

文章编号: 1674-5566(2020)02-0313-08

DOI:10.12024/jsou.20190302564

团头鲂肠道菌株 MA35 产纤维素酶分离纯化及性质分析

江小妹¹, 林春伟¹, 王魁云¹, 蒋霞云¹, 李 燕^{1,2,3}, 邹曙明⁴

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 国家淡水水产品加工技术研发分中心, 上海 201306; 4. 上海海洋大学 农业农村部种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306)

摘 要: 对团头鲂肠道菌株 *Aspergillus niveus* MA35 发酵得到一种内切型纤维素酶采用 Q-琼脂糖凝胶 FF 阳离子交换层析和葡聚糖 G-100 凝胶层析进行分离纯化。酶的比活力由 22.3 U/mg 提高到 30.6 U/mg。SDS-PAGE 结果显示, 酶的分子量约为 45 ku。该酶水解羧甲基纤维素钠的最适温度为 45 °C, 最适 pH 4.5, 在 pH 4.0~8.0 以及 30~55 °C 之间具有良好的稳定性。在终离子浓度为 1 mmol/L 以及 10 mmol/L 下, Zn²⁺、Mn²⁺ 对酶的活性有激活作用, Mg²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Cd²⁺、Co²⁺ 对酶的活性有抑制作用, 其中 Mg²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺ 抑制作用较强, Na⁺、K⁺、Ca²⁺ 对酶的活性几乎没有影响。

关键词: 纤维素酶; 分离纯化; 酶学性质; 肠道菌株

中图分类号: Q 93 **文献标志码:** A

纤维素是世界上最丰富的可再生资源, 纤维素酶(Cellulase)可以催化纤维素链 β-1,4-糖苷键水解, 将纤维素转化葡萄糖、纤维二糖、纤维低聚糖^[1], 传统上将其分为 3 类^[2]: 内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β-葡萄糖苷酶, 分别水解底物羧甲基纤维素钠、微晶纤维素和水杨素。纤维素酶可被广泛应用于食品、饲料、纺织、发酵等领域^[3-5]。纤维素酶的来源十分广泛, 昆虫、动物体、细菌、真菌等都能产生纤维素酶, 且纤维素酶多来源于微生物, 尤其是细菌与真菌^[6]。

近年来研究较多的是从食草性陆生动物与昆虫消化道或者土壤、木屑中筛选纤维素酶产生菌^[4]并多为细菌。例如从土壤中筛选出纤维素酶产生菌 *Bacillus mycoides* S122C^[7], 分离出分子量为 62 ku 的纤维素酶, 最适温度及 pH 分别为 50 °C 和 7。从米糠中筛选出纤维素酶产生菌 *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3^[8], 生产纤维素酶的分子量为 43 ku。研究草食性水生动物肠道着手研究的很少, 随着水产品加工业的不断发展, 面临的最大问题是饲料的利用率不高^[9], 大多数

水产品饲料中含有丰富的蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶等来补充动物的消化酶, 促进营养吸收, 消除抗营养因子改善饲料的品质^[10-11], 所以这类天然酶的研究对水产品加工业来说有着至关重要的作用。

目前从水生动物肠道内筛选出的纤维素酶产生菌多为细菌, 本研究从团头鲂肠道内筛选出的真菌雪白曲霉 *Aspergillus niveus* MA35 为出发菌株, 发酵生产纤维素酶分离得到了一种纤维素酶, 并初步探索了部分酶学性质, 对更好地为草食性鱼类饲料的配比提供了一定的技术支持, 并且为真菌纤维素酶工程菌种的构建提供了优良的基因源^[12]。本文底物选取的是羧甲基纤维素钠, 故分离得到的纤维素酶属于内切型纤维素酶。

1 材料与方法

1.1 试验材料

团头鲂肠道菌株 *Aspergillus niveus* MA35 由上海海洋大学食品学院提供。

收稿日期: 2019-03-24 修回日期: 2019-05-22

基金项目: 国家自然科学基金(31201760, 31572220); 国家科技支撑计划(2015BAD17B02)

作者简介: 江小妹(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化学。E-mail: 993201725@qq.com

通信作者: 李 燕, E-mail: liyan@shou.edu.cn

1.2 试剂与仪器

主要试剂: Sephadex G-100 葡聚糖凝胶填料购于 GE 公司; Q-Sepharose Fast Flow 离子交换填料购自上海高信化玻仪器有限公司; 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、30% 丙烯酰胺溶液、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)标准蛋白、过硫酸铵等购于上海生工生物工程有限公司; 酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸、氯化锰、氯化钠、氢氧化钠、氯化钾、氯化铜、氯化钴、氯化亚铁等购于国药集团化学试剂有限公司, 分析纯。

主要仪器: HDB-7L 电脑高灵敏度紫外检测仪、CBS-A 程控全自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂有限公司); Sorvall Lynx 4000 高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技); DYY-III 型稳压稳流电泳仪、DYCZ-24D 型垂直板电泳槽(北京市六一仪器厂); TS-2000A 型脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Bio-6000 扫描仪(上海中晶科技有限公司); 超声波处理器 FS-1200N(上海生析超声仪器有限公司)。

1.3 培养基

羧甲基纤维素培养基(g/L): CMC-Na 10; KH_2PO_4 4; Na_2HPO_4 4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2; CaCl_2 0.001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001; 蛋白胨 2; 琼脂粉 15。

种子培养液(g/L): 葡萄糖 2; KH_2PO_4 4; Na_2HPO_4 4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2; CaCl_2 0.001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004; 蛋白胨 2(pH 7.0)。

发酵培养液(g/L): CMC-Na 10; KH_2PO_4 4; Na_2HPO_4 4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2; CaCl_2 0.001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004; 蛋白胨 2(pH 7.0)。

1.4 纤维素酶的制备与纯化

1.4.1 纤维素酶的制备

挑取菌体接入装液量为 200 mL 种子培养基的 1 L 三角瓶中, 在 28 °C、150 r/min 的条件下培养 36 h。再将种子液以 3% 接种量接入装液量为 200 mL 发酵培养液的 1 L 三角瓶中, 在 32 °C、160 r/min 的条件下培养 60 h 得到发酵液。真空抽滤将发酵液与菌体分离, 得菌体加入 20 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液(pH 7.0) 15 mL 重悬, 超声波细胞破碎(600 W) 45 min(3 s/6 s)后, 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min 离心得上清液, 经 0.22 μm 水系膜过滤后所得溶液即为粗酶液。

1.4.2 纤维素酶的纯化

Q-Sepharose Fast Flow 离子交换层析: 将所得粗酶液上样于已用 20 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液(pH 7.0) 平衡好的离子交换层析柱(1.5 cm \times 20 cm)中, 待样品刚好进入凝胶, 用上述缓冲液洗脱未结合的蛋白, 被吸附的蛋白用含 0~1 mol/L NaCl 该缓冲液进行线性梯度洗脱, 洗脱流速为 1.5 mL/min, 全自动部分收集器收集, 每管收集 5.0 mL。测定各管的酶活力和蛋白浓度, 收集活性峰, 进行冷冻干燥浓缩并保存。

Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析: 将 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换柱活性峰处收集的样品, 用适量 20 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液(pH 7.0) 溶解, 经 0.22 μm 水系膜过滤后上样于已用该缓冲液平衡过的 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱(1.0 cm \times 40 cm)中, 待样品刚好进入凝胶时用该缓冲液洗脱, 洗脱流速为 0.5 mL/min, 全自动部分收集器收集, 每管收集 5.0 mL, 测定各管的酶活力和蛋白浓度, 收集活性峰, 用于鉴定纯化后纤维素酶的纯度、分子量及部分酶学性质。

1.4.3 纤维素酶活力检测方法

酶活力方法主要参照何力等^[13], 并作部分调整。将酶液与含 1% CMC-Na 的 20 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 4.8) 置于 50 °C 水浴锅中预热 5 min, 各取 0.5 mL 将二者混合, 50 °C 条件下反应 30 min, 立即置于 100 °C 沸水浴锅中灭活 5 min, 终止反应。加入 DNS 溶液煮沸 5 min 显色, 立即冷却, 定容至 25 mL, 于波长 540 nm 处测定其吸收值。上述反应以煮沸灭活的酶液作为对照, 每组 3 个平行重复实验。一个酶活力单位(U) 定义为每分钟释放 1 μg 葡萄糖所需要的酶量。

1.4.4 蛋白质浓度测定方法

采用 Folin-酚法^[14] 测定粗酶液和酶活峰中的蛋白含量。取 1 mL 稀释一定倍数的酶液, 加入 5 mL Folin-酚 A 试剂混匀, 置于室温下 10 min, 再加入 Folin-酚 B 试剂立即混匀, 置于室温下 30 min, 于波长 650 nm 处测定其吸光值。上述反应以去离子水作为对照, 每组 3 个平行重复实验。

用紫外分光光度计于波长 280 nm 处检测柱层析过程中的蛋白质浓度。

1.4.5 蛋白纯度及分子量测定

使用 5% 浓缩胶与 12% 分离胶对纯化后的内切纤维素酶进行 SDS-PAGE 电泳,分离胶配方 5 mL[1.9 mL 去离子水、1.7 mL 30% 丙烯酰胺、0.05 mL 10% (w/v)SDS、1.3 mL 1.5 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)、0.05 mL 10% (w/v)过硫酸铵、0.002 mL TEMED],浓缩胶配方 3 mL[2.1 mL 去离子水、0.5 mL 30% 丙烯酰胺、0.03 mL 10% (w/v)SDS、0.38 mL 1.0 mol/L Tris-HCl(pH 6.8)、0.03 mL 10% (w/v)过硫酸铵、0.003 mL TEMED]。硝酸银染色法分析纤维素酶蛋白的纯化效果,用标准蛋白质(98~14.4 ku)作对照。

1.4.6 纤维素酶酶学性质研究

酶的最适反应温度:将酶液分别置于温度为 30~80 °C 的水浴中反应 30 min,不改变其他条件,绘制酶活力对温度的曲线,研究酶的最适反应温度。

酶的热稳定性:将酶液置于温度为 30~80 °C 水浴中孵育 2 h,间隔 30 min 取出部分酶液,按照 1.4.3 节中酶活力测定方法测定其活力大小。绘制相对酶活力对温度的曲线,研究纤维素酶的温度稳定性。以未经过热处理的纤维素酶活力计为 100%。

酶的最适反应 pH:用 pH 分别为 3.0~10.0 的缓冲液配制浓度为 1% 的 CMC-Na 底物溶液,所用缓冲液为 20 mmol/L Na₂HPO₄-柠檬酸(pH

3.0~8.0)、20 mmol/L Tris-HCl(pH 9.0)、20 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃(pH 10.0),不改变其他条件测定酶活力大小,绘制酶活力对 pH 的曲线,确定酶的最适反应 pH。

酶在不同 pH 下的稳定性:将酶液与等量的各 pH(3.0~10.0)缓冲液混合,置于 4 °C 下孵育 20 h 后,测定酶活力,绘制相对酶活对 pH 的曲线,研究纤维素酶对 pH 的稳定性。以未经过酸碱处理的纤维素酶活力计为 100%。**金属离子对酶活力的影响:**将不同金属离子的溶液与酶液混合,离子终浓度分别为 1 mmol/L 和 10 mmol/L。然后测定其相应的酶活力,研究各金属离子对该纤维素酶活力的影响。以不加金属离子的纤维素酶活力计为 100%。

2 实验结果

2.1 纤维素酶的层析柱纯化结果

2.1.1 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换的纯化结果

将粗酶液上样于 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱中,根据酶所带电荷不同,共洗脱出 5 个蛋白峰(图 1),其中 P₁ 为未结合峰,显示具有较高的活性,用含有 0~1 mmol/L NaCl 缓冲液洗脱,由 P₂~P₅ 显示蛋白没有很好地分开,对其酶活力大小检测发现并未有酶活,可舍去故收集 P₁ 峰处的酶液,进行冷冻干燥浓缩并保存,用于下一步的纯化。

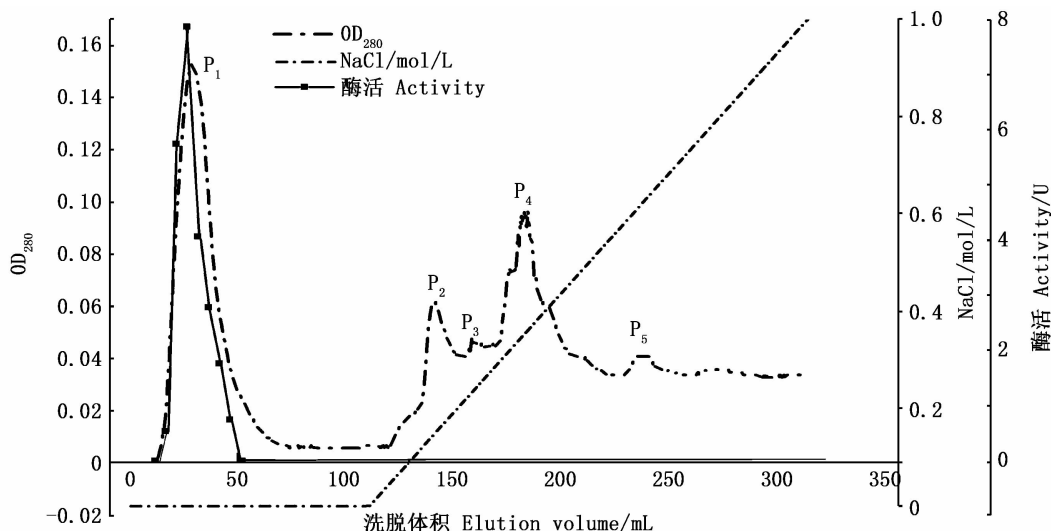


图 1 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换层析洗脱图谱

Fig. 1 Q-Sepharose Fast Flow column chromatography of cellulase

2.1.2 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析的纯化结果

将 2.1.1 节收集到的经冷冻干燥浓缩后的样品用适量缓冲液溶解过膜后,上样于葡聚糖凝胶层析柱中,根据分子量的大小,共洗脱出 4 个蛋白峰,其中 P_1 和 P_4 蛋白含量较大,但酶活很低或未检测到酶活, P_2 则是蛋白含量低且并未显示有活性,故可认为这 3 个峰均为杂蛋白峰, P_3 中蛋白含量虽没有很高却显示具有较高的活性,综上收集 P_3 峰处的酶液,进一步鉴定其分子量以及纯度。见图 2。

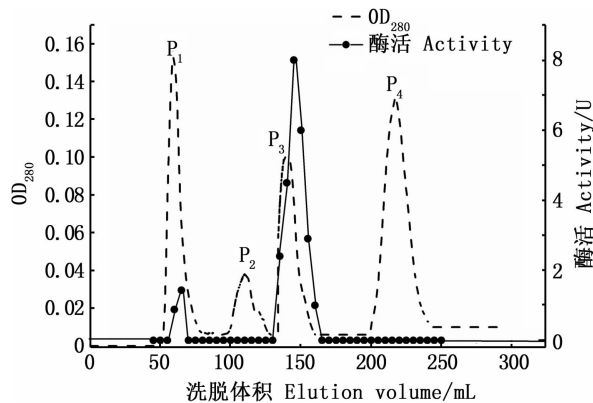


图 2 Sephadex G-100 凝胶层析洗脱图谱

Fig. 2 Sephadex G-100 chromatography of cellulase

2.2 纯化结果及分子质量的确定

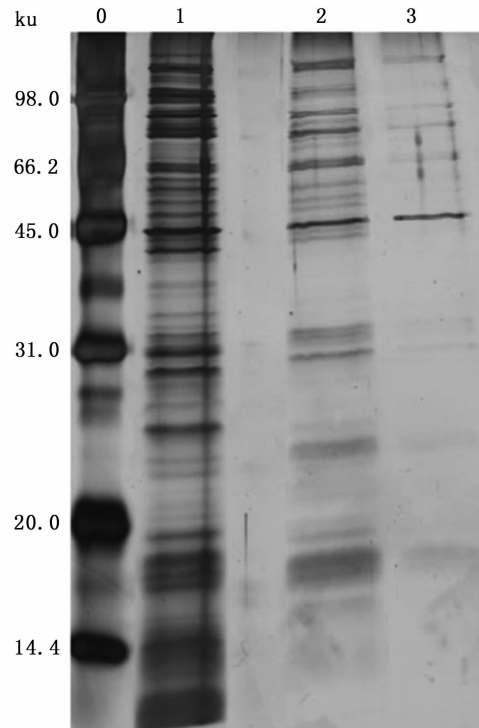
2.2.1 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳

纯化的纤维素酶液由于蛋白含量较低,故经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,选择银染作为染色方式,根据聚丙烯酰胺凝胶电泳结果,可知在经过离子交换层析后已除去大部分杂蛋白,泳道 3 即经过葡聚糖凝胶层析后呈现单一条带,表明该酶已得到高度纯化(图 3),并且根据标准蛋白质的相对分子质量的对数 $\lg M_w$ 与其迁移率 R_f 的线性关系,可得该内切纤维素酶分子质量约为 45 ku。

2.2.2 纯化结果

本文对团头鲂肠道菌株 *Aspergillus niveus* MA35 产纤维素酶进行了两步纯化, Q-Sepharose

Fast Flow 离子交换层析和 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析,得到了一种高纯度胞内内切型纤维素酶,从表 1 可看出,最终纤维素酶的纯化倍数为 1.37,其比活力为 30.6 U/mg,回收率为 42%。



0. 标准蛋白; 1. 粗酶液; 2. Q-Sepharose Fast Flow 离子交换层析后酶液; 3. 葡聚糖 G-100 凝胶层析后酶液

0. Protein marker; 1. Crude; 2. Q-Sepharose Fast Flow column chromatography of Cellulase; 3. Sephadex G-100 chromatography of Cellulase

图 3 纤维素酶纯化过程电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE of cellulase

2.2.3 纤维素酶的最适反应温度及温度稳定性

在酶促反应最适 pH 缓冲体系中,改变反应温度,测定纤维素酶活力,结果见图 4a,在 30 ~ 45 °C 之间,随着温度的升高,酶活力呈上升趋势,在 45 ~ 80 °C 之间,酶活力随着温度的升高在逐渐下降,故该酶催化底物 CMC-Na 最适反应温度为 45 °C。

表 1 *Aspergillus niveus* MA35 产纤维素酶的纯化结果

Tab. 1 Purification of Cellulase from *Aspergillus niveus* MA35

纯化步骤 Purification steps	总蛋白 Total protein/ mg	总活力 Total activity/ U	比活 Specific activity/(U/mg)	纯化倍数 Purification folds	酶回收率 Yield/%
粗酶液 Crude	10.4	232	22.3	1.0	100
Q-Sepharose-FF	6.9	178	25.8	1.2	77
Sephadex G-100	3.1	98	30.6	1.37	42

取一定量的酶液在不同温度下孵育 3 h, 每隔 30 min 取出部分酶液测定剩余酶活力, 结果如图 4 b 所示, 不同温度下酶孵育 1.5 h 后, 在 30 ~ 50 °C 之间, 剩余酶活在 60% 以上, 且各温度下剩余酶活相差不大, 故在 1.5 h 内该酶在 30 ~ 50 °C 之间具有良好的稳定性, 在 55 ~ 80 °C 之间, 将酶孵育 30 min 后, 剩余酶活在 60% 以下, 当温

度为 80 °C 时, 剩余酶活不足 40%, 且随着时间的增长酶活大小迅速下降甚至丧失酶活, 故该酶在高温下酶活极不稳定, 在不同温度下孵育 3 h 后, 30 ~ 55 °C 之间, 酶活保留 30% 以上, 30 °C 时酶活仍保留 50%, 由以上可见, 该酶在 30 ~ 55 °C 之间具有良好的稳定性。

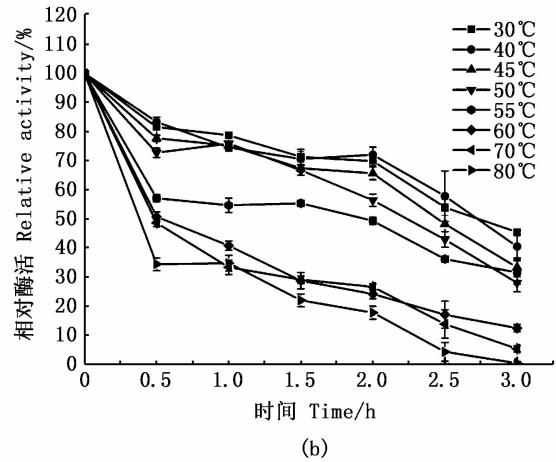
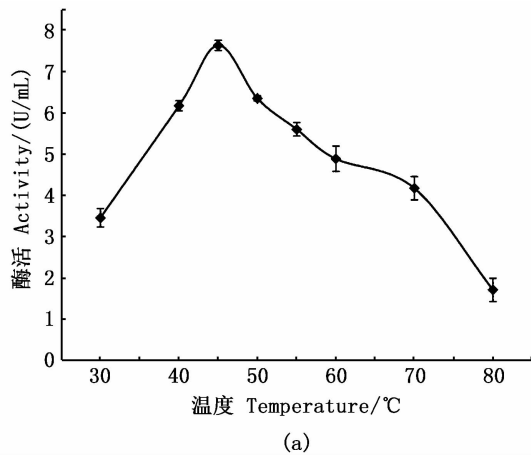


图 4 纤维素酶的最适反应温度 (a) 及温度稳定性 (b)
Fig. 4 The optimum temperature (a) and thermal stability (b) of cellulase

2.2.4 纤维素酶最适反应 pH 及其 pH 稳定性

由如图 5 a 可知, 在 pH 3.0 至 pH 4.5 之间, 随着 pH 的增长, 酶活力也呈上升趋势, 在 pH 4.5 至 pH 10.0 之间, 随着 pH 的下降, 酶活力大小逐渐减小直至丧失酶活, 由此可见, 该内切纤维素酶最适反应的 pH 为 4.5。

缓冲液中置于 4°C 冰箱中孵育, 测定剩余纤维素酶活力, 检测该酶 pH 的稳定性。由图 5b 可知, 在 pH 5.0 至 pH 8.0 之间, 剩余酶活力在 80% 以上, 具有良好的稳定性, 当 pH > 8.0 时, 剩余酶活力骤降至 30%, 故当 pH > 8 时该酶活力极不稳定易丧失酶活。在 pH 3.0 至 pH 5.0 之间酶活仍保留 55% 以上, 该酶具有良好的耐酸性。

将一定量的酶液分别加入等体积不同 pH 的

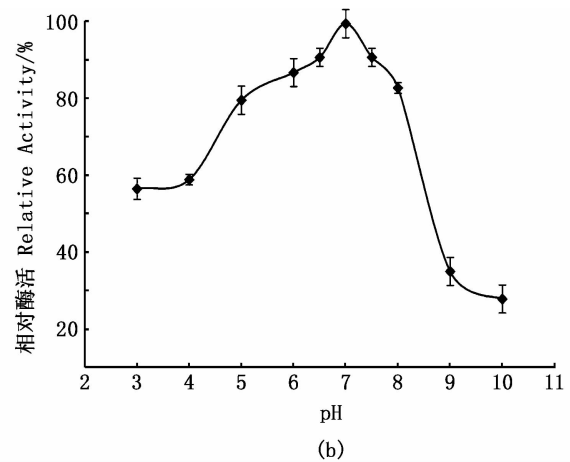
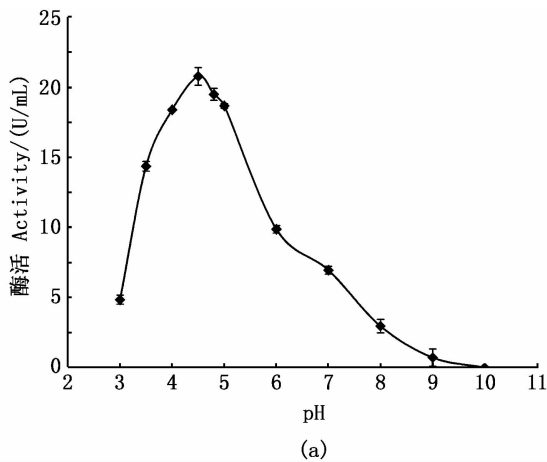


图 5 纤维素酶的最适反应 pH (a) 及 pH 稳定性 (b)
Fig. 5 The optimum pH (a) and pH stability (b) of cellulase

2.2.5 金属离子对酶活力的影响

用含有不同离子浓度的 CMC-Na 底物,各离子终浓度分别为 1 mmol/L 和 10 mmol/L,在最适条件下测定酶活力大小,由表 2 可看出 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶的活性有激活作用, Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 对酶的活性有抑制作用,其中 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 抑制作用较强, Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 对酶的活性几乎没有影响。

表 2 不同金属离子对纤维素酶活力的影响

Tab.2 The effect of metal ions on activity of cellulase

金属离子 Metal ion	不同用量的相对酶活力 Relative activity/%	
	1 mmol/L	10 mmol/L
Na^+	99.3	100.2
K^+	99.7	100.3
Li^+	98.0	99.7
Mg^{2+}	19.7	11.3
Ca^{2+}	101.7	99.3
Cu^{2+}	79.0	13.8
Pb^{2+}	90.2	44.6
Fe^{2+}	83.0	26.3
Zn^{2+}	113.5	139.7
Mn^{2+}	122.0	187.6
Cd^{2+}	91.5	61.7
Co^{2+}	88.4	64.1

3 讨论

本研究在实验室前期研究的基础上,进一步将雪白曲霉 *Aspergillus niveus* MA35 发酵生产的纤维素酶采用离子交换层析和葡聚糖凝胶层析分离纯化得到了一种内切纤维素酶,酶的比活力由 22.3 U/mg 提高到 30.6 U/mg,SDS-PAGE 显示该酶的分子量约为 45 ku。近年来纤维素酶的研究引起了研究者的关注,WON 等^[15] 通过 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶层析、DEAE-Sepharose 离子交换层析、DEAE-cellulose 离子交换层析和 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析 4 步从 *Penicillium camemberti* 产生的纤维素酶液中分离得到纤维素酶的 3 种组分,分子量分别为 99 ku、87 ku 和 61 ku; ISLAM 等^[16] 采用 DEAE-cellulose 和 CM-cellulose 两步离子交换层析从细菌发酵液中分离得到内切纤维素酶,其分子量为 67 ku; ANNAMALAI 等^[17] 从 *Bacillus licheniformis* AU01 分离得到一种纤维素酶,其分子量为 37 ku。由此可知,纤维素酶分子量的大小会因为来源的不同而表现出差异性。

该纤维素酶部分性质研究发现,该酶最适反应温度和 pH 分别为 45 °C 和 4.5,在 pH 4.0 ~ 8.0 以及 30 ~ 55 °C 之间具有良好的稳定性。研究表明,真菌酶通常在微酸性 pH 和中等温度下显示出最高的催化活性,而细菌酶在较宽的 pH 和温度条件范围内显示活性^[18]。该真菌所产纤维素酶特性符合目前的研究结果。

各金属离子对纤维素酶活力的影响研究发现, Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 浓度在 1 mmol/L 和 10 mmol/L 时对酶有激活作用; Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 对酶有抑制作用,其中 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 抑制作用较强, Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 对酶几乎没有影响。根据国内外研究表明,各金属离子对来源不同的纤维素酶的影响存在部分差异, Mg^{2+} 对 ANNAMALAI 等^[17] 从牡蛎中分离得到的纤维素酶有激活作用, Ca^{2+} 对其表现出抑制作用,与本研究一致的是 K^+ 和 Na^+ 对纤维素酶是没有明显影响的,但是不能因此判定这两种离子对纤维素酶没有影响,有研究^[8] 表明 K^+ 和 Na^+ 对 *Bacillus mycoides* S122C 所生产纤维素酶有轻微的抑制作用,因此实现纤维素酶应用的最大化,金属离子影响研究是有必要的。本研究中还可以逐步增加 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 金属离子浓度,研究这 3 种离子对纤维素酶活力是否有影响。

目前在工业化生产中,纤维素酶产生菌多为木霉和曲霉,但是在实验水平中筛选出的纤维素酶产生菌大多为细菌,本文从曲霉出发分离得到该纤维素酶,并且通过对该内切纤维素酶性质的研究,为真菌纤维素酶工程菌种的构建提供了优良的基因源,对更好地开发纤维素资源提供了一定的技术支持。

参考文献:

- [1] 王魁云,蒋霞云,江小妹,等. 团头鲂和草鱼肠道纤维素酶产生菌的筛选和鉴定[J]. 上海海洋大学学报, 2018, 27(4): 624-632.
WANG K Y, JIANG X Y, JIANG X M, et al. Screening and identification of cellulase-producing strains from intestines of *Megalobrama amblycephala* and *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2018, 27(4): 624-632.
- [2] HAN S J, YOO Y J, KANG H S. Characterization of a bifunctional cellulase and its structural gene. The *cel* gene of *Bacillus* sp. D04 has exo- and endoglucanase activity [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270 (43):

- 26012-26019.
- [3] SINGHANIA R R, SUKUMARAN R K, PATEL A K, et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 46(7): 541-549.
- [4] LIN H L, LI W G, GUO C H, et al. Advances in the study of directed evolution for cellulases [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, 2011, 5(4): 519-525.
- [5] MAKI M, LEUNG K T, QIN W S. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2009, 5(5): 500-516.
- [6] 张传富, 顾文杰, 彭科峰, 等. 微生物纤维素酶的研究现状[J]. *生物信息学*, 2007, 5(1): 34-36.
ZHANG C F, GU W J, PENG K F, et al. Present situation of research on microbial cellulase [J]. *China Journal of Bioinformatics*, 2007, 5(1): 34-36.
- [7] BALASUBRAMANIAN N, TOUBARRO D, TEIXEIRA M, et al. Purification and biochemical characterization of a novel thermo-stable carboxymethyl cellulase from azorean isolate *Bacillus mycoides* S122C [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 168(8): 2191-2204.
- [8] LEE Y J, KIM B K, LEE B H, et al. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(2): 378-386.
- [9] 解绶启, 张文兵, 韩冬, 等. 水产养殖动物营养与饲料工程发展战略研究[J]. *中国工程科学*, 2016, 18(3): 29-36.
XIE S Q, ZHANG W B, HAN D, et al. Study on the developmental strategies for the engineering of aqua nutrition and feed[J]. *Engineering Science*, 2016, 18(3): 29-36.
- [10] 刘大森, 鞠涛, 杨方, 等. 纤维素酶在反刍动物饲料中的应用研究进展[J]. *东北农业大学学报*, 2011, 42(6): 7-11.
LIU D S, JU T, YANG F, et al. Applied research progress of cellulase in ruminant animal feed[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 42(6): 7-11.
- [11] 孙乐常, 巫朝华, 蔡秋凤, 等. 九孔鲍鱼纤维素酶分离纯化与性质分析[J]. *中国食品学报*, 2010, 10(3): 76-82.
SUN L C, WU C H, CAI Q F, et al. Isolation, purification and characterization analysis of a cellulase from abalone (*Haliotis diversicolor*) [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2010, 10(3): 76-82.
- [12] 王刚, 丛子添, 郭明珠, 等. 绿色木霉 Fn10-1 纤维素酶分离纯化及酶学特性测定[J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(16): 3874-3876, 3881.
WANG G, CONG Z T, GUO M Z, et al. Isolation, purification and characteristics of *Trichoderma viride* Fn10-1 [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, 53(16): 3874-3876, 3881.
- [13] 何力. 草鱼纤维素分解菌筛选、酶提纯及其相关活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
HE L. Study on cellulose-decomposing strains from Herbivorous Fish and purification of the cellulase and related activity [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008.
- [14] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265-275.
- [15] WON J C, ZENG M M, MEK S K. Purification of the cellulase complex produced by *Penicillium camemberti* and its partial characterization[J]. *Folia Microbiologica*, 1992, 37(3): 199-204.
- [16] ISLAM F, ROY N. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses [J]. *BMC Research Notes*, 2018, 11: 445.
- [17] ANNAMALAI N, RAJESWARI M V, ELAYARAJA S, et al. Purification and characterization of thermostable alkaline cellulase from marine bacterium *Bacillus licheniformis* AU01 by utilizing cellulosic wastes [J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2012, 3(3): 305-310.
- [18] SUKUMARAN R K, SINGHANIA R R, PANDEY A. Microbial cellulases—production, applications and challenges[J]. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2005, 64(11): 832-844.

Isolation, purification and characterization of cellulase produced from *Aspergillus niveus* MA35 in the gut of the *Megalobrama amblycephala*

JIANG Xiaomei¹, LIN Chunwei¹, WANG Kuiyun¹, JIANG Xiayun¹, LI Yan^{1,2,3}, ZOU Shuming⁴

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Engineering Research Center for Processing and Storage of Shanghai Seawater Products, Shanghai 201306, China; 3. National Freshwater Aquatic Products Processing Technology R&D Center, Shanghai 201306, China; 4. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: An intracellular endo-cellulase was isolated and purified from the fermentation of *Aspergillus niveus* MA35 in the gut of *Megalobrama amblycephala*. The enzyme was purified sequentially by Q-Sepharose Fast Flow chromatography and Sephadex G-100 gel chromatography. The specific activity of the purified endoglucanase increased to 30.6 U/mg from 22.3 U/mg of the crude endoglucanase. The molecular masses of the enzyme was determined by SDS-PAGE to be about 45 ku. The optimum temperature is 45 °C and the optimum pH is 4.5. The enzyme has good stability between pH 4.0 – 8.0 and 30 – 55 °C. Zn^{2+} and Mn^{2+} have an activation effect on enzymes. Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} and Co^{2+} have inhibitory effects on enzyme activities, among which Mg^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{2+} have strong inhibitory effects, and Na^+ , K^+ and Ca^{2+} have little effect on enzymes.

Key words: cellulase; purification and characterization; enzymatic properties; *Megalobrama amblycephala*