

# 黑曲霉纤维素酶系中内切 $\beta$ -葡聚糖酶的分纯化

王沁

赵学慧

(厦门大学生物系, 厦门 361005) (华中农业大学食品科技系, 武汉 430070)

**摘要** 使用硫酸铵分级沉淀、Sephadex G-100 凝胶过滤色谱及 DEAE-Sephadex A-25 (A-50) 离子交换色谱等分离技术, 从黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 培养液中分离到 7 种内切  $\beta$ -葡聚糖酶组分, 分别称为 I-2a、I-2b、I-2c、I-2d、IIa、IIb 和 IIIa。经凝胶电泳鉴定均为单一带。

**关键词** 黑曲霉; 内切 $\beta$ -葡聚糖酶; 分离纯化

内切  $\beta$ -葡聚糖酶又称 CMC 酶或  $C_x$  酶, 是纤维素酶系中的重要组成酶之一。该酶广泛存在于各种微生物中, 对于降解自然界大量存在的纤维素起着重要作用。此酶并非单一酶, 而是一组性质极为相近的酶的总称。这种多型性使内切  $\beta$ -葡聚糖酶较酶系中的其它组分更难分离。加之内切  $\beta$ -葡聚糖酶在分子量及电性质方面与  $\beta$ -葡萄糖苷酶又十分相近, 故仅使用凝胶过滤和离子交换色谱还难以将它们全部分开, 需要利用疏水相互作用色谱、亲和层析法等技术才能取得良好的分离效果<sup>[1,2]</sup>。现在, 已有报道从黑曲霉中提纯  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶<sup>[3]</sup>, 但至今未见报道从黑曲霉中提纯内切  $\beta$ -葡聚糖酶。为了深入了解微生物来源的内切  $\beta$ -葡聚糖酶的性质、作用机制及可能的应用价值, 本研究通过使用凝胶过滤和离子交换色谱在不同 pH、不同浓度的缓冲条件下, 用比较简便的程序获得了 7 种内切  $\beta$ -葡聚糖酶组分。

## 材料与方 法

### (一) 材料

1. 菌种: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) W<sub>25</sub> 为作者从湖北武汉分离到, 华中农大食科系菌种保藏室提供。

2. 粗酶制剂: 将黑曲霉 W<sub>25</sub> 菌株的培养液离心除菌体后, 用 80% 饱和度硫酸铵沉淀, 离心收集沉淀物, 真空干燥成粗酶粉。

3. 主要化学试剂: Sephadex G-25 (粒度 50—100 $\mu$ m), Sephadex G-100 (粒度 40—120 $\mu$ m) 及 DEAE-Sephadex A-25 (A-50) (粒度 40—120 $\mu$ m) 均为瑞典 Pharmacia 公司产品。

### (二) 方法

1. 酶活力测定:  $C_1$  酶、 $C_x$  酶糖化力及  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的测定见参考文献[4]。酶活力以在实验条件下水解出的还原糖在 530 毫米的光密度值 OD<sub>530nm</sub> 表示。

2. 蛋白质的测定: 柱层析时测定各管的吸光度 A<sub>280nm</sub>, 一般分析采用 Lowry 法<sup>[5]</sup>。

3. 纯度鉴定: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法<sup>[6]</sup>。

## 结 果

### (一) 酶的分纯化

1. Sephadex G-100 凝胶过滤: 将硫酸铵分级沉淀的粗酶制剂用透析法脱盐, 冻干浓缩后上到预先用 0.02mol/L, pH5.4 乙酸缓冲液平衡好的 Sephadex G-100 柱 (2.5 × 100cm) 上, 用同一缓冲液洗脱 (图 1)。峰 I、峰 II 和峰 III 洗脱部分都具有 CMC 酶活力。分别将这三部分洗脱液收集起来, 作进一步分离。

2. DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱层析

(1) 峰 I 部分洗脱液的离子交换柱层析:

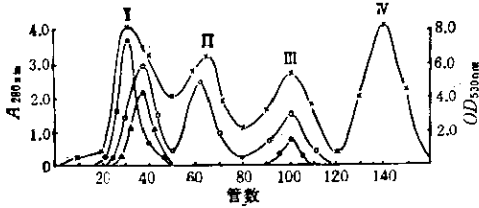


图1  $W_{15}$  纤维素酶的 Sephadex G-100 凝胶过滤图  
 ×—×  $A_{280nm}$ , ○—○ CMC 酶活力, △—△  $C_1$  酶活力, ●—●  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力, 层析温度  $20^{\circ}C$ , 流速  $20ml/h$ , 每管  $5ml$

将已浓缩的峰 I 部分洗脱液转移至用  $0.02mol/L$ ,  $pH5.4$  乙酸缓冲液预平衡的 DEAE-Sephadex A-25 柱 ( $2.2 \times 47cm$ ) 上, 先用起始缓冲液洗脱, 待穿过峰流完之后, 改用  $0-0.3mol/L$  NaCl (用起始缓冲液配置) 盐梯度洗脱(图 2)。峰 I-2 部分洗脱液具有 CMC 酶活性, 但电泳结果表明, 这一部分并非单一组分而是由多个组分所组成, 尚需进一步分离纯化。

(2) 峰 II 部分洗脱液的离子交换层析: 将已浓缩的峰 II 部分上到预先经  $0.02mol/L$ ,  $pH6.8$  乙酸缓冲液平衡好的 DEAE-Sephadex A-25 柱 ( $1.4 \times 30cm$ ) 上。先用起始缓冲液充分洗柱, 而后用  $0.05mol/L$ ,  $pH6.8$  乙酸缓冲液配

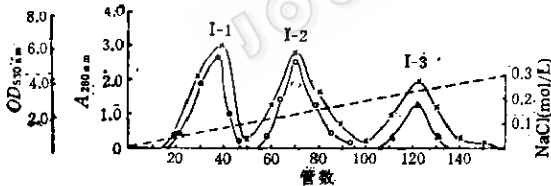


图2 峰 I 部分的 DEAE-Sephadex A-25 柱层析图  
 ×—×  $A_{280nm}$ , ○—○ CMC 酶活力, △—△  $C_1$  酶活力, ●—●  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力, 层析温度  $20^{\circ}C$ , 流速  $10ml/h$ , 每管  $5ml$

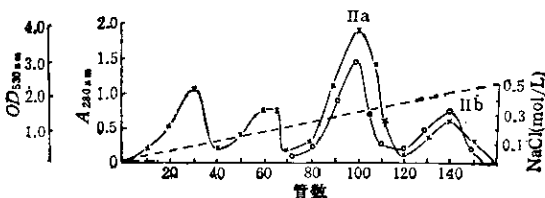


图3 峰 II 部分的 DEAE-Sephadex A-25 柱层析图  
 ×—×  $A_{280nm}$ , ○—○ CMC 酶活力, ---- NaCl 层析温度  $20^{\circ}C$ , 流速  $10ml/h$ , 每管  $5ml$

制的  $0-0.5mol/L$  NaCl 进行线性梯度洗脱(图 3)。可见经 DEAE-Sephadex A-25 离子交换柱层析得到两个具有 CMC 酶活的蛋白峰, 依出峰先后次序分别称为 IIa 和 IIb。

(3) 峰 III 部分洗脱液的离子交换层析: 将样品与 DEAE-Sephadex A-25 色谱柱 ( $1.5 \times 20cm$ ) 用  $0.02 mol/L$ ,  $pH5.8$  Tris-HCl (缓冲液平衡, 上样后, 用同一缓冲液洗脱, 再用含  $0-0.3 mol/L$  NaCl 的  $0.05 mol/L$ ,  $pH5.8$  Tris-HCl 缓冲液进行线性梯度洗脱 (图 4)。峰 III 部分洗脱液经 DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析得到一个具有 CMC 酶活的蛋白洗脱峰, 称为 IIIa。

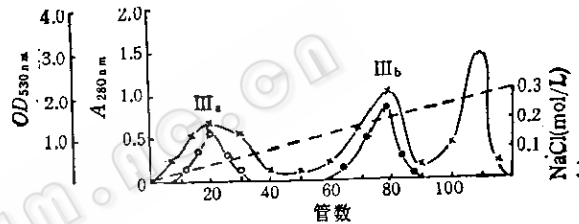


图4 峰 III 部分的 DEAE-Sephadex A-25 柱层析图  
 ×—×  $A_{280nm}$ , ○—○ CMC 酶活力, ●—●  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力 ---- NaCl, 层析温度  $20^{\circ}C$ , 流速  $10ml/h$ , 每管  $5ml$

3. DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱层析: 收集图 2 中峰 I-2 部分洗脱液, 冷冻真空浓缩后用 Sephadex G-25 柱脱盐, 再上到预先用  $0.02mol/L$ ,  $pH6.8$  柠檬酸缓冲液平衡好的 DEAE-Sephadex A-50 柱 ( $2.0 \times 25cm$ ) 上。先用起始缓冲液充分洗脱, 以除去杂蛋白, 再用上述缓冲液配制的  $0-0.5mol/L$  NaCl 线性梯度洗脱(图 5)。得到 4 个蛋白洗脱峰, 都具有 CMC 酶活力。依出峰先后分别称为 I-2a, I-

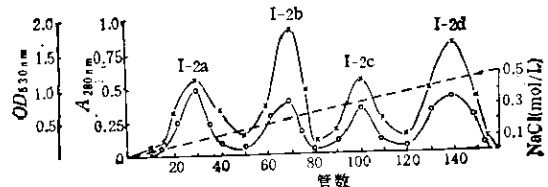


图5 峰 I-2 部分的 DEAE-Sephadex A-50 柱层析图  
 ×—×  $A_{280nm}$ , ○—○ CMC 酶活力 ---- NaCl 层析温度  $20^{\circ}C$ , 流速  $10ml/h$ , 每管  $5ml$

表1 黑曲霉内切 $\beta$ -葡聚糖酶的提纯

提纯步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (u)*	比活 (u*/mg)	提纯倍数	收率 (%)
粗酶液	13640	33230	2.43	1.00	100
硫酸铵分段	9560	28680	3.00	1.23	86.3
Sephadex G-100					
峰 I 部分	1071.6	9780	9.13	3.75	29.4
峰 II 部分	223.0	1922	8.62	3.42	5.8
峰 III 部分	356.7	3490	9.78	4.02	10.5
DEAE-Sephadex A-25					
峰 I-2 部分	143.2	2600	16.74	6.89	7.8
IIa	33.1	843	25.46	10.48	2.5
IIb	10.9	260	23.85	9.81	0.78
IIIa	22.0	666	30.27	12.46	2.0
DEAE-Sephadex A-50					
I-2a	26.0	574	22.10	9.08	1.72
I-2b	14.0	272	15.81	6.50	0.81
I-2c	17.2	350	20.34	8.37	1.09
I-2d	15.0	367	24.46	10.07	1.1

\* u 为酶活单位, 即每毫升酶液, 每分钟形成 1 $\mu$ mol 还原糖(以葡萄糖计)定义为 1 个酶活力单位。

2b, I-2c 和 I-2d。

上述内切 $\beta$ -葡聚糖酶的整个提纯过程见表 1。

## (二) 酶的纯度

将分离到的 7 个内切 $\beta$ -葡聚糖酶组分用 7% 凝胶浓度的 PAGE 分析, 表明 I-2a, I-2b, I-2c, I-2d, IIa, IIb, IIIa 均为均一成份(图版 1)。

## 讨 论

本研究通过对黑曲霉 W<sub>5</sub> 菌株纤维素酶系中内切 $\beta$ -葡聚糖酶组分的分离纯化认为, 使用凝胶过滤和离子交换色谱在不同 pH、不同浓度的缓冲条件下, 经过多次反复分离, 即可取得良好的分离效果。由此可见, 在酶的分离纯化工作中, 除了所使用的色谱类型对分离效果有很

大的影响外, 使用的缓冲剂类型、pH 范围、浓度大小等也对分离结果有较大的影响。因此选择适宜的缓冲系统就可减少色谱柱的使用类型, 特别是一些贵重和稀少色谱柱的使用而将较复杂的酶组分分离开。

## 参 考 文 献

1. Woodard J et al.: *Biochemistry*, 16(4): 337-352, 1986.
2. Sawao M et al.: *Agric. Biol. Chem.* 49(12): 3511-3517, 1985.
3. 戈苏国等: *生物化学杂志*, 1(1): 67, 1985.
4. 曲音波等: *真菌学报*, 3(4): 238, 1984.
5. Lowry O H et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
6. Davis B J: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404-427, 1964.

(1992-1-8 收稿)

## ISOLATION AND PURIFICATION OF ENDO- $\beta$ -GLUCANASE FROM *ASPERGILLUS NIGER*

Wang Qin

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Zhao Xue hui

(Department of Food Science, Hua Zhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Through systematical isolation and purification of cellulase from *Aspergillus niger* using the technique of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractionation, gel filtration and ion exchange chromatography, we obtained seven components of endo- $\beta$ -glucanase (I-2a, I-2b, I-2c, I-2d, IIa, IIb, IIIa) All of them showed homogeneity in the disc gel electrophoresis.

**Key words** *Aspergillus niger*; Endo- $\beta$ -glucanase; Isolation and purification