

金属离子对白蚁纤维素酶活力的影响

安刚, 陶毅明, 龙敏南, 王勤, 陈清西*

(厦门大学 生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 以厦门树白蚁 (*Glyptotermes Xiamenensis* Li et Huang) 为原料, 经 PBS 缓冲液 (pH 6.7) 抽提、硫酸铵分级分离获得纤维素酶粗提物 (简称 EGase), 经 DEAE-Sephadex Fast Flow 阴离子交换柱层析、Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析等纯化, 得到电泳单一纯的酶制剂, 比活力为 458.7 U/mg。研究了金属离子对该酶活力的影响: 结果表明, 正一价金属离子 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 对酶活力没有影响, Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 有激活作用, 重金属离子 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 有抑制作用, 表现为不可逆抑制。

关键词: 厦门树白蚁; 纤维素酶; 金属离子; 酶活力

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)S2-0107-03

纤维素是地球上最丰富而可再生的生物聚合物。它是由 D-葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成的线性不分枝的同聚多糖^[1]。纤维素是植物纤维的主要成分, 约占其干重的 30% ~ 50%, 是目前分布最广的天然碳水化合物。地球上每年光合作用约产生 1.5×10^{11} t 植物材料, 其中 50% 为纤维素。这些材料需转换成葡萄糖、乙醇、甲烷等低分子物质才能被利用。但目前对纤维素有效的利用却很少, 其中一小部分用于纺织、造纸、建筑和饲料等方面, 一部分用作燃料, 大部分没有被利用, 而是通过微生物自然分解, 参加自然界碳素循环, 这不仅是很大的浪费, 并且在城市又造成公害。因此, 如何综合、有效利用纤维素资源, 成为世界各国十分关注的重要领域^[2-3]。纤维素酶的研究为此开辟了一条广阔的途径。我们从厦门树白蚁体内分离纯化得到纤维素酶, 纯度达到电泳单一纯。在此基础上进一步研究金属离子对该酶活力的影响, 为纤维素酶的应用及结构与功能的研究奠定理论基础。

1 材料与实验方法

1.1 实验材料

厦门树白蚁 (*Glyptotermes Xiamenensis* Li et Huang) 购自厦门穿山甲白蚁防治公司^[4], 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 为汕头市西陇化工厂生产, 其他生化试剂均为国药集团化学试剂有限公司生产分析纯, 使

用的蒸馏水均为玻璃重蒸水。

1.2 实验方法

纤维素酶活性的测定: 以 0.5% CMC-Na 为底物, 在 0.1 mol/L NaAc-HAc pH 5.0 缓冲液中加入 0.5 mL 1% CMC-Na, 0.49 mL H_2O 和 10 μL 酶液, 40 $^\circ\text{C}$ 水浴 10 min, 冷却后, 加入 1 mL DNS, 沸水浴 5 min, 测 $OD_{540\text{nm}}$ 。酶活力单位定义为: 在上述条件下, 每分钟水解底物产生 1 μg 还原糖的酶量。比活力为每毫克酶蛋白具有的酶活力单位数^[5]。

金属离子对酶活力的影响是在 40 $^\circ\text{C}$, pH 5.0 的测活体系中, 加入不同浓度的金属离子, 测定出酶的相对活力, 分析它们对酶活力的影响。

动力学方法: 在含不同浓度金属离子的测活体系中, 改变底物浓度, 测定酶促反应初速度, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图法判断机理, 并根据酶动力学参数的变化进行二次作图求效应常数。

2 实验结果

2.1 正一价金属离子对酶活力的影响

我们选用 LiCl 、 NaCl 、 KCl 为效应物, 探讨正一价碱金属离子 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 对厦门树白蚁 EGase 活力的影响, 结果表明当 Li^+ 、 K^+ 达到 4 mmol/L, Na^+ 达到 5 mmol/L 时, 酶活力基本保持不变, 说明这 3 种碱金属离子对酶活力没有影响, 同时也表明 Cl^- 对该酶活力没有影响。

2.2 正二价金属离子对酶活力的影响

选用 MgCl_2 、 CaCl_2 、 ZnCl_2 、 MnCl_2 、 CoCl_2 、 CdCl_2 为效应物, 探讨这些正二价金属离子对厦门树白蚁

收稿日期: 2008-07-09

基金项目: 福建省科技项目 (2006H10091) 和国家基础科学人才培养

基金项目 (J0630649) 资助

* 通讯作者: chengq@xmu.edu.cn

EGase活力的影响. 结果见图 1 表明: Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 离子对酶活力有激活作用, 0.5~1.0 mmol/L 的 Ca^{2+} 可使酶活力提高 40%, 相比之下, Zn^{2+} 对该酶的激活作用较弱, 1.5 mmol/L 的浓度仅使酶活力提高 25.1%, 而 Mn^{2+} 的激活作用较强, 1.5 mmol/L 的浓度即可使酶活力提高 1 倍, 浓度达 3.5 mmol/L 时, 酶活力提高到 275%. Mg^{2+} 、 Co^{2+} 和 Cd^{2+} 对该酶有不同程度的抑制作用, 其抑制作用呈现浓度效应, 当浓度为 0.5 mmol/L 时, 它们分别可使酶活力下降 50%、40% 和 45%.

2.3 重金属离子对酶活力的影响

在 0.1 mol/L NaAc-HAc pH 5.0 的测活体系中, 分别研究重金属离子 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Pb^{2+} 对厦门树白

蚁 EGase活力的影响, 见图 2 结果表明, 上述 3 种重金属离子对该酶均有明显的抑制作用, 抑制强度随着重金属离子的浓度增大而加强. 图 3 表示 Hg^{2+} 对该酶效应的浓度依赖关系. 测定 3 种重金属离子 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Pb^{2+} 对该酶活力效应的 IC_{50} 值分别为: 0.18、0.35 和 0.98 mmol/L. 进一步研究这 3 种重金属离子对酶的抑制作用机理, 定底物浓度为 0.5 mg/mL, 改变酶的加入量, 测定不同浓度金属离子对酶活力的影响. 图 3 表示 Hg^{2+} 对酶的抑制作用情况, 酶的剩余活力与加入酶量作图, 为一组平行直线, 说明 Hg^{2+} 对酶的抑制作用是不可逆过程. 横轴截距随着加入的效应物增大而增大, 说明只有在反应体系中加入的酶量大于抑制剂的量, 才能检测到酶的活力.

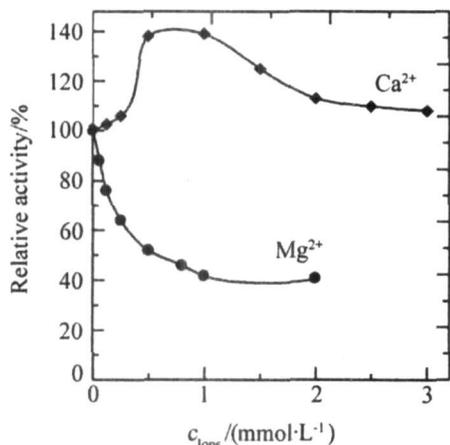


图 1 金属离子对酶活力的影响

Fig. 1 Effects of metal ions on the activity of EGase

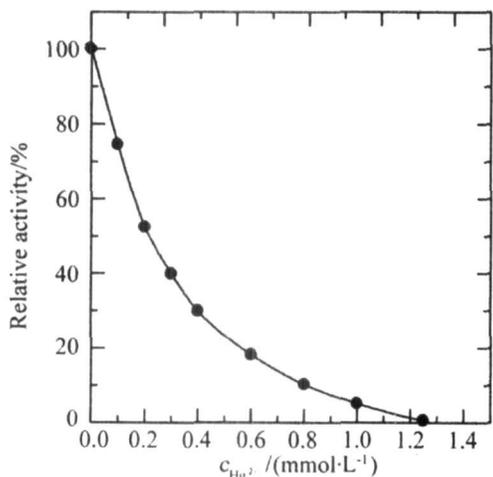
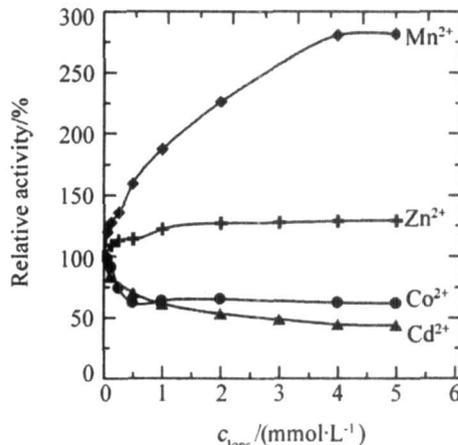


图 2 Hg^{2+} 对白蚁 EGase活力的影响

Fig. 2 Effects of mercury ion on the enzyme activity

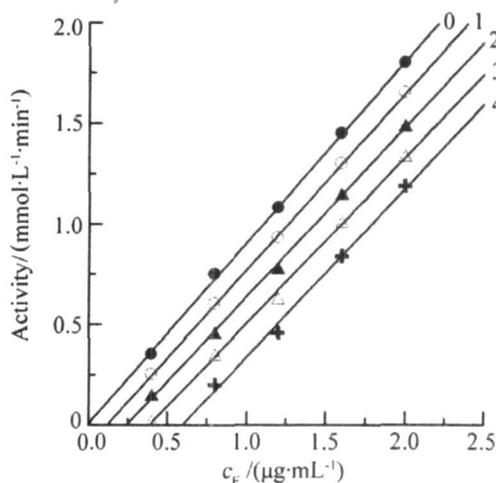


图 3 Hg^{2+} 对酶抑制机理的判断

曲线 0~4 分别代表 Hg^{2+} 的浓度为 0.0、0.1、0.2、0.3 和 0.4 mmol/L

Fig. 3 Judgement of inhibition of mercury ion on the enzyme

3 讨 论

白蚁纤维素酶成分比较复杂, 如何从厦门树白蚁体内分离出纤维素酶主要成分将是我们研究的重点. 有关纤维素酶的分离纯化主要采用: 离子交换法 (EC)、羟基磷灰石法 (HAC)、凝胶电泳方法、凝胶过滤柱层析等^[6]. 其中离子交换层析法是目前广受欢迎的一种蛋白质分离纯化方法, 以厦门树白蚁为材料, 经 PBS 缓冲液 (pH 6.7) 匀浆抽提处理、硫酸铵分级分离, DEAE-Sephadex Fast Flow 阴离子交换柱层析、Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析等纯化, 得到电泳单一纯的纤维素酶制剂, 比活力为 458.7 U/mg.

正一价金属离子 Li^+ , Na^+ , K^+ 对酶活力没有影响. 总结已报道的研究结果发现, 来源于绿色木霉 *W S-71*、拟康氏木霉 *Trichalema pseudokoningii* 放线菌 *Thermomonospora curvata*^[7] 具有相似的特性, Mg^{2+} 对酶具有抑制作用, Co^{2+} 对酶有明显的抑制作用, 当 Co^{2+} 浓度达到 0.45 mmol/L 时, 酶活力下降 40%, 张喆等^[8] 报道的 Co^{2+} 对福寿螺 EGase 有激活作用, 而 Mg^{2+} 对福寿螺 EGase 基本没有作用, Co^{2+} 浓度在 0.45 mmol/L 时, 可以使酶活力提高 21.2%. Hg^{2+} 对酶具有不可逆的抑制作用, 这可能是由于重金属离子能引起蛋白质变性的原因. 总之, 不同金属离子对酶的影响不同,

同种金属离子对于不同来源的同类酶也可能有不同的作用效果.

参考文献:

- [1] 庄总来, 周兴旺, 唐志军, 等. 福寿螺纤维素酶的开发与应用 [J]. 台湾海峡, 2000, 19(1): 6-10
- [2] 杨天赐, 莫建初, 程家安. 白蚁消化纤维素机理研究进展 [J]. 林业科学, 2006, 12(1): 110-115
- [3] 王艺军, 柳兵. 纤维素酶的开发应用 [J]. 科技资讯, 2007(7): 4
- [4] 金则安. 厦门房屋建筑白蚁种类及危害情况调查 [J]. 白蚁科技, 1999, 16(1): 22-24
- [5] 李燕红, 赵辅昆. 纤维素酶的研究进展 [J]. 生命科学, 2005, 17(5): 392-397.
- [6] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. Biochemistry, 1951, 193(1): 265-275.
- [7] Presutti D G, Hughes T A, Stutzenberger F J. Characterization of a *Thermomonospora curvata* endoglucanase expressed in *Escherichia coli* [J]. Journal of biotechnology, 1993, 29(3): 307-320.
- [8] 张喆, 赵红, 周兴旺, 等. 福寿螺 β -葡萄糖苷酶分离纯化及性质的初步研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1999, 38(2): 287-291

Effects of Metal Ions on Cellulase Activity from the Termite *Glyptotermes Xiamenensis*

AN Gang TAO Yiming LONG Minnan WANG Qin CHEN Qing-xi*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering

School of Life Sciences Xiamen University Xiamen 361005 China)

Abstract An endo-1, 4- β -D-glucanase (EC#3.2.1.4) was purified from the termite *Glyptotermes Xiamenensis* Li et Huang by PBS buffer (pH 6.7) extraction, ammonium sulfate precipitation, the ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex Fast Flow and the gel filtration through Sephadex G-100. The final preparation was homogeneous and electrophoretic pure with the specific activity of 458.7 U/mg. The effects of several metal ions on the enzyme activity were studied. Li^+ , Na^+ , K^+ had no effects on the enzyme activity. The enzyme activity was stimulated by Ca^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} but inhibited by Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} following the irreversible mechanism.

Key words *Glyptotermes Xiamenensis*; cellulase; metal ion; enzyme activity