

# 九孔鲍褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶的提取纯化\*

吴永沛 何碧烟

(集美大学生物工程学院 361021)

**提要** 采用  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分段盐析和葡聚糖凝胶 Sephadex G-100 柱层析纯化技术,从九孔鲍 *Haliotis diversicolor supertexta* 内脏器官中提取纯化褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶。结果表明,在  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分段盐析纯化中,褐藻酸酶和纤维素酶的最适分离饱和度为 60%,而琼脂酶为 70%。分段盐析的提纯倍数为(以粗酶提取液为参照)褐藻酸酶 13.3,琼脂酶 8.7 和纤维素酶 10.9。葡聚糖凝胶 Sephadex G100 层析分离过程中,褐藻酸酶、琼脂酶和纤维素酶的比活力高峰分别出现在洗脱液的 64, 48 和 80 ml 处,提纯倍数分别为褐藻酸酶 80.9,琼脂酶 68.0 及纤维素酶 15.2。上述提纯方法的研究结果将为这 3 种酶性质的进一步研究以及作为工具酶制剂产品的开发提供了工艺技术基础。

**关键词** 九孔鲍,褐藻酸酶,琼脂酶,纤维素酶

九孔鲍 *Haliotis diversicolor supertexta* 为热带、亚热带重要经济鲍种,是我国福建省、台湾省及广东省海域最主要的人工养殖种类之一<sup>[1]</sup>。鲍的人工养殖要求对其营养生理特点进行深入的研究,九孔鲍的天然及人工饲料中,海藻多糖是其主要的能量来源<sup>[2]</sup>。褐藻酸酶 (Algalase)、琼脂酶 (Agarase) 及纤维素酶

\* 福建省自然科学基金资助项目 B0010031 号的部分内容。  
第一作者:吴永沛,出生于 1956 年,学士,教授,从事生物工程领域的研究。E-mail: wuyongpei@china.com; 电话: 0592-6183381

收稿日期:2001-12-27;修回日期:2002-01-09

(Cellulase) 是其特别重要的消化酶类。本文报道从九孔鲍消化器官中分离纯化褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶的技术和方法,为进一步研究上述3种酶的动力学性质提供技术基础。

## 1 实验材料

### 1.1 九孔鲍

九孔鲍 *H. dilatator super texta* 购自同安县大嶝岛养鲍场,用于酶纯化的鲍大小为3~4 cm(壳长),养殖周期约6个月。每次取10只大小较一致的鲍,量体长,测体重,并取其内脏存放于冰箱冻结储藏。

### 1.2 葡聚糖凝胶 Sephadex G100

称取葡聚糖(G100)6.0 g,加蒸馏水200 ml,溶于250 ml烧杯,静置15 min,去除上层悬浮小分子,砂芯漏斗滤干,加0.5 mol/L NaOH溶液100 ml,浸泡15 min。洗至中性,滤干。再用0.5 mol/L HCl溶液浸泡15 min。洗至中性,滤干。将处理完的葡聚糖装入250 ml烧杯,加0.5% KCl溶液200 ml,半透膜扎口,于室温下放置两天备用。

## 2 实验方法

### 2.1 粗酶液的提取

取鲍内脏(冻结储藏)→称取10 g→研钵研磨(冰液中进行)→加0.5% KCl溶液100 ml→室温下抽提30 min→4 500 r/min离心30 min→取上清液过滤(低温中进行)→收集滤液于250 ml容量瓶中→4℃冰箱冷藏。

### 2.2 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>分段盐析纯化

取离心管6支,分别加入粗酶提取液5 ml,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>固体0.885 0 g,1.218 9 g,1.565 9 g,1.951 8 g,2.360 2 g及2.805 6 g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>饱和度依次为30%,40%,50%,60%,70%和80%。玻棒搅拌均匀溶解,静置30

min,然后离心4 500 r/min 15 min。去除上清液,沉淀物转移到半透膜袋,扎口后浸泡于事先预冷的蒸馏水中,放入冰箱(4℃)透析24 h,每隔2~4 h换水一次。透析完毕的酶液用蒸馏水定容至25 ml,放入4℃冰箱备用。

### 2.3 葡聚糖凝胶 Sephadex G100 层析纯化

层析柱洗净晾干,底部填一层玻璃纤维,整平,加适量蒸馏水,加少量沸石,轻轻敲击层析柱,使沸石平整无倾斜,排净蒸馏水,加适量0.5% KCl溶液,装入经处理并用洗脱液浸泡2 d的葡聚糖凝胶 Sephadex G100至柱高30 cm,始终保持洗脱液液面高于葡聚糖床面。轻敲层析柱,使葡聚糖整体无倾斜,无裂纹,不含气泡,旋紧层析柱顶端盖子。开启恒流泵,洗脱液清洗200 ml,备用。

层析开始时,打开层析柱上端盖子,待洗脱液液面与葡聚糖床面相平时,沿壁缓缓加入经盐析纯化的酶液2 ml,待酶液液面与葡聚糖床面相平时,加适量洗脱液,旋紧层析柱上端盖子,开启恒流泵,泵入洗脱液,同时打开自动部分收集仪、核酸蛋白检测仪及自动记录仪。核酸蛋白检测仪波长调至280 nm,电流1 A,记录仪调节起始速度为4 mm/min,部分收集仪收集8 ml/管,恒流泵流速为20 ml/h。

### 2.4 酶活力测定

向试管中分别加入3 ml底物→3 ml缓冲液→1 ml酶液,摇匀后置于45℃恒温水浴槽中,保温30 min后,立即取出后于100℃的沸水浴中热灭活15 min,冷却后过滤,从滤液中移取1 ml于25 ml比色管(带塞)中,加入3 ml 3,5-二硝基水杨酸,放于100℃沸水中显色15 min后,加入蒸馏水定容至25 ml刻度,摇匀后在550 nm波长下测定A<sub>550</sub>。并以1 ml灭活酶液代替酶液作为空白对照。3种酶的测定条件比较如表1。

表1 3种酶的测定条件

Tab.1 The requirements for the determining enzyme activity

酶	底物	缓冲液
褐藻酸酶	2%褐藻酸钠溶液	0.04 mol/L 巴比妥钠-0.02 mol/L HCl 缓冲液, pH = 8.8
琼脂酶	1%琼脂溶液	0.1 mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -0.2 mol/L 柠檬酸缓冲液, pH = 4.2
纤维素酶	2%羧甲基纤维素钠溶液	0.1 mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -0.2 mol/L 柠檬酸缓冲液, pH = 5

## 3 实验结果

### 3.1 褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶的盐析纯化结果

从图1可以看出,分段盐析后褐藻酸酶最高酶活力出现在(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>60%饱和度,酶活力为92.8 U/ml。酶的比活力出现两个高峰,分别在30%饱和度和60%饱和度,其值分别为64.1 U/mg和64.3 U/mg蛋

白质。其在(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>60%饱和度情况下,褐藻酸酶的活力和比活力都较高,考虑到还要进一步纯化,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>60%饱和度为褐藻酸酶的盐析最佳条件。

琼脂酶的分段盐析纯化结果见图2。从图2可以看出,琼脂酶酶活力高峰出现在(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>70%饱和度,其值为8.87 U/ml。比活力的高峰也出现在(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>70%饱和度,为6.17 U/mg蛋白质。故琼脂酶的盐析最适

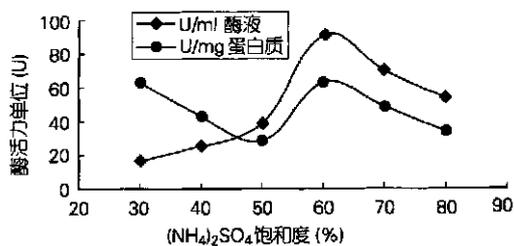


图1 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 分段盐析与褐藻酸酶活力的变化  
Fig.1 The change of algalase activity along with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> frantinated saltingout

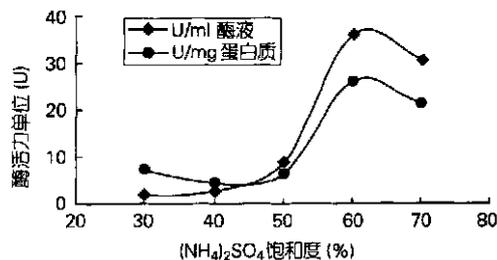


图3 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 分段盐析与纤维素酶活力的变化  
Fig.3 The change of cellulase activity along with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> frantinated saltingout

合条件为(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70%饱和度。纤维素酶盐析纯化结果见图3。从图3可以看出,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 饱和度在30%~70%范围内,纤维素酶活力和比活力的最大值均出现在(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60%饱和度处,与褐藻酸酶基本相同。

### 3.2 褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶的 Sephadex G 100 层析纯化结果

粗酶提取液经过(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 分段盐析纯化后,再经葡聚糖凝胶 Sephadex G100 层析纯化。纯化结果见图4,

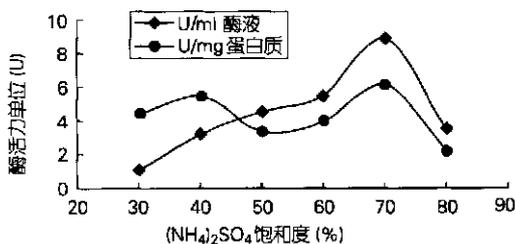


图2 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 分段盐析与琼脂酶活力的变化  
Fig.2 The change of agarase activity along with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> frantinated saltingout

5,6。从图4可以看出,在总数72 ml洗脱液中,褐藻酸酶出现了3个峰值,分别在24, 40, 64 ml处。其中以64 ml处最高,酶活力为27.2 U/ml,比活力为410.3 U/mg,纯化倍数为分段盐析的6.4倍。从图5可以看出,琼脂酶的酶活力曲线也出现3个峰值,分别在24, 48和64 ml处。其中以48 ml处最大,比活力为48.14 U/mg蛋白质,纯化倍数为分段盐析的7.8倍。从图6可以看出,洗脱液中纤维素酶的活力曲线也有3个峰值,分别在48, 64及80 ml处。其中以80 ml处为最大值,比活力为36.3 U/mg蛋白质,纯化倍数为分段盐析的1.8倍。

## 4 讨论

Thanassi 1967年及 Tanaka 1968年对鲍 *H. gigantea* α-岩藻糖酶的研究,采用硫酸铵分段盐析、DEAE 纤维素及 IRC-50 树脂层析对酶进行纯化及性质研究,指出该酶制剂

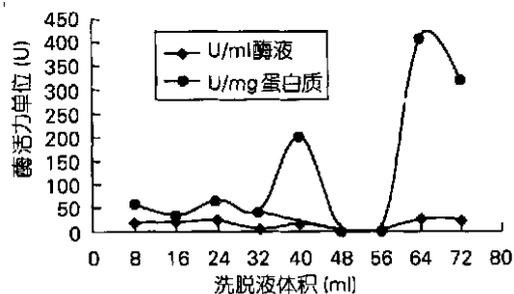


图4 Sephadex G100 柱层析过程褐藻酸酶活力的变化  
Fig.4 The change of algalase activity in process of Sephadex G100 gel-filtration

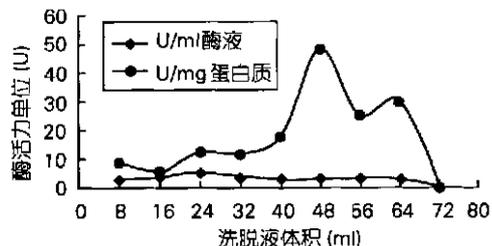


图5 Sephadex G100 柱层析过程琼脂酶活力的变化  
Fig.5 The change of agarase activity in process of Sephadex G100 gel filtration

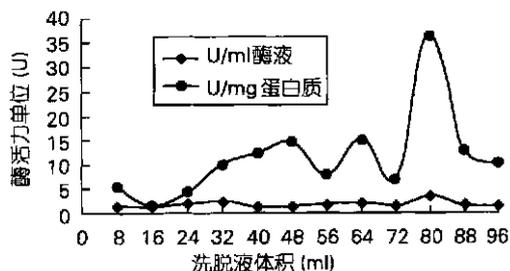


图6 Sephadex G100 柱层析过程纤维素酶活力的变化  
Fig.6 The change of cellulase activity in process of Sephadex G100 gel-filtration

作为医学上的潜在用途。Clark 1978 年对产于新西兰虹鲍 *H. iris* 的内脏消化酶进行研究,测定了内脏中 14 种多糖酶的活力,指出这些酶作为商业酶制剂的可能性。我国学者对鲍生物学的研究主要集中在对皱纹盘鲍 *H. discus hannai* Ino 上。

王运吉等 1990 年采用在粗酶提取液中加固体硫酸铵至 20% 及 95% 饱和液,再用葡聚糖凝胶 G25 分离的方法,制成皱纹盘鲍消化酶制剂,该酶几乎集中了消化器官所有的水解酶类。杨蕙萍 1997 年测定了皱纹盘鲍粗酶提取液的蛋白酶活力及其性质。杨蕙萍 1998 年<sup>[3]</sup>进一步测定了淀粉酶和褐藻酸酶的活力和性质。结果表明,淀粉酶的活力仅为褐藻酸酶活力的几分之一,表明褐藻酸酶在鲍消化生理学上的重要

性。李太武 1995 年测定了不同大小及不同健康状况的皱纹盘鲍,发现淀粉酶随着鲍生长发育而活力下降,而蛋白酶即随着鲍生长发育而活力上升。本研究采用  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 饱和度分段盐析九孔鲍消化器官粗酶提取液。研究证明,在  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60% 饱和度条件下,褐藻酸酶和纤维素酶的比活力最高。而  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  70% 饱和度条件下,琼脂酶的比活力最高。在此基础上,采用葡聚糖凝胶 G100 层析,有效地对这 3 种酶进一步纯化。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分段盐析和葡聚糖凝胶 G-100 层析纯化结果的比较见表 2。本研究结果将为制备高纯度褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶制剂提供了可靠方法,并为阐

表 2  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分段盐析和葡聚糖凝胶 Sephadex G 100 层析纯化效果的比较

Tab.2 The comparisons between the effects of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractinated salting out and Sephadex G 100 Gel filtration

提纯方法	提纯倍数			回收率(%)		
	褐藻酸酶	琼脂酶	纤维素酶	褐藻酸酶	琼脂酶	纤维素酶
粗酶液	1	1	1	100	100	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析	13.3	8.7	10.9	22.5	15.4	83.8
Sephadex G 100	80.9	68.0	15.2	6.6	5.2	32.7

明九孔鲍的消化生理奠定了理论基础。

#### 参考文献

- 1 钟幼平,陈昌生,吴永沛等.国内南方鲍鱼工厂化育苗和养殖技术,集美大学学报,1999,451~58
- 2 周歧存,麦康森.皱纹盘鲍营养研究进展,饲料研究,1999,2:16~17
- 3 杨蕙萍,童圣英,王子臣.皱纹盘鲍淀粉酶和褐藻酸酶的研究,水产学报,1998,22(4):345~351

## THE FRACTINATIONS AND PURIFICATIONS OF ALGALASE, AGARASE AND CELLULASE FROM THE ABALONE *Haliotis diversicolor supertexta*

WU Yongpei HE Bi-yan  
(Bioengineer School, Jimei University, Xiamen 361021)

Received: Dec., 27, 2001

Key Words: The abalone *Haliotis diversicolor supertexta*, Algalase, Agarase, Cellulase

### Abstract

Algalase, agarase, and cellulase were extracted and purified from the abalone *Haliotis diversicolor supertexta* by the means of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractinated salting out and gel-filtration Sephadex G100. In the means of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fratonated salting out, the 60% is the optimum saturation degree for the enzymes of algalase and cellulase, as well as the 70% is the optimum for the enzyme of agarase. The number of purification times of algalase was 13.3 (crude extraction liquid as control), 8.7 for agarase and 10.9 for cellulase. The specific activity peaks were showed out in the washing off liquid of 64 ml for algalase, 48 ml for agarase and 80 ml for cellulase, as well as the number of the purification times were 80.9 for algalase, 68.0 for agarase and 15.2 for cellulase. The above study results on the three enzymes can be used to study the specifications and to make the enzyme preparations afterward.

(本文编辑:李本川)