

纤维素酶的二步分离纯化新工艺

时祥柱, 郭春腾, 周建武, 王中来, 饶平凡

(福州大学生物工程研究所, 福建 福州 350002)

摘要 :以普通定性滤纸为底物,经碱处理后,研究其对纤维素酶的亲和吸附作用。结果表明,普通定性滤纸对纤维素酶具有比较强的特异性吸附作用,能够从粗酶液中分离出纤维素酶,再经 POROS 20HQ 阴离子交换柱纯化后即可得到电泳纯的纤维素酶。该法大大简化了传统的纤维素酶纯化工艺,所得的纤维素酶活力极高,比活达 350 U/mg 以上,滤纸一步吸附后纤维素酶的纯化倍数为 9.55,活性回收率在 10% 左右。纯化后的纤维素酶为内切 β -葡聚糖酶,相对分子质量为 60 000,最佳 pH 为 4.0,最佳温度为 70 $^{\circ}\text{C}$ 。

关键词 纤维素酶 滤纸 纯化 亲和

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2002)04-0308-05

Separation and Purification of Cellulase Using Affinity Membrane

SHI Xiang-zhu, GUO Chun-teng, ZHOU Jian-wu, WANG Zhong-lai, RAO Ping-fan

(Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

Abstract : The importance of cellulase as a means for the efficient utilization of abundant cellulose resources in the world has been well recognized. Many researchers devote themselves to studying the mechanism of the action of cellulase to cellulose so that such expensive enzyme can be used much more widely. The first step is to obtain cellulase of high purity. So purification of cellulase is the key point in this field. However, the major problem in isolation is that cellulase is a complicated enzyme system and needs too many steps for separation, and that every cellulase needs special purification processing which cannot be used for the others. A novel method for the separation of the cellulase from crude extraction of *Aspergillus niger* with normal qualitative filter paper processed by 5 mol/L sodium hydroxide without precipitation and desalting steps was developed. Further purification of the cellulase was achieved by using an anion-exchange column of POROS 20HQ. The cellulase purified was identified as a new endoglucanase that had relatively high endurance to pH and temperature. Its relative molecular mass was estimated to be 60 000 by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. This enzyme exhibited very high activity towards carboxymethyl cellulose (CMC) with specific activity of 350 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ and the recovery of activity of 9.7%. Its optimum pH and temperature were 4.0 and 70 $^{\circ}\text{C}$, respectively. This is a simple, rapid and efficient method for purifying cellulase with high activity.

Key words : cellulase ; filter paper ; purification ; affinity

纤维素是地球上最丰富、最廉价的资源,资料显示全世界每年纤维素和半纤维素的生物合成总量约为 850 亿 t^[1]。随着全球化的食品和能源危机日益加剧,纤维素资源的利用已引起世界范围的普遍关注。由于纤维素的水不溶性,纤维素的降解机理和纤维素酶的研究自然成了其中的主要组成部分。到目前为止,国内外许多专家学者已经从多种微生物如黑曲霉^[2]、木霉^[3,4]等发酵液和灵芝^[5]中分离纯化出纤维素酶,对纤维素酶的研究也早已到了分子

生物学水平^[6]。但在纤维素酶纯化工艺方面一直没有大的突破,还拘泥于不同柱色谱方法的排列组合,存在分离步骤多、过程长等缺点。

近几年来,基于亲和理论的分离技术受到人们的普遍关注,谭天伟等^[7]曾用膨胀床金属亲和色谱从淡菜匀浆液中分离纯化纤维素酶,魏桂林等^[8]应用亲和膜去除血液中胆红素也取得了较好的结果,贾凌云^[9]、周冬梅^[10]等将蛋白 A 亲和膜色谱分别用于人血浆免疫球蛋白的纯化和测定,但还未见用

亲和膜分离纯化纤维素酶的研究报道。我们用纤维素酶的天然底物纤维素做成的滤纸“亲和”分离纤维素酶,并研究了该方法的可行性。结果表明,粗酶液经一步滤纸“亲和”后,再经一步POROS 20HQ阴离子交换柱纯化,仅两步工艺即能得到电泳纯的纤维素酶。

1 材料与方法

1.1 材料

黑曲霉发酵粉(福建沙县酶制剂厂惠赠);普通定性滤纸(杭州富阳特种纸厂,直径为100 mm);不锈钢过滤器(直径为100 mm);POROS 20HQ高效阴离子交换色谱柱(1.5 cm i.d. × 6.8 cm);灌注色谱工作站(BioCAD700E, PE公司);紫外-可见分光光度计(Lambda Bio 10, PE公司)。其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液制备

将10 g黑曲霉发酵粉溶于100 mL醋酸钠缓冲液(0.02 mol/L, pH 4.0)中,4℃下浸泡12 h后再于4℃下离心(1×10^4 r/min)10 min,弃去沉淀,收集上清液进行分离。

1.2.2 纤维素酶的分离纯化

普通定性滤纸浸泡于5.0 mol/L的氢氧化钠溶液中处理30 min,用蒸馏水漂洗至中性,再将其装入不锈钢过滤器中。用0.02 mol/L pH 4.0的醋酸钠缓冲液平衡滤纸后,上样,再分别用0.02 mol/L pH 4.0醋酸钠平衡缓冲液和含0.5 mol/L氯化钠的平衡缓冲液洗脱,收集高盐洗脱液。吸附及洗脱过程中平衡缓冲液流速均为1.0 mL/min。洗脱液经浓缩,并用2 000 mL 0.02 mol/L pH 4.5醋酸钠缓冲液透析3 h~4 h后,上样于用0.02 mol/L pH 4.5醋酸钠缓冲液平衡好的POROS 20HQ阴离子交换柱。用0~0.4 mol/L氯化钠溶液线性梯度洗脱(80 min),流速为1.0 mL/min。收集活力峰。

1.2.3 酶活力测定

羧甲基纤维素(CMC)酶活力测定:取0.5 mL适当浓度的酶液,加入1.5 mL 5 g/L羧甲基纤维素钠(CMC-Na,用0.1 mol/L pH 5.0的柠檬酸缓冲液配制),50℃下反应30 min;再加入2.5 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂,100℃下水浴5 min,冷却后,用水定容至5.0 mL,测定530 nm下的吸光度,以葡萄糖为标准制作标准曲线。在上述条件下,每毫升酶溶液在30 min内酶解羧甲基纤维素钠产生1 mg葡萄糖为一个酶活力单位。

水杨素-葡萄糖苷酶活力测定:用0.05 mol/L

pH 5.0醋酸钠缓冲液配制10 g/L的水杨素溶液,从中取0.5 mL,再加入0.5 mL已纯化的酶溶液,于50℃下反应30 min,以DNS法测定还原糖。

微晶纤维素酶活力测定:用0.05 mol/L pH 5.0醋酸钠缓冲液配制10 g/L的微晶纤维素溶液,离心后取0.5 mL上清液,加入0.5 mL已纯化的酶溶液,30℃下振荡20 h后,以DNS法测定还原糖。

1.2.4 蛋白质浓度测定

采用Folin-酚法^[11]测定。

1.2.5 垂直板状十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

参照Laemmli^[12]方法,分离胶的质量浓度为125 g/L,浓缩胶的质量浓度为44 g/L,电压120 V,用1 g/L硝酸银染色。

1.2.6 pH和温度适应性

最适pH值在不同缓冲液(0.1 mol/L, pH 2.5~8.0柠檬酸-磷酸缓冲液)中测定;最适温度在pH 5.0 0.1 mol/L的柠檬酸缓冲液中测定,温度范围为20℃~100℃。以CMC-Na为底物,按DNS法测定还原糖。

2 结果与讨论

2.1 纤维素酶的滤纸分离

滤纸分离纤维素酶的饱和吸附及洗脱曲线如图1所示。粗酶液上样于平衡好的过滤器中,35 min后吸附达到饱和。经加盐缓冲液洗脱后,洗脱液酶的比活比粗酶液提高了近10倍,单张滤纸的饱和吸附量是1.56 mg。

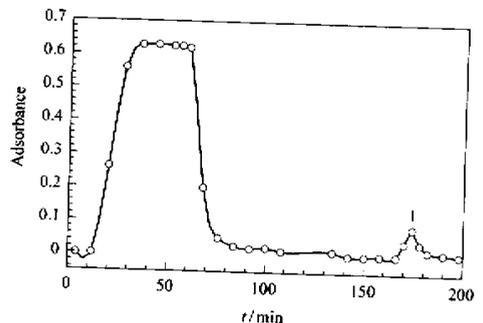


图1 膜分离纤维素酶饱和吸附及洗脱曲线
Fig. 1 Saturated adsorption and elution curve of cellulase by membrane separation

Detection wavelength: 280 nm.

1. The peak eluted by equilibration buffer containing 0.5 mol/L NaCl.

2.2 纤维素酶的POROS 20HQ纯化

将洗脱液再用POROS 20HQ进一步分离,色谱图见图2。由图2可看出,在粗酶液中,不止纤维素酶一种蛋白对滤纸有吸附作用。这是因为纤维素多

糖链有很多羟基,本身存在着比较强的非特异吸附作用。用盐进行梯度洗脱时,发现结合在滤纸上的蛋白均在相近的盐浓度范围内洗脱下来,说明这些杂蛋白和纤维素酶对滤纸的吸附力相差不大。用 POROS 20HQ 进一步分离,其中峰 III, IV, V 具有 CMC 酶活。SDS-PAGE 结果显示(图 3),峰 V 已达电泳纯,峰 III 也接近电泳纯。结果显示提纯的纤维素酶的相对分子质量为 60 000。

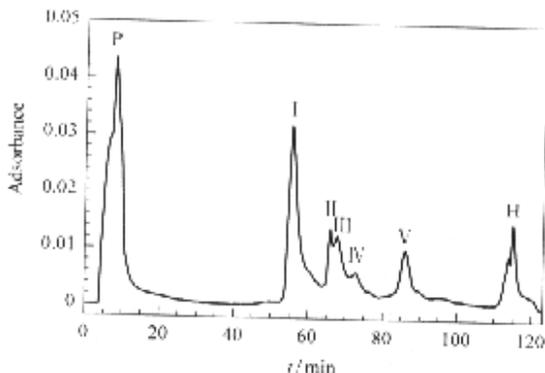


图 2 POROS 20HQ 对膜洗脱液中纤维素酶的进一步分离纯化

Fig.2 Purification of cellulase by POROS 20HQ

Detection wavelength : 280 nm.

Peak P is breakthrough curve. Peak H is the peak eluted by 1.0 mol/L NaCl. Peaks III, IV, V have CMC-cellulose degrading activity, of which the peak V is of SDS-PAGE purity.

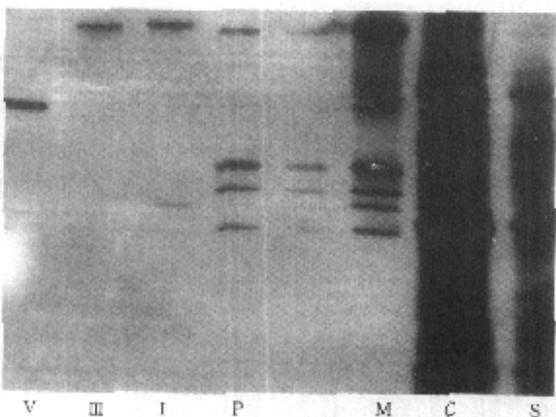


图 3 粗酶液、洗脱液、POROS 20HQ 各峰的 SDS-PAGE 图

Fig.3 SDS-PAGE for crude cellulase solution, eluant of membrane and POROS 20HQ

Lanes P, I, III, V are corresponding to peaks P, I, III, V in Fig.2; Lanes M, C and S are corresponding to the eluant from filter paper, crude sample and molecular mass marker respectively. Sample size of V is 0.1 μg.

黑曲霉是公认安全(generally recognized as safe, GRAS)的微生物,因此很多学者都从黑曲霉中分离纤维素酶进行研究。早在 1975 年, Freedberg 等^[13]就从黑曲霉中纯化出一种外切葡聚糖酶,随后, Hurst 等^[14]又从黑曲霉中分离出一种 CMC 酶。近几年, Siddiqui^[15]和 Singh 等^[16]分别从黑曲霉中分离纯化出 CMC 酶和内切葡聚糖酶,他们所用的方法都离不开分子筛色谱、沉淀(硫酸铵)、离子交换

色谱等,近几年发展较快的亲和色谱则应用较少。谭天伟等^[7]虽然用亲和色谱纯化纤维素酶大大简化了纯化工艺,但成本较高且操作繁琐。由图 2 和图 3 我们可看到,“二步法”新工艺充分发挥了膜分离操作简便、高效节能等优点,并利用了纤维素酶和纤维素的特异性亲和作用,使纯化工艺大大简化。

纤维素酶在整个分离纯化过程中的纯化倍数见表 1。

表 1 纤维素酶的分离纯化结果

Table 1 Purification of an endoglucanase from *Aspergillus niger*

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U·mg ⁻¹)	Purification fold
Crude extract	414.00	1950.00	4.71	1.00
Filter paper eluate	5.7	256.5	45.0	9.55
POROS 20HQ eluate	0.54	189.1	350.2	74.35

2.3 底物特异性

用不同的底物测酶活,结果显示,纯化后的纤维素酶(HQV 峰)只能降解羧甲基纤维素钠,几乎不降解微晶纤维素。这表明所纯化的纤维素酶是内切 β-葡聚糖酶^[17],该酶对水杨素也不能降解,因此没有 β-葡萄糖苷酶活性。

2.4 pH 和温度适应性

纯化后的纤维素酶在不同 pH(图 4-a)和不同温度下(图 4-b)测酶活,发现该酶的最佳 pH 为 4.0,最佳温度为 70 °C;100 °C 下处理 30 min 仍保留有部

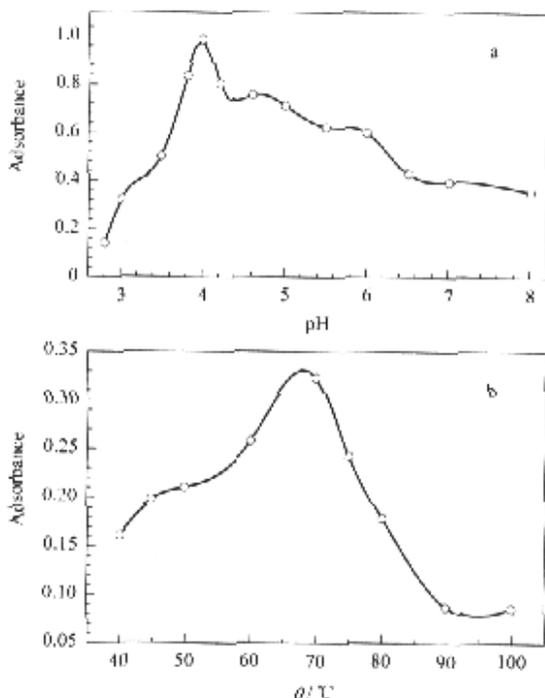


图 4 pH(a)及温度(b)对所纯化的纤维素酶活力的影响

Fig.4 Influences of pH(a) and temperature(b) on the activity of purified cellulase

Detection wavelength : 530 nm.

分酶活,说明该酶对温度的耐受性比较强。

2.5 滤纸分离纯化工艺与其他纯化工艺的比较

我们利用碱处理后的滤纸进行纤维素酶的亲和纯化研究,结合了柱色谱和膜分离的优点,简化了工

艺流程。本方法与几种典型的柱色谱分离纯化纤维素酶工艺的比较如表 2 所示。我们还用传统方法从黑曲霉粉中分离纯化纤维素酶^[22],其工艺流程与本纯化工艺的比较见表 3。

表 2 柱色谱工艺与膜色谱工艺比较
Table 2 Comparison of column and membrane chromatographic processes

Gerrit ^[18]	Processes of column chromatography			Process of this study
	Karim ^[19]	Rouland ^[20]	HONG Jiong ^[21]	
1. Precipitation	1. precipitation	1. precipitation	1. precipitation	1. filter paper adsorption isolation
2. Bio-Gel filtration	2. FPLC ¹⁾	2. hydroxyapatite adsorption chromatography	2. gel filtration	2. POROS 20HQ anion exchange chromatography
3. DEAE ²⁾ Bio-Gel anion exchange chromatography	3. hydrophobic chromatography	3. DEAE-Sepharose anion exchange chromatography	3. DEAE-Sephadex A-50 anion exchange chromatography	
4. SE ³⁾ Sephadex cation exchange chromatography	4. Mono Q anion exchange chromatography	4. Hydroxyapatite adsorption chromatography		
5. Affinity-column chromatography	5. Superose 12 filtration			

1) FPLC : fast protein liquid chromatography ; 2) DEAE : diethylaminoethyl ; 3) SE : sulfoethyl.

表 3 同一物系不同分离纯化工艺比较
Table 3 Comparison of different processes for the separation and purification of cellulase from the same *Aspergillus niger*

Process of column chromatography ^[22]			Process of this study		
fraction	total protein(mg)	percent recovery of activity(%)	fraction	total protein(mg)	percent recovery of activity(%)
Crude extract	1 656.00	100.00	crude extract	414.00	100.00
1. Precipitation using (NH ₄) ₂ SO ₄	765.00	82.56	1. filter paper eluate	5.70	13.15
2. Sephadex G-25 filtration	682.00	75.83	2. POROS 20HQ anion exchange chromatographic eluate	0.54	9.70
3. CM ¹⁾ cation exchange chromatographic eluate (Peak II)	144.60	20.41			
4. DEAE ²⁾ anion exchange chromatographic eluate (Peak II)	5.86	11.67			
5. POROS 20HQ anion exchange chromatographic eluate	1.72	5.25			
6. TSK ³⁾ filtration eluate	1.04	4.68			

1) CM : carboxymethyl ; 2) DEAE : diethylaminoethyl ; 3) TSK : G3000SWXL.

3 结论

近几年来,生化分离技术朝着高效、集成化方向发展,如将亲和柱色谱与膜分离结合在一起的亲和膜色谱。我们用滤纸分离纤维素酶,具备亲和膜色谱的一些特征,虽然不能如多数的亲和色谱一样一步得到纯品,但可以大大简化纯化流程。实验所用的滤纸很便宜,而且滤纸经高浓度碱液处理后强度增加,可以长期多次使用。由于用滤纸分离纤维素酶时回收率比较低,本方法目前仅适合于实验室小规模制备之用。

参考文献 :

[1] Misel L. Food Biotechnology , 1989 , (3) : 145
[2] WANG Xin , ZHAO Xue-hui. Microbiology Aviso ,

1993 , 20(1) : 13
王 芯 , 赵学慧. 微生物学通报 , 1993 , 20(1) : 13
[3] SUN Dong-ping , PANG Yan-jun , LI Zhao-lan , et al. Journal of Xuzhou Teachers College , 1996 , 14(2) : 62
孙东平 , 庞延军 , 李兆兰 , 等. 徐州师范大学学报 , 1996 , 14(2) : 62
[4] Wood T M , Sheila I M. J Biochem , 1972 , 128 : 1 183
[5] DUAN Ming-xing , ZHU Tao , XU Wen-lian , et al. Journal of Tsinghua University , 1998 , 38(6) : 56
段明星 , 朱 涛 , 徐文联 , 等. 清华大学学报 , 1998 , 38(6) : 56
[6] Moser B , Gilkes N R , Kilburn D G , et al. Appl Environ Microbiol , 1989 , 55(10) : 2 480
[7] TAN Tian-wei , DENG Li-xu , WEI Jian , et al. Chinese Journal of Biotechnology , 1998 , 14(4) : 434
谭天伟 , 邓利许 , 伟 坚 , 等. 生物工程学报 , 1998 , 14(4) : 434

- [8] WEI Gui-lin , SHANG Zhen-hua , YU Yi-nian , *et al.* Chinese Journal of Chromatography , 2001 , 19(1) : 74
魏桂林 , 商振华 , 于亿年 , 等. 色谱 , 2001 , 19(1) : 74
- [9] JIA Ling-yun , YANG Li , ZOU Han-fa , *et al.* Chinese Journal of Chromatography , 1998 , 16(6) : 476
贾凌云 , 杨 利 , 邹汉法 , 等. 色谱 , 1998 , 16(6) : 476
- [10] ZHOU Dong-mei , ZOU Han-fa , YANG Li , *et al.* Chinese Journal of Chromatography , 1998 , 16(3) : 195
周冬梅 , 邹汉法 , 杨 利 , 等. 色谱 , 1998 , 16(3) : 195
- [11] Lowry O H , Rosebrough N , Farr A , *et al.* J Biol Chem , 1951 , 193 : 265
- [12] Laemmli U K. Natur(London) , 1970 , 227 : 680
- [13] Freedberg I M , Levin Y , Kay C M , *et al.* European Biochim Biophys Acta , 1975 , 391(2) : 361
- [14] Hurst P L , Nielsen J , Sullivan P A , *et al.* J Biochem , 1977 , 165(1) : 33
- [15] Siddiqui K S , Azhar M J , Rashid M H , *et al.* Folia Microbiol , 1997 , 42(4) : 303
- [16] Singh A , Agrawal A K , Abidi A B , *et al.* FEMS Microbiol Lett , 1990 , 59(1) : 221
- [17] Shoemaker S P , Brown R D. Biochim Biophys Acta , 1978 , 523 : 133
- [18] Gerrit B , Marjo F S , Van L , *et al.* Eur J Biochem , 1985 , 146 : 301
- [19] Karin B , Anja K , Wolfgang L , *et al.* Applied and Environ Microbiol , 1995 , 61(4) : 1 399
- [20] Rouland C , Civas A , Renoux J , *et al.* Comp Biochem Physiol , 1998 , 91B : 449
- [21] HONG Jiong , HUANG Xiu-li. Journal of Beijing Normal University(Natural Science) , 1998 , 34(3) : 403
洪 洞 , 黄秀梨. 北京师范大学学报(自然科学版) , 1998 , 34(3) : 403
- [22] GUO Chun-teng , FU Rong , DENG Wen-han , *et al.* Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology , 2002 , 2(1) : 12
郭春腾 , 傅 蓉 , 邓文汉 , 等. 中国食品学报 , 2002 , 2(1) : 12

北京明尼克分析仪器设备中心

北京明尼克分析仪器设备中心是从事实验室色谱仪器及配件、化学标准品销售的专业公司。

本中心主要供应销售的产品有气相色谱仪、液相色谱仪、原子吸收分光光度计、紫外分光光度计、数据处理机及工作站、仪器配件及消耗品。另有气源、稳压电源、国产和进口水质仪表、环保仪器、可燃气体报警器、红外线分析器、氢分析器、氧分析器、微量氧分析仪、溶解氧测量仪、露点仪、试剂标样、气相色谱毛细管柱、填充柱、液相色谱柱、梅特勒电子天平、水分仪、注射器、阀门、纯气、标准气、炼厂用高温炉传感器、石油产品烃类测定仪、进口硅胶(100~200 目) 和 FIA 荧光指示剂(适合于 GB/T11132-89)。可提供汽油中的苯含量测定、汽油中的氧化物含量测定专用色谱仪及有关配置的咨询 , 同时提供对不同型号气相色谱仪器进行技术改造的服务。常年提供汽油分析用标样及软件。欢迎惠顾垂询。

一次合作 终生朋友

本公司常年招聘业务员

地址 : 北京市海淀区学院路 20 号 911 信箱(北京石油化工科学研究院内)

新址 : 北京市海淀区学清路 16 号学知轩 1117 室

电话 : (010) 62318809 62341274 邮编 : 100083

手机 : 13601000228 13901109086 传真 : (010) 62318809

E-mail : hailing@public3. bta. net. cn