

黑曲霉 β -D 甘露聚糖酶酶学 性质及化学组成

田 亚 平 金 其 荣

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 在纯化研究的基础上对土壤中筛选诱变得到的黑曲霉菌株所产的 β -D 甘露聚糖酶进行了部分酶学性质的研究。该酶的最适温度为 55°C , 最适 pH 为 5.5, 酸碱稳定区域为 4.5~8.0, 以魔芋精粉和瓜儿豆胶为底物分别测得该酶米氏常数为 14.2 g/L, 10.2 g/L, 发现 Ag^{+} 、 Pb^{2+} 离子对该酶有较强的抑制作用, Ca^{2+} 离子有一定的激活作用。纯化酶的氨基酸组成分析表明, 天门冬氨酸和谷氨酸 (包括酰胺) 含量为 26.9%。利用纸层析初步了解了不同条件下粗酶对魔芋精粉底物的水解产物情况。

关键词 β -D 甘露聚糖酶; 黑曲霉; 性质

分类号 Q556.2

0 前 言

β -D 甘露聚糖酶是一类能水解含甘露糖多糖的水解酶, 自然界合成的化合物中植物半纤维素的数量仅次于纤维素, 利用 β -D 甘露聚糖酶对富含甘露聚糖的植物材料进行深加工和综合利用具有很大的潜在应用价值。

该酶可从植物中提取^[1], 或利用微生物发酵, 如嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus alcalophilus*)^[2,3]、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)^[4]、链霉菌 (*Streptomyces sp*)^[5]、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)^[6,7]等。不同来源的 β -D 甘露聚糖酶, 因性质上的差别, 其应用范围和价值也不尽相同。

我们曾对黑曲霉 *Asp. niger* WX 96 所产 β -D 甘露聚糖酶纯化并研究了相对分子质量、等电点等基本性质^[8], 我们继续研究了此酶的酶学性质、化学组成及粗酶对魔芋甘露聚糖的水解情况。

1 材料与方法

1.1 酶的培养及提取^[8]

原酶液经硫酸铵分级盐析得粗酶液, 采用二次羟基磷灰石吸附层析纯化获得较纯酶液。

收稿日期: 1997-09-09

第 1 作者: 田亚平, 女, 1964 年 5 月生, 工学硕士, 讲师

1.2 甘露聚糖酶活力的测定

测定方法按文献 [8] 中方法。

1.3 蛋白质含量分析

采用 Folin 酚法,以酪蛋白为标准蛋白质。

1.4 动力学参数 K_m 的测定

用 pH5.5 的磷酸缓冲液配制不同浓度的魔芋精粉和瓜儿豆胶底物溶液,在酶浓度相同的酶活力测定条件下测定。用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求出 K_m 值。

1.5 氨基酸组成的分析

用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定酸水解液中各种氨基酸的含量。

1.6 魔芋葡甘露聚糖水解产物的检测

将正交实验各条件下粗酶液对魔芋葡甘露聚糖的水解产物在新华 1 号滤纸上进行纸层析,溶剂系统: $V(\text{正丁醇}):V(\text{吡啶}):V(\text{水}) = 6:4:3$,用 AgNO_3 试剂浸湿法显色。

2 结果与讨论

2.1 pH 对酶活力和酶稳定性的影响

55℃ 下测定 β -D 甘露聚糖酶在不同 pH 缓冲液中的酶活力, (其中 pH3.5~6.0 为 0.05 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液; pH6.0~8.0 为 0.05 mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液)。结果见图 1。

图 1 表明纯化酶的最适 pH 为 5.5,在 pH7.0 处还有一小峰,当用盐析后的粗酶实验则发现,不仅 7.0 处的峰更明显,还在 pH3.5 处有一峰值,说明此黑曲霉酶系中能作用于魔芋精粉的甘露聚糖酶可能不止一种,而纯化酶也不可能达绝对纯。酶的最适 pH 并不是一个常数,它只有在一定条件下才有意义,不同种类的缓冲液往往会影响到酶的最适 pH 值。为此我们分别采用过广泛缓冲液,柠檬-磷酸缓冲液在相同条件下测定 (见图 1),发现曲线在形状上有些差别,但 pH5.5 处基本上都落在最适范围内。同批酶在相同条件下测定时,发现用醋酸缓冲液时酶活性最高。有文献报道:一般来源真菌的甘露聚糖酶的最适 pH 在 3~5.5 之间^[7],而其它来源的则一般在中性范围,也有一些在碱性范围的。

将酶液与不同 pH 的柠檬-磷酸缓冲液混合,30℃ 保温 1 h,然后在酶活测定条件下测定酶活力,见图 2。在此缓冲体系下, β -D 甘露聚糖酶的 pH 稳定区域为 4.5~8.0。

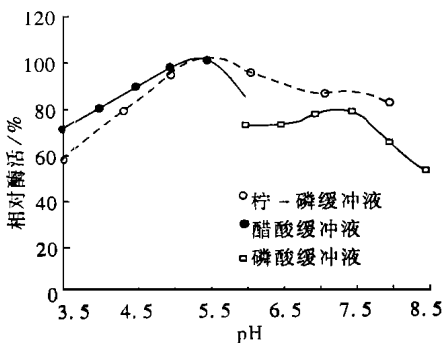


图 1 pH 对酶活性的影响

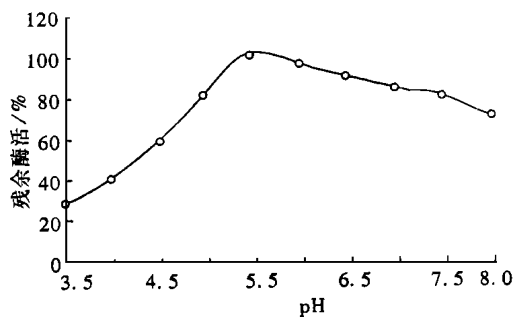


图 2 pH 对酶稳定性的影响

2.2 温度对酶活力和酶稳定性的影响

pH5.5下测定不同温度的酶活性,表明本实验条件下,该酶在 55℃时活性最大,见图 3.粗酶在 pH5.5下不同温度分别处理 30,120 min,再在 55℃下测定,得酶的热稳定性曲线,见图 4,该酶在超过 45℃时活性呈明显下降趋势,盐析酶在 50℃处理 30,120 min 剩余酶活性分别为 88%,57%;而 HA 纯化后酶 50℃处理 30,120 min 则只剩下 74%,46%.粗酶的热稳定性相对高一些,可能因其所含杂质中有一些酶的稳定性因子存在.

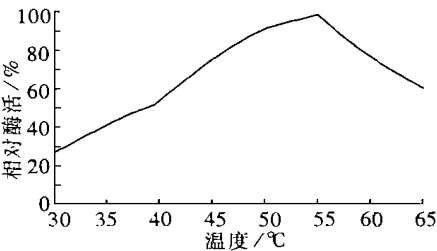


图 3 温度对酶活力的影响

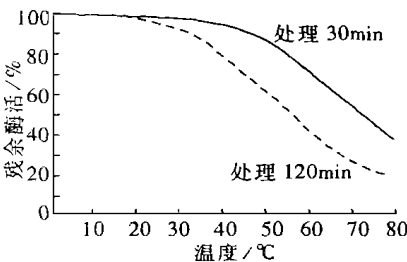


图 4 温度对酶稳定性的影响

2.3 米氏常数 K_m 的测定

按方法所述进行实验,用双倒数作图法求得以魔芋精粉为底物的 K_m 为 14.2 g/L,回归方程为: $Y = 3.29X + 2.32$ 同法求得该酶以瓜儿豆胶为底物时 K_m 为 10.2 g/L,回归方程为: $Y = 4X - 3.93$ 该酶 K_m 大小比 Toshiro Akino^[3]等从嗜碱芽孢杆菌中分离的三种 β -D 甘露聚糖酶以魔芋精粉为底物的 K_m 7.7 g/L 大近一倍,也比 Shigenori Emi^[7]从细菌中分离的酶 K_m 3.4 g/L 值大.这说明此酶对魔芋精粉的亲和力比上述微生物相对较小.

2.4 金属离子对酶活力的影响

以去离子水 (pH5.6左右) 配合 1 mmol/L 的各种金属离子溶液,加入经 EDTA 透析过的纯化酶,55℃条件下,保温 1 h 后测酶活,结果见表 1, Pb^{2+} 与 Ag^+ 对酶活性具明显抑制作用, Ca^{2+} 则对酶活性有一定激活作用,其它一些离子大多有一些抑制作用, NH_4^+ 和 EDTA 对酶活力基本无影响

表 1 金属离子对酶活力的影响

离 子	Co ²⁺	Cu ²⁺	Li ⁺	Pb ²⁺	N H ₄ ⁺	M g ²⁺	Sn ²⁺	Fe ²⁺	Zn ²⁺	Ca ²⁺	Ag ⁺	ED TA 对照
相对酶活 / %	93	89.3	82.8	13.4	100	92	90.8	80	79.9	128	0.5	98 100

2.5 黑曲霉 β -D 甘露聚糖酶的氨基酸组成

纯化酶液各氨基酸含量见表 2,结果表明此酶 Asx 和 Glx 含量较多 (26.9%),结合前文^[8]测得此酶等电点为 3.8 的结果,推测此酶是酸性蛋白质

表 2 黑曲霉 β -D 甘露聚糖酶的氨基酸组成 %

氨基酸	Asx	Thr	Ser	Glx	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Cys	Pro	Trp ¹⁾
含 量	12.16	6.34	6.61	14.78	5.23	8.13	6.70	2.16	5.49	8.46	4.25	4.29	7.70	1.98	5.72	0.00	0.00	-

1) 因纯化酶液量少,浓度低,对 Trp 未作专门测定

2.6 不同条件下粗酶水解魔芋葡甘露聚糖的情况

据特异性基质的结构及酶对它们的作用特点,可将 β -D 甘露聚糖酶分成 2 种类型:内 β -D 甘露聚糖酶,外 β -D 甘露聚糖酶.为了解黑曲霉所产 β -D 甘露聚糖酶酶系情况,利用底物魔芋精粉,设计了下面的正交实验,见表 3.

表 3 正交实验结果实验号

实验号	A (底物浓度 %)	B (酶用量 /(U/g))	C (水解时间 /min)	D(pH)	还原糖浓度 /(g/L)
1	1(0.5)	1(25)	1(5)	1(3.5)	0.179
2	1(0.5)	2(50)	2(10)	2(5.5)	0.377
3	1(0.5)	3(75)	3(15)	3(7.0)	0.377
4	2(1.0)	1(25)	2(10)	3(7.0)	0.358
5	2(1.0)	2(50)	3(15)	1(3.5)	1.470
6	2(1.0)	3(75)	1(5)	2(5.5)	0.807
7	3(1.5)	1(25)	3(15)	2(5.5)	1.363
8	3(1.5)	2(50)	1(5)	3(7.0)	1.112
9	3(1.5)	3(75)	2(10)	1(3.5)	2.008
k ₁	0.311	0.634	0.699	1.219	
k ₂	0.879	0.886	0.915	0.848	
k ₃	1.494	1.064	1.069	0.616	
R	1.183	0.430	0.37	0.603	

从极差的大小看出,底物浓度对酶反应产生还原糖量的影响最大,其次是水解 pH 值。底物浓度增加时,还原糖量明显增加,这与该酶的 K_m 较大有关,但因魔芋粉的水溶液粘度较大,若超过 2% 则近乎形成凝胶状态,所以实验的范围未加大。从酶的用量和水解时间的影响趋势看,在小范围里继续加大,增加的幅度较小。而 pH 值为 3.5 时,还原糖的产生量明显高,推测此酶系中有最适 pH 在 3.5 的甘露聚糖酶,从图 5 的纸层析结果来看,各种因素对水解产物的影响较复杂,反映此黑曲霉粗酶液酶系较复杂,底物浓度增高时,还原糖浓度尽管明显增大,但除 5 号与 9 号,其余水解产物大多为某一聚合度范围的寡糖,在单因素实验里,发现水解时间 30 min 以上时,水解产物大多趋向于单、双糖范围,由此认为此黑曲霉的甘露聚糖酶酶系较全,可能内切酶外切酶都有,而 5 号 9 号的结果可说明此酶系中最适 pH 在 3.5 左右的甘露聚糖酶是外切型的酶。

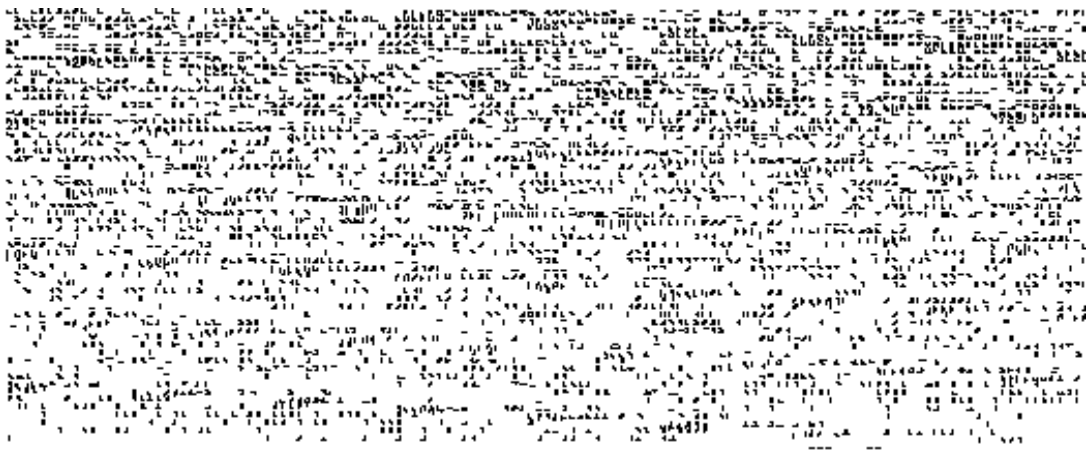


图 5 正交实验各条件下水解产物纸层析图谱

3 结 论

我们从黑曲霉 *Asp.niger* WX96 中分离得到一种甘露聚糖酶,从它的等电点和氨基酸

组成来看,它是一种酸性蛋白质,最适温度为 55°C ,比一般细菌的甘露聚糖酶略低,最适 pH 值为 5.5,与已研究过的一些真菌甘露聚糖酶接近,相对分子质量 50 000 也属中等范围。这些性质应该说对其应用较为有利,因中性中温下对材料进行酶解,不仅能源消耗少,同时还可避免水解液过酸过碱带来的脱盐工序,也减少了环境污染。许多研究表明不管是动物、植物还是微生物,它们产生的半纤维素酶往往是几种起协同作用的酶组份,我们所得的此黑曲霉菌株产酶也不例外。因此对其应用范围及应用价值的研究,可从协同作用着手。

参 考 文 献

- 1 Barry V, McCleary. Purification and Properties of α -D Mannoside mannohydrolase from guar. Carbohydrate Research, 1982, 101: 75~ 92
- 2 田新玉,徐毅,马延和,等.嗜碱芽孢杆菌 N16-5 β 甘露聚糖酶的纯化与性质.微生物学报, 1993, 33(2): 115~ 121
- 3 Toshiro Akino, Nobuyuki Nakamura, Koki Horirosi. Characterization of Three β -Mannanases of an Alkalophilic *Bacillus* sp. Agric Biol Chem, 1988, 52(3): 773~ 779
- 4 杨文博,沈庆.地衣芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶的纯化及酶学性质.微生物学通报, 1995, 22(6): 338~ 342
- 5 Rhei Takahashi, Isao Kusakabe, Hideyuki Kobayashi. Purification and some Properties of Mannanase from *Streptomyces* sp. Agric Biol Chem, 1984, 48(9): 2189~ 2195
- 6 Ahmet Civas, Renee Eberhard. Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*. Bio Chem J, 1984, 219: 857~ 867
- 7 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
- 8 田亚平,金其荣.黑曲霉 β -D 甘露聚糖酶的纯化及基本性质.无锡轻工大学学报, 1998, (2): 16~ 21

The Chemical Composition and Enzymic Properties of β -D Mannanase from *Aspergillus Niger*

Tian Yaping Jing Qirong

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

Abstract After α -D mannanase had been purified from *Aspergillus niger*, we studied the enzymic properties and chemical composition of this enzyme. The optimum pH was found to be 5.5 (stable from 4.5~ 8.0) and the optimum temperature 55°C . The enzyme followed typical Michaelis-Menten kinetics with apparent K_m of 14.2 g/L and 10.2 g/L for konjak powder and Guar gum. Effects of various metal ions and buffers on enzyme activity were also examined. The activity of enzyme was enhanced by Ca^{2+} , but strongly inhibited by Pb^{2+} , Ag^{+} . Analyses of amino acid composition showed that this β -D mannanase contained about 26.9% Asx and Glx.

Key words β -D mannanase; *Aspergillus niger*; properties

(责任编辑:陈 娇)