

郭建华, 蒋海娇, 郭宏文, 等. 1 株产纤维素酶细菌的内切- $\beta$ -葡聚糖苷酶的分离纯化及其酶学性质[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(16): 227-234. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.16.033

# 1 株产纤维素酶细菌的内切- $\beta$ -葡聚糖苷酶的分离纯化及其酶学性质

郭建华, 蒋海娇, 郭宏文, 邹东恢, 王 燕

(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

**摘要:**为对 1 种细菌来源的内切- $\beta$ -葡聚糖苷酶进行分离纯化和酶学性质研究, 利用盐析沉淀、凝胶层析、疏水层析和弱阳离子交换色谱等对细菌菌株 DM-4 所产内切- $\beta$ -葡聚糖苷酶进行了分离纯化, 利用 SDS-PAGE 电泳对其纯度和分子量进行检测, 考察温度和 pH 值对酶活力的影响, 最后计算酶的反应动力学常数。结果显示, 经分离纯化, 获得 2 个酶活组分 CMC 酶 I 和酶 II, 其纯化倍数分别为 45.94 倍和 32.27 倍, 回收率分别为 14.66% 和 8.33%。CMC 酶 I 和酶 II 分子量分别为 38.99、45.53 ku, 其最适作用温度分别为 55~60℃ 和 55℃, 最适 pH 值均为 7.5。温度低于 70℃ 时, 2 种酶组分均对热稳定, 并在 pH 值为 6.0~8.0 范围内具有良好稳定性。CMC 酶 I 的  $K_m$  为 2.55 g/L,  $V_m$  为 37.59  $\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ ; CMC 酶 II 的  $K_m$  值为 4.37 g/L,  $V_m$  为 28.82  $\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。结果表明, 采用盐析沉淀、凝胶层析、疏水层析和弱阳离子交换色谱多种分离技术对菌株 DM-4 所产内切- $\beta$ -葡聚糖苷酶具有良好的分离纯化效果, 经凝胶电泳检测, 酶组分达电泳级纯度。酶学性质表明, 菌株 DM-4 所产的 2 种 CMC 酶组分均为中性偏碱性纤维素酶, 这与霉菌来源的纤维素酶有所不同。

**关键词:**纤维素酶产生菌; 内切- $\beta$ -葡聚糖苷酶; 分离纯化; 酶学性质

**中图分类号:** S182      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2022)16-0227-08

纤维素酶在饲料工业、食品工业、洗涤工业及纺织工业中具有广泛的利用前景。大多数细菌所产纤维素酶与真菌来源的酶性质不同, 某些方面具有真菌酶不可替代的作用<sup>[1]</sup>, 因此细菌纤维素酶在工业生产中的地位逐渐提高<sup>[2]</sup>。其中, 产纤维素酶的芽孢杆菌逐渐成为近年研究热点<sup>[3]</sup>。自 1960 年来, 对纤维素酶的分离纯化开展了广泛的科学探索<sup>[4]</sup>。微生物所产纤维素酶是由多种酶组分组成的复杂酶系统, 将酶从系统中分离纯化出来是精确研究它们的前提<sup>[5]</sup>。酶的分离纯化技术有多种, 一是可根据蛋白质热稳定性差异进行分离纯化; 二是利用酶蛋白溶解特性的不同进行分离纯化, 可利用盐分级沉淀或利用双水相体系进行分离纯化, 如 Liu 等利用响应面法优化了双水相体系(ATPS)对贝莱斯芽孢杆菌所产的纤维素酶的分离纯化工艺<sup>[6]</sup>; 三是利用电泳和液相色谱技术分离纯化, 主要作用是检测酶蛋白的分子量和纯度<sup>[7]</sup>; 四是利用

分子筛凝胶色谱、离子交换色谱等色谱层析分离纯化, 如江小妹等采用 Q-琼脂糖凝胶 FF 阳离子交换层析和葡聚糖 G-100 凝胶层析对团头鲂肠道菌株 *Aspergillus niveus* MA35 所产的内切型纤维素酶进行分离纯化, 酶的比活力由 22.3 U/mg 提高至 30.6 U/mg<sup>[8]</sup>。实际研究工作中, 一般要采用多种分离技术对纤维素酶进行分离纯化。Clare 等利用 4 mol/L 蔗糖溶液透析、Q-Sepharose FF 离子交换色谱和苯基 Sepharose CL-4B 疏水作用色谱对球形芽孢杆菌 CE-3 产生的纤维素酶进行纯化, 利用 SDS-PAGE 电泳检测酶的分子质量<sup>[9]</sup>。王婷婷等利用  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分级沉淀、DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析和 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 疏水层析, 从文蛤(*Meretrix meretrix* L.) 中分离纯化出 1 种纤维素酶, 分离纯化后的纤维素酶比活力达到 40.33 U/mg, 纯化倍数达 13.12<sup>[10]</sup>。目前为止, 在纤维素酶分离纯化方面, 存在着纯化倍数较低、回收率低、纯化不完全等问题, 同时很多分离纯化技术仅能局限于实验室层面, 影响对酶的特性的研究及其应用<sup>[11]</sup>。针对来源和种类众多的纤维素酶体系的各个组分, 研究开发分离纯化手段是提高纯化倍数和提高回收率等问题的关键所在。

收稿日期: 2021-09-21

基金项目: 黑龙江省教育厅基本业务专项(编号: 135109257); 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(编号: 135309209)。

作者简介: 郭建华(1977—), 男, 山东高唐人, 博士, 副教授, 研究方向为微生物发酵。E-mail: gjh19771123@163.com。

本研究以选育得到 1 株产纤维酶细菌的突变菌株为试验菌株,利用硫酸铵盐析、疏水相互作用色谱、离子交换层析及分子筛凝胶色谱从其发酵液中分离纯化内切- $\beta$ -葡聚糖苷酶(CMC 酶),测定分离纯化后的酶的纯度、分子量及部分酶学特性,以期菌株所产纤维素酶的应用提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌株

菌株 DM-4,笔者所在实验室从白酒酒醅中选育得到,经鉴定该菌为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。试验于 2020 年 6—10 月在齐齐哈尔大学食品与生物工程学院实验室进行。

### 1.2 实验方法

1.2.1 培养基 种子培养基:牛肉膏 0.5%,蛋白胨 1%,NaCl 0.5%,pH 值 7.5~7.6,121℃下灭菌 30 min。

发酵培养基:麸皮(过 80 目筛)2.54%,蛋白胨 0.92%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.50%,NaCl 0.50%,硫酸镁 0.02%,pH 值为 6.0~6.5,121℃下灭菌 30 min。

1.2.2 酶液的制备 将菌株 DM-4 接种在种子培养基上,置于恒温摇床内,温度 37℃、转速 180 r/min 条件下培养 12 h 作为种子。将种子液以 5%接种量接种至发酵培养基内,温度 37℃、转速 231 r/min 发酵 36 h。将发酵液倒入离心管内,于温度 4℃、转速 5 000 r/min 条件下离心 10 min,得到粗酶液。

1.2.3 内切型- $\beta$ -葡聚糖酶(CMC 酶)活力的测定 内切型- $\beta$ -葡聚糖酶(CMC 酶)活力的测定见参考文献[12]。

1.2.4 蛋白质含量的测定 280 nm( $D_{280\text{ nm}}$ )光吸收法:利用试验用缓冲溶液将分光光度计  $D_{280\text{ nm}}$  调至零;利用分光光度计检测样品在 280 nm 波长下的吸光度。

或采用 Folin-酚法测定,见参考文献[13]。

### 1.2.5 内切- $\beta$ -葡聚糖苷酶的分离纯化

1.2.5.1 硫酸铵盐析 将酶液装入 8 个试管内(每管 5 mL),放入冰水浴中,向管内缓慢加入粉末硫酸铵,使硫酸铵饱和度分别为 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 和 90%。4℃放置 12 h,离心后测定酶液 CMC 酶活。

取 300 mL 离心除去菌体粗酶液,缓缓加入粉末硫酸铵至分级盐析沉淀条件下限,4℃放置 12 h,离

心后测定清液体积。向清液中缓缓加入粉末硫酸铵至分级沉淀条件的上限,4℃放置 12 h。离心弃上清,将沉淀溶于 30 mL 0.1 mol/L 柠檬酸 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液(pH 值 7.0)中。

1.2.5.2 透析脱盐 将透析袋剪成约 20 cm 长度,放入碳酸氢钠(2%)和 EDTA(1 mmol/L)混合溶液中,加热沸腾 10 min。清洗干净放入 EDTA(1 mmol/L)溶液中加热沸腾 10 min,降温后浸在乙醇溶液(20%)中冰箱 4℃存放。

取 1 000 mL 烧杯加入蒸馏水,加入搅拌转子,将烧杯放在磁力搅拌器上,把复溶酶液倒入透析袋内,止水夹夹住末端,装进烧杯内在 4℃低温下进行脱盐。每 2 h 换水,将  $\text{BaCl}_2$  溶液滴入烧杯内,若无沉淀出现,则脱盐过程结束,后利用聚乙二醇(分子量 20 000)将酶液浓缩。

1.2.5.3 Sephadex G-25 凝胶色谱分离 通过 Sephadex G-25 凝胶色谱层析对盐析并脱盐后的酶液脱色和交换缓冲液。柱型: $\Phi 2.6\text{ cm} \times 30\text{ cm}$ ,洗脱液:0.02 mol/L PBS 缓冲液(pH 值 7.0,硫酸铵饱和度 30%);流速:2 mL/min,每管 6 mL。检测每个管内液体的吸光度及 CMC 酶活力,混合具有活性的液体。

1.2.5.4 Phenyl-Sephadex HP 疏水相互作用色谱分离 柱型: $\Phi 2.6\text{ cm} \times 15\text{ cm}$ ;起始缓冲液:0.02 mol/L PBS 缓冲液(pH 值 7.0,硫酸铵饱和度 30%);洗脱液:0.02 mol/L PBS 缓冲液(pH 值为 7.0);流速:2 mL/min。上样后起始缓冲溶液恒流洗至吸光度( $D_{280\text{ nm}}$ )接近于 0,再用起始缓冲溶液和等体积洗脱液进行线性梯度洗脱;每管收集 6 mL。检测每个管内液体的吸光度及 CMC 酶活力,混合具有活性的液体。

1.2.5.5 CM-Sephadex FF 弱阳离子交换色谱分离 将 Phenyl-Sephadex HP 分离收集的液体透析脱盐,再利用 CM-Sephadex FF 进一步分离纯化。

吸附 pH 值的确定:准备 6 个小烧杯,每个烧杯放入 1 mL 处理好的 CM-Sephadex FF,采用浓度为 0.02 mol/L PBS(pH 值分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5)5 mL 漂洗树脂 10 次,每个烧杯内 PBS 高出约 1 cm,每个烧杯内移入 1 mL 酶液,混匀,静置约 10 min,取上清液检测其残留酶活,计算酶活残留率(%),确定最佳吸附 pH 值。

柱型: $\Phi 2.6\text{ cm} \times 15\text{ cm}$ ;起始缓冲液:0.02 mol/L PBS 缓冲液(pH 值为 5.5、6.0);流速:2.0 mL/min;

上样后用起始缓冲液冲洗至  $D_{280\text{ nm}}$  接近于 0, 按照 NaCl 浓度递增方向采用起始缓冲液和等体积含 NaCl 0.8 mol/L (0.5 mol/L) 的洗脱液进行梯度洗脱; 每管收集 6 mL。检测每个管内液体的吸光度及 CMC 酶活力, 混合具有活性的液体。

**1.2.5.6 Superdex 75 凝胶色谱分离** 将离子交换色谱后处理后的液体, 透析脱盐浓缩后通过 Superdex 75 进一步分离提纯。柱型: Superdex 75 16/60 预装柱; 洗脱液: 0.02 mol/L PBS 缓冲液 (0.5 mol/L NaCl, pH 值 7.0); 洗脱液体积: 120 mL; 流速: 1.0 mL/min; 每管收集 1 mL。检测每个管内液体的吸光度及 CMC 酶活力, 混合具有活性的液体。

**1.2.5.7 纯度检测及分子量的测定** 利用 SDS-PAGE 电泳检测酶的纯度<sup>[14]</sup>。

**1.2.6 内切- $\beta$ -葡聚糖苷酶酶学特性测定**

**1.2.6.1 最适作用温度及热稳定性测定** 取分离提纯后的酶液稀释后, 在温度 30、35、40、45、50、55、60、65、70 °C 的水浴条件下测定 CMC 酶活力。

将上述酶液置于 40、50、60、70、80 °C 的水浴中, 每隔 20 min 检测 CMC 酶活力, 计算残留率 (%)。

**1.2.6.2 最适作用 pH 值及 pH 稳定性测定** 采用 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5 的醋酸-醋酸钠溶液制备羧甲基纤维素钠溶液 (1%) 作为底物, 取纯化后的酶液适当稀释后, 检测 CMC 酶活力。

取纯化后酶液适当稀释后分成 6 份, 分别加入双倍体积的 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 及 9.0 醋酸-醋酸钠溶液, 放入 40 °C 水浴中, 每 20 min 检测 CMC 酶活 1 次, 计算残留率 (%)。

**1.2.6.3 酶的反应动力学常数  $K_m$  和  $v_m$  的测定** 将纯化后酶液利用醋酸-醋酸钠溶液 (pH 值 7.5) 稀释 30 倍, 取 1 mL 加入 1 mL 采用醋酸-醋酸钠溶液制备不同浓度的 CMC-Na 溶液 (pH 值 7.5), 使酶液进反应时底物浓度分别为 10、8、6、4、2 g/L, 反应温度和 pH 值设在最适条件下。每种底物浓度分别于 0、5、10、15、20、25 min 采用 DNS 法测定还原糖含量。绘制还原糖含量与时间的变化曲线, 进行二次回归求得  $v_0$ , 利用 L-B 法作图计算  $K_m$  和  $v_m$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶的分离纯化

**2.1.1 硫酸铵沉淀** 利用不同饱和度硫酸铵进行

沉淀试验确定盐析条件, 由表 1 可知, 随硫酸铵饱和度增加, 上清中残余酶活逐渐降低, 当硫酸铵饱和度达 70% 时, 上清液中的残留酶活已降至 1.02%。因此, 确定硫酸铵的饱和度沉淀区间为 20% ~ 70%。沉淀采用缓冲液溶解后, 再充分透析脱盐。

表 1 硫酸铵不同饱和度的上清液酶活残留率

硫酸铵饱和度 (%)	上清液残留相对酶活 (%)
0	100.00
20	92.31
30	79.64
40	45.76
50	27.35
60	10.22
70	1.02
80	0.00
90	0.00

**2.1.2 Sephadex G-25 凝胶分离** 本研究采用分子量范围为 100 ~ 5 000 u Sephadex G-25, 对经 20% ~ 70% 饱和度硫酸铵处理的酶脱色和初步分离, 洗脱曲线。由图 1 可知, 洗脱时 CMC 酶组分首先被洗脱下来, 可推测菌株 DM-4 所产 CMC 酶的分子量 > 5 000 u。酶的活性峰和蛋白峰相对应, 提示 Sephadex G-25 凝胶去除色素和分离较小的杂质蛋白效果理想。

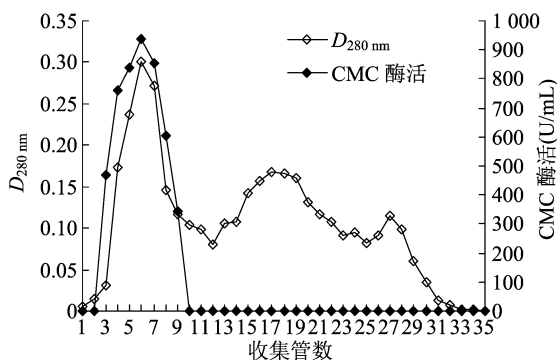


图 1 Sephadex G-25 的洗脱曲线

**2.1.3 Phenyl-Sephrose HP 疏水相互作用色谱分离结果** 经过 Sephadex G-25 凝胶分离后, 收集的活性组分过度到硫酸铵饱和度为 30% 缓冲体系, 进行下一步 Phenyl-Sephrose HP 分纯。由图 2 可知, 恒洗过程中疏水性较弱的杂质去除了很多。在硫酸铵饱和度线性降低的梯度洗脱过程中分离出 2 个 CMC 酶活性组分, 命名为 CMC 酶 I 和 CMC 酶 II。CMC 酶 I 在梯度洗脱中期被洗脱下来, 其活性

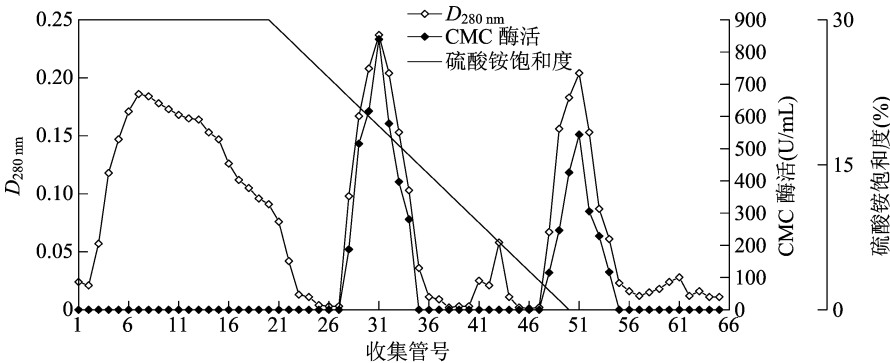


图2 Phenyl-Sephrose HP 洗脱曲线

较高,CMC 酶Ⅱ在梯度洗脱结束时被洗脱下来,说明 CMC 酶Ⅱ疏水性强于酶Ⅰ。

2.1.4 CM-Sephrose FF 弱阳离子交换色谱分离

利用 CM-Sephrose FF 将经疏水相互作用分纯收集到的 CMC 酶Ⅰ和 CMC 酶Ⅱ活性组分再次分纯。由表 2、表 3 可知,CMC 酶Ⅰ和 CMC 酶Ⅱ分别在 pH 值 5.5 和 pH 值 6.0 时吸附效果最好,因此,起始缓冲液 pH 值分别确定为 pH 值 5.5 和 pH 值 6.0。经多次试验比较后,对 CMC 酶Ⅰ选择 0.8 mol/L NaCl 溶液为洗脱液,对 CMC 酶Ⅱ选择 0.5 mol/L NaCl 溶液为洗脱液。

由图 3 和图 4 可知,在各自优化条件下,CMC

表 2 不同 pH 值缓冲液树脂对 CMC 酶Ⅰ吸附效果

pH 值	上清液 CMC 酶活残留率 (%)
5.0	1.56
5.5	0.17
6.0	10.62
6.5	23.84
7.0	28.38
7.5	35.92

表 3 不同 pH 缓冲液树脂对 CMC 酶Ⅱ吸附效果

pH 值	上清液 CMC 酶活残留率 (%)
5.0	1.85
5.5	1.33
6.0	0.14
6.5	10.84
7.0	31.24
7.5	44.92

酶Ⅰ和 CMC 酶Ⅱ均能很好地与填料结合,在恒洗阶段,活性组分未被洗脱,而杂蛋白在恒洗阶段被大量洗脱。梯度洗脱时酶活性组分被洗脱下来,并且酶活性峰与蛋白峰基本对应。

2.1.5 Superdex 75 凝胶过滤色谱分离

将 CMC 酶Ⅰ和 CMC 酶Ⅱ活性组分脱盐浓缩后,进行 Superdex 75 分离。由图 5、图 6 可知,在洗脱过程 CMC 酶蛋白峰与其他蛋白峰分开,并且与活性峰完全对应,说明 CMC 酶Ⅰ和 CMC 酶Ⅱ均已达比较理想的纯化效果,分别将 CMC 酶Ⅰ和 CMC 酶Ⅱ的活性组分收集,-20℃保存备用。

2.1.6 CMC 酶Ⅰ和 CMC 酶Ⅱ分离纯化回收后的结果

由表 4、表 5 可知,经 Phenyl-Sephrose HP

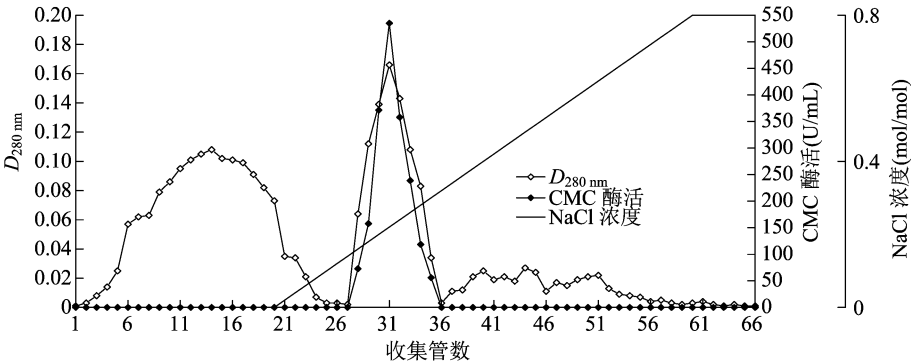


图3 CMC酶Ⅰ的CM-Sephrose FF洗脱曲线

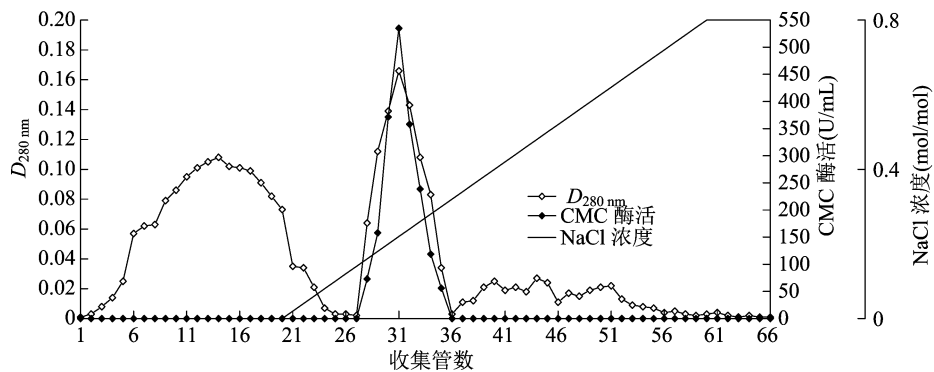


图4 CMC 酶ⅡCM-Sephrose FF洗脱曲线

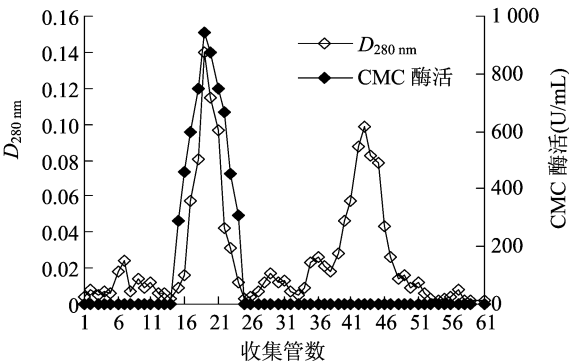


图5 CMC酶ⅠSuperdex75 凝胶色谱洗脱曲线

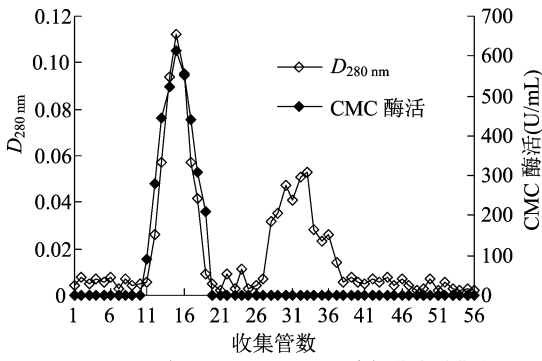


图6 CMC酶ⅡSuperdex75 凝胶色谱洗脱曲线

疏水相互作用色谱处理后,CMC 酶Ⅰ和 CMC 酶Ⅱ比活力分别达 960.82、717.19 U/mL,纯化倍数为 19.33 倍和 14.43 倍,提示 Phenyl-Sephrose HP 疏水相互作用色谱分离是适合用于菌株 DM-4 所产内切纤维素酶的一种分离手段。经 CM-Sephrose

FF 处理后,纯化倍数进一步提高,最后经过 Superdex 75 处理后,纯化倍数分别达 45.94 倍和 32.27 倍。

2.1.7 CMC 酶纯度检验及分子量检测 利用 SDS-PAGE 电泳检测 CMC 酶纯度及其相对分子质

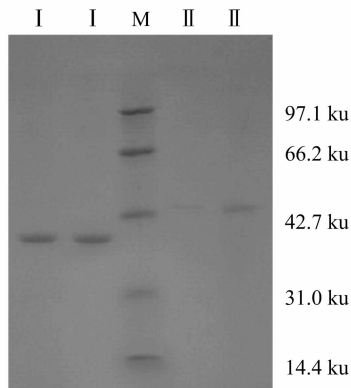
表 4 CMC 酶Ⅰ纯化结果

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (U)	比活力 (U/mg)	回收率 (%)	纯化倍数 (倍)
发酵液	836.73	41 587.35	49.70	100.00	1.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 沉淀	268.89	31 947.39	118.81	76.82	2.39
Sephadex G-25	94.56	28 824.18	304.82	69.31	6.13
Phenyl-Sephrose HP	21.33	20 494.26	960.82	49.28	19.33
CM-Sephrose FF	6.81	11 453.37	1 681.85	27.54	33.84
Superdex 75	2.67	6 095.70	2 283.03	14.66	45.94

表 5 CMC 酶Ⅱ纯化结果

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (U)	比活力 (U/mg)	回收率 (%)	纯化倍数 (倍)
发酵液	836.73	41 587.35	49.70	100.00	1.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 沉淀	268.89	31 947.39	118.81	76.82	2.39
Sephadex G-25	94.56	28 824.18	304.82	69.31	6.13
Phenyl-Sephrose HP	16.59	11 898.18	717.19	28.61	14.43
CM-Sephrose FF	4.53	4 676.19	1 032.27	11.24	20.77
Superdex 75	2.16	3 464.25	1 603.82	8.33	32.27

量,由图 7 可知,经分离纯化得到 CMC 酶 I 及 CMC 酶 II 均已达电泳级别纯度。由图 8 可知,利用 Mark 中蛋白分子量的对数和迁移率绘制蛋白分布曲线。根据 CMC 酶 I 和 CMC 酶 II 的相对迁移率大小及分布曲线,计算得到 CMC 酶 I 分子量约 38.99 ku, CMC 酶 II 分子量约 45.53 ku。



I—CMC 酶 I; M—蛋白 marker(14.4~97.1 ku); II—CMC 酶 II

图7 CMC酶 I 和CMC酶 II 的SDS-PAGE电泳图

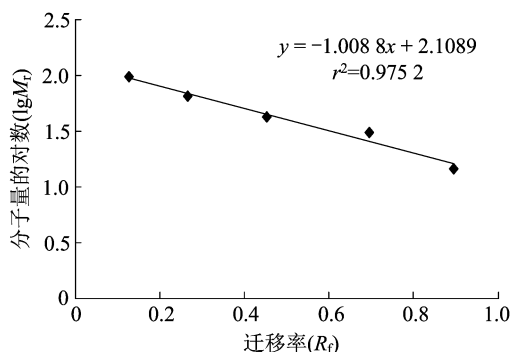


图8 蛋白Mark分布曲线

这与其他学者分离纯化出的细菌内切纤维素酶具有一些差别,如 Aa 等从枯草芽胞杆菌中纯化的 CMC 酶分子量为 70 ku<sup>[15]</sup>。Allardyce 等从某细菌中获得的 2 种 CMC 酶分子量分别为 53 ku 和 52 ku<sup>[16]</sup>。Yan 等从蜡样芽胞杆菌中获得的 CMC 酶分子量为 51.3 ku<sup>[17]</sup>。Lo 等纯化出得活性 CMC 酶分子量约 35.8 ku<sup>[18]</sup>。Zakaria 等从枯草芽胞杆菌菌株 KU-1 获得的 CMC 酶分子量为 39~40 ku<sup>[19]</sup>。

## 2.2 菌株所产内切-β-葡聚糖苷酶的酶学性质

2.2.1 酶最适作用温度及热稳定性检测 将纯化后的 CMC 酶 I 和 CMC 酶 II 适当稀释后,于不同温度条件分别检测其活力大小。由图 9 可知,CMC 酶 I 在 60℃ 反应条件下表现出最高活力,CMC 酶 II 在 55℃ 反应条件下表现出最高活力。

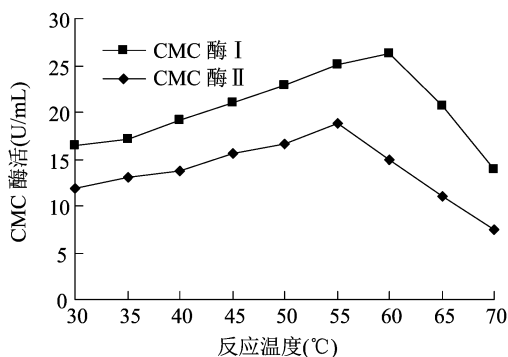


图9 不同反应温度下 CMC 酶 I 和 CMC 酶 II 活力

经差异显著性检测,55℃ 与 60℃ 时,CMC 酶 I 的酶活不具有显著差异( $P < 0.05$ ),55℃ 与其他温度下酶活差异显著( $P < 0.01$ );CMC 酶 II 在 55℃ 时酶活与其他温度下均具有显著差异( $P < 0.01$ )。因此,确定 CMC 酶 I 最适作用温度范围为 55~60℃,CMC 酶 II 为 55℃。

将纯化稀释后的 CMC 酶 I 和 CMC 酶 II 分别放置在不同温度水浴中,每 20 min 取样检测酶活,计算残留率。由图 10、图 11 可知,当温度低于 70℃ 时,在 60 min 前,CMC 酶 I 和 CMC 酶 II 残留率均大于 50%,稳定性良好。当温度升高至 80℃ 后,随时间延长酶活残留降低很快,直至完全丧失活力,但在 80℃ 保温 60 min 后,仍具有 25% 以上的残留率,提示 CMC 酶 I 和 CMC 酶 II 耐温性较强。本研究所分离的 2 种纤维素酶的最适温度和耐热性与吴石金等<sup>[20]</sup>和 Xu 等<sup>[21]</sup>获得的 CMC 酶具有相似性。

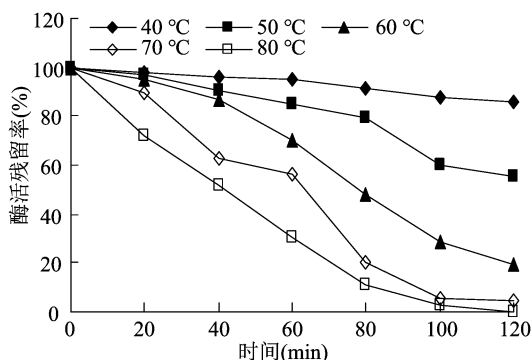


图10 CMC 酶 I 热稳定性检测结果

## 2.2.2 酶的最适作用 pH 值及酶的 pH 值稳定性

将分离纯化的 CMC 酶 I 和 CMC 酶 II 适当稀释,于不同 pH 值反应体系中检测酶活力大小。由图 12 可知,CMC 酶 I 和 CMC 酶 II 在 pH 值为 7.5 时均具有最大酶活力,可确定 pH 值 7.5 是 2 种酶最适作用 pH 值。由图 13、图 14 可知,2 种酶在 pH 值为 6.0~8.0 范围内均具有良好稳定性,而在其他 pH

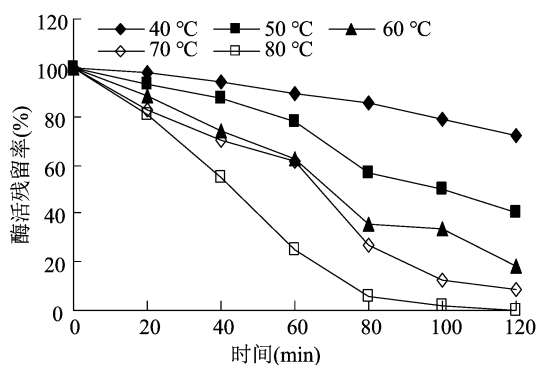


图11 CMC 酶 II 热稳定性检测结果

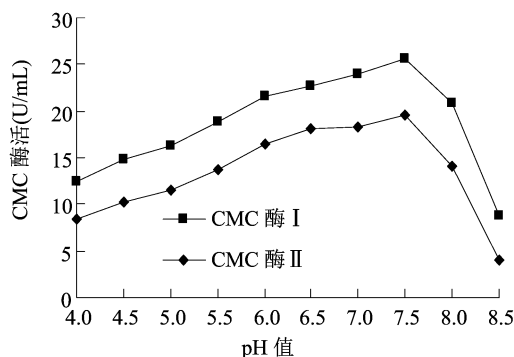


图12 不同 pH 值条件下 CMC 酶 I 和 II 的酶活

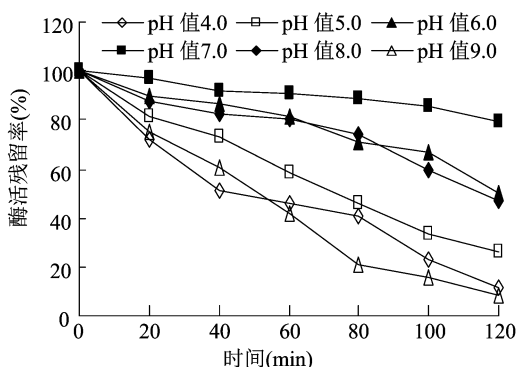


图13 CMC 酶 I 的 pH 值稳定性检测

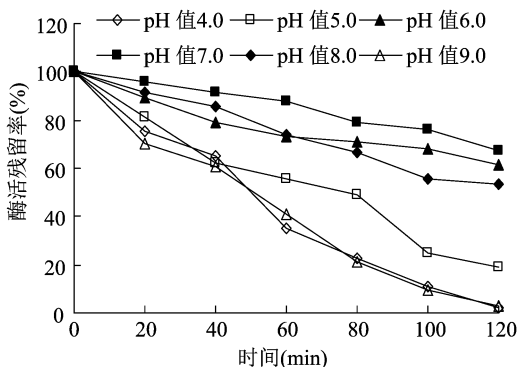


图14 CMC 酶 II 的 pH 值稳定性检测

### 2.2.3 CMC 酶的反应动力学常数 $K_m$ 和 $v_m$ 的测定

由图 15、图 16 可知,求得 CMC 酶 I 的米氏常数  $K_m$  为 2.55 g/L,  $v_m$  为 37.59  $\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。CMC 酶 II 的米氏常数  $K_m$  为 4.37 g/L,  $v_m$  为 28.82  $\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。来源于不同细菌的内切- $\beta$ -葡聚糖苷酶的动力学常数常会有些区别,如 Au 等从枯草芽胞杆菌中得到的 CMC 酶  $K_m$  为 4 g/L,  $v_m$  为 0.42  $\text{mg}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ <sup>[26]</sup>; Yan 等从蜡样芽胞杆菌中获得的 CMC 酶的  $K_m$  为 2.12 g/L,  $v_m$  为 5.37  $\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ <sup>[17]</sup>。

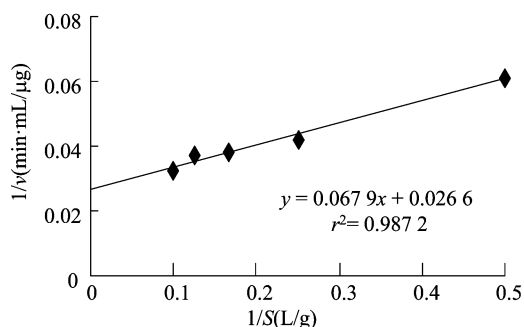


图15 CMC 酶 I 的动力学曲线

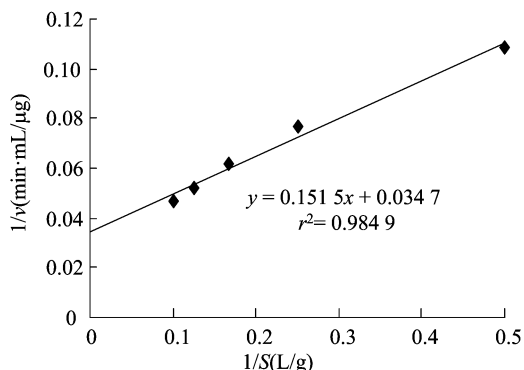


图16 CMC 酶 II 的动力学曲线

## 3 结论

经分离纯化,获得 2 个酶活组分 CMC 酶 I 和 CMC 酶 II,其纯化倍数分别为 45.94 倍和 32.27 倍,回收率分别为 14.66% 和 8.33%。经电泳检测,CMC 酶 I 和 CMC 酶 II 分子量分别约为 38.99 ku 和 45.53 ku。经凝胶电泳检测,获得 2 个酶活组分 CMC 酶 I 和 CMC 酶 II 均能达电泳级纯度,提示利用盐析沉淀、凝胶层析、疏水层析和弱阳离子交换色谱能够对菌株 DM-4 所产内切- $\beta$ -葡聚糖苷酶具有良好的分离纯化效果。酶学性质显示,CMC 酶 I 最适作用温度为 55~60 °C,CMC 酶 II 为 55 °C。当温度低于 70 °C 时,2 种酶均对热稳定。2 种酶作用最适 pH 值为 7.5,在 pH 值为 6.0~8.0 范围内两

值条件下,酶活下降速度很快,与其他研究者试验结果<sup>[22-25]</sup>相似。根据本试验结果可初步确定此次分离的 CMC 酶为中性纤维素酶。

者均具有良好稳定性。 $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  对 CMC 酶 I 和 CMC 酶 II 有激活作用。CMC 酶 I 的米氏常数  $K_m$  为 2.55 g/L,  $v_m$  为 37.59  $\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。CMC 酶 II 的米氏常数  $K_m$  为 4.37 g/L,  $v_m$  为 28.82  $\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。酶学性质表明,菌株 DM-4 所产的 2 种 CMC 酶组分均有中性偏碱性纤维素酶,这与大多数霉菌来源的纤维素酶有所不同。

本研究在实验室水平上将细菌菌株 DM-4 所产 CMC 酶组分进行了分离纯化,研究其酶学性质,获得良好的分离纯化结果,但将其应用于工业化生产,还需要进行分离纯化技术的深入研究和开发。

#### 参考文献:

- [1] Taechapoempol K, Sreethawong T, Rangsunvigit P, et al. Cellulase - producing bacteria from Thai higher termites, *Microcerotermes* sp.: enzymatic activities and ionic liquid tolerance [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 164(2): 204 - 219.
- [2] Deka D, Jawed M, Goyal A. Purification and characterization of an alkaline cellulase produced by *Bacillus subtilis* (As3) [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2013, 43(3): 256 - 270.
- [3] 毛丽春, 修立辉, 胡刚. 产纤维素酶细菌菌株的分离鉴定及产酶条件优化[J]. 中国酿造, 2018, 37(4): 83 - 87.
- [4] Gilbert H J, Hazlewood G P. Bacterial cellulases and xylanases[J]. Journal of General Microbiology, 1993, 139(2): 187 - 194.
- [5] Percival Z Y H, Himmel M E, Mielenz J R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(5): 452 - 481.
- [6] Liu Y, Guo H P, Gu J L, et al. Optimize purification of a cellulase from *Bacillus velezensis* A4 by aqueous two - phase system (ATPS) using response surface methodology[J]. Process Biochemistry, 2019, 87: 196 - 203.
- [7] Karlapudi A P, Venkateswarulu T C, Srirama K, et al. Purification and lignocellulolytic potential of cellulase from newly isolated *Acinetobacter* Indicus KTCV2 Strain[J]. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, 2019, 43(3): 755 - 761.
- [8] 江小妹, 林春伟, 王魁云, 等. 团头鲂肠道菌株 MA35 产纤维素酶分离纯化及性质分析[J]. 上海海洋大学学报, 2020, 29(2): 313 - 320.
- [9] Ekwealor C C, Odibo F J C, Onwosi C O. Partial purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus sphaericus* CE - 3 [J]. Advances in Microbiology, 2017, 7(4): 293 - 303.
- [10] 王婷婷, 宋星, 李燕. 文蛤纤维素酶分离纯化及性质[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(12): 1324 - 1329.
- [11] Herculano P N, Porto T S, Maciel M H C, et al. Partitioning and purification of the cellulolytic complex produced by *Aspergillus japonicus* URM5620 using PEG - citrate in an aqueous two - phase system[J]. Fluid Phase Equilibria, 2012, 335: 8 - 13.
- [12] Nwagu K E, Ominyi M C, Nwoba G E. Isolation, screening and measurement of amylase and cellulase activities of some microorganisms [J]. Continental Journal of Biological Sciences, 2012, 6(1): 37.
- [13] Baydas G, Reiter R J, Nedzvetskii V S, et al. Altered glial fibrillary acidic protein content and its degradation in the *Hippocampus*, cortex and cerebellum of rats exposed to constant light: reversal by melatonin[J]. Journal of Pineal Research, 2002, 33(3): 134 - 139.
- [14] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2005: 92 - 118.
- [15] Aa K, Flengsrud R, Lindahl V, et al. Characterization of production and enzyme properties of an endo - beta - 1, 4 - glucanase from *Bacillus subtilis* CK - 2 isolated from compost soil[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1994, 66(4): 319 - 326.
- [16] Allardyce B J, Linton S M. Purification and characterisation of endo - beta - 1, 4 - glucanase and laminarinase enzymes from the gecarcinid land crab *Gecarcoidea natalis* and the aquatic crayfish *Cherax destructor*[J]. The Journal of Experimental Biology, 2008, 211(Pt 14): 2275 - 2287.
- [17] Hong Y. Purification and characterization of an endo - 1, 4 -  $\beta$  - glucanase from *Bacillus cereus* [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(72): 16277 - 16285.
- [18] Lo A C, MacKay R M, Seligy V L, et al. *Bacillus subtilis* beta - 1, 4 - endoglucanase products from intact and truncated genes are secreted into the extracellular medium by *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(9): 2287 - 2292.
- [19] Zakaria M M, Yamamoto S, Yagi T. Purification and characterization of an endo - 1, 4 -  $\beta$  - mannanase from *Bacillus subtilis* KU - 1 [J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 158(1): 25 - 31.
- [20] 吴石金, 汪劼. 内切  $\beta$  - 葡聚糖苷酶的分离纯化及酶学性质[J]. 科技通报, 2006, 22(1): 51 - 55.
- [21] Xu B Z, Hellman U, Ersson B, et al. Purification, characterization and amino - acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo -  $\beta$  - 1, 4 - glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis* [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(16): 4970 - 4977.
- [22] 贺芸. 产耐高温纤维素酶细菌的筛选及酶学性质研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2004.
- [23] Huang X P, Monk C. Purification and characterization of a cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen. nov., sp. nov [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 20(1): 85 - 92.
- [24] Dar R A, Saba I, Shah Nawaz M, et al. Isolation, purification and characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from endophytic *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin [J]. Advances in Enzyme Research, 2013, 1(4): 91 - 96.
- [25] Liu S L, Chen W Z, Wang Y, et al. Purification and characterization of a novel neutral  $\beta$  - glucanase and an alkaline  $\beta$  - glucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(2): 149 - 155.
- [26] Au K S, Chan K Y. Purification and properties of the endo - 1, 4 - glucanase from *Bacillus subtilis* [J]. Microbiology, 1987, 133(8): 2155 - 2162.