

文章编号:1673-1689(2007)02-0021-05

黑曲霉酸性 β -甘露聚糖酶的酶学特性

朱 劼, 邬敏辰

(江南大学医学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要:纯化的黑曲霉 *Aspergillus niger* WM20-11 所产的酸性 β -甘露聚糖酶经 Sephadex G-100 凝胶过滤层析和 SDS-PAGE 分别测得相对分子质量为 39 000 和 40 000; IEF-PAGE 测得酶的等电点为 4.0; 最适作用 pH 值和温度分别为 3.5 和 70 $^{\circ}\text{C}$; 糖质量分数 19.6%; Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Li^{+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 对酶有激活作用, Pb^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 对酶有抑制作用; 酶对角豆胶的 K_m 和 $V_{\max}$ 分别为 66.7 g/L 和 333 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$; 酶蛋白的氨基酸组成中 Asp 和 Glu 含量最高; HPLC 分析角豆胶酶水解液的主要产物是低聚糖。

关键词:黑曲霉; β -甘露聚糖酶; 性质

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Studies on the Characterization of acidic β -Mannanase from *Aspergillus niger*

ZHU Jie, WU Min-chen

(School of Medicine, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this manuscript, the characterization of acidic β -mannanase from *Asp. niger* WM20-11 was investigated. Molecular weight of the enzyme was determined as 39 000 on Sephadex G-100 gel filtration and 40 000 on SDS-PAGE. The isoelectric point was estimated to be 4.0 by IEF-PAGE. The optimum temperature and pH were 70 $^{\circ}\text{C}$ and 3.5. It contained 19.6% carbohydrate. The activity of the enzyme was stimulated by Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Li^{+} 、 Na^{+} 、 K^{+} , but inhibited by Pb^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} and Hg^{2+} . K_m and $V_{\max}$ were 66.7 g/L and 333 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ with locust bean gum. The content of Asp and Glu was the highest. Enzyme hydrolysis products from locust bean gum were oligosaccharides by HPLC analysis.

Key words: *Aspergillus niger*; β -mannanase; Characterization

β -甘露聚糖酶(β -1,4-D-mannan mannohydrolase, EC 3.2.1.78)是一种能降解甘露聚糖、葡萄糖甘露聚糖和半乳甘露聚糖的主链 β -1,4-D-甘露糖苷键的水解酶,属于半纤维素酶类^[1],在食品、医药、

造纸、饲料和石油等工业中有着广泛的应用前景。该酶可将自然界广泛存在的 β -甘露聚糖降解为甘露寡糖,此产物可有效地改善动物肠道菌群的结构,促进肠道内双歧杆菌增殖,进而调节肠功能,以

收稿日期:2006-05-18.

基金项目:国家“九五”重大科技攻关项目(96-C03-02-01).

作者简介:朱劼(1969-),女,江苏无锡人,工学硕士,讲师,主要从事生物化学方面的研究. Email:zhj_sytu@hotmail.com.

通讯作者:邬敏辰(1962-),男,江苏无锡人,副教授,理学博士,主要从事生物化学方面的研究. Email:bioch@163.com

增强机体免疫力^[2]。将 β -甘露聚糖酶运用于造纸工业纸浆的漂白工艺中,一方面可以得到比单纯用氯漂白、碱提取更好的纸浆特性,还可以减少氯和碱的用量以及由它们带来的环境污染。此酶应用于饲料工业,主要作为外源性酶参与机体活动,并且其对动物健康和生产性能的促进作用在某些方面可代替抗生素。 β -甘露聚糖酶还可以作为多糖链结构分析中的工具酶。近年来国内对 β -甘露聚糖酶的研究和开发进入了一个新的高潮。

对于不同菌种来源的 β -甘露聚糖酶的性质已有所报道,但多数为中性、碱性 β -甘露聚糖酶。本实验室保存了一株高产酸性 β -甘露聚糖酶的黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* WM20-11,前文^[3]对其产生酸性 β -甘露聚糖酶的条件做了总结。在此基础上继续对该酶进行了分离纯化。本文将报道该酶的理化性质、化学组成及对角豆胶甘露聚糖的水解情况。

1 材料与方法

1.1 菌种

黑曲霉(*Aspergillus niger*) WM20-11 酸性 β -甘露聚糖酶高产菌株,由江南大学医学院生物化学实验室保存。

1.2 主要试剂及仪器

Sephadex G-100、蓝葡聚糖 2 000: Pharmacia 产品;牛血清白蛋白、鸡卵白蛋白、胰蛋白酶:上海伯奥生物科技有限公司产品;角豆胶、细胞色素 C: Sigma 产品;丙烯酰胺、 N,N' -甲叉双丙烯酰胺(Fluka);SDS-PAGE 低相对分子质量标准蛋白质、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、 N,N,N',N' -四甲基乙二胺:上海华美公司进口分装;Ampholine: pH 3.5~10.0 for IEF, Amersham Bio-sciences 公司产品;其它常用化学试剂均为国产分析纯。层析系统:南京南达生物技术开发公司生产;分光光度计:WFZ800-D3B 型;垂直蛋白电泳系统:Mini-PROTEAN II 型;等电聚焦电泳仪:DYY-12C 型;凝胶成像系统:Touching 995 型;氨基酸自动分析仪:AGILENT 1100 型;高压液相色谱仪:Waters 600/2410 型。

1.3 主要方法

1.3.1 酶活性测定 按文献^[4]并略作修改:取 0.5 mL 适当稀释的酶液,加到 2.0 mL 用 0.1 mol/L、pH 4.8 醋酸缓冲液配制的 5.0 g/L 的角豆胶溶液中,60℃ 反应 10 min;3,5-二硝基水杨酸显色法(即 DNS 法)测定还原糖。在上述条件下,每分钟

产生的还原糖量相当于 1 μ mol 甘露糖所需酶量定义为 1 个 β -甘露聚糖酶活性单位(IU)。

1.3.2 相对分子质量测定 方法 1: Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析,柱型 1.6 cm $\times$ 100 cm,洗脱液为 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0),体积流量 0.2 mL/min。标准相对分子质量蛋白质为牛血清白蛋白(67 000)、鸡卵白蛋白(45 000)、胰蛋白酶(29 000)和细胞色素 C(12 300)。蓝葡聚糖 2 000 上柱测得 V_0 ,同样条件下将酶样上柱得到 V_e ,根据 $\lg M_r$ 对 V_e/V_0 的回归方程求出 M_r 。方法 2: SDS-PAGE,按文献^[5]的方法,不连续垂直板电泳系统,分离胶质量浓度 120 g/L,浓缩胶质量浓度 30 g/L,Tris-HCl 缓冲体系,考马斯亮蓝 R-250 染色。低相对分子质量标准蛋白为兔磷酸化酶 B(97 400)、牛血清白蛋白(66 200)、兔肌动蛋白(43 000)、牛碳酸酐酶(31 000)、胰蛋白酶抑制剂(20 000)和鸡蛋清溶菌酶(14 400)。以相对迁移率为横坐标,标准蛋白相对分子质量的对数为纵坐标,得标准曲线。

1.3.3 等电点测定 采用等电聚焦电泳(IEF-PAGE)法,进口 Ampholine(pH 3.5-10.0)为两性电解质载体,胶质量浓度 54 g/L。等电聚焦结束后用刀片沿电泳方向依次将一条 2 cm $\times$ 6 cm 的胶切成 0.5 cm 长的小段,每段用 2 mL H_2O 浸泡 20 min 并搅碎,精确测定浸提液的 pH 值。样品部分的胶行固定—染色—脱色。以凝胶长度对 pH 值作图,绘制出凝胶的 pH 梯度曲线,然后直接从曲线上求出蛋白质样品的 pI 值。

1.3.4 最适 pH 及 pH 稳定范围 pH 2~6.5 用柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲体系,pH 值 7~10 用甘氨酸-NaOH 缓冲体系。以不同 pH 的缓冲液配制 5.0 g/L 角豆胶底物溶液,按测定酶活方法测定不同 pH 条件下的酶活力,可得酶反应的最适 pH 值。将酶液与不同 pH 的缓冲液混合,37℃ 保温 2 h,然后再于酶活测定条件下测定酶活力,可得酶稳定 pH 范围。

1.3.5 最适温度及温度稳定范围 酶液在不同温度的水浴中,按测酶活方法测定不同温度下的酶活,得酶反应的最适温度。研究酶的温度稳定范围时则将酶液在不同温度的水浴中保温不同时间,然后再于酶活测定条件下测定残余相对酶活。

1.3.6 金属离子对酶稳定性的影响 将金属离子(终浓度为 1 mmol/L)与酶液一同 40℃ 保温 1 h,以不加金属离子的酶液为对照测酶活性。

1.3.7 含糖量测定 采用苯酚-硫酸法:1 mL 适当稀释的酶蛋白液,加入 0.5 mL 60 g/L 的重蒸酚水

溶液,再快速加入浓硫酸 3.6 mL,室温静置反应 20 min,测定 OD_{490} 。以葡萄糖为标准。

1.3.8 动力学常数测定 以 0.625~5.0 g/L 的角豆胶为底物,按酶活力测定方法测定酶活,以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/V$ 为纵坐标,作出双倒数(Lineweaver-Burk)曲线。测定出该酶对角豆胶半乳糖甘露聚糖的 K_m 和 V_{max} 。

1.3.9 氨基酸组成及含量分析 酶样品经 HCl 彻底水解,上 AGILENT 1100 氨基酸自动分析仪测定水解液中各种氨基酸的组成和含量。

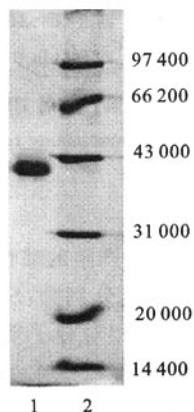
1.3.10 水解产物 HPLC 分析 酶在 50 °C 下水解 10 g/L 角豆胶 10 h 后的上清液测定水解产物。色谱条件为: Waters 600/2410 色谱仪, Sugar-pak-1 色谱柱(6.5 mm×300 mm),流动相为水,柱温 85 °C,体积流量 0.4 mL/min,示差折光检测器。

2 结果与讨论

2.1 相对分子质量

按相对分子质量测定的方法 1,通过 Sephadex G-100 凝胶过滤层析得回归方程 $\lg M_r = -0.8949 (V_e/V_0) + 6.1702$, $R^2 = 0.9986$,再根据纯酶样品在相同条件下的 V_e/V_0 (1.765) 求出此法测得的 β -甘露聚糖酶的 M_r 为 39 000。

按方法 2 进行 SDS-PAGE,结果见图 1,并获得 $\lg M_r = -0.9703 (R_f + 5.0778)$, $R^2 = 0.9849$,根据酶蛋白的 R_f 值(0.490)从标准曲线上求得 M_r 为 40 000。两种方法测得的 M_r 相近,说明该酶为单体酶。不同来源的 β -甘露聚糖酶的 M_r 有较大差异,小的只有 22 000,大的可到 162 000^[1],但多数为单体酶。



1. 纯酶;2. 低相对分子质量标准蛋白质

图 1 β -甘露聚糖酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE pattern of β -mannanase

2.2 等电点

电泳结束后绘制 pH-凝胶长度曲线, $pH = 0.0933 (\text{length} + 3.0268)$, $R^2 = 0.9913$ 。根据纯酶所在的位置(10.4 mm)求得该酶等电点为 4.0。

2.3 最适 pH 及 pH 稳定性

由图 2 可见纯酶的最适 pH 为 3.5。pH 除了影响酶的反应速度外,还影响酶的稳定性。pH 稳定性曲线表明在 pH 2.5~6.0 范围内剩余酶活力在 80% 以上,该酶具有良好的对酸稳定性。

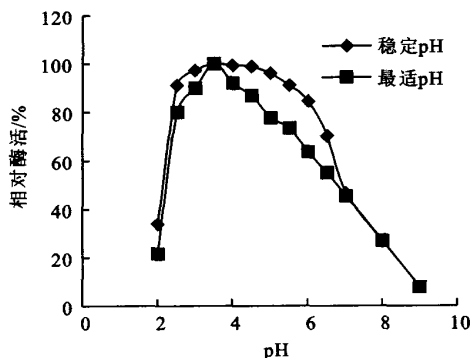


图 2 pH 对酶活力及其稳定性的影响

Fig. 2 Effect of pH on enzyme activity and stability

2.4 最适温度及温度稳定性

直接在各温度下测定酶活力(图 3),得知该酶的最适作用温度为 70 °C。对酶热稳定性的研究(图 4)表明,酶在 50、60 °C 保温 20 min,活力下降不多;65、70 °C 时温度越高,酶活维持时间越短;而 75 °C 酶很快即失活。并且酶在 50、60 °C 保温 30 min 时,仍能保持 90% 左右的活力,说明此酶的热稳定性较好。YU Hong-Ying 等^[6]研究的枯草芽孢杆菌 SA-22 β -甘露聚糖酶的热稳定性也很好,其在 50 °C 保温 4 h 后活力不变,60 °C 保温 4 h 后剩余酶活为 74.2%,70 °C 的酶活半衰期为 3 h。

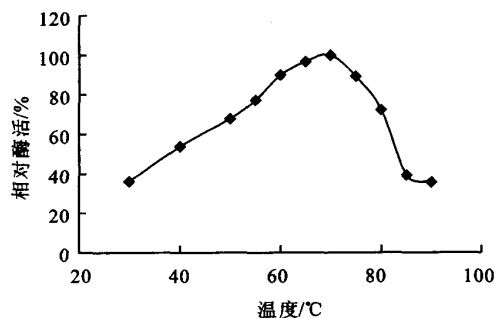


图 3 温度对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature on enzyme activity

2.5 金属离子对酶稳定性的影响

由表 1 可知 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 对酶有

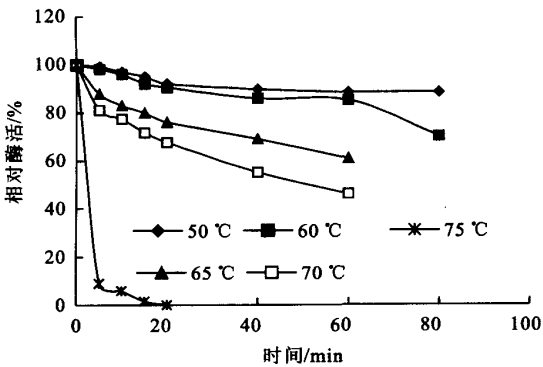


图 4 温度对酶稳定性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on enzyme stability

不同程度的激活作用; Pb^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 对酶有抑制作用; 而 NH_4^{+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 对酶的影响不大。吴襟等^[7] 和余红英等^[8] 分别对诺卡氏菌形放线菌及枯草芽孢杆菌的 β -甘露聚糖酶的化学修饰研究表明, 巯基是维持酶活性的必需基团。这在一定程度上可以解释虽然离子对不同来源的 β -甘露聚糖酶的影响有差异, 但几乎所有的 β -甘露聚糖酶的活性都能被 Hg^{2+} 严重抑制。

表 1 金属离子对酶稳定性的影响

Tab. 1 Effect of metallic ions on enzyme stability

金属离子	相对酶活/%	金属离子	相对酶活/%
CK	100	Cu^{2+}	96.2
Mg^{2+}	139.9	Fe^{2+}	90.2
Ca^{2+}	132.6	Pb^{2+}	89.3
Li^{+}	119.2	Co^{2+}	84.2
Na^{+}	115.2	Fe^{3+}	58.4
K^{+}	114.8	Mn^{2+}	49.0
NH_4^{+}	101.3	Hg^{2+}	2.3
Zn^{2+}	97.8		

2.6 含糖量

此 β -甘露聚糖酶含糖量为质量分数 19.6 %, 故为糖蛋白。也正因为此酶为含有一定量糖基的蛋白质, 因此其具一定的耐热稳定性。许多研究表明, 真菌及某些放线菌的 β -甘露聚糖酶有不同程度的糖基化, 而在细菌和植物则很少发现^[9]。

2.7 动力学常数

双倒数作图法测定出该酶对角豆胶半乳甘露聚糖的 K_m 为 66.7 g/L, $V_{\max}$ 为 333 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。

2.8 氨基酸组成及含量

氨基酸组成(表 2)中, $(\text{Asp} + \text{Glu})/(\text{Lys} +$

$\text{Arg})$ 为 3.74, 说明黑曲霉 WM20-11 所产的 β -甘露聚糖酶为酸性蛋白质, 而等电点的测定结果也证实了这一点。Lind 等^[10] 提出高的 Lys 和低的 Arg 含量是耐热蛋白质的氨基酸组成特征。该酶的 Lys/Arg 的比值为 1.36, 且实际上酶的热稳定性良好。

表 2 β -甘露聚糖酶的氨基酸组成

Tab. 2 Amino acid content of β -mannanase

氨基酸	质量分数/%	氨基酸	质量分数/%	氨基酸	质量分数/%
Asp	14.4	Ala	5.9	Phe	5.5
Glu	10.3	Arg	2.8	Ile	5.3
Ser	8.1	Tyr	8.1	Leu	7.8
His	1.9	Cys-s	0.8	Lys	3.8
Gly	6.1	Val	5.7	Pro	3.5
Thr	9.5	Met	0.7		

注: 在上述测定条件下, 色氨酸全部被破坏, 丝氨酸和苏氨酸均被破坏 10~15%。

2.9 水解产物的 HPLC 分析

角豆胶的酶水解液进行 HPLC 分析, 结果(图 5)显示, 酶解产物主要是二糖以上的低聚糖, 推测此酶可能为内切酶。

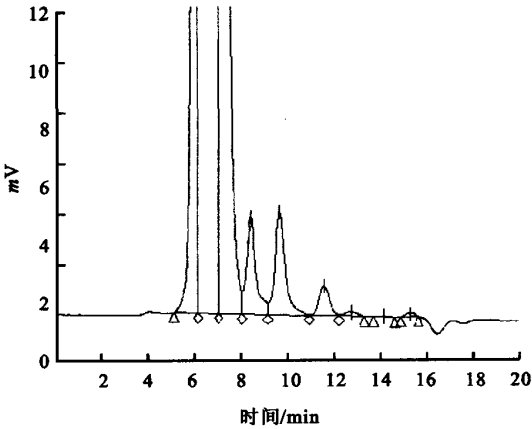


图 5 酶解产物的 HPLC

Fig. 5 HPLC of β -mannanase reaction mixture

3 结 语

黑曲霉 WM20-11 产生的酸性 β -甘露聚糖酶经纯化, 其各项理化性质分别为: Sephadex G-100 和 SDS-PAGE 测得酶的相对分子质量分别为 39 000 和 40 000, 为单体酶; 等电点 4.0; 最适作用 pH 和温度分别为 3.5 和 70 $^{\circ}\text{C}$; 酶蛋白含糖质量分数 19.6%; Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Li^{+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 对酶有激活作用, Pb^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 对酶有抑制作用; 对角豆胶底物的 K_m 和 $V_{\max}$ 分别为 66.7 g/L 和

333 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$;氨基酸组成中 Asp 和 Glu 含量最高;HPLC 分析酶水解角豆胶的产物主要是二糖以上的低聚糖。

研究结果表明,该 β -甘露聚糖酶具有在酸性环境中活力高、稳定性好等特性,并具有一定的耐热

稳定性,为实现酸性 β -甘露聚糖酶的工业化生产和在饲料中的广泛应用打下了基础。此外,利用 β -甘露聚糖酶水解来源丰富的含甘露聚糖的植物胶,产生的甘露寡糖的生理功能和用途开发正在进一步研究中,必将产生一定的经济效益和社会效益。

参考文献(References):

- [1] 吴襟,何秉旺. 微生物 β -甘露聚糖酶[J]. 微生物学通报, 1999, 26(2):134—136.
WU Jin, HE Bing-wang. β -mannanase of Microbiology[J]. **Microbiology**, 1999, 26(2):134—136. (in Chinese)
- [2] 杨文博,佟树敏,沈庆,等. β -甘露聚糖酶酶解植物胶及其产物对双歧杆菌的促生长作用[J]. 微生物学通报, 1995, 22(4):204—207.
YANG Weng-bo, TONG Shu-min, SHEN Qin, et al. Enzymic Hydrolysing Plant Gums by β -mannanase and the Promoting Growth Effect of Bifidobacterium with its Production[J]. **Microbiology**, 1995, 22(4):204—207. (in Chinese)
- [3] 朱劭,李剑芳,邹敏辰. 酸性 β -甘露聚糖酶的固态发酵工艺研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2005, 33(8):139—143.
ZHU Jie, LI Jian-fang, WU Min-chen. Study on the solid-state fermentation of acidic β -mannanase[J]. **Jour of Northwest Sci-Tech Univ of Agri and For**, 2005, 33(8):139—143. (in Chinese)
- [4] Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. Characterization of three β -mannanase of an alkaliphilic *Bacillus* sp. [J]. **Agri Biol Chem**, 1988, 52(3): 773—779.
- [5] 何忠效,张树政. 电泳[M]. 北京:科学出版社, 1999.
- [6] YU H Y, SUN Y M, WANG W J, et al. Purification and Properties of *Bacillus subtilis* SA-22 endo-1,4- β -D-mannanase[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2003, 19(3):327—331.
- [7] 吴襟,何秉旺. 诺卡氏菌放线菌 β -甘露聚糖酶的化学修饰及活性中心的研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(2):227—230.
WU Jin, HE Bin-wang. The Study on Chemical Modification and Active Site of β -D-Mannanase from Nocardioform Actinomycetes[J]. **Chin J Biochem Mol Biol**, 2000, 16(2):227—230. (in Chinese)
- [8] 余红英,王炜军,孙远明,等. 枯草芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶活性中心氨基酸的化学修饰[J]. 工业微生物, 2005, 35(1):21—23.
YU Hong-yin, WANG Wei-jun, SUN Yan-min, et al. Chemical modification of active side of β -mannanase from *Bacillus subtilis*[J]. **Industrial Microbiology**, 2005, 35(1):21—23. (in Chinese)
- [9] 李剑芳,邹敏辰,夏文水. 微生物 β -甘露聚糖酶的研究进展[J]. 江苏食品与发酵, 2004, 118:4—8.
LI Jian-fang, WU Min-chen, XIA Wen-shui. Development of Researches on Microbiological β -mannanase[J]. **Jiangsu Food and Fermentation**, 2004, 118:4—8. (in Chinese)
- [10] Lind DL, Daniel RM, Cowan DA, et al. β -galactosidase from a strain of the *Thermophilic anaerobe*[J]. **Enzyme Microbiol Technol**, 1989, 11:180—186. (in Chinese)

(责任编辑:杨萌)