

桔青霉 CR-2 内切葡聚糖酶蛋白纯化研究初探

顿宝庆, 曲小爽, 郭明鸣, 路明, 李桂英, 张保明

(中国农业科学院作物科学研究所, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程,
中国农业科学院生物质能源研究中心, 北京 100081)

摘要:以高效纤维素分解菌桔青霉(*Penicillium citrinum*) CR-2 菌株为材料,利用分子筛及离子交换技术纯化分离其内切葡聚糖酶蛋白,首次获得了电泳纯的桔青霉内切葡聚糖酶蛋白组分,大小为 27.26 kDa,最适作用温度为 60℃,最适作用 pH 为 5。对研究桔青霉纤维素酶降解纤维素的作用机理以及该菌株的改造应用具有重要意义。

关键词:桔青霉;内切葡聚糖酶;纯化

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2010.02.18

中图分类号:S216.3

文献标识码:A

文章编号:1008-0864(2010)02-0098-05

Initial Studies on Endoglucanase Purification from *Penicillium Citrinum* Strain CR-2

DUN Bao-qing, QU Xiao-shuang, GUO Ming-ming, LU Ming,
LI Gui-ying, ZHANG Bao-ming

(Institute of Crop Sciences, National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement,
Biomass Energy Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract:Endoglucanase was purified firstly with molecular sieve and ion exchange technology from *Penicillium citrinum* strain CR-2. The electrophoretically purified enzyme protein was obtained. Its molecular size is 27.26 kDa. The optimum functional temperature of enzyme is 60℃ and the optimum pH is 5. This study is of great significance to explore the enzymatic degradation mechanism of cellulose by *Penicillium citrinum* strains and the application of CR-2 strain.

Key words:*Penicillium citrinum*; endoglucanase; purification

随着化石能源的日趋枯竭和环境的不断恶化,开发利用可再生的清洁能源成为必然选择,纤维质燃料乙醇被认为是第二代燃料乙醇,成为当前国际研究热点之一^[1,2],是目前生物质能源发展的一个重要领域,而纤维素酶作用效率和成本是实现其经济转化的关键因素之一。

在纤维素降解菌和纤维素酶的研究方面,长时间以来主要集中于木霉(*Trichoderma*)和白腐菌(*Panus conchatus*)等菌株。然而近年研究表明青霉属(*Penicillium*)真菌中的一些种类不仅能分泌组成齐全且酶活较高的木质纤维素降解酶系,还具

有易培养和生长快的优势^[3]。目前对于青霉菌在纤维素酶及其作用机理方面的研究相对不多,关于桔青霉纤维素酶基因的研究也未见报道,但已有的研究表明桔青霉在纤维素分解领域有着重要的研究应用价值和前景^[4,5]。本研究中的桔青霉(*Penicillium citrinum*) CR-2 菌株为自主分离的高效纤维素分解菌,是理想的研究、改造应用的材料菌株(专利申请号 200910082211.3),较 Tanmay 等^[5]报道的同种菌株纤维素酶活高出约 20 倍,但以往对该类菌株纤维素酶蛋白基因编码序列的研究报道为空白,不利于对其作用机制的深入研究

收稿日期:2009-12-11;修回日期:2010-01-05

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAD41B02);农业部农村能源综合建设项目(2130138-018);中国农业科学院作物科学研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目(2060302-13)资助。

作者简介:顿宝庆,助理研究员,研究方向为能源微生物。E-mail:baopingdun9@hotmail.com。通讯作者:李桂英,研究员,从事生物质能源研究。E-mail:liguiying@caas.net.cn

以及改造应用。同源序列基因克隆是基因克隆的重要手段,而本研究发现根据绳状青霉(*Penicillium funiculosum*)、微紫青霉(*Penicillium janthinellum*)、产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*)及斜卧青霉(*Penicillium decumbens*)等来源的纤维素酶编码基因同源序列无法获得 CR-2 纤维素酶有效基因,表明桔青霉纤维素酶基因可能具有全新的编码序列。而蛋白质纯化进而氨基酸测序结合基因克隆手段成为获得目的基因的另一有效方式。

本研究以桔青霉 CR-2 菌株为材料,利用分子筛及离子交换技术初步分离获得了其纤维素酶组分中的内切葡聚糖酶蛋白,为进一步发掘其关键酶编码基因,研究桔青霉纤维素酶降解纤维素作用机理以及该菌株的改造应用具有重要理论和现实意义。

1 材料与方法

1.1 菌种

桔青霉 CR-2 菌株由本实验室分离并保存(CGMCC3024)。

1.2 培养基

1.2.1 PDA 培养基 去皮马铃薯 20%,葡萄糖 2%,蛋白胨 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%, K_2HPO_4 0.3%,琼脂 2%,维生素 B_1 0.001%,105℃ 灭菌 30 min。

1.2.2 种子培养基 CMCNa 1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%,蛋白胨 0.1%,酵母膏 1.0%,琼脂粉 1.5%。

1.2.3 发酵产酶培养基 玉米秸秆粉 2.3%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.25%, KH_2PO_4 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $CaCO_3$ 0.06%。

1.3 主要试剂、仪器设备

1.3.1 试剂 葡聚糖凝胶 SephadexG-75,购自 Pharmacia 公司;DEAE PE52 购自 Whatman 公司;丙烯酰胺、N,N-甲叉双丙烯酰胺购自 Novagen 公司;Tris Base 购自 Sigma 公司;蛋白质分子量标准购自 NEB 公司;蛋白质测定试剂购自 BioRad 公司;其他分析纯化学试剂购自北京化学试剂公司。

1.3.2 主要仪器设备 蛋白质电泳仪,为美国 BioRad 公司产品;自动部分收集器 BSZ-100,上海

青浦沪仪器厂生产;恒流蠕动泵 BT100-1J,购自保定兰格恒流泵有限公司;超滤管 MWC0-10,购自法国 Millipore 公司;凝胶层析柱 1cm × 19cm,购自上海楚柏实验室设备有限公司。

1.4 粗酶液的制备

用 10 mL 无菌水将生长于 PDA 斜面培养基上的 CR-2 菌株孢子洗下,制成浓度约为 1×10^7 个/mL 的孢子悬液,吸取 1 mL 加入到 100 mL 种子培养基中,30℃、200 r/min 培养 2 d,以 10% 接种量转接于 800 mL 发酵产酶培养基中继续培养 5 d 后,发酵液用纱布过滤,4℃、13 200 r/min 离心 20 min,上清液即为粗酶液。粗酶液用 Millipore 超滤管进行浓缩。

1.5 CMCase 酶活性分析方法

酶活力测定采用 DNS 法^[6]。移取 200 μ L 适当稀释的酶液(洗脱液)于 50℃ 恒温水浴中预热后,加入 0.5% CMC-Na 溶液(pH 4.8)600 μ L,50℃ 恒温水浴准确反应 30 min,加入 200 μ L 浓度为 1 mol/L NaOH 溶液,摇匀,终止反应。加入 600 μ L DNS 试剂,于沸水浴中准确反应 5 min,用流动的冷水终止反应。用去离子水定容至 5 mL,测定 OD_{540} 光吸收值,对照标准曲线后测算酶活力。在上述条件下,以国际单位为依据,定义每 min 催化纤维素水解生成 1 μ mol 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位 IU。

1.6 蛋白质浓度测定方法

采用 Bradford 方法^[7]和 BioRad 公司蛋白质试剂盒进行测定。

1.7 内切葡聚糖酶蛋白纯化方法

首先采用固体硫酸铵分级沉淀^[8],去除大量杂蛋白,在本研究中通过选择 40%、50%、60%、70%、80%、90% 和 100% 饱和度的硫酸铵进行盐析沉淀,比较分析 CMCase 酶活,确定内切葡聚糖酶在硫酸铵饱和度为 60% 时沉淀量最大。经盐析去除了大量杂蛋白的酶液经透析超滤处理的样品用于经柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 4.8)充分平衡的 SephadexG-75 柱子,洗脱流速 1 mL/min,洗脱液经紫外分光光度计检测并分步收集(5.0 mL/管),分别测定出峰部分洗脱液的酶活力,合并活性部分,活性部分经 Millipore 超滤管浓

缩。浓缩后的活性部分用0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)平衡好的 DEAE PE52 阴离子交换柱(1 cm × 19 cm)进一步纯化,以0.5 mL/min 流速洗脱,分别测定出峰部分洗脱液的酶活力,收集最高活性部分,浓缩用于 SDS-PAGE 检测。

1.8 SDS-PAGE 分析和蛋白质分子量测定^[9]

采用美国 Bio-Rad 公司的蛋白质电泳系统,对不同纯化步骤的内切葡聚糖酶蛋白进行 SDS-PAGE 分析。蛋白质分子量大小用软件 Bio-Profil Bio-1D ++ Windows Application Version 10.02 分析处理,计算测得该内切-葡聚糖酶分子量大小。

1.9 内切葡聚糖酶的最适作用温度测定

将纯化得到的内切葡聚糖酶液分别在不同的温度(30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃和90℃)下,按照1.5步骤测定 CMCase 酶活性,将最高的酶活力定义为100%,分别计算不同温度条件下内切葡聚糖酶活性(采用相对酶活性来表示,即在不同温度条件下剩余的酶活性占其中酶活性的最高值的百分比)。

2.10 内切葡聚糖酶的最适作用 pH 测定

将纯化得到的内切葡聚糖酶液分别在 pH 2~9 的不同条件下,按照1.5步骤测定 CMCase 酶活性,将最高的酶活力定义为100%,分别计算不同 pH 条件下内切葡聚糖酶活性(采用相对酶活性来表示,即在不同 pH 条件下剩余的酶活性占其中酶活性的最高值的百分比)。

2 结果与分析

2.1 内切葡聚糖酶蛋白纯化结果

2.1.1 SephadexG-75 凝胶柱层析 以0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 4.8)洗脱,洗脱曲线中共有4个蛋白质峰,对该部分收集管中的洗脱液进行酶活力分析测定,结果如图1所示。酶活性检测表明,只有在第2个蛋白质峰位置收集的洗脱液有较高酶活性,也就是集中在9~11号收集管,在其他几个蛋白质峰的位置没有检测到酶活性或酶活性很低,因此将9~11收集管中的洗脱液进行合并,经超滤浓缩后进行下一步纯化。同时分析可知,经过 SephadexG-75 柱纯化可以去除大量杂蛋白,样品中的目的蛋白质纯度得到很大程度的提高。

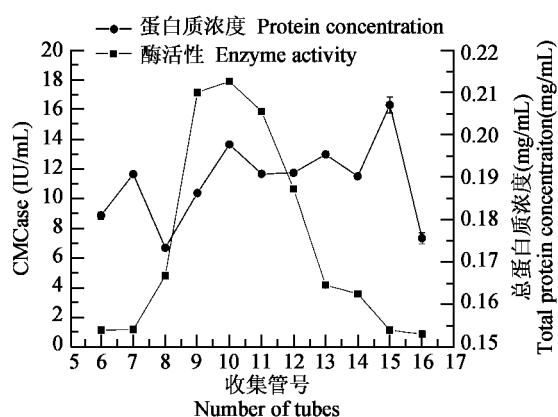


图1 内切葡聚糖酶分子筛层析图

Fig. 1 Chromatography of endoglucanase purification on SephadexG-75.

2.1.2 DEAE-PE52 柱层析 经过 SephadexG-75 柱纯化、浓缩后的活性部分用经0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)平衡好的 DEAE PE52 阴离子交换柱进一步纯化,以0.5 mL/min 流速进行洗脱。洗脱曲线中有3个蛋白质峰出现,对该部分收集管中的洗脱液进行酶活力分析测定,结果如图2所示。酶活性检测表明,只有在中间的蛋白质峰位置收集的洗脱液有较高酶活性,以第7收集管最高,在其他2个蛋白质峰位置酶活性很低,因此将第7收集管中的洗脱液经超滤浓缩后进行下一步检测。内切葡聚糖蛋白经两步柱纯化浓缩后,纯度提高了23.09倍。

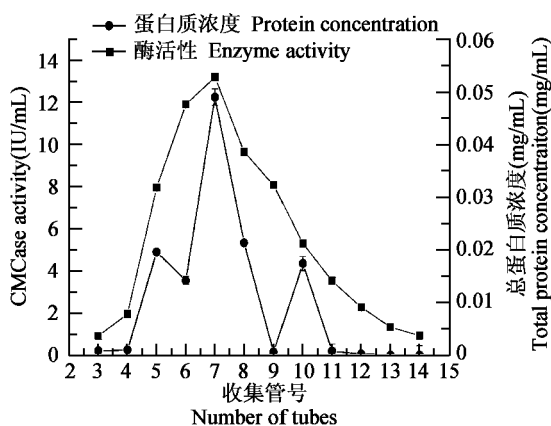


图2 内切葡聚糖酶 DEAE-52 阴离子交换柱层析图

Fig. 2 Chromatography of endoglucanase purification on DEAE-52.

2.2 内切葡聚糖酶 SDS-PAGE 分析及分子量测定

采用 SDS-PAGE 方法测定所得到的内切葡聚

糖蛋白的纯度,如图 3。分析结果可知,大部分杂蛋白是在分子筛 SephadexG-75 层析时去除的。经 SephadexG-75 和 DEAE PE52 两次层析纯化后的酶蛋白在电泳图上表现为单一条带,即得到了电泳纯的内切葡聚糖酶。经过软件 Bio-Profil Bio-ID ++ Windows application Version 10.02 分析处理,计算测得该内切葡聚糖酶分子量为 27.26 kDa。

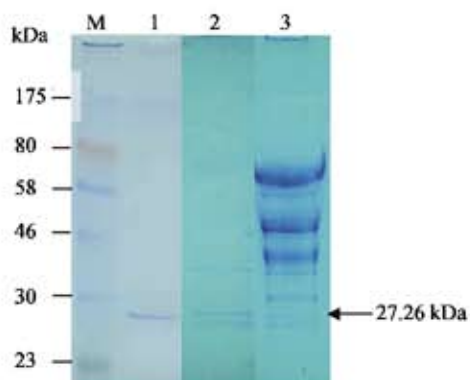


图 3 不同纯化步骤蛋白质 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified endoglucanase.

M: 蛋白质分子量 marker; 1: DEAE-52 阴离子交换柱层析样品; 2: SephadexG-75 凝胶柱层析样品; 3: 60% 过硫酸铵沉淀样品
M: Protein molecular weight marker; 1: Chromatography sample of endoglucanase purification on DEAE-52; 2: Chromatography sample of endoglucanase purification on Sephadex G-75; 3: Sample of 60% ammonium persulfate precipitation.

2.3 内切葡聚糖酶的最适温度测定

在不同温度条件下测定内切葡聚糖酶的活性,测定结果如图 4 所示。分析可知,由 CR-2 菌株产生的胞外酶纯化得到的内切葡聚糖酶最适反应温度在 60℃ 左右,在 50℃、60℃ 和 70℃ 时酶活相对较高,在 80℃ 时酶活下降很快,因此,该内切葡聚糖酶是一种耐中高温的酶。

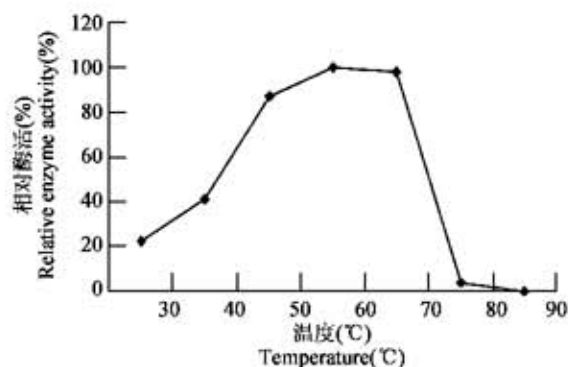


图 4 纯化的内切葡聚糖酶最适温度测定

Fig. 4 Effect of temperature on the activity of purified endoglucanase.

2.4 内切葡聚糖酶的最适 pH 测定

在不同 pH 值的条件测定内切葡聚糖酶的活性。结果如图 5 所示,可知内切葡聚糖酶的最适反应 pH 为 5 左右,随着 pH 的升高酶活力逐渐下降,在碱性条件下活性减弱较快,表明该酶为酸性酶。

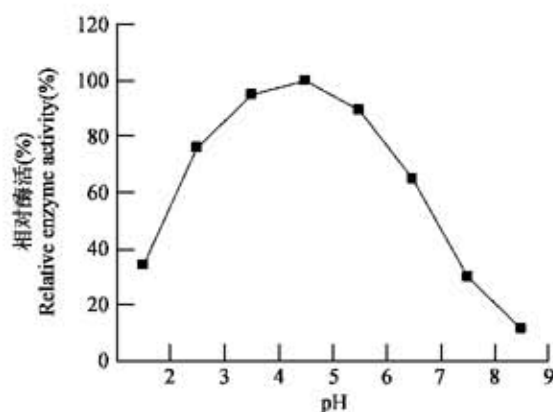


图 5 纯化的内切葡聚糖酶最适 pH 测定

Fig. 5 Effect of pH on the activity of purified endoglucanase.

3 讨论

青霉纤维素酶组分分离研究已经取得了一定的进展,已有包括斜卧青霉和绳状青霉等在内的几十种组分得到了分离并克隆了部分编码基因,包括斜卧青霉、绳状青霉和巴西青霉等^[10]。然而对于桔青霉纤维素酶组分的分离纯化目前还是空白,只有 Dutta 等^[5]报道了产纤维素酶的桔青霉菌株 MTCC6489,能够产生耐碱且热稳定性的纤维素酶,初步认为其可能具有分子量大小分别为 90 kDa 和 38 kDa 的 2 个内切葡聚糖酶,但并未分离得到。本研究由 CR-2 菌株产生的胞外酶得到的纯化内切葡聚糖酶在 60℃, pH 5 时酶活最高,据此可知由 CR-2 发酵液胞外生物物质降解酶分离到的该内切葡聚糖酶是一种耐中高温的酸性酶,并确定其分子量大小为 27.26 kDa,这在桔青霉纤维素酶中是首次报道。

就目前研究来看,青霉属真菌具有木质纤维素降解酶系组成的多样性、合理性以及酶的结构与功能的独特性的特点。这些特点使得青霉在木质纤维素降解酶系的开发与应用上,具有木霉等其他菌株所不具有的优势。然而目前国内外的研

究主要围绕木霉和曲霉的纤维素降解酶合成调控展开,对青霉尤其桔青霉的研究只有有限的几篇报道,并且对桔青霉纤维素酶纯化分离以及基因序列方面尚无报道。本研究利用具有自主知识产权的桔青霉 CR-2 菌株,分离获得了其生物质降解酶组分中的内切葡聚糖酶,使得进一步利用分离纯化的酶进行质谱氨基酸序列测定进而克隆目的基因具有了理论和实验的可行性。该项工作的开展将为研究桔青霉纤维素酶代谢调控、降解木质纤维素的作用机制等提供重要理论和实验基础。

参 考 文 献

- [1] Ragauskas A J, Williams C K, Davison B H, *et al.*. The path forward for biofuels and biomaterials[J]. *Science*, 2006,311(5760):484-489.
- [2] Sticklen M B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol [J]. *Nature Rev. genet.*, 2008,9:433-443.
- [3] Rgensen H J, Eriksson T, Rjesson J B, *et al.*. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888 [J]. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2006,32(7):851-861.
- [4] Polman K J, Stoner D L, Delezene-Briggs K M. Bioconversion of coal, lignin, and dimethoxybenzyl alcohol by *Penicillium citrinum*[J]. *J. Ind. Microbiol.*, 1994,13(15):292-299.
- [5] Dutta T, Sahoo R, Sengupta R, *et al.*. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization [J]. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2008,35(4):275-282.
- [6] 顿宝庆,吴薇,王旭静,等. 一株高纤维素酶活纤维素分解菌的分离与鉴定[J]. *中国农业科技导报*,2008,10(1):115-119.
- [7] Bradford M M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding [J]. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248-254.
- [8] 汤鸣强. 黑曲霉 SL2-111 固体发酵生产果胶酯酶的研究[J]. *生物技术*,2006,16(2):65-68.
- [9] 郭尧君. 蛋白电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,2003, 123-138.
- [10] 孙宪昀,曲音波,刘自勇. 青霉木质纤维素降解酶系研究进展[J]. *应用与环境生物学报*,2007,13(5):736-740.

第三届全国生物质谱暨蛋白质组数据处理学术交流会

为了积极促进我国生物质谱、蛋白质组学技术发展和应用,加强数据挖掘的经验交流,全国生物质谱暨蛋白质组数据处理学术交流会定于2010年5月15~17日在云南省丽江市召开。本届学术会议将邀请生物质谱、蛋白质组学及生物信息学相关领域的专家和教授作专题报告,热诚欢迎全国从事生物质谱、蛋白质组学技术发展和应用以及数据挖掘的科研和技术人员,以及相关企业与会交流。

一、会议时间、地点:

2010年5月15~17日,云南省丽江市

二、会议组织:

主办单位:中国生物化学与分子生物学会蛋白质组学专业委员会

中国质谱学会生物质谱专业委员会和中国化学会分析化学委员会

承办单位:北京蛋白质组研究中心

复旦大学

三、会议内容:

大会设有大会报告和分会讨论两种形式。主要讨论生物质谱、蛋白质组学技术和应用以及数据挖掘方面的现状及其进展,内容包括:生物质谱技术的最新进展;分离技术与生物质谱联用技术进展及其在疾病蛋白质组研究、功能蛋白质组研究、药物蛋白质组研究、结构蛋白质组研究中的应用,以及这些技术与蛋白质化学、生物信息学等技术结合在蛋白质表达谱、修饰谱、相互作用以及比较蛋白质组学研究中的新进展;蛋白质组数据挖掘的方法和经验交流。

四、联系方式:

地 址:北京市昌平区科学园路33号

北京蛋白质组研究中心(102206)

联系人:彭 博,张雪莉

电 话:010-80727777 转 1146/1546

传 真:010-80705155

邮 箱:bioms2010@163.com