

裂褶菌产内切 β -1, 3-葡聚糖酶的

分离纯化

畅晓洁, 郑必胜*, 赵欣

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 采用不同饱和度的硫酸铵溶液对内切 β -1, 3-葡聚糖酶粗酶液进行分段盐析, 以确定最佳盐析条件, 将盐析处理后的酶液经透析浓缩、DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析、Sephadex G-75 凝胶过滤层析等进一步分离纯化, 浓缩纯化后的含酶组分, 经过 SDS-PAGE 电泳分析其纯度并初步确定其分子量。结果显示: 经过纯化后的内切 β -1, 3-葡聚糖酶的比活力由 20.90U/mg 提高到 933.37U/mg, 纯化倍数为 44.7 倍, 酶活回收率为 11.6%, 电泳分析呈单一条带, 分子量近似为 45ku。

关键词: 裂褶菌, 内切 β -1, 3-葡聚糖酶, 分离纯化

Separation and purification of endo- β -1, 3-glucanase producing by *Schizophyllum commune* Fr.

CHANG Xiao-jie, ZHENG Bi-sheng*, ZHAO Xin

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to determine the best salting-out conditions, the different saturation of ammonium sulfate were used to subsection salting-out endo- β -1, 3-glucanase crude enzyme solution producing by *Schizophyllum commune* Fr. The enzyme solution processed by salting-out is concentrated by dialysis and purified by DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography and Sephadex G-75 gel filtering chromatography. SDS-PAGE electrophoresis was used to analyze the purity and molecular weight of the enzyme fraction. The results showed that: the specific activity of purified endo- β -1, 3-glucanase increased from 20.90U/mg to 933.37U/mg, the purification factor was 44.7 times and the recovery of enzyme activity was 11.6%. The electrophoresis showed a single band with molecular weight of approximately 45ku.

Key words: *Schizophyllum commune* Fr.; endo- β -1, 3-glucanase; separation and purification

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)04-0227-04

裂褶多糖 (Schizophyllan, SPG) 是从裂褶菌子实体、菌丝体或发酵液中提取出来的中性胞外多糖, 只含有 β -D-葡聚糖^[1]。裂褶多糖的结构是: β -(1, 3)糖苷为主链, β -(1, 6)糖苷为侧链。SPG 具有抑制肿瘤、抗菌消炎、抗辐射、提高机体免疫力等多种生理活性^[2]。但天然裂褶多糖分子量大, 在水中溶解度小、粘度大, 若将未经降解处理的裂褶多糖用于注射治疗肿瘤疾病, 会引发肌肉疼痛、血栓等问题^[3], 大大降低了其抗癌活性和生物利用度。 β -1, 3-葡聚糖酶属水解酶类, 能够专一性水解以 β -1, 3-糖苷键聚合而成的高分子葡聚糖。内切酶则能够以随机方式切断 β -1, 3-糖苷键主链, 产生寡糖和葡萄糖^[4], 即通过酶切来降低 β -D-葡聚糖的聚合度可不改变其天然结构, 不会影响或降低其生物活性^[5-6]。 β -1, 3-葡聚糖

酶来源十分广泛, 真菌、细菌、放线菌、藻类、软体动物和高等植物中都能产生, 但真菌是主要来源^[7]。日本学者提出在提取天然裂褶多糖时必须获得有效的“活性多糖”, 也就是在提取过程就要对多糖进行降解或者改性^[8]。裂褶菌可产生胞外内切 β -1, 3-葡聚糖酶, 因此研究裂褶菌产的内切 β -1, 3-葡聚糖酶对提取活性裂褶多糖具有重要意义。本实验采用硫酸铵分段盐析、DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析、Sephadex G-75 凝胶过滤层析等步骤进行内切 β -1, 3-葡聚糖酶的分离纯化, 为进一步研究裂褶菌产的内切 β -1, 3-葡聚糖酶的酶学性质提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

裂褶菌 (*Schizophyllum commune* Fr.) 广东省微生物研究所; 裂褶多糖 本实验室制备; 内切 β -1, 3-葡聚糖酶粗酶液 本实验室提取; 考马斯亮蓝 G-250 分析纯, Sigma 公司; 牛血清蛋白、葡萄糖、生

收稿日期: 2011-03-14 * 通讯联系人

作者简介: 畅晓洁 (1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 糖类分离提纯新方法新技术。

化试剂 分析纯,上海博奥生物科技有限公司;95%乙醇、磷酸、硫酸铵 分析纯,广州市东红化工厂;冰醋酸、NaAc、无水亚硫酸钠、酒石酸钾钠、NaOH、NaCl 分析纯,天津化学试剂厂;苯酚、3,5-二硝基水杨酸 分析纯,汕头市光华化学厂;聚乙二醇 分析纯,广州化学试剂厂;透析袋 上海源聚生物科技进口分装,截留分子量 8000u;DEAE Sephadex A-50、Sephadex G-75 Pharmacia 公司。

UV-2012PC 紫外可见分光光度计 上海 UNICO 公司;KDC40 离心机 科大创新股份有限公司;pHS-3C 酸度计 上海虹益仪器厂;DBS-100 自动收集装置、BT-100 恒流蠕动泵 上海泸西分析仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质含量的测定

1.2.1.1 考马斯亮蓝 G-250 溶液的配制^[9] 取考马斯亮蓝 G-250 染色剂 100mg 溶于 50mL 95% 乙醇中,加入 100mL 85% 的磷酸,用蒸馏水稀释至 1000mL,滤纸过滤避光保存备用。

1.2.1.2 标准曲线的制作 采用考马斯亮蓝 G-250 法,以牛血清蛋白为对照制作标准曲线,取 5mL 考马斯亮蓝溶液中加入 200~1000 μ g 的牛血清蛋白在 595nm 下测定光吸收值。蛋白质浓度标准曲线见图 1。

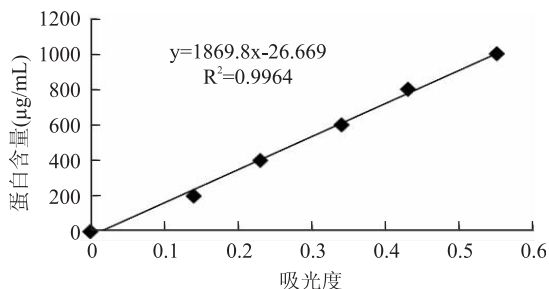


图1 蛋白质浓度标准曲线

Fig.1 Standard curve of protein concentration

1.2.2 酶活力的测定 以裂褶多糖为底物,采用应用最广泛的还原糖法测定 β -1,3-葡聚糖酶活力。

1.2.2.1 DNS 试剂的配制^[10] 称取 10g 3,5-二硝基水杨酸于水中,全部溶解后,加入 20g NaOH、200g 酒石酸钾钠,加入蒸馏水,使总体积至 500mL 左右,加热溶解后,加 2g 苯酚、0.5g 无水亚硫酸钠,加热搅拌至全部溶解,冷却,用水稀释至 1000mL,储于棕色瓶中。

1.2.2.2 标准曲线的制作 准确称取葡萄糖 100mg,用适量蒸馏水溶解并定容于 100mL 容量瓶中。分别吸取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6mL 葡萄糖液,各加水至 1.0mL,加入 DNS 溶液 1.5mL,沸水浴 5min 显色。冷却后用蒸馏水定容至 25mL,摇匀,在 520nm 条件下测定吸光值,取 1.5mL 蒸馏水代替 DNS 溶液作为空白,绘制标准曲线,标准曲线见图 2。

1.2.2.3 裂褶菌产内切 β -1,3-葡聚糖酶活力的测定 将 1mL NaAc-HAc 缓冲液(0.05mol/L, pH 5.0),1mL 酶液,1mL 0.5% 裂褶多糖组成反应体系于 50 $^{\circ}$ C 水浴中振荡反应 30min,沸水浴 5min 灭酶活,取上清液 1mL 用还原糖法测定酶水解液中的还原糖量(以

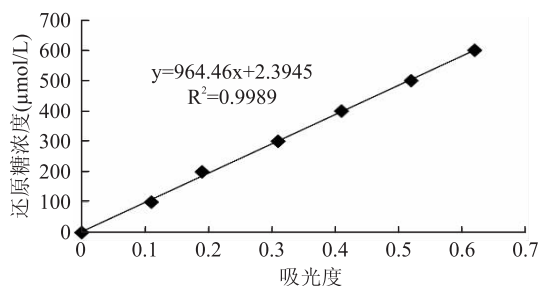


图2 还原糖法标准曲线

Fig.2 Standard curve of reduced sugars

葡萄糖计),以灭活酶作空白。

酶活力单位:在上述反应条件下,1min 水解 β -1,3-葡聚糖释放出 1 μ mol 葡萄糖所需的酶量,即为一个酶活力单位,以 U 表示。比活力:每毫克的酶活数,单位为 U/mg。

1.2.3 硫酸铵盐析

1.2.3.1 硫酸铵盐析浓度的确定 在 4 $^{\circ}$ C 下,取内切 β -1,3-葡聚糖酶的粗酶液 100mL,加入固体硫酸铵粉末,搅拌使之溶解,达到一定饱和度,静置于冰箱过夜,之后 4000r/min,离心 30min,沉淀用少量 0.05mol/L, pH 5.0 的 NaAc-HAc 缓冲液溶解,转入透析袋中,用相同的缓冲液于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中透析除盐至少 24h,期间不断更换缓冲液。离心上清液中再加入硫酸铵,重复上述操作,从而得到硫酸铵饱和度分别为 40%、50%、60%、70%、80% 和 90% 时盐析出来的蛋白质。测定透析得到的各部分蛋白质溶液的蛋白质含量和酶活力,确定蛋白质最佳盐析条件的硫酸铵饱和度。

1.2.3.2 硫酸铵分段盐析 取 200mL 原粗酶液,分别测定其蛋白质浓度和酶活力,根据确定好的硫酸铵饱和度,先加入低饱和度的硫酸铵的量,4 $^{\circ}$ C 放置过夜,离心去除沉淀物,使有效成分保留在上清液中,上清液中加入高饱和度的硫酸铵的量,4000r/min 离心 20min,弃去上清液,得到蛋白质沉淀,沉淀物溶于 0.05mol/L, pH 5.0 的 NaAc-HAc 缓冲液中,然后透析去除一部分小分子杂质、离子和盐,透析至少 24h,期间不断更换缓冲液,最后得到初步纯化的酶液。测定初步提取酶液的体积,蛋白质含量和酶活力。

1.2.4 DEAE-Sephadex A-50 柱层析 将经过硫酸铵初步纯化的酶液透析至无 SO_4^{2-} ,用聚乙二醇浓缩,取 2mL 经透析后得到的酶液,通过 1.6cm \times 15cm 的 DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱,用 0.05mol/L, pH 7.0 的磷酸盐缓冲液进行平衡和洗脱,洗脱速度为 12mL/h,0~0.5mol/L NaCl 溶液进行线性梯度洗脱,分析酶活和蛋白质浓度,收集酶组分。

1.2.5 Sephadex G-75 柱层析 合并上述酶组分并浓缩,取 2mL 通过 Sephadex G-75 柱(1.6cm \times 15cm)进一步纯化,用上述相同的缓冲液进行平衡和洗脱,洗脱速度为 12mL/h,每管收集 5mL,分析酶活和蛋白质浓度,收集酶组分。

1.2.6 SDS-PAGE 电泳纯度鉴定 SDS-PAGE 电泳试剂的配制参照《蛋白质技术手册》^[11],SDS-PAGE 电泳条件为:分离胶浓度 12.5%,浓缩胶 3%,样品浓

度为 2mg/mL, 上样量为 20 μ L, 标准蛋白为 Pharmacia 公司的小分子量标准蛋白。

2 结果与分析

2.1 最佳盐析条件的确定

粗酶液经过不同浓度的饱和硫酸铵沉淀, 结果如图 3 所示。

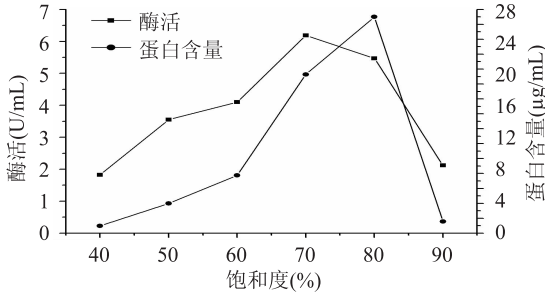


图 3 最佳盐析条件的确定

Fig.3 Salting-out curve of endo- β -1,3-glucanase

从图 3 可以看出, 在硫酸铵饱和度为 80% 时, 发现有较高的盐析峰, 分别测定各个浓度下盐析出来的酶蛋白的酶活, 发现饱和度为 70% 时酶活达到最高, 而在 80% 饱和度时, 虽有最高的盐析峰, 但是酶活比饱和度为 70% 的要低。当饱和度为 80% 时, 由于盐浓度过高, 部分酶蛋白变性, 导致酶活力下降。因此, 本实验确定将饱和度为 40%~70% 作为分段处理粗酶液的饱和硫酸铵的浓度。

2.2 DEAE-Sephadex A-50 柱层析

取 2mL 盐析的酶液经过 DEAE-Sephadex A-50 柱层析, 分段收集其洗脱液, 测定蛋白质含量和酶活, 结果见图 4。

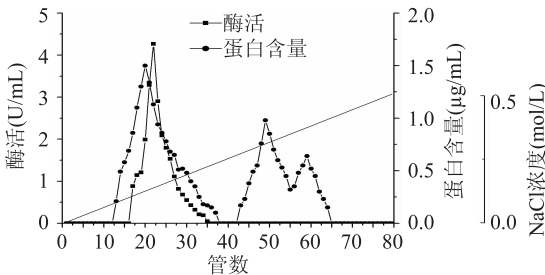


图 4 DEAE-Sephadex A-50 柱层析洗脱曲线

Fig.4 Elution curve of endo- β -1,3-glucanase from DEAE-Sephadex A-50 column

从图 4 可知, 经过洗脱后出现三个蛋白峰, 分别集中在第 11~36 管、第 43~55 管和第 57~65 管。在第 18~32 管具有较高的内切 β -1,3-葡聚糖酶活性和蛋白质含量, 合并各管并浓缩。

2.3 Sephadex G-75 柱层析

取上述 2mL 含酶样品, 经过 Sephadex G-75 柱层析, 分段收集其洗脱液测定蛋白质含量和酶活, 结果见图 5。

从图 5 可知, 经过 Sephadex G-75 柱洗脱, 分别在第 11~25 管和第 29~44 管出现两个蛋白峰, 且第一个蛋白峰较第二个更为明显, 在第 16~25 管具有较高的内切 β -1,3-葡聚糖酶活性和蛋白质含量。说明经过 DEAE-Sephadex A-50 柱层析和 Sephadex

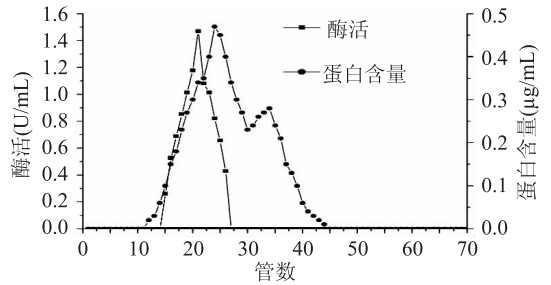


图 5 Sephadex G-75 柱层析洗脱曲线

Fig.5 Elution curve of endo- β -1,3-glucanase from Sephadex G-75 column

G-75 柱层析之后, 内切 β -1,3-葡聚糖酶的纯度明显提高, 其他杂蛋白的含量明显减少。

通过硫酸铵分段盐析、DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱层析和 Sephadex G-75 凝胶过滤柱层析, 内切 β -1,3-葡聚糖酶分离纯化结果见表 1。由表 1 可知, 内切 β -1,3-葡聚糖酶经过分离纯化后, 相对于粗酶液纯化了 44.7 倍, 酶的比活力由 20.90U/mg 提高到 933.37U/mg, 酶的回收率为 11.6%。

表 1 内切 β -1,3-葡聚糖酶的分离纯化

Table 1 Purification results of endo- β -1,3-glucanase

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (U)	比活力 (U/mg)	纯化倍数	回收率 (%)
粗酶液	242	5050	20.90	1.0	100
硫酸铵沉淀	85	2474	29.05	1.4	49
DEAE-Sephadex A-50	3.0	1707	562.22	26.9	33.8
Sephadex G-75	0.6	588	933.37	44.7	11.6

2.4 电泳纯度鉴定

收集经过 Sephadex G-75 层析分离纯化的含酶组分, 透析后用聚乙二醇浓缩, 采用 SDS-PAGE 进行纯度鉴定, 结果见图 6。

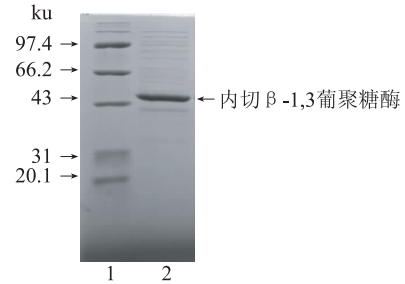


图 6 内切 β -1,3-葡聚糖酶的纯度鉴定图

Fig.6 Purify identification of endo- β -1,3-glucanase

注: 1-泳道为标准分子量蛋白;

2-泳道为纯化后的内切 β -1,3-葡聚糖酶

从图 6 可知, 经过 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析和 Sephadex G-75 凝胶过滤分离纯化得到的含酶组分在 SDS-PAGE 图上呈一条带, 说明经过上述步骤的纯化, 得到了电泳纯的内切 β -1,3-葡聚糖酶, 经过软件 Quantityone 计算得到内切 β -1,3-葡聚糖酶的分子量约为 45ku。

3 结论

3.1 裂褶菌发酵液经过离心除去菌丝体, 得到内切 (下转第 233 页)

化细胞制备工艺和参数如下:采用2%海藻酸钠复合2%的凹凸棒石粘土,灭菌冷却,与预先制得的酵母菌悬液(湿菌体9g/100mL)等体积混匀,用20mL医用注射器吸取并滴入2%的灭菌冷却的氯化钙溶液中,30℃下调pH为7,静置固化4h,倾去氯化钙溶液并用无菌生理盐水洗涤3次,获得固定化酵母细胞。在250mL的三角瓶中装30mL发酵培养基,摇床转速为150r/min,于26℃发酵48h,GDL产量可达4.17g/L,比游离细胞高2.5倍。以该工艺制得的固定化酵母细胞可重复使用3次,第3次的GDL产量仍可达3.87g/L。实验证明采用固定化细胞发酵转化法提高GDL产量是一种行之有效的方法。

参考文献

- [1] Siek T J, Albin I A, Sather L A, et al. Comparison of flavor thresholds of aliphatic lactones with those of fatty acids, esters, aldehydes, alcohols, and ketones [J]. Journal of Dairy Science, 1971, 54: 1-9.
- [2] Gilles F, Caroline B P, Isabelle K, et al. Metabolism of fatty acid in yeast: Characterisation of β -oxidation and ultrastructural changes in the genus *Sporidio-bolus sp.* cultivated on ricinoleic acid methyl ester [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 250: 63-69.
- [3] Palmela V, Maurice NJ, Diana SZ, et al. Influence of starch addition and dough microstructure on fermentation aroma production by yeasts and lactobacilli [J]. Food Chemistry, 2008, 108: 1217-1225.

(上接第229页)

β -1,3-葡聚糖酶的粗酶液后,经硫酸铵盐析发现当饱和度为80%时出现最大盐析峰,但是饱和度为70%时酶活达到最高,因此确定硫酸铵盐析最佳饱和度和为70%。

3.2 粗酶液经过硫酸铵40%~70%分段盐析、透析浓缩、DEAE-Sephadex A-50离子交换层析、Sephadex G-75凝胶过滤层析等的分离纯化后,实验测得内切 β -1,3-葡聚糖酶的比活力由20.90U/mg提高到933.37U/mg,纯化倍数为44.7倍,酶活回收率为11.6%。

3.3 浓缩纯化后的含酶组分,经过SDS-PAGE电泳分析,可发现酶蛋白呈单一条带,分子量约为45ku。

参考文献

- [1] 李兆兰. 裂褶多糖的结构研究[J]. 南京大学学报:自然科学版, 1994, 30(3): 482-486.
- [2] 王振河, 霍云凤. 裂褶菌及裂褶菌多糖研究进展[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(1): 73-76.
- [3] Kikumoto S, Yamamoto O, Komatsu N. Method of producing neoschizophyllan having novel pharmacological activity [J]. United States Patent, 1978(4): 661.
- [4] Jung Min Song, Kiwoong Nam, Young-Uk Sun. Molecular and biochemical characterizations of a novel arthropod endo- β -1,3-glucanase from the Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*, horizontally acquired from bacteria [J]. Comparative Biochemistry

[4] 宋焕禄, 刘晋芳, 吕跃钢. 耶罗维亚酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 发酵蓖麻油制备 γ -癸内酯的研究 [J]. 中国食品学报, 2007(5): 102-107.

[5] Schrader J, Etschmann MMW, Sell D, et al. Applied biocatalysts for the synthesis of natural flavour compounds current industrial processes and future prospects [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26: 463-472.

[6] 苏畅, 杜毅, 陈洪, 等. 微生物发酵法生产 γ -癸内酯的研究 [J]. 食品工业科技, 2004(10): 118-119.

[7] Feron G, Dufosse L, Pierard E, et al. Production, identification and toxicity of γ -decalactone and 4-hydroxydecanoic acid from *Sporidiobolus sp.* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(8): 2826-2831.

[8] 林芳, 张伟国. 固定化耶罗维亚酵母发酵生产 γ -癸内酯 [J]. 生物技术, 2008, 18(5): 66-69.

[9] 李雪雁, 王玉丽. 凹凸棒土-壳聚糖耦合固定化乳糖酶及其在低乳糖乳制备中的应用 [J]. 甘肃农业大学学报, 2009, 44(2): 149-152.

[10] 仲惠, 赵玉萍, 李文谦, 等. 原生质体融合法构建 γ -癸内酯高产菌株 [J]. 中国酿造, 2011(5): 102-105.

[11] 张春红, 张莹, 赵菲. 利用固定化酶改善酸法大豆浓缩蛋白持水性和吸油性的研究 [J]. 食品工业科技, 2011(3): 208-214.

[12] 杨秋明, 郭彩华, 蔡慧农, 等. 耐盐酵母固定化方法的初步研究 [J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(6): 85-93.

[13] 于伟, 徐岩, 喻晓蔚, 等. 生物法转化分离耦合制备 γ -癸内酯研究 [J]. 化工进展, 2007, 26(8): 1151-1154.

and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 155(4): 403-412.

[5] Alexander M Zakharenko, Mikhail I Kusaykin, Svetlana N Kovalchuk. Enzymatic and molecular characterization of an endo-1,3- β -d-glucanase from the crystalline styles of the mussel *Perna viridis* [J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(2): 243-252.

[6] Ana-Belén Martín-Cuadrado, Thierry Fontaine. Characterization of the endo- β -1,3-glucanase activity of *S. cerevisiae* Eng2 and other members of the GH81 family [J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(4): 542-553.

[7] Bei-Wei Zhu, Jun-Gang Zhao, Jing-Feng Yang. Purification and partial characterization of a novel β -1,3-glucanase from the gut of sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. Process Biochemistry, 2008, 43(10): 1102-1106.

[8] Kyoung-Mi Lee, Marimuthu Jeya, Ah-Reum Joo. Purification and characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(3-4): 206-211.

[9] Brodford M M. Determination of trace amount of proteins by (CBB)G-250 [J]. Anal Biochem, 1996, 204(2): 254-256.

[10] 张龙翔. 生化实验方法和技术 [M]. 人民教育出版社, 1982.

[11] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-100.