

黑曲霉 β -D 甘露聚糖酶的纯化及基本性质

田亚平 金其荣

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 设计了利用硫酸铵分级沉淀, 凝胶过滤层析和羟基磷灰石吸附层析相结合及二次羟基磷灰石吸附层析二种分离方案, 使一种黑曲霉 β -D 甘露聚糖酶得到纯化, 纯化酶经聚丙烯酰胺凝胶电泳显示基本为单一蛋白带。凝胶过滤法测的全酶相对分子质量为 49 000, SDS-PAGE 法测得相对分子质量为 51 000。聚丙烯酰胺等电聚焦测得此纯化酶等电点为 3.8。

关键词 魔芋精粉; β -D 甘露聚糖酶; 纯化; 性质

中图分类号 Q556.2

0 前言

β -D 甘露聚糖酶是能水解各种甘露聚糖之间 β 糖苷键的多糖水解酶类。国外通过对各种来源的 β -D 甘露聚糖酶的研究, 已开发出广泛的应用, 如用作鉴定多糖结构的工具酶^[1,2]; 在纸浆制造业, 用酶法代替碱法进行脱色、漂白^[3]; 利用 β -D 甘露聚糖酶与其它酶联合作用, 对自然资源进行开发利用^[4]; 利用内切的 β -D 甘露聚糖酶, 水解来源丰富的含甘露聚糖的植物胶, 制取有特殊保健作用的甘露寡糖等。这些开发一旦工业化将在许多行业产生较大的经济效益和社会效益, 国内已开始注意此类酶的开发和应用。

1 材料与方法

1.1 试剂

Sephadex G-150, 电泳标准蛋白质为 pharmacia 产品; 羟基磷灰石为中科院产品; 其它化学试剂均为化学纯以上。

1.2 粗酶的制备

将黑曲霉 *ASP. Niger WX96* 菌株斜面接种三角瓶固体发酵培养基, 35℃ 恒温培养 48 h, 发酵麸曲中加入 pH5.6 的醋酸缓冲液, 摇床摇 30 min 后, 用脱脂棉过滤得粗酶液。

1.3 甘露聚糖酶活力的测定

用 pH5.6 的醋酸缓冲液配制 1% 的魔芋精粉底物, 吸 1 ml 于试管中, 加适当稀释酶液 1 ml, 以灭活酶液代替活酶液作对照, 55℃ 准确反应 10 min, 立即吸出 0.5 ml 反应液于含 1.5 ml DNS 的具塞比色管中, 沸水浴 5 min 后, 定容至 25 ml, 于 520 nm 处测定光吸收值。在本

实验条件下,定义每 10 min 产生 1 mg 还原糖的酶量为一个单位

1.4 蛋白质含量分析

采用 Folin-酚法,以酪蛋白为标准蛋白质。

1.5 相对分子质量测定

1.5.1 凝胶过滤法^[4] Sephadex G-150 柱 (1.6 cm× 100 cm),用 pH5.8, 0.05 mol/L 醋酸缓冲液充分平衡,流速 15 ml/h。

1.5.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 按文献 [5] 中方法进行。

1.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度

按文献 [5] 中方法进行。

1.7 聚丙烯酰胺等电聚焦法测定等电点并进一步鉴定纯度

按文献 [6] 中方法进行。

2 结果与讨论

2.1 黑曲霉 β -D 甘露聚糖酶的纯化

2.1.1 凝胶过滤层析与羟基磷灰石吸附层析 (HA) 相结合方案

1) 将发酵粗酶液预冷后,加 45% ~ 80% (NH₄)₂SO₄ 进行分级盐析。将沉淀溶解透析后真空冷冻干燥得酶粉。

2) 称 50 mg 冷冻干燥酶粉溶于 1 ml pH 5.8, 0.05 mol/L 醋酸缓冲液,上 Sephadex G-150 (1.6 cm× 100 cm) 柱,用缓冲液洗脱,流速 12 ml/h,获得 2 个未分开的活性峰,见图 1。

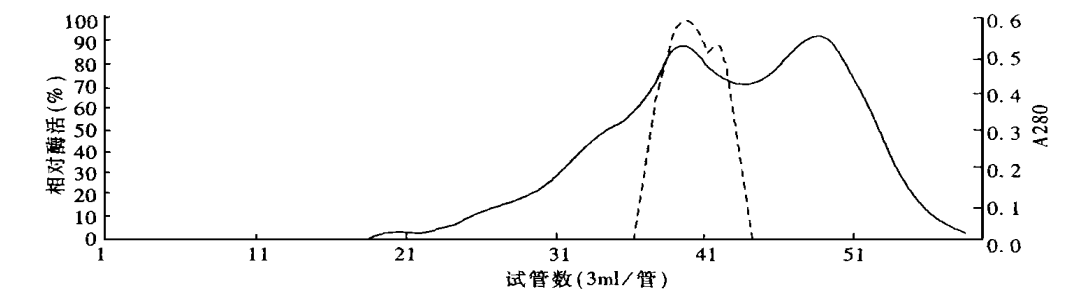


图 1 Sephadex G-150 凝胶过滤层析分离黑曲霉 β -D 甘露聚糖酶
—— A280 β -D 甘露聚糖酶相对酶活

3) 将活性峰主要分部合并,透析 48 h,用聚乙二醇 20 000 浓缩,上羟基磷灰石吸附柱层析 (1.6 cm× 25 cm),起始与平衡缓冲液用 pH6.8 0.01 mol/L 磷酸缓冲液,尔后用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗脱,获得一个高活性峰,见图 2,其比活力为原粗酶液的 15 倍。纯化情况见表 1。

表 1 黑曲霉 β -D 甘露聚糖酶的纯化					
步骤	总蛋白质 /mg	总酶活 /u	比活力 /u·mg ⁻¹	纯化倍数	收率 (%)
原酶液	5475	12800	2.3	1	100
硫酸铵分级盐析 (40% ~ 85%)	1084	6528	6.0	2.6	51

续表 1 黑曲霉 β -D甘露聚糖酶的纯化					
步骤	总蛋白质 /mg	总酶活 /u	比活力 /u [·] mg ⁻¹	纯化倍数	收率 (%)
Sephadex G-150 凝胶过滤	38	547	14.4	6.3	21.4
羟基磷灰石层析	5	175.5	35.1	15.3	6.85

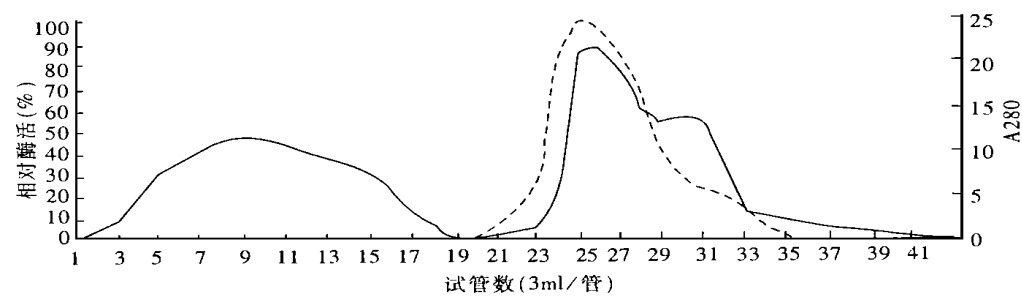


图 2 羟基磷灰石吸附层析分离黑曲霉 β -D甘露聚糖酶
—— A280 β -D甘露聚糖酶相对酶活

4) 将纯化了的 β -D甘露聚糖酶经聚丙烯酰胺凝胶电泳(圆盘电泳),考马斯亮蓝染色显示一条较深的带和另两条几乎看不见的带,与分级盐析后的酶比较,可说明纯化的效果比较明显。结果见图 3。

2.1.2 二次羟基磷灰石吸附层析方案 取按文中 2.1.1 步骤 1)制取的酶粉 50 mg,溶于 1 ml, pH6.8, 0.01 mol/L磷酸缓冲液,上羟基磷灰石吸附层析(1.6 cm $\times$ 25 cm),用 0.01~ 0.3 mol/L的梯度洗脱,流速 15 ml/h,结果见图 4。

将上述高活性峰合并,透析 48 h,用聚乙二醇浓缩,再上羟基磷灰石吸附层析(1.6 cm $\times$ 25 cm),采用 0.1 mol/L磷酸缓冲液进行阶段洗脱结果见图 5。

图 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
1—硫酸盐析后透析酶样;
2—经 Sephadex G-150 HA后透析浓缩酶样

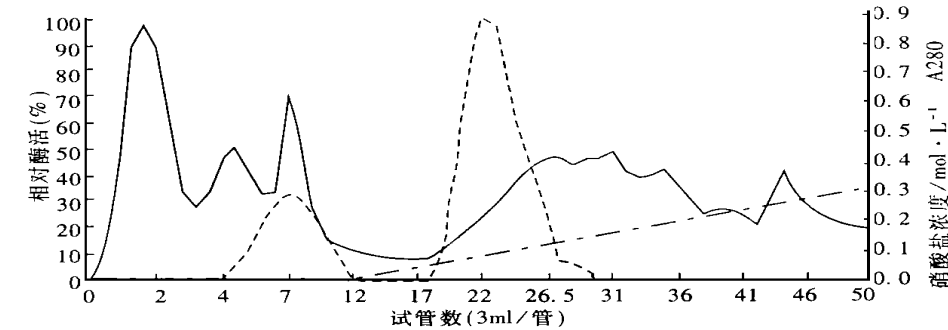


图 4 羟基磷灰石吸附层析 (1)分离黑曲霉 β -D甘露聚糖酶 (梯度洗脱)
—— A280 β -D甘露聚糖酶相对酶活 ——— 磷酸盐浓度 /mol[·] L

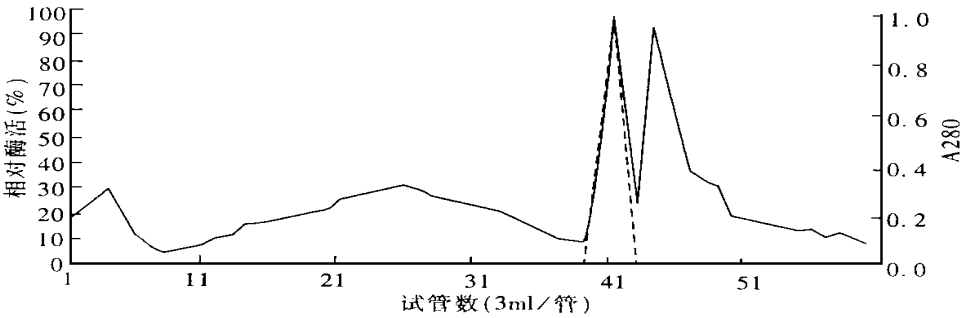


图 5 羟基磷灰石吸附层析 (2) 分离黑曲霉 β -D 甘露聚糖酶
—— A280 β -D 甘露聚糖酶相对酶活

二次 HA 分离的酶液亦在完全相同条件下用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度,结果见图 6。对二次 HA 分离跟踪测定酶活力的结果,发现最终纯化倍数为 10.8,而电泳结果表明分离效果与 2.1.1 方案相当。在第 1 次层析中还发现,不管是凝胶过滤还是 HA 吸附层析都有 2 个活性峰,我们推测此黑曲霉的酶系中不止一种甘露聚糖酶,其酶系有待进一步探讨。酶蛋白的后期层析分离,一般总是从相对分子质量的差异和电性差异两方面去考虑,由于黑曲霉的酶系相当复杂,一次层析很难达较高纯度,而多次层析又会造成样品过于稀释,回收率过低的缺点。通过几种方案的尝试,上面这 2 种分离方案步骤简捷,分离效果较好。第 1 种方案将分子筛色谱与吸附层析相结合,其优点是利用了两种性质的差异,但据资料报道各种不同来源的 β -D 甘露聚糖酶的相对分子质量在几万到几十万范围,在相对分子质量

图 6 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
1—第 1 次 HA 层析后透析浓缩;
2—第 2 次 HA 层析后透析浓缩酶样

未知的情况下,选用 Sephadex G-150,此种凝胶因刚性差,容易压缩,使样品不易洗脱,流速也相当慢。粗酶中含杂质较多,有些杂质可能会与凝胶发生作用而污染凝胶,而凝胶对有些组分的一些吸附作用也会使洗脱体积产生偏差。相比较而言,第 2 种方案尽管只利用了一种手段,但由于 HA 对核酸、蛋白质大分子有很高的吸附性能,具独特的分离效果。它带正负两种电荷 (Ca^{2+} 与 PO_4^-),与蛋白质间的相互作用比离子交换更为复杂。一般认为,HA 的层析机制与 Ca^{2+} 有关,其保留机制与羧基有密切关系。其吸附性能影响因素主要有床体体积大小、样品的浓度和量、溶剂的组成和浓度等,我们通过层析条件的优化选择,使二次 HA 最终达到了较好的分离效果。当样品中杂质较多时,第 1 次 HA 采用梯度洗脱,它可对一系列 k 值的层析系统进行“扫描”分析,初步测知了目的酶洗脱浓度,第 2 次为保证一定的回收率,采用了阶段洗脱方式,结果表明,仍达到了进一步去杂分纯的效果,这是因为蛋白质类具非线性等温曲线的溶质,当样品浓度变化,各组份比例变化时,它们在 HA 上的吸附保留性能也随之变化,从而拉开差距,进一步分离。

2.2 黑曲霉 β -D 甘露聚糖酶的基本性质

2.2.1 酶相对分子质量的测定

1) 采用 Sephadex G-150凝胶过滤法,将已知相对分子质量的标准蛋白质混合进样,纯化酶也在同样条件下进样,测得结果见表 2

表 2 凝胶过滤法测分子量 ($V_o = 68.5$)

	U-淀粉酶	乙醇脱氢酶	牛血清白蛋白	胰蛋白酶	纯化酶
M_r	2.0×10^5	1.5×10^5	6.7×10^4	2.9×10^4	
V_e / ml	85.8	95	110.9	136.1	120

根据表 2数据,用最小二乘法求得回归方程: $\lg M_r = 6.88 - 1.25 \times V_e / V_o$,利用此方程可求得 β -D甘露聚糖酶的相对分子质量为 49 000.

2) 采用 SDS-PAGE电泳法,将混合标准蛋白质和纯化酶样在同样条件下上电泳,标准蛋白质为 碳酸酐酶 (M_r 30 000)、卵清蛋白 (M_r 43 000)、牛血清蛋白 (M_r 67 000)、磷酸 b (M_r 94 000),电泳后以不同蛋白分子量对数对 R_f 值作图 (见图 7),查图可求出为 51 000,同样用最小二乘法求得回归方程:

$\lg M_r = 5.2 - 0.67 \times de l d o$,将纯化酶的迁移率 R_f 0.73代入求得 M_r 为 51 000. 因与凝胶过滤法所测比较接近,推测此酶由一条肽链组成,为单体酶. 考虑凝胶可能有一些吸附作用的影响而使数据偏小的现象,该酶的相对分子质量可推断在 50 000左右. 与资料相比,除 Alan D. Elbein^[2]等从黑曲霉中得到一种甘露糖苷酶相对分子质量较高为 120 000外,其它各种来源的甘露聚糖酶大多在 30 000~ 90 000之间, Ahmet Civas^[5]等人从黑曲霉中分离得到的一种 β -D甘露寡糖酶相对分子质量则为 53 000,本酶的相对分子质量与之相接近

2.2.2 等电点的测定及进一步纯度鉴定 各种酶样配胶,测定结果见表 3.

表 3 等电聚焦法测定胶带 pH梯度

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9
距离 /cm	0	0.7	1.4	2.4	3.1	3.8	4.3	5.8	8.7

染色后的纯化酶蛋白质区带的位置在 2.3 cm,采用内插法求得 pI 为 3.8.

将盐析后的酶、一次 HA分离后的酶、二次 HA分离后的酶透析后同时等电聚焦,结果见图 8.

从结果可进一步说明二次 HA分离效果显著,与一般凝胶电泳比较,等电聚焦无扩散作用的影响,分辨率比一般电泳要高,它不仅可测等电点,而且可将具不同等电点的物质分离,重复性好;由于其独特的聚焦作用,还可分析浓度很低的样品. 但聚焦图谱中出现谱带较宽的现象,分析所分离的纯化酶可能还含有等电点与之相

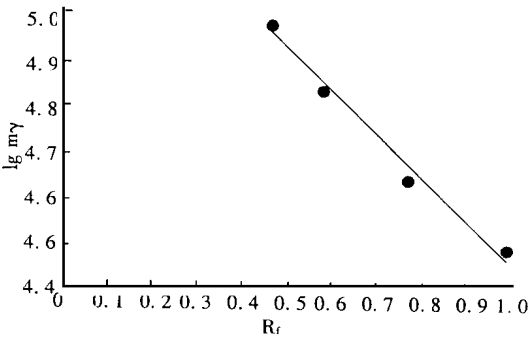


图 7 SDS-PAGE测定 β -D甘露聚糖酶分子量



图 8 等电聚焦法测定 β -D甘露聚糖酶等电点

1—盐析透析酶样 2—一次 HA层析酶样
3—二次 HA层析酶样

当接近的蛋白质组份。许多资料表明,许多微生物在合成 β -D 甘露聚糖酶的同时也合成纤维素酶和半纤维素酶的复合物,它们具有相似的理化性质,故酶的纯化很困难。我们比较二种分离方案对 β -D 甘露聚糖酶的分离纯化,从黑曲霉固体发酵浸液中提取得到较纯的一种 β -D 甘露聚糖酶,并研究了一些此酶的基本性质,为进一步了解此酶的酶学性质及进行应用的可能性研究提供参考。

致 谢

我院陈蕴、金丰秋同志在菌种扩培、麸曲制备中做了大量工作,在此表示衷心感谢!

参 考 文 献

- 1 Mccleary, Barry V. β -D Mannosidase from *Helix Pomatia*. Carbohydrate Research, 1983, 111: 297~ 310
- 2 Elbein, Alan D. Surekha Adya, Yuan Chuan lee. Purification and Properties of α - β -Mannosidase from *Aspergillus niger*. The Bio Chem J, 1977, 252: 2026~ 2031
- 3 Talbot G, Sygusch J. Purification and Characterization of Thermostable β -Mannanase and α -Galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(6): 3505~ 3510
- 4 Mccleary, Barry V. Purification and Properties of α - β -D Mannoside Mannohydrolase from Guar. Carbohydrate Research, 1982, 101: 75~ 92
- 5 Ahmet Civas, Renee Eberhard. Glycosidases Induced in *Aspergillus tamarii*. Bio Chem J, 1984, 219: 857~ 867
- 6 马延和,周培谨. 浅谈寡糖的开发和应用. 食品与发酵工业, 1992, 1: 80~ 82
- 7 Toshiro Akino, Nobuyuki Nakamura, Koki Horiroschi. Characterization of Three β -Mannanases of an Alkalophilic *Bacillus sp.* Agric Biol Chem, 1988, 52(3): 773~ 779
- 8 Rihiei Takahashi, Isao Kusakabe, Hideyuki Kobayashi. Purification and Some Properties of Mannanase from *Streptomyces sp.* Agric Biol Chem, 1984, 48(9): 2189~ 2195
- 9 陶蔚孙,李惟,姜涌明,等. 蛋白质分子基础. 北京: 高等教育出版社, 1989
- 10 冯万祥,赵伯龙. 生化技术. 长沙: 湖南科学出版社, 1989
- 11 苏拔贤. 生物化学制备技术. 北京: 科学出版社, 1986

Purification and Properties of β -D Mannanase from *Aspergillus Niger*

Tian Yaping Jing Qirong

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract β -D Mannanase has been purified from *Aspergillus niger*. The first method includes ammonium sulphate precipitation, Sephadex G-150 gel filtration chromatography and hydroxylapatite chromatography; The second method includes ammonium sulphate precipitation, twice hydroxylapatite chromatography. The molecular weight of the enzyme, was determined to be 48000 and 53000 by gel filtration and SDS-PAGE respectively. The pI value for β -D mannanase is about 3.8 on PAGIF electrophoresis.

Key words konjak powder; β -D mannanase; purification; properties

(责任编辑: 陈 娇)