

and fluorescence detection[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 216 (17): 3602–3605.

[33] Zhang Z X, Zhang X W, Wang J, et al. Sequential preconcentration by coupling of field amplified sample injection with pseudo isotachopheresis—acid stacking for analysis of alkaloids in capillary electrophoresis[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 390: 1645–1652.

[34] Takagai Y, Akiyama R, Igarashi S. Powerful preconcentration method for capillary electrophoresis and its application to analysis of ultratrace amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 385: 888–894.

开发与应用

DEVELOPMENT AND APPLICATION

灰绿曲霉 β -葡萄糖苷酶的分离及特性

邓敏, 鄢小兵, 李倩一, 黄丽春, 鲍思龙, 龙敏南*

(厦门大学生命科学学院, 厦门大学能源研究院, 福建 厦门 361005)

摘要: 目的: 利用灰绿曲霉 EU7-22 发酵产纤维素酶, 从中分离到 β -葡萄糖苷酶, 分析其理化特性, 确定其最佳活性条件。方法: 灰绿曲霉 EU7-22 发酵液离心后, 上清液经硫酸铵沉淀、Phenyl 6 Fast Flow (high sub) 疏水层析和 Sephacryl S-200 凝胶层析, 获得纯化的 β -葡萄糖苷酶。结果: 纯酶的比活性为 5.1 IU/mg, 得率为 13.89%。SDS-PAGE 凝胶电泳分析表明该酶是单亚基蛋白, 其分子量为 56.2 kDa。在 pH 4.0~6.0 范围内, β -葡萄糖苷酶具有较高的稳定性, 该酶的最适酶促反应 pH 为 5.0。当 β -葡萄糖苷酶在温度低于 60℃的缓冲液中温育 1 h 后, 酶活损失不大, 表现了较好的稳定性; 当该酶在温度高于 60℃的缓冲液中温育 1 h 后, 酶活迅速丧失。 β -葡萄糖苷酶在 70℃时具有最大催化活性。结论: 灰绿曲霉 EU7-22 发酵产生的 β -葡萄糖苷酶具有较高活性, 具有分子量较小、最佳催化温度较高的特点。

关键词: 灰绿曲霉 EU7-22; β -葡萄糖苷酶; 分离纯化; 理化特性

中图分类号: Q556 文献标识码: A 文章编号: 1004-311X(2009)06-0061-03

Purification and Properties of β -glucosidase from *Aspergillus glaucus* EU7-22

DENG Min, WU Xiao-bing, LI Qian-yi, HUANG Li-chun, BAO Si-long, LONG Min-nan*

(School of Life Sciences, School of Energy Research, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: **Objective** β -glucosidase produced by *Aspergillus glaucus* EU7-22 was purified and characterized. **Method:** The β -glucosidase of *Aspergillus glaucus* EU7-22 was purified from ferment supernatant liquid by three steps of purification, ammonium sulfate precipitation (80%, W/V), Phenyl 6 Fast Flow (high sub) column chromatography and Sephacryl S-200 column chromatography, with a specific activity of 5.1 IU/mg and a yield of 13.89%. **Result:** The purified β -glucosidase was determined as a monomeric protein with a molecular weight of 56.2 kDa. The enzyme exhibited high stability when it was kept in the buffer at pH 4.0~6.0 and at the temperature below 60℃. β -glucosidase exhibited its optimal activity at 70℃. **Conclusion:** β -glucosidase produced by *Aspergillus glaucus* EU7-22 with small molecular showed high activity under the optimal conditions.

Key words: *Aspergillus glaucus* EU7-22; β -glucosidase; purification; property

纤维素降解酶是一个复杂的多酶体系, 主要包括纤维素酶与半纤维素酶。纤维素酶是指能水解纤维素 β -1, 4-葡萄糖苷键, 使纤维素变成纤维二糖和葡萄糖的一组酶的总称^[1,2]。纤维素酶是一个多组分酶系, 主要由三类具有不同催化功能的酶组成, 即内切- β -1, 4-葡聚糖酶 (endo- β -1, 4-glucanase, EG, EC 3.2.1.4)^[3,4]、外切- β -1, 4-葡聚糖酶 (exo- β -1, 4-glucanase, CBH, EC 3.2.1.91) 和 β -1, 4-葡萄糖苷酶 (β -1, 4-glucosidase, BG, EC 3.2.1.21)^[5-8]。 β -葡萄糖苷酶水解纤维二糖、纤维寡糖及其它 β -葡萄糖苷, 产生葡萄糖。 β -葡萄糖苷酶是纤维素降解过程的关键酶, 它决定纤维素糖化过程的最终效率。在我国, 农林植物纤维资源非常丰富, 每年农林废弃物与工业纤维性废渣有数千万吨。利用生物技术手段将其中一部分转化为燃料、饲料、食品等化学、化工原料, 是解决人类能源、粮食、资源与环境危机的重要途径之一。但由于纤维素酶价格昂贵, 酶解效率低下, 极大地影响了酶的广泛使用。因此, 提高纤维素酶的酶解效率成为解决这一问题的关键。本文研究菌株为作者实验室经筛选及诱变, 具有高纤维素酶活性的菌株, 对 β -glucosidase 的分离与酶学特性分析, 为进一步研究特别是为提高纤维素酶解活性、酶的基因克隆等提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2009-06-07; 修回日期: 2009-08-18

基金项目: 国家“973”计划项目(2010CB732201); 国际科技合作重点项目(2009DFA60930)资助

作者简介: 邓敏(1982-), 女, 硕士, 研究方向: 木质纤维素生物质转化与利用。Email: dm-cinderella1112@hotmail.com; * 通讯作者, Email: longmn@xmu.edu.cn

1.1.1 实验材料

菌株: 灰绿曲霉 (*Aspergillus glaucus*) EU7-22 菌株由作者实验室分离保存^[9]。Phenyl 6 Fast Flow (high sub)、Sephacryl S-200 购于 GE。蛋白标准物 Marker (#SM0431) 购于 Fementas。

1.1.2 试剂

(NH₄)₂SO₄、KH₂PO₄、CaCl₂、MgSO₄、CoCl₂、FeSO₄·7H₂O、ZnSO₄·7H₂O、MnSO₄·H₂O、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 均为分析纯购于国药集团。十二烷基硫酸钠 (SDS) 购于上海生工。对硝基酚- β -葡萄糖苷 pNPG (4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside) 购于 SIGMA 公司(美国); 牛血清白蛋白 (BSA) 购于华美生物工程公司; 考马斯亮蓝 G250 购于 BBL, 分装。

1.1.3 仪器

小型单垂直电泳槽 (DYY III), 北京六一厂; SW-CJ-1FD 单人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; 01J2003-04 型立式压力蒸汽灭菌器, 上海东亚压力容器制造有限公司; DK-8D 型电热恒温水槽, 上海一恒科技有限公司; JS-4.2 台式高速离心机, BECKMAN; PHS-3C 精密酸度计, 厦门星鲨分析仪器厂; M2 多功能酶标仪, Molecular Devices; MJP-250 霉菌培养箱, 上海精宏试验设备有限公司; HD 21C-A 核酸蛋白检测仪, 上海康华生化仪器制造厂; BS-160A 自动部分收集器, 上海青浦沪西仪器厂; Stirred Cells 8050 搅拌式超滤装置, Amico Incorporation; YM3 纤维素超滤膜, Millipore。

1.1.2 培养基

① 种子培养基 (PDA): 土豆 200g 洗净, 去皮, 切成小块, 煮沸 30min, 纱布过滤, 再加 1% 葡萄糖, 定容至 1L, 自然 pH (平板或斜面培养基中添加 2% 琼脂)。

② 发酵产酶培养基: (NH₄)₂SO₄ 2.0g, KH₂PO₄ 3.0g, CaCl₂ 0.5g, MgSO₄ 0.5g, CoCl₂ 3.0mg, FeSO₄·7H₂O 7.5mg, ZnSO₄·7H₂O

2.0mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.5mg, 3% (W/V) 碱处理蔗渣, 蛋白脬 0.5%, pH 5.0 加水至 1L。

1.2 粗酶液制备

将PDA斜面保种的 *A. glaucus* EU7-22 菌体接种于 PDA 平板培养基上进行活化, 然后接入到发酵产酶培养基中, 振荡培养 5d (35℃, 130r/min)。发酵完成后, 将发酵液低温离心 (4000×g, 20min), 收集上清酶液, 保存于 -20℃ 备用。

1.3 β-葡萄糖苷酶分离

硫酸铵沉淀: 取粗酶液 50mL, 慢慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 不断搅拌, 直至完全溶解, 饱和度 80%。置于 4℃, 1h, 离心 (25000×g, 15min)。弃上清, 沉淀溶于 5mL 醋酸钠缓冲液 (50mmol/L, pH 5.6) 中, 置于 4℃ 备用。

疏水层析 (Phenyl 6 Fast Flow) 柱: 用含有 2mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的醋酸钠缓冲液 (50mmol/L, pH 5.6) 平衡, 柱体积为 30mL (2.6cm×5cm)。用相同的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 缓冲液作为流动相, 流速 5mL/min, 洗脱未结合在疏水柱上的蛋白, 洗至基线水平。从含有 2mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的醋酸钠缓冲液 (50mmol/L, pH 5.6) 线性梯度洗脱至 H_2O , 共洗脱 27 个柱体积。分别收集各蛋白峰, 并检测 β-葡萄糖苷酶活性及蛋白含量。

凝胶层析 (Sephacryl S-200) 柱: 将含有较高 β-葡萄糖苷酶活性的蛋白峰收集后超滤浓缩, 离心 (8000×g, 15min)。用含有 0.1mol/L NaCl 的醋酸钠缓冲液 (50mmol/L, pH 5.6) 进行平衡。柱体积为 34mL (0.8cm×67cm), 共洗脱柱 2 个体积, 流速为 0.35mL/min, 收集含有 β-葡萄糖苷酶的蛋白峰, 每管 1mL。

1.4 酶活测定与蛋白质分析

β-葡萄糖苷酶酶活测定: 移取用柠檬酸钠缓冲液 (50mmol/L, pH 5.0) 稀释酶液 50 μ L 于离心管中, 加入 50 μ L 用柠檬酸钠缓冲液 (50mmol/L, pH 5.0) 配制的 pNPG (50mmol/L) 或 pNPC (50mmol/L), 50℃ 水浴 30min。反应结束后, 取出 100 μ L 反应液加入至 96 孔板中, 再加入 100 μ L Na_2CO_3 (1mol/L) 溶液, 测定 OD_{405} 值。以 100℃ 水浴中灭活的粗酶液为空白对照。一个酶活力单位 (IU) 定义为每 min 催化底物水解生产 1 μ mol pNP 所需的酶量^[10]。

蛋白质含量测定参照 Bradford 方法。① 分别在 1.5mL 的离心管中加入浓度为 0.5mg/mL 牛血清白蛋白 (0.5、10、15、20、25 μ L), 用 NaCl 溶液 (0.15mmol/L) 补至 100 μ L。② 每管各加入 0.9mL 考马斯亮蓝溶液, 振荡混匀, 室温放置 5min。③ 测 A_{595} 吸光值制作标准蛋白浓度曲线。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 参照文献[11]。

1.5 β-葡萄糖苷酶理化特性

pH 与温度对酶促反应的影响: 配制不同 pH 的缓冲液, 加入底物和适量的纯化酶液, 混匀后于 50℃ 反应 30min, 测定酶活。在最适酶促反应的 pH 缓冲液中加入木聚糖底物和适量的酶液, 分别在不同温度下反应 30min, 测定酶活。

pH 与温度对酶稳定性的影响: 配制不同 pH 的缓冲液, 加入纯化的酶液, 在 50℃ 下保持 1h 后加入底物, 混合均匀后在最适酶促反应温度下反应 30min, 测定酶活。使用最适酶促反应的 pH 缓冲液稀释纯化酶液, 分别在不同温度下保持 1h 后加入底物, 在最适酶促反应温度下反应 30min, 测定酶活。

2 结果

2.1 β-1,4-葡萄糖苷酶的纯化

将经硫酸铵沉淀的粗酶液 (5mL) 过疏水层析柱。从图 1 中可以看出共有 5 个蛋白峰, 在第 4 个蛋白峰中可以检测到 β-1,4-葡萄糖苷酶活性, 而其余 4 个均为较大的杂蛋白峰。

收集具有较高 β-1,4-葡萄糖苷酶活性的组份蛋白并超滤浓缩酶样品。将 Sephacryl S-200 柱用含 0.1mol/L NaCl 的醋酸钠缓冲液 (50mmol/L, pH 5.6) 平衡, 将浓缩的酶样品装柱,

开始洗脱并收集洗脱液 (1mL/管), 测定不同管样品 β-1,4-葡萄糖苷酶酶活。结果如图 2 所示, 在第 1 个蛋白峰中检测到 β-1,4-葡萄糖苷酶活性。

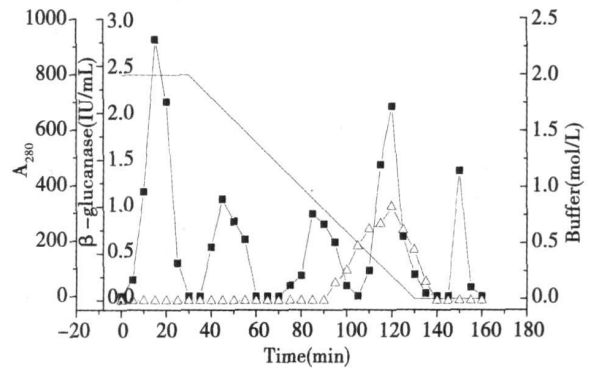


图 1 β-1,4-葡萄糖苷酶疏水层析洗脱曲线

Fig. 1 Elution profile of β-1,4-glucosidase from Phenyl 6 Fast Flow column. (NH₄)₂SO₄ 洗脱浓度梯度 (—); β-1,4-葡萄糖苷酶酶活 (△); 蛋白 (■)。

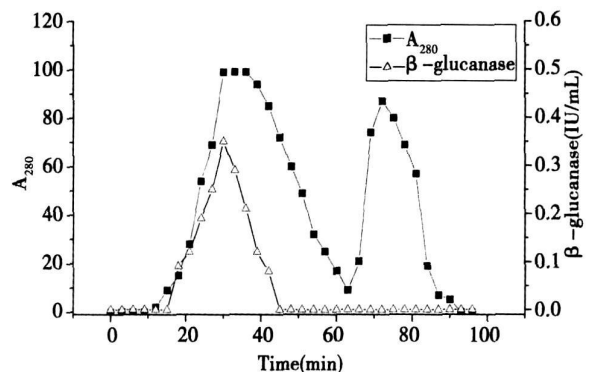


图 2 β-1,4-葡萄糖苷酶凝胶层析洗脱曲线

收集 β-1,4-葡萄糖苷酶活性峰的蛋白溶液, 进行 SDS-PAGE 检测, 如图 3 所示, 活性峰的组份蛋白纯度较高, 为单一条带, 经电泳后计算, 蛋白的 m_r 值为 0.098 分子量为 56.2 kDa。

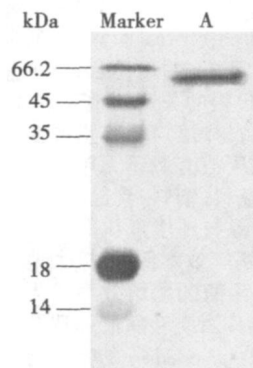


图 3 β-1,4-葡萄糖苷酶 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE of purified β-1,4-glucosidase

经过硫酸铵沉淀、疏水柱层析和凝胶柱层析三个步骤, 获得了纯化的 β-1,4-葡萄糖苷酶, 该酶被纯化 5.1 倍, 得率为 13.9%。β-1,4-葡萄糖苷酶的纯化各步骤见表 1。

2.2 pH 对 β-1,4-葡萄糖苷酶催化的影响

将 β-1,4-葡萄糖苷酶置于不同 pH 的缓冲液中温育 1h 后, 其催化活性发生明显变化。当缓冲液 pH 在 4~6 之间, 残余的酶活在 85% 以上。当在 pH > 7 的缓冲液中温育 1h 后, 残余的酶活小于 30%。在 pH 4~6 之间, β-1,4-葡萄糖苷酶的

催化活性基本没有变化。综合考虑 pH 对酶的稳定性和催化活性的影响,选择 pH 5.0 作为该酶的最适反应 pH。

表 1 β -1,4-葡萄糖苷酶的纯化过程

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (IU)	比活力 (IU/mg)	纯化倍数	得率 (%)
粗酶液	48.0	47.5	0.99	/	100
硫酸铵沉淀	10.05	12.5	1.2	1.2	26.32
疏水柱层析	3.57	12.07	3.3	3.3	25.41
凝胶柱层析	1.32	6.60	5.1	5.1	13.89

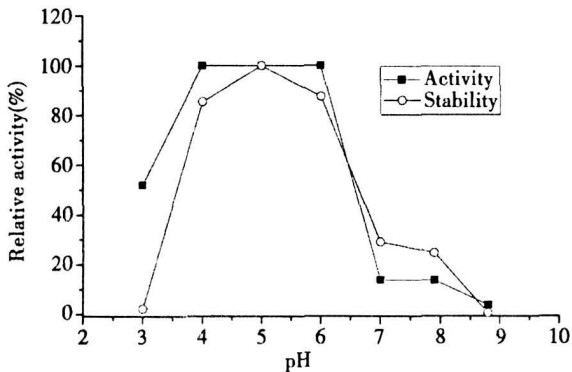


图 4 pH 对 β -1,4-葡萄糖苷酶酶促反应及对酶稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH on stability and activity of purified β -1,4-glucosidase

2.3 温度对 β -1,4-葡萄糖苷酶催化的影响

将 β -1,4-葡萄糖苷酶在不同温度下保温 1h 时,当温度低于 60℃ 时,温度升高对酶活的影响不大。当温度大于 60℃ 后,酶蛋白快速变性,酶活迅速丧失。从图 5 可以看出,当反应温度为 70℃ 时, β -1,4-葡萄糖苷酶具有最大催化活性;当温度低于 70℃ 时,酶活随温度上升而逐渐升高;当反应温度高于 70℃ 后,酶活迅速下降。尽管 β -1,4-葡萄糖苷酶在 70℃ 时有最高催化活性,但在该温度下保温 1h 后,酶活基本丧失。

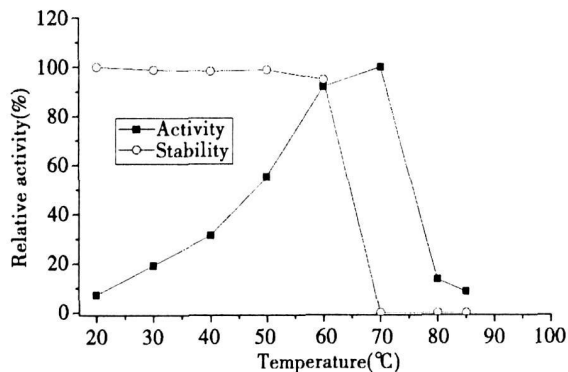


图 5 温度对 β -1,4-葡萄糖苷酶酶促反应及对酶稳定性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on stability and activity of purified β -1,4-glucosidase

3 讨论

β -1,4-葡萄糖苷酶是纤维素物质糖化过程的关键酶,它决定糖化效率和产量。本研究纯化了 *A. glaucus* EU7-22 的 β -1,4-葡萄糖苷酶,该酶的分子量为 56.2kDa,与表 2 中其它 β -1,4-葡萄糖苷酶相比,其分子量相对较小。一般来说,分子量较小的酶蛋白分子在与底物反应过程更易于与底物结合,因而在相同条件下糖化时具有一定的优势。真菌纤维素酶是一种分泌型酶,分子量较小的蛋白分子更有利于进行分泌表达,在构建基因表达工程菌株时,可以优先考虑分子量较小的酶蛋白基因作为目的基因。

温度是影响糖化效率的关键因素,升高反应温度可以提

高酶活,加速反应进程。*A. glaucus* EU7-22 β -1,4-葡萄糖苷酶在 70℃ 时具有最大酶促反应速度,在 60℃ 以下能保持较长时间的稳定。目前大多数纤维素糖化反应在 55℃ 条件下进行,将 *A. glaucus* EU7-22 β -1,4-葡萄糖苷酶糖化反应温度由 55℃ 提高到 60℃,其活性可提高约 10%,它可以大大提高酶糖化效率和适用范围。

表 2 部分真菌 β -1,4-葡萄糖苷酶特性比较

菌株来源	蛋白分子量 (kDa)	最适反应温度 (°C)	最适 pH
<i>Aspergillus glaucus</i> EU7-22	56.2	70	5.0
<i>Cellulomonas bizotai</i> ^[12]	109	70	4.8
<i>Stachybotrys</i> sp. ^[13]	85	50	5.0
<i>Trichoderma reesei</i> ^[14]	75	60	5.0
<i>Chaetomium thermophilum</i> ^[15]	118	70	4.0~5.0

本研究纯化了 *A. glaucus* EU7-22 的 β -1,4-葡萄糖苷酶,该酶的分子量为 56.2kDa,在 70℃ 时具有最大酶促反应速度,在 60℃ 以下能保持较长时间的稳定。本研究为进一步完善 *A. glaucus* EU7-22 产酶发酵条件,提高酶解纤维素效率与基因克隆改造菌株提供了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 高培基,曲音波,汪天虹. 微生物降解纤维素机制的分子生物学研究进展[J]. 纤维素科学与技术,1995,2:16-19.
- [2] Yanhong Li, Fukun Zhao. Advances in cellulase research[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2005, 17(5): 392-397.
- [3] Koichiro Murashima, Tomoko Nishimura, Yuko Nakamura, et al. Purification and characterization of new endo-1,4- β -glucanases from *Rhizopus oryzae* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30: 319-320.
- [4] Pamy NJ, Beever DE, et al. Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus* [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 404: 243-253.
- [5] 赵云,刘伟丰,毛爱军,等. 多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*) β -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达、纯化及酶学性质分析[J]. 生物工程学报, 2004, 20(5): 741-744.
- [6] Riccardo N. Barbagallo, Giovanni Spagna, Rosa Palmeri, et al. Selection characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological application[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35: 58-66.
- [7] Bin Qi, Limei Wang, and Xianjin Liu, et al. Purification and characterization of β -glucosidase from newly isolated *Aspergillus* sp. MT-0204 [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8 (10): 2367-2374.
- [8] Daniel DJ, Simonetti A, Hertz P F, Brandelli A. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18 (5): 933-941.
- [9] 杜娟,曲音波,林勤勤,等. 灰绿曲霉高产纤维素酶突变株的选育[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2006, 45(Sup): 23-26.
- [10] Badal C Saha. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor arcinelloides* [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 1871-1876.
- [11] 萨姆布鲁克,马尼迪斯. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 北京:科学出版社,1992:880-887.
- [12] Andy T Y Lau, W K R Wong. Purification and characterization of a major secretory cellobiase, Cba2 from *Cellulomonas bizotai* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2001, 23: 159-166.
- [13] Bahia Amouri, Ali Gargouri. Characterization of a novel β -glucosidase from a *Stachybotrys* sp. [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 32: 191-197.
- [14] 于兆海. 里氏木霉纤维素酶的分离纯化与酶学性质研究[D]. 南京:南京林业大学硕士论文,2006.
- [15] 李亚玲. 嗜热真菌热稳定性纤维素酶的分离纯化及基因的克隆与表达[D]. 泰安:山东农业大学博士论文,2007:13.