

康氏木霉诱变菌株纤维素酶系的分离纯化与酶学特性研究

葛飞, 石贝杰, 唐尧, 朱龙宝, 李婉珍, 陶玉贵

(安徽工程大学生物与化学工程学院, 安徽芜湖 241000)

摘要: 探讨来源于康氏木霉诱变菌株 SG0026 10L 发酵罐发酵液中纤维素酶系的分离纯化过程及其酶学性质。采用硫酸铵盐析、Sephadex G-100 凝胶过滤、DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析柱和 CM-Sepharose FF 阳离子交换层析等分离纯化技术, 从康氏木霉诱变菌株发酵液中分离纯化得到 3 个电泳纯的纤维素酶系组分(内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶)。对纯化的电泳纯内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的酶活进行测定, 发现 3 种酶的比活力分别为 4.67 ± 0.06 IU/mg、 5.16 ± 0.08 IU/mg 和 12.52 ± 0.12 IU/mg。采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)确定其分子量, 发现其分子量分别为 78.1、91.2 和 83.1 kDa。利用 Lineweaver-Burk 法对 3 种酶的动力学参数进行测定, 发现 3 种酶的 K_m 值分别为 3.84、6.62 和 6.21 mg/mL, V_{max} 值分别为 2.29、1.74 和 2.19 mg/(min mL)。在此基础上, 对 3 种酶的反应温度和 pH 进行了研究, 发现 3 种酶的最适反应温度分别为 50、50 和 55 $^{\circ}\text{C}$, 最适反应 pH 均为 5.0。

关键词: 纤维素酶; 康氏木霉; 纯化; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2015)12-149-155

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.022

Isolation, Purification, and Enzymatic Properties of Cellulase System in Mutant Strain *Trichoderma koningii* SG0026

GE Fei, SHI Bei-jie, TANG Yao, ZHU Long-bao, LI Wan-zhen, TAO Yu-gui

(Department of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China)

Abstract: Cellulase purification from the broth of the mutant strain *Trichoderma koningii* SG0026 allowed for the investigation of the enzymatic properties of its cellulase system. Three electrophoretically pure components of the cellulase system (endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase, and β -glucosidase) were isolated and purified from the broth of the mutant strain *Trichoderma koningii* SG0026 by a combination of ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-100 gel filtration, DEAE-Sepharose FF anion exchange column chromatography, and CM-Sepharose FF cation exchange chromatography. The specific enzyme activities of electrophoretically pure endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase, and β -glucosidase were measured to be 4.67 ± 0.06 , 5.16 ± 0.08 , and 12.52 ± 0.12 IU/mg, respectively. The relative molecular masses of three cellulases were measured by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and were 78.1, 91.2, and 83.1 kDa, respectively. The Lineweaver-Burk method was used to calculate the kinetic parameters of the three cellulases; the K_m values for endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase, and β -glucosidase were 3.84, 6.62, and 6.21 mg/mL, respectively and the V_{max} values were 2.29, 1.74, and 2.19 mg/(min mL), respectively. Based on the results, the reaction temperature and pH of these three cellulases were determined. The optimal temperatures for endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase, and β -glucosidase were 50, 50, and 55 $^{\circ}\text{C}$, respectively, and their optimum pH values were 5.0.

Key words: cellulase; *Trichoderma koningii*; purification; enzymatic properties

纤维素是地球上最丰富的能源, 纤维素酶可将木质纤维材料中的纤维素和半纤维素转化为葡萄糖, 进

收稿日期: 2015-05-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270135); 安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目(KJ2013A049)

作者简介: 葛飞(1978-), 男, 副教授, 博士研究生, 研究方向为微生物资源开发与利用。

而发酵为燃料乙醇等, 广泛用于食品、发酵、纺织等工业领域, 有效解决能源短缺、环境污染等问题^[1-4]。纤维素酶是一种复合酶系, 包括内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶, 三种酶协同作用水解纤维素^[5-6]。由于纤维素酶系的复杂性, 使其相关组分不易分离、纯化, 另外只有分离、纯化出纯酶, 才能对酶系各组分的功能、作用以及协同作用机制加以阐释,

为进一步的基因克隆、分子改造、规模化生产、降低生产成本提供理论依据,因此加强对不同来源纤维素酶系的分离、纯化具有重要的理论意义和应用价值。

目前,国内外学者已发现有近百种微生物可以产生纤维素酶,其中木霉属(*Trichoderma* sp.)是公认的产纤维素酶最高的菌种之一^[7]。康氏木霉纤维素酶的相关研究已有报道。Halliwell等利用康氏木霉纤维素酶,从棉花纤维中制备出寡纤维素,并通过DEAE-Sephadex等技术分离出C₁-纤维素酶和CM-纤维素酶^[8]。Wang等从纤维素中酸解获得一种纤维寡糖GX,发现其对康氏木霉纤维素酶具有诱导作用^[9]。覃益民等从康氏木霉发酵液中分离纯化出 β -葡萄糖苷酶和一种纤维素酶协同增效蛋白^[10]。但从康氏木霉诱变菌株发酵液中同时分离、纯化内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶3种酶,并对其酶学性质进行初步研究的相关文献未见报道。本文在前期研究的基础上,对一株产纤维素酶的康氏木霉诱变菌株分泌的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶以及 β -葡萄糖苷酶进行分离纯化,并对纯化得到的三种酶的酶学性质进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 菌株及其来源

康氏木霉(*Trichoderma koningii*)诱变菌株SG0026,安徽工程大学微生物发酵安徽省工程技术研究中心保藏。

1.1.2 主要试剂与仪器设备

硫酸铵、KH₂PO₄、MgSO₄、CaCl₂、DNS试剂、Tween-80 购于国药集团分析纯;考马斯亮蓝G-250,蛋白分子质量Marker 购于Takara公司;透析袋、0.45 nm超滤膜购于上海Sangon公司;DEAE-SepharoseFF、CM-SepharoseFF、Sephadex G-100 购于GE公司;AKTA avant全自动蛋白质分离纯化仪,美国通用电气医疗集团;L5型紫外可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;DYCP-31DN电泳仪,北京市六一仪器厂;JS-380C全自动数码凝胶成像分析仪,上海培清科技有限公司;BIOTECH-10JSA 3L-10L发酵罐,上海保兴生物设备工程有限公司。

1.1.3 培养基

斜面活化培养基:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 15 g/L, MgSO₄ 1.5 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, 自然 pH。

摇瓶种子培养基: 100 g 麸皮,沸水煮 30 min, 4层纱布过滤,定容至 1000 mL。

液体发酵培养基: 豆渣 1.7 g/L, 稻草秸秆 10 g/L, 尿素 1.7 g/L, KH₂PO₄ 1.1 g/L, Tween-80 0.27 mL/L, MgSO₄ 1.5 g/L, CaCl₂ 3 g/L, pH 为 5.0。

1.2 试验方法

1.2.1 康氏木霉诱变菌株 SG0026 10L 发酵罐培养方法

将康氏木霉诱变菌株 SG0026 摇瓶发酵液按 10% 接种量接种至 3 L 发酵罐, 30 °C 下培养 36 h 后, 按 10% 接种量转种至 10 L 发酵罐, 发酵罐培养基按 1.1.3 中液体发酵培养基配方进行配置, 30 °C 下培养 96 h, pH 5.0, 通气量为 1:1v/v min。

1.2.2 粗酶液的制备

用饱和度为 70% 的硫酸铵 4 °C 下处理发酵液, 3000 r/min 离心 20 min, 取沉淀, 用 0.05 M、pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液溶解沉淀。在 2 L 的烧杯中加入 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 再将盐析后的蛋白装入透析袋(使用前用水反复冲洗干净)中, 12 h 换一次缓冲溶液, 反复 3 次后, 将透析袋放入 30% 聚乙二醇溶液中浓缩至适当浓度, 即为粗酶液。

1.2.3 Sephadex G-100 凝胶过滤层析

称取 10g Sephadex G-100 干粉放入 500 mL 加有蒸馏水的烧杯中, 在沸水浴中热膨胀 4 h, 静置冷却到室温后, 用蒸馏水清洗, 脱气, 用蒸馏水将柱子内壁润湿, 然后加入 1/4 柱体积 pH 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 然后将处理好的凝胶一并倒入柱中, 等到凝胶慢慢下沉, 然后将柱子上端的帽子拧好, 再用 pH 4.8、0.05 M 的柠檬酸缓冲液平衡。等凝胶完全下沉, 将 1.2.2 中的粗酶液沿柱子内壁缓缓加入, 上样量为 4 mL。上样结束后, 用 0.05 M、pH 4.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液进行洗脱, 洗脱速度 0.25 mL/min, 打开色谱工作站, 收集具有纤维素酶活的洗脱蛋白峰, 保存备用。

1.2.4 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析

用 0.05 M、pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液平衡 DEAE-Sepharose FF 离子交换柱, 缓慢上样(1.2.3 中收集的蛋白样), 上样量为 20 mL, 使蛋白样与层析柱充分结合。用含 0.1~1 M NaCl 的 0.05 M、pH 4.8 Tris-HCl 缓冲液进行 0.05 M 梯度洗脱, 每个梯度共洗脱约 5 个柱体积, 流速为 0.25 mL/min。收集具有酶活力的蛋白峰, 保存备用。

1.2.5 CM-Sepharose FF 阳离子交换层析柱

用 0.05M 的醋酸-醋酸钠缓冲液平衡离子交换柱, 直至流出液的 pH 为 4.8, 将 1.2.4 中收集的蛋白样过 0.45 nm 超滤膜后, 缓慢上样, 使蛋白样与柱子充分结合。将过完 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析柱

后的蛋白通过 CM-SepharoseFF 阳离子交换层析柱, 用含 0.1~1 M NaCl 的 0.05 M、pH 4.8 醋酸-醋酸钠缓冲液进行 0.05 M 梯度洗脱, 每个梯度共洗脱约 5 个柱体积, 流速为 0.25 mL/min。收集具有酶活力的蛋白峰, 保存备用。

1.2.6 蛋白质标准曲线

蛋白质标准曲线的绘制, 采用考马斯亮蓝法^[11,12]。取 6 支 10mL 干净试管, 分别取标准蛋白样 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mL, 蒸馏水 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2 和 0 mL, 盖塞后混匀, 放置 2 min 后, 在 595 nm 波长下测定 OD 值。

以牛血清白蛋白含量($\mu\text{g/mL}$)为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 如图 1 所示。牛血清蛋白浓度在 0~120 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内, 线性关系良好, 回归方程为: $y=0.006x$, 相关系数 $R^2=0.9997$ 。

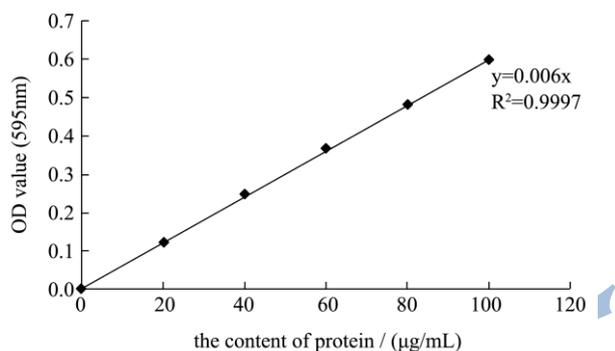


图 1 蛋白质标准曲线

Fig.1 Standard curve for the protein concentration

1.2.7 蛋白质纯度及分子量测定

采用 SDS-PAGE 法^[13]。配制分离胶以后, 将待测蛋白和上样缓冲液按 5:1 的比例混合, 100 °C 下热变性 5 min, 上样。加入电泳缓冲液, 用移液枪将标准蛋白 Marker 和待测蛋白加到点样孔中(约 20 μL)。接通电源, 调节电压为 80 V, 30 min 后, 将电压调到 120 V。当染料到达底部时, 关闭电源。取出胶, 用 1% 的考马斯亮蓝染色液染色 30 min, 再用脱色液脱色 12 h 以上。

1.2.8 内切葡聚糖酶酶活测定

采用 DNS 法^[14], 取适当稀释的粗酶液和 pH 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液各 0.5 mL, 加入 1.0 mL 以 0.05 M、pH 4.8 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 1% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 作为底物, 50 °C 水浴反应 30 min 后, 加入 3.0 mL DNS 试剂, 加热 10 min, 冷却至室温后, 加水稀释到 25.0 mL, 于 540 nm 处测量 OD 值。

1.2.9 外切葡聚糖酶酶活测定

取适当稀释的粗酶液和 pH 4.8 的柠檬酸-柠檬酸

钠缓冲液各 0.5 mL, 加入 1.0 mL 以 0.05 M、pH 4.8 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 1% 微晶纤维素作为底物, 50 °C 水浴反应 30 min 后, 加入 3.0 mL DNS 试剂, 加热 10 min, 冷却至室温后, 加水稀释到 25.0 mL, 于 540 nm 处测量 OD 值。

1.2.10 β -葡萄糖苷酶酶活测定

取适当稀释的粗酶液和 pH 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液各 0.5 mL, 加入 1.0 mL 以 0.05 M、pH 4.8 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 1% 水杨苷作为底物, 50 °C 水浴反应 30 min 后, 加入 3.0 mL DNS 试剂, 加热 10 min, 冷却至室温后, 加水稀释到 25.0 mL, 于 540 nm 处测量 OD 值。

酶活力单位定义: 在酶的最适催化条件下, 每分钟催化 1 μmol 的底物转化为产物需要的酶量为 1 个酶活单位 IU。

1.2.11 酶的最适反应温度

分别取电泳纯的酶液和柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 0.5 mL, 1.0 mL 1% CMC-Na, 1.0 mL 1% 微晶纤维素, 1.0 mL 1% 水杨苷于比色管中, 在 20~80 °C 条件下分别反应 30 min 后加 3.0 mL DNS, 沸水煮 10 min, 冷却至室温后加水稀释到 25.0 mL, 于 540 nm 处测量 OD 值。以最高酶活为 100%。其余折算为最高活力的百分数, 以温度为横坐标, 最高活力的百分数为纵坐标。分别绘制内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的酶活力对温度曲线。

1.2.12 酶的最适反应 pH

将纯化后酶液的 pH 调至 3.0~8.0, 用上述各 pH 的缓冲液分别配制 1% 的 CMC-Na 底物溶液, 1% 的微晶纤维素底物溶液和 1% 的水杨苷底物溶液, 在 50 °C 下反应 30 min。分别测定不同 pH 值下内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶酶活, 以最高酶活为 100%, 其余折算为最高活力的百分数, 以 pH 为横坐标, 最高活力的百分数为纵坐标。分别绘制内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的酶活力对 pH 曲线。

1.2.13 酶反应动力学常数 K_m 及 V_{max} 的测定

用 0.02 M、pH 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制浓度分别为 1.0%、0.8%、0.6%、0.4% 和 0.2% 的 CMC-Na 底物、微晶纤维素底物和水杨苷底物, 50 °C 下反应 30 min, 依次测定内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶酶活, 测定酶的反应初速度, 根据 Lineweaver-Burk 作图法^[15]求出内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的 K_m 值及 V_{max} 值。

1.2.14 数据分析

采用 Origin8.5 软件进行绘图, SPSS19.0 软件对

数据进行处理分析。

2 结果与讨论

2.1 硫酸铵分级沉淀

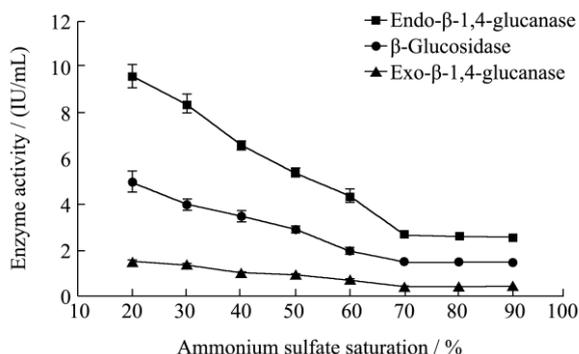


图2 硫酸铵浓度对纤维素酶组分沉淀的影响

Fig.2 Effect of ammonium sulfate concentration on the precipitation of cellulase components

由图2可知,内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶三种酶的沉淀效果,随不同硫酸铵饱和度的变化趋势基本相同。硫酸铵饱和度在20~70%时,上清液中酶活逐渐减小。当硫酸铵浓度为70%时,上清液中内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶三种酶的酶活分别为3.02、0.51和1.72 IU/mL。硫酸铵饱和度在70~90%时,上清液中三种酶的酶活变化不明显。因此,选择饱和度为70%的硫酸铵溶液来沉淀康氏木霉发酵液。

2.2 Sephadex G-100 凝胶过滤层析

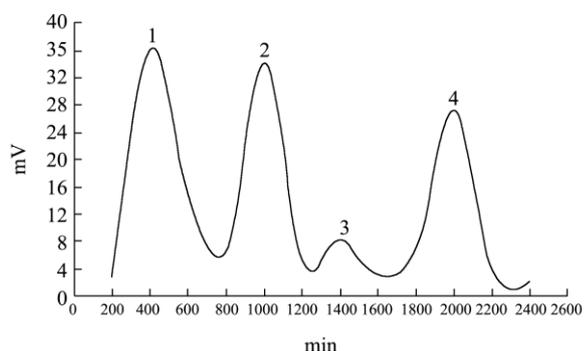


图3 纤维素酶粗酶液 Sephadex G-100 分子筛洗脱图谱

Fig.3 Elution profile of crude cellulase components from SephadexG-100 gel filtration chromatography

将经硫酸铵沉淀后的蛋白质,用 Tris-HCl 缓冲液溶解、盐析和聚乙二醇包埋法浓缩处理的粗酶液,过 Sephadex G-100 凝胶过滤层析柱,共得到四个洗脱蛋白峰,结果如图3所示。经检测,蛋白峰3无纤维素酶活性,为杂蛋白。蛋白峰1、2和4均有较高的纤维

素酶活,其中蛋白峰1和2主要含有内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶,而蛋白峰4中主要含内切葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶。

2.3 DEAE-SepharoseFF 阴离子交换层析

将过完 Sephadex G-100 凝胶过滤层析柱的蛋白峰1、2和4合并,上样于 DEAE-SepharoseFF 阴离子交换层析柱,并进行洗脱,洗脱曲线如图4所示。经检测,蛋白峰1无酶活,蛋白峰2和3含有β-葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶,蛋白峰4仅含外切葡聚糖酶。

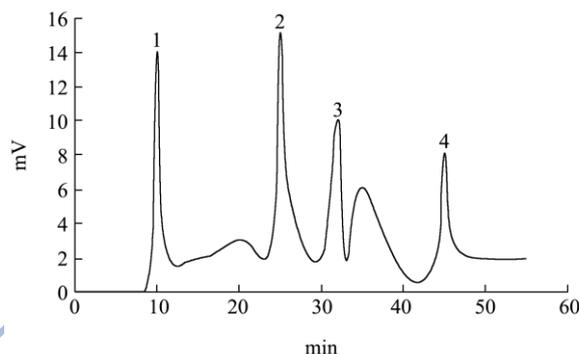


图4 蛋白峰1、2和4(图3)合并液 DEAE-SepharoseFF 阴离子交换层析洗脱图谱

Fig.4 Elution profile for combined fractions of protein peaks 1, 2, and 4 (Fig. 3) based on DEAE Sepharose Fast Flow anion exchange column chromatography

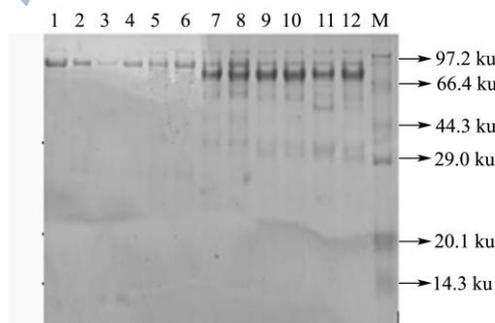


图5 蛋白峰2和3(图4)合并液及蛋白峰4(图4)电泳图
Fig.5 SDS-PAGE image of protein peak 4 (Fig. 4) and combined fractions of protein peaks 2 and 3

注:1~6泳道为洗脱峰4(图4)蛋白;7~12泳道为洗脱峰2和3(图4)合并蛋白;13泳道为标准蛋白 marker。

用 SDS-PAGE 法检测,经 DEAE-SepharoseFF 阴离子交换层析柱纯化后收集的蛋白峰纯度,结果如图5所示。1-6泳道均为蛋白峰4的凝胶成像图,为单一条带,表明该组分已达电泳纯,分子量大小约为91.2 kDa,为外切葡聚糖酶,比活力为 5.16 ± 0.08 IU/mg;7到12泳道含内切葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶。

2.4 CM-SepharoseFF 阳离子交换层析

由于在 DEAE-SepharoseFF 阴离子交换层析柱上, β -葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶基本上同时被洗脱下来, 两种酶的等电点均在 7.0 附近, 因此在溶液 pH 为 7.0 时, 不适合用阴离子交换柱进行分离纯化。基于以上分析, 考虑用 CM-Sepharose FF 阳离子交换层析柱对蛋白峰 2 和 3 (图 4) 的合并液进行进一步的分离纯化, 结果如图 6 所示。经检测, 蛋白峰 1 仅含 β -葡萄糖苷酶, 蛋白峰 2 仅含内切葡聚糖酶。

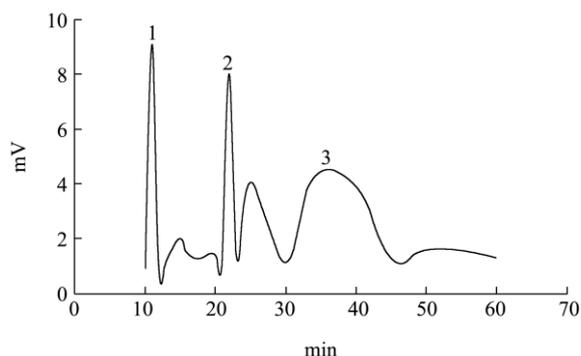


图 6 蛋白峰 2 和 3 (图 4) 合并液 CM-SepharoseFF 阳离子交换层析洗脱图谱

Fig.6 Elution profile for the combined fractions of protein peaks 2 and 3 (Fig. 4) based on CM-Sepharose Fast Flow cation exchange column chromatography

用 SDS-PAGE 法检测, 经 CM-SepharoseFF 阳离子交换层析柱纯化后收集的蛋白峰 1 和 2 纯度, 结果如图 7 所示。图 7a 中, 1-2 泳道为蛋白峰 1 (图 6) 的凝胶成像图, 为单一条带, 表明该组分已达电泳纯, 分子量大小约为 83.1 ku, 为 β -葡萄糖苷酶, 比活力为 12.52 ± 0.12 IU/mg。图 7b 中, 1-3 泳道为蛋白峰 2 (图 6) 的凝胶成像图, 为单一条带, 表明该组分已达电泳

纯, 分子量大小约为 78.1 ku, 为内切葡聚糖酶, 比活力为 4.67 ± 0.06 IU/mg。

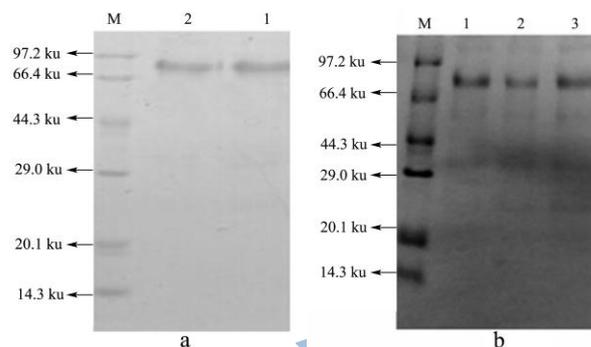


图 7 蛋白峰 1 和 2 (图 6) 电泳图

Fig.7 SDS-PAGE images of purified protein peaks 1 and 2 (Fig. 6)

注: a 图, M 为标准蛋白 marker, 1~2 泳道为洗脱峰 1 (图 6) 蛋白; b 图, M 为标准蛋白 marker, 1~3 泳道为洗脱峰 2 (图 6) 蛋白。

2.5 康氏木霉诱变菌株产纤维素酶系分离纯化结果

2.5.1 外切葡聚糖酶分离纯化结果

由表 1 可知, 外切葡聚糖酶粗酶液, 经硫酸铵沉淀后, 总蛋白含量为 41.82 mg, 酶活力为 18.29 IU。然后经过 Sephadex G-100 凝胶过滤层析和 DEAE-SepharoseFF 阴离子交换层析后, 外切葡聚糖酶纯化了 9.31 倍, 总蛋白质量为 0.72 mg, 酶活力为 1.10 IU, 酶比活力为 5.16 IU/mg, 表明纯化效果良好。

2.5.2 内切葡聚糖酶分离纯化结果

表 1 外切葡聚糖酶的分离纯化

Table 1 Purification of exo- β -1,4-glucanase

纯化步骤	总蛋白/mg	总活力/IU	比活力/(IU/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	57.13	27.11	0.21	1	100
硫酸铵沉淀	41.82	18.29	0.74	1.54	85.21
Sephadex G-100 凝胶过滤层析	19.78	4.14	4.29	5.42	17.34
DEAE-SepharoseFF 阴离子交换层析	0.72	1.10	5.16	9.31	15.25

表 2 内切葡聚糖酶的分离纯化

Table 2 Purification of endo- β -1,4-glucanase

纯化步骤	总蛋白/mg	总活力/IU	比活力/(IU/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	56.12	19.31	3.31	1	100
硫酸铵沉淀	41.12	15.33	3.73	6.23	75.33
Sephadex G-100 凝胶过滤层析	26.17	13.29	7.12	10.77	44.19
DEAE-SepharoseFF 阴离子交换层析	15.31	6.23	7.41	23.15	22.83
DEAE-SepharoseFF 阳离子交换层析	8.12	2.12	4.67	31.12	10.73

从表 2 可以看出, 内切葡聚糖酶纯化倍数随纯化

步骤逐步提高, 但在经 DEAE-SepharoseFF 阳离子交

换层析纯化之后, 内切葡聚糖酶比活力为 4.67 IU/mg 反而小于经 Sephadex G-100 凝胶过滤层析后的 7.12 IU/mg 和 DEAE-SepharoseFF 阴离子交换层析后的 7.41 IU/mg。造成这种现象的原因可能是经 Sephadex G-100 凝胶过滤层析和 DEAE-SepharoseFF 阴离子交换层析后的洗脱峰中, 内切葡聚糖和 β -葡萄糖苷酶同

时存在, 由于这两种酶之间存在协同水解作用, 酶活测定时表现出较高的活力。当两个组分经 DEAE-SepharoseFF 阳离子交换层析分离后, 再测定酶活时, 由于失去了 β -葡萄糖苷酶的协同水解作用, 进而表现出较低的酶活。

2.5.3 内切葡聚糖酶分离纯化结果

表 3 β -葡萄糖苷酶的分离纯化

Table 3 Summary of purification of β -glucosidase from *Trichoderma koningii*

纯化步骤	总蛋白/mg	总活力/IU	比活力/(IU/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	54.62	21.34	0.42	1	100
硫酸铵沉淀	42.66	17.21	3.24	7.12	73.21
Sephadex G-100 凝胶过滤层析	20.01	9.21	7.21	16.62	34.32
DEAE-SepharoseFF 阴离子交换层析	1.72	6.12	10.01	23.52	25.53
DEAE-SepharoseFF 阳离子交换层析	0.23	1.32	12.52	32.16	19.26

表 3 数据显示, 纤维素酶粗酶液中 β -葡萄糖苷酶经硫酸铵沉淀、Sephadex G-100 凝胶过滤层析、DEAE-SepharoseFF 阴离子交换层析和 DEAE-SepharoseFF 阳离子交换层析后比活力达到了 12.52 IU/mg, 纯化倍数达 32.16 倍。

2.6 纤维素酶最适反应温度

将纯化后的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶酶液, 在不同温度 (20~80 °C 区间范围内, 每隔 5 °C 取一个测量点) 下反应, 测定酶活确定最适反应温度, 结果如图 8 所示。内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶的最适反应温度为 50 °C, β -葡萄糖苷酶的最适反应温度为 55 °C。

2.7 纤维素酶最适反应 pH

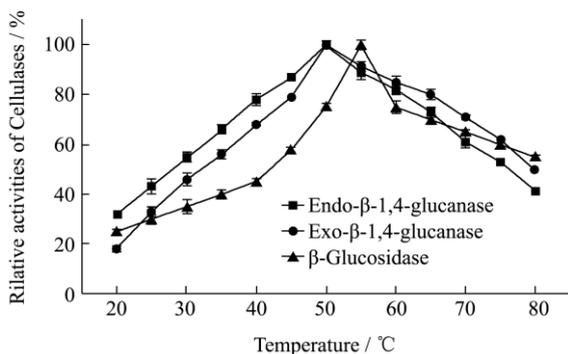


图 8 温度对纤维素酶活的影响

Fig.8 The effect of temperature on the activity of cellulases

将纯化后的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶酶液, 在不同 pH (3.0~8.0 区间范围内, 每隔 1.0 取一个测量点) 条件下反应 30 min, 测定酶活确定最适反应 pH, 结果如图 9 所示。由图 9 可见, 内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶最适反应

pH 均为 5.0。

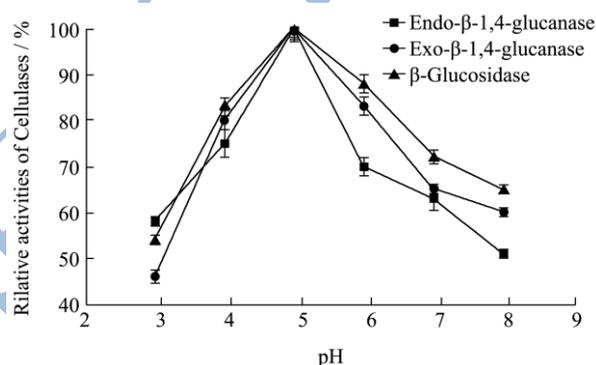


图 9 pH 对纤维素酶活的影响

Fig.9 The effect of pH on the activity of cellulases

2.8 酶的动力学参数 K_m 及 V_{max} 的测定

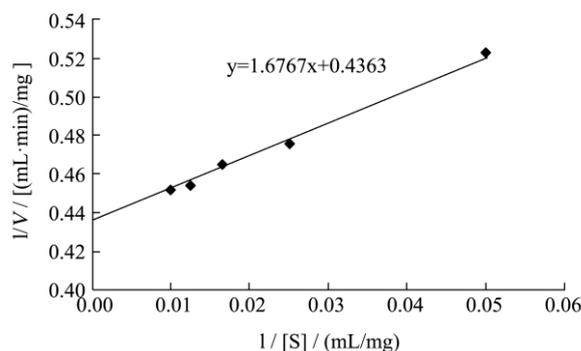


图 10 内切葡聚糖酶的 Lineweaver-Burk 图

Fig.10 The Lineweaver-Burk plot for endo- β -1,4-glucanase

将稀释的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的纯酶液分别与不同浓度的 CMC-Na、微晶纤维素和水杨苷底物反应, 测定生成的还原糖量。根据 Lineweaver-Burk 作图法 (图 10、11 和 12), 分别求出三种酶的 K_m 值及 V_{max} 值, 内切葡聚糖酶的 K_m 值为 3.84 mg/mL, V_{max} 为 2.29 mg/(min mL); 外切

葡聚糖酶的 K_m 值为 6.62 mg/mL, V_{max} 为 1.74 mg/(min mL); β -葡萄糖苷酶的 K_m 值为 6.21 mg/mL, V_{max} 为 2.19 mg/(min mL)。

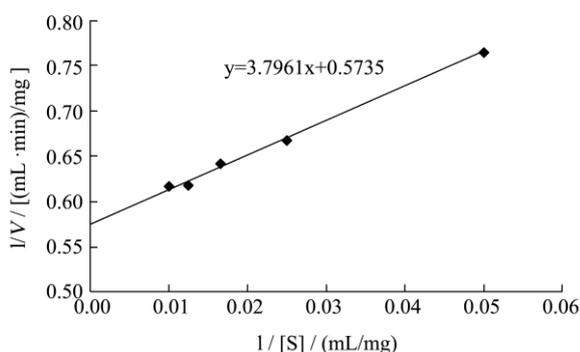


图 11 外切葡聚糖酶的 Lineweaver-Burk 图

Fig.11 The Lineweaver-Burk plot for exo- β -1,4-glucanase

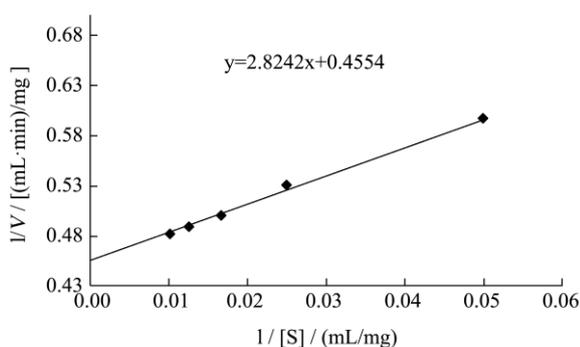


图 12 β -葡萄糖苷酶的 Lineweaver-Burk 图

Fig.12 The Lineweaver-Burk plot for β -glucosidase

3 结论

3.1 木霉诱变菌株 SG002610L 发酵罐发酵液, 采用一系列分离纯化技术, 获得了电泳纯的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶。经测定, 内切葡聚糖酶比活力为 4.67 ± 0.06 IU/mg, 相对分子量约为 78.1 ku; 外切葡聚糖酶比酶活为 5.16 ± 0.08 IU/mg, 相对分子量约为 91.2 ku; β -葡萄糖苷酶比酶活为 12.52 ± 0.12 IU/mg, 相对分子量约为 83.1 ku。严芬等从绿色木霉发酵液中分离纯化得到了 4 个电泳纯的内切葡聚糖酶组分, 最大分子量仅为 60.5 ku, 小于本文获得的内切葡聚糖酶的分子量 78.1 ku^[16]。Beldman 从绿色木霉中分离得到了 3 个外切葡聚糖组分, 最大分子量为 76 ku, 小于本文获得的外切葡聚糖酶的分子量 91.2 ku^[17]。覃益民等从康氏木霉发酵液中分离得到 1 个 β -葡萄糖苷酶, 分子量约为 61.8 ku, 小于本文获得的 β -葡萄糖苷酶的分子量 83.1 ku^[10]。与相关文献对比我们发现, 本文分离获得的康氏木霉诱变菌株 SG0026 产生的纤维素酶系的分子量偏大, 不同于其它微生物来源的纤维素酶系, 这为更好地对纤维素酶系开展理论

和应用基础研究提供了实验和理论依据。

3.2 在此基础上, 对以上三种酶的酶学性质进行了初步研究, 内切葡聚糖酶反应的最适温度为 50 °C, 最适 pH 为 5.0, K_m 值为 3.84 mg/mL, V_{max} 值为 2.29 mg/(min mL); 外切葡聚糖酶反应的最适温度为 50 °C, 最适 pH 为 5.0, K_m 值为 6.62 mg/mL, V_{max} 值为 1.74 mg/(min mL); β -葡萄糖苷酶反应的最适温度为 55 °C, 最适 pH 5.0, K_m 值为 6.21 mg/mL, V_{max} 值为 2.19 mg/(min mL)。

参考文献

- [1] HUANG Y P, QIN X L, LUO X M, et al. Efficient enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse pulp for ethanol production by cellulase from *Penicillium oxalicum* EU2106 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* ZM1-5 [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2015, 77: 53-63
- [2] 张鹤, 佟心洁, 庞春生, 等. 纤维素酶酶解玉米秸秆新型蒸煮浆的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(2): 182-186
ZHANG He, TONG Xin-jie, PANG Chun-sheng, et al. Research of enzymatic hydrolysis of corn stalk pulp with new cooking method [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(2): 182-186
- [3] VAN DYK J, PLETSCHKE B. A review of lignocellulase bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-factors affecting enzymes, conversion and synergy [J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1458-1480
- [4] Thomas L, Joseph A, Gottumukkala L D. Xylanase and cellulase systems of *Clostridium* sp.: An insight on molecular approaches for strain improvement [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 158: 343-350
- [5] Johnson E A, Sakajoh M, Halliwell G, et al. Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43(5): 1125-1132
- [6] Vazana Y, Morais S, Barak Y, et al. Designer cellulosomes for enhanced hydrolysis of cellulosic substrates [J]. *Methods Enzymol*, 2012, 510: 429-452
- [7] WANG Z, ONG H X, GENG A. Cellulase production and oil palm empty fruit bunch saccharification by a new isolate of *Trichoderma koningii* D-64 [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(11): 1564-71
- [8] Halliwell G, Riaz M. The formation of short fibers from native cellulase by components of *Trichoderma koningii*

- cellulase [J]. *Biochem. J.*, 1970, 116: 35-42
- [9] Wang C H, Hseu T H, Huang C M. Induction of cellulase by cello-oligosaccharides in *Trichoderma koningii* G-39 [J]. *Journal of Biotechnology*, 1988, 9: 47-59
- [10] 覃益民,张静茹,叶锦,等.康氏木霉内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化及酶学性质[J].*江苏农业科学*,2015, 43(1): 40-43
TAN Yi-min, ZHANG Jing-ru, YE Jing, et al. Isolation, Purification and enzymological characteristics of β -glucosidase from *trichoderma koningii* [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2015, 43(1):40-43
- [11] Marshall T, Williams K M. Coomassie blue protein dye-binding assays measure formation of an insoluble protein-dye complex [J]. *Analytical Biochemistry*, 1992, 204(1): 107-109
- [12] Splittgerber A G, Sohl J. Nonlinearity in protein assays by the Coomassie blue dye-binding method [J]. *Analytical Biochemistry*, 1989, 179(1): 198-201
- [13] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685
- [14] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical chemistry*, 1959, 31(3): 426-428
- [15] Yue W, Erica F, Roberto D S, et al. Improvement of *Aspergillus niger* Glucoamylase Thermostability by Directed [J]. *Evolution Starch/Stake*, 2006, 58: 501-508
- [16] 严芬,李源涛,林娟,等.绿色木霉内切葡聚糖酶的分离纯化及酶学性质研究[J].*中国食品学报*,2014, 14 (11):96-103
YAN Fen, LI Yuan-tao, LIN Juan, et al. Purification and characterization of endoglucanases from *trichoderma viride* [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(11): 96-103
- [17] Beldman G, Searle-Van Leeuwen MF, Rombouts FM, et al. The cellulose of *Trichoderma viride* Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and beta-glucosidases [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1985, 146: 301-308