [11] Yang XZ, Shi PJ, Huang HQ, Luo HY, Wang Y, Zhang W, Yao B. Two xylose-tolerant GH43 bifunctional β -xylosidase/ α -arabinosidases and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan. *Food Chemistry*, 2014, 148: 381–387.
- [12] Hu JG, Arantes V, Pribowo A, Saddler JN. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 112.
- [13] Terova G, Pisanu S, Roggio T, Preziosa E, Saroglia M, Addis MF. Proteomic profiling of sea bass muscle by two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(1): 311–322.
- [14] Brown JR, Dinu V. High performance computing methods for the integration and analysis of biomedical data using SAS. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 2013, 112(3): 553–562.
- [15] Huang Y, Ling M, Qin YL, Liang ZQ. Cloning and expression of endoglucanase I of *T. Knoningii*. *Biotechnology*, 2008, 18(2): 10–13. (in Chinese)
黄艳, 凌敏, 覃拥灵, 梁智群. 康氏木霉内切葡聚糖酶 (EGI)基因的克隆及表达. *生物技术*, 2008, 18(2): 10–13.
- [16] Liu JJ, Cao XJ. Biodegradation of cellulose by β -glucosidase and cellulase immobilized on a pH-responsive copolymer. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2014, 19(5): 829–837.
- [17] Karnchanatat A, Petsom A, Sangvanich P, Piapukiew J, Whalley AJS, Reynolds CD, Gadd GM, Sihanonth P. A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.: Fr.) Rehm. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 42(5): 404–413.
- [18] Xie ZL, Gao HY, Zhang Q, Wang H, Liu Y. Cloning of a novel xylanase gene from a newly isolated *Fusarium* sp. Q7-31 and ITS expression in *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43(1): 405–417.
- [19] Zhang YP. The research advance of biosynthesis and regulation mechanism on *Fusarium* mycotoxins. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(3): 311–316. (in Chinese)
张岳平. 镰刀菌真菌毒素产生与调控机制研究进展. *生命科学*, 2011, 23(3): 311–316.
- [20] Marx IJ, van Wyk N, Smit S, Jacobson D, Viljoen-Bloom M, Volschenk H. Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 172.
- [21] Wang LS, Zhang YZ, Gao PJ, Shi DX, Liu HW, Gao HJ. Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 93(3): 443–456.
- [22] Ghatge SS, Telke AA, Kang SH, Arulalapperumal V, Lee KW, Govindwar SP, Um Y, Oh DB, Shin HD, Kim SW. Characterization of modular bifunctional processive endoglucanase Cel5 from *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(10): 4421–4435.

Purification and characterization of endoglucanase Egn21 from *Fusarium* sp. Q7-31T

Xinyuan Chang, Zhanling Xie^{*}, Fengmei Zhang, Jieqiong Lei, Rongwei Cui, Shouyi Nie

State Key Laboratory of Breeding Base for Innovation and Utilization of Plateau Crop Germplasm, College of Ecological and Environment Engineering, University of Qinghai, Xining 810016, Qinghai Province, China

Abstract: [Objective] The objective of this research was to study plant cell wall degradation enzymes from *Fusarium* sp. Q7-31T. [Methods] Strain was cultured in liquid medium with 1% (W/V) peptone as nitrogen source, 0.5% (W/V) oat straw as carbon source, 120 r/min shaking at 20 °C for 3 days. The endoglucanase Egn21 was purified by using Sephacry S-100 chromatography and DEAE-sepharose ion-exchange column chromatography. Then the enzymatic properties and MADIL-TOF-TOF identification were analyzed. [Results] The molecular weight and isoelectric point (pI) of Egn21 was 44.25 kDa and 4.91, respectively. Egn21 had optimal activity with carboxymethyl cellulose at 40 °C and pH 6.0, stable at 45 °C and pH between 5.0 and 8.0, inhibited by Fe²⁺, Ca²⁺, K⁺, Na⁺, Mn²⁺ and inactivated by Hg²⁺, whereas Co²⁺, Zn²⁺ and Mg²⁺ had no effect. [Conclusion] The enzymatic properties and MADIL-TOF-TOF results suggested that Egn21 belongs to GH5 family.

Keywords: *Fusarium* sp., endoglucanase, protein purification, identification, enzymatic properties

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31560028) and by the Qinghai Science and Technology Department Project (2014-zj-903)

*Corresponding author. Fax: +86-971-5310086; E-mail: xiezhanling2012@126.com

Received: 11 April 2016; Revised: 20 June 2016; Published online: 19 July 2016