

泡盛曲霉 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的纯化、性质及其用于制备 β -葡寡糖

陈子贤¹, 刘学强², 张彬¹, 闫巧娟², 江正强^{*3}

(1. 河南科技大学 食品与生物工程学院, 洛阳 471023; 2. 中国农业大学 工学院, 北京 100083; 3. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 作者研究了泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)一种 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(AaBglu29)的纯化、性质及其水解燕麦麸皮制备葡寡糖。粗酶液采用硫酸铵沉淀、QSFF 强阴离子柱和 DEAE-52 弱阴离子柱层析 3 步纯化, 得到电泳级纯酶, 经 SDS-PAGE 和 Sephacryl-100 测定的相对分子质量分别为 30.7×10^3 和 27.6×10^3 。该酶最适 pH 为 5.0, 最适温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 。AaBglu29 底物特异性专一, 对大麦葡聚糖、燕麦葡聚糖和地衣多糖的比酶活力分别为 9 500、7 950 U/mg 和 5 980 U/mg。该酶水解燕麦麸皮产生葡三糖和葡四糖, 经优化, 当底物质量分数为 5%, 加酶量为 100 U/g 时, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.0 条件下水解 4 h, 葡寡糖转化率可达 90%。AaBglu29 优良的酶学特性使其在食品和饲料工业具有较大的应用潜力。

关键词: 泡盛曲霉; β -1,3-1,4-葡聚糖酶; 纯化; 性质; 葡寡糖

中图分类号: Q 814 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.01.007

Purification and Characterization of a β -1,3-1,4-Glucanase from *Aspergillus awamori* and Its Application in Preparation of Glucooligosaccharides

CHEN Zixian¹, LIU Xueqiang², ZHANG Bin¹, YAN Qiaojuan², JIANG Zhengqiang^{*3}

(1. College of Food Science and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China; 2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 3. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: A β -1,3-1,4-glucanase (AaBglu29) from *Aspergillus awamori* was purified and its application in glucooligosaccharides production from oat bran was studied. The β -1,3-1,4-glucanase was purified to homogeneity by ammonium precipitation and anion-exchange chromatography. The molecular mass of AaBglu29 was estimated to be 30.7×10^3 and 27.6×10^3 by SDS-PAGE and gel filtration, respectively. The AaBglu29 was most active at pH 5.0 and 55 $^{\circ}\text{C}$. The enzyme displayed strict substrate specificity towards barely β -glucan (9,500 U/mg), oat β -glucan (7 950 U/mg) and lichenan (5 980 U/mg). In addition, the enzyme was suitable for production of glucooligosaccharides

收稿日期: 2018-11-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471688)。

* 通信作者: 江正强(1971—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

引用本文: 陈子贤, 刘学强, 张彬, 等. 泡盛曲霉 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的纯化、性质及其用于制备 β -葡寡糖[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(01): 45-52.

(GOS) from oat bran. The highest GOS yield of 90% (based on β -1,3-1,4-glucan in oat bran) was achieved from 5% oat bran after 4 h of enzymatic hydrolysis (100 U/g) at 50 °C and pH 5.0. The properties indicated that AaBglu29 is a promising candidate for application in food and feed fields.

Keywords: *Aspergillus awamori*, β -1,3-1,4-glucanase, purification, characterization, glucoooligosaccharides

β -1,3-1,4-葡聚糖主要存在于谷物胚乳和麸皮的细胞壁中,是由葡萄糖通过 β -1,3 和 β -1,4 混合糖苷键连接而成^[1]。 β -1,3-1,4-葡聚糖可用于生产 β -葡寡糖。 β -葡寡糖具有较好的生理活性,如燕麦 β -葡寡糖对鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhammosus*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 和双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) 等益生菌有较好增殖效果^[2];地衣多糖葡寡糖对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 等有害菌具有较高的抑制活性^[3];还有研究报道 β -葡寡糖具有改善脂代谢和延缓衰老的功能活性^[4]。目前,生物酶解 β -1,3-1,4-葡聚糖是制备 β -葡寡糖的主要方法。

β -1,3-1,4-葡聚糖酶 (EC 3.2.1.73) 又称地衣多糖酶,能专一性水解 β -1,3-1,4-葡聚糖中临近 β -1,3-糖苷键的 β -1,4-糖苷键生成 β -葡寡糖。 β -1,3-1,4-葡聚糖酶在啤酒和饲料工业中具有重要的应用价值^[5]。该酶可降解大麦中 β -葡聚糖,从而降低啤酒黏度,提高过滤速度,提升啤酒生产效率和品质^[6]。该酶添加于饲料中可有效降低动物消化道食糜的黏度,提高饲料利用率,促进动物生长^[7]。

β -1,3-1,4-葡聚糖酶来源广泛,微生物 β -1,3-1,4-葡聚糖酶是报道最多的,其中细菌来源多以芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属为主,如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[8]、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)^[9]、巴伦葛兹类芽孢杆菌 (*Paenibacillus barengoltzii*)^[10]等。真菌来源相对较少,如嗜热拟青霉 (*Paecilomyces thermophila*)^[11]、米黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*)^[12]、樟绒枝霉 (*Malbranchea cinnamomea*)^[13]、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)^[14]、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)^[15] 等报道产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶。目前已有一些真菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶纯化和性质的报道,如:丁叶梅等^[16]从碎囊毛霉 (*Mucor*

petrinsularis) 发酵液中分离纯化了一个 β -1,3-1,4-葡聚糖酶,该酶相对分子质量为 17.2×10^3 ,其最适 pH 和温度分别为 5.5 和 55 °C。Elgharbi 等^[17]从黑曲霉发酵液中分离纯化了一个 β -1,3-1,4-葡聚糖酶,该酶相对分子质量为 3.2×10^4 ,其最适 pH 和温度分别为 5.0 和 60 °C。但目前尚未有泡盛曲霉 β -1,3-1,4-葡聚糖酶纯化和性质的报道。

泡盛曲霉 CAU33 是作者所在研究室筛选的一株高产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的真菌。前期研究优化了泡盛曲霉液体发酵和固体发酵产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的条件,最终发酵酶活力分别可达 8 447 U/mL 和 40 833 U/g^[18-19],但并未研究分离纯化和酶学性质。根据泡盛曲霉的葡聚糖酶酶谱分析表明,该菌在液体发酵时能够分泌一种 β -1,3-1,4-葡聚糖酶 (29 kDa),而固体发酵时可同时分泌 3 种 β -1,3-1,4-葡聚糖酶,其中最主要的是相对分子质量 2.9×10^4 的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶。因此作者主要研究该酶 (AaBglu29) 的纯化和酶学性质。另外,燕麦麸皮作为一种农业废弃物,其 β -1,3-1,4-葡聚糖质量分数可达 5.5%~9.0%^[10],可作为一种优良的葡寡糖制备原料,故进一步考察了 AaBglu29 水解燕麦麸皮制备葡寡糖。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

泡盛曲霉 CAU33: 作者所在实验室筛选并保存;燕麦葡聚糖: 购于武汉百特纯产品;大麦葡聚糖、地衣多糖、桦木木聚糖、CMC、可得然胶、昆布多糖、壳聚糖、槐豆胶和对硝基苯酚化合物 (pNP- β -xylopyranoside, pNP- β -galactopyranoside, pNP- β -glucopyranoside 和 pNP- β -cellobioside): 购于 Sigma 公司;纤维二糖、纤维三糖和纤维四糖购于上海源叶生物公司;低相对分子质量标准蛋白购于日本 Takara 公司;阴离子亲和层析 QSFF 和 DEAE-52 柱料: 购于美国 GE Healthcare 公司;薄层层析 Gel

Plate:购于德国 Merck 产品;其他试剂均为国产分析纯。

LRH-恒温恒湿培养箱:广东省医疗器械厂产品;HZQ-F160 全温振荡培养箱:太仓实验设备厂产品;TU-1900PC 紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器设备有限公司产品;Power Pac Basic™ 型电泳仪 BIO-RAD、GL-20B 高速冷冻离心机:上海安亭科学仪器厂产品;PB21 型 pH 计:德国赛多利斯公司产品;ÄKTA 蛋白纯化系统 美国 GE Healthcare 公司产品;立式圆形压力灭菌锅:上海医用核子仪器厂产品;JJT-900 型洁净工作台:北京半导体设备一厂产品;DK-S24 电热恒温水浴锅:上海精宏实验设备有限公司产品;恒温水浴摇床:金坛市荣华仪器公司产品;Agilent 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪、G7162A 型示差折光检测器:美国 Agilent 公司产品;Shodex Sugar KS-802 色谱柱:日本 Shodex 公司产品。

1.2 泡盛曲霉 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的纯化

将泡盛曲霉液体发酵粗酶液^[18]置于冰水浴中,缓慢搅拌,同时缓慢加入硫酸铵干粉,至粗酶液硫酸铵饱和度达到质量分数 60%,继续搅拌 30 min 后,10 000 g 离心 10 min 收集上清液。向上清液中继续加入硫酸铵,至硫酸铵饱和度至质量分数 80%,10 000 g 离心 10 min 收集沉淀。将沉淀用 20 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液溶解,在相同缓冲体系中 4 ℃透析 4~5 h。将透析好的酶液上样于 QSFF 强阴离子交换柱(20 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液平衡),流量为 1.0 mL/min,用 0~500 mmol/L 的 NaCl 溶液洗脱,收集具有 β -1,3-1,4-葡聚糖酶活性组分。收集部分于 20 mM pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液透析过夜,透析好的酶液上样于 DE52 弱阴离子交换柱(20 mmol/L pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液平衡),用 0~500 mmol/L 的 NaCl 溶液线性洗脱,流量为 1.0 mL/min,收集有活性的组分,最后通过 SDS-PAGE 检测纯化蛋白质的纯度。

1.3 β -1,3-1,4-葡聚糖酶活力及蛋白质浓度的测定

β -1,3-1,4-葡聚糖酶活力测定参照 Yang 等^[11]的方法:添加 50 μ L 质量分数 1%的大麦 β -葡聚糖于小试管中,55 ℃预热 3 min,然后加入 150 μ L 用 50 mmol/L 乙酸-乙酸钠(Acetate)缓冲液(pH 5.0)适当稀释的酶液,55 ℃反应 10 min 后加入 200 μ L DNS 试剂,煮沸 15 min 后加入 200 μ L 质量分数

40%酒石酸钾钠溶液,冷却后于 540 nm 波长下测定吸光值,以葡萄糖作为标准。 β -1,3-1,4-葡聚糖酶活力单位(U)的定义为:在上述条件下每分钟水解大麦 β -葡聚糖生成 1 μ mol 葡萄糖所需要的酶量。

蛋白质浓度的测定按照 Lowry 法进行,以牛血清蛋白(BSA)作为标准蛋白^[20]。

1.4 SDS-PAGE、 β -1,3-1,4-葡聚糖酶酶谱和相对分子质量测定

SDS-PAGE 电泳按照 Laemmli^[21]的方法进行。分离胶质量浓度为 12.5 g/dL,浓缩胶质量浓度为 4.5 g/dL,电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色。 β -1,3-1,4-葡聚糖酶酶谱参照 Yang 等^[13]的方法。

β -1,3-1,4-葡聚糖酶变性和活性状态下的相对分子质量分别采用 SDS-PAGE 和 Sephacryl S-100 HR 凝胶过滤层析法测定。SDS-PAGE 测定方法:以标准蛋白相对分子质量的对数值为纵坐标,迁移率为横坐标,根据目标蛋白的迁移率计算出目标蛋白的相对分子质量。Sephacryl S-100 HR 凝胶层析测定:葡聚糖酶活性状态下的相对分子质量采用 S-100 凝胶过滤法测定。凝胶柱先用乙酸-乙酸钠缓冲液(20 mmol/L, pH 5.0, 0.15 mol/L NaCl)平衡,分别将 2 mg/mL 的标准蛋白和目标蛋白以 0.33 mL/min 的流量过凝胶柱,以洗脱体积 V_e 为横坐标,标准蛋白分别是:细胞色素 C(12.4×10^3),胰凝乳蛋白酶原(25.6×10^3),鸡卵清蛋白(44.3×10^3),牛血清白蛋白(66.5×10^3),磷酸酶 B(97.2×10^3)。

1.5 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的最适 pH 和最适温度

β -1,3-1,4-葡聚糖酶最适 pH 的测定:采用 50 mmol/L pH 2.0~11.0 范围内的不同缓冲液配制质量分数 1%大麦葡聚糖底物,然后在 55 ℃下按标准方法测定 β -1,3-1,4-葡聚糖酶酶活,以最大值为 100%,分别计算各 pH 条件下的相对酶活。缓冲体系包括:Glycine-HCl (pH 2.0~4.0)、McIlvaine (pH 3.0~7.0)、Acetate (pH 4.0~6.0)、 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (pH 6.0~8.0)、CHES (pH 8.0~10.0)、CAPS (pH 10.0~11.0)。

β -1,3-1,4-葡聚糖酶最适温度的测定:采用 50 mmol/L pH 5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液配制质量分数 1%大麦葡聚糖底物,在 30~80 ℃范围内测定 β -1,3-1,4-葡聚糖酶酶活力,以最大值 100%,分别计算各温度下的相对酶活。

1.6 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的底物特异性

用 50 mmol/L pH 5.0 乙酸-乙酸钠缓冲液配制不同的聚糖底物(质量分数%)。于 55 °C 下参照标准方法测定酶活力,以葡聚糖酶对大麦葡聚糖的酶活力为 100%, 分别计算葡聚糖酶对各种底物的比酶活力和相对酶活力。聚糖底物包括:大麦葡聚糖、燕麦葡聚糖、地衣多糖、可得然胶、昆布多糖、CMC、梓木木聚糖、槐豆胶、壳聚糖。另人工合成糖苷类底物 pNP-glycosides: pNP- β -xylopyranoside, pNP- β -glucopyranoside, pNP- β -galactopyranoside 和 pNP- β -cellobioside 用 50 mmol/L pH 5.0 乙酸-乙酸钠缓冲液配制成 5 mmol/L 浓度的底物,55 °C 反应 10 min,测定 410 nm 处的吸光值。酶活力(U)定义为,在上述反应条件下每分钟水解底物释放 1 μ mol pNP 所需要的酶量。

1.7 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的水解特性

最适缓冲体系下,底物质量分数为 1% 的大麦葡聚糖,加酶量为 10 U/mL,50 °C 水浴反应,间隔一定时间取样,沸水 5 min 灭活,之后采用薄层层析法(TLC)分析水解产物。

薄层层析法:硅胶板 Merck Slica Gel 254,展层液为 V(正丁醇):V(乙酸):V(水)=2:1:1 系统,样品点样后将硅胶板用展层剂展开两次,吹干后在其表面均匀用 V(硫酸):V(甲醇)=5:95 溶液浸湿,最后在 150 °C 烘箱中烘烤 3 min 显色。以葡萄糖及纤维寡糖(DP 2-4)的混合物为标准。

1.8 AaBglu29 酶解燕麦麸皮制备葡寡糖

燕麦麸皮中 β -1,3-1,4 葡聚糖含量的测定参照 Megazyme Mixed-linkage β -glucan 含量测定试剂盒。燕麦麸皮内源酶灭活参照 Zhang 等^[10]的方法。以下所提到的燕麦麸皮均为内源酶失活燕麦麸皮。

取 40 目燕麦麸皮 2 g,加 50 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液(50 mmol/L pH 5.0),加酶 200 U/g 底物,于 50 °C 酶解 8 h 后,煮沸 10 min 终止酶解反应,10 000 g 离心 10 min 后取上清液过 0.45 μ m 滤膜备 TLC 和 HPLC 分析。

按照如下顺序依次优化产糖条件:固液质量体积比:1 g:15 mL~1 g:30 mL;酶解温度:45~60 °C;加酶量:50~150 U/g;酶解时间:0~8 h 间于不同时间取样。TLC 分析同 1.7。HPLC 分析:Agilent 高效液相,RID 检测器,色谱条件:色谱柱为 Shodex KS-802,流动相:水,流量:0.8 mL/min,柱温:65 °C,运行时

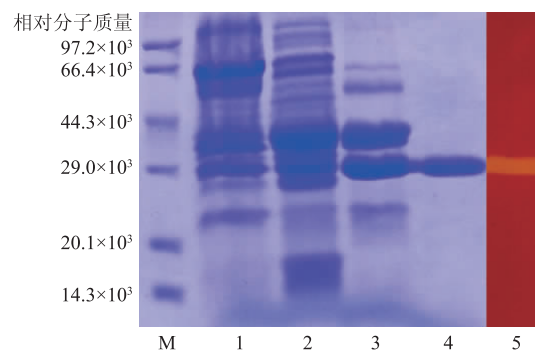
间:20 min。

β -葡寡糖得率: $Y_{GOS}=C_{G2-G4} \times V / 2000 \times 8.9\% \times 100\%$ 式中: C_{G2-G4} 为酶解上清液二糖~四糖的质量浓度,mg/mL; V 为酶解完成后离心上清液体积,mL;2 000 为燕麦麸皮质量,8.9% 为本实验燕麦麸皮中的 β -1,3-1,4 葡聚糖质量分数。

2 结果

2.1 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的纯化

粗酶液经硫酸铵沉淀、QSFF 强阴离子柱和 DEAE-52 弱阴离子柱 3 步交换层析纯化后得到电泳级纯酶(AaBglu29)(图 1)。纯化过程中酶活力回收率为 13.9%,纯化倍数为 6.6,比酶活由 1 432 U/mg 提高到 9 500 U/mg(表 1)。SDS-PAGE 法测定的酶相对分子质量为 30.7×10^3 ,Sephacryl-100 凝胶层析方法测定的酶相对分子质量为 27.6×10^3 ,表明该酶为单亚基蛋白。



M: 低相对分子质量标准蛋白;1:粗酶液;2:硫酸铵沉淀;3:QSFF(pH 7.0);4:DE52(pH 7.0);5: β -1,3-1,4-葡聚糖酶图谱
图 1 泡盛曲霉 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(AaBglu29)的纯化电泳图

Fig. 1 Purification of the β -1,3-1,4-glucanase from *Aspergillus awamori*

2.2 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的最适 pH 和最适温度

在不同 pH 下测定酶活力,AaBglu29 的最适 pH 为 5.0,在 pH 3-8 之间时,酶活力残留 50% 以上(图 2a)。AaBglu29 的最适温度为 55 °C,当反应温度为 30-65 °C 时, β -1,3-1,4-葡聚糖酶残余酶活力在 50% 以上(图 2(b))。

2.3 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的底物特异性

如表 2 所示,AaBglu29 对大麦葡聚糖的比酶活力最高(9 500 U/mg),其次是燕麦葡聚糖(7 950 U/mg),最后是地衣多糖(5 180 U/mg)。该酶对 CMC、

表 1 泡盛曲霉 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(AaBglu29)的纯化表
Table 1 Purification of the β -1,3-1,4-glucanase from *Aspergillus awamori*

纯化步骤	总酶活力/U	总蛋白质质量/mg	比酶活力/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗酶	2 887 290	2 016	1 432	1	100
硫酸铵沉淀	2 143 530	918	2 335	1.6	74
QSFF	500 371	71.4	7 008	4.9	17.3
DEAE-52	401 850	42.3	9 500	6.6	13.9

注:酶活力测定条件:pH 5.0,55 $^{\circ}\text{C}$

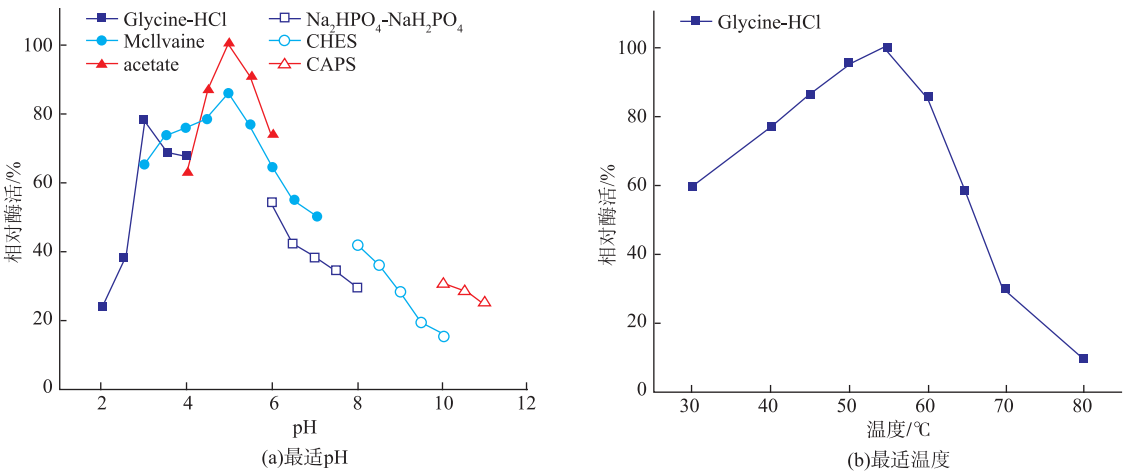


图 2 AaBglu29 的最适 pH 和最适温度

Fig. 2 Optimal pH and temperature of AaBglu29

桦木木聚糖、可得然胶、昆布多糖、槐豆胶、壳聚糖和人工合成糖苷底物均没有表现出活性,说明该酶底物特异性专一。

表 2 泡盛曲霉 AaBglu29 底物特异性

Table 2 Substrate specificity of the purified AaBglu29

底物种类	比酶活/(U/mg)	相对酶活力/%
大麦葡聚糖	9 500	100
燕麦葡聚糖	7 950	83.7
地衣多糖	5 980	62.9

注:酶活力测定条件:pH 5.0,55 $^{\circ}\text{C}$

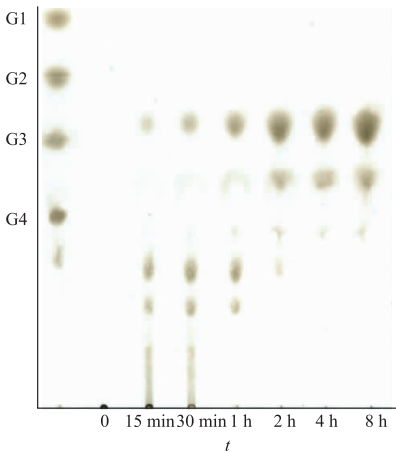
2.4 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的水解特性

AaBglu29 水解大麦葡聚糖的前期产物是聚合度 5 以上的葡寡糖和少量的葡三糖,随着水解时间的延长,聚合度 5 以上的葡寡糖转化为葡三糖和葡四糖,最终水解产物主要是葡三糖和葡四糖(图 3)。

2.5 AaBglu29 水解燕麦麸皮制备葡寡糖

燕麦麸皮中通常含有质量分数 5.5%~9.0%的 β -1,3-1,4-葡聚糖,但不同地区产地的含量略有差异。燕麦麸皮含有质量分数 8.7%的 β -1,3-1,4-葡聚糖,经内源酶灭活预处理后,其 β -1,3-1,4-葡聚

糖质量分数为 8.9%。



注:G:葡萄糖 G2:纤维二糖 G3:纤维三糖 G4:纤维四糖

图 3 AaBglu29 水解大麦葡聚糖 TLC 图

Fig. 3 TLC analysis of the hydrolytic products of barley β -glucan by AaBglu29

内源酶失活前后的燕麦麸皮经 β -1,3-1,4-葡聚糖酶水解 8 h 后,水解产物均主要为葡三糖和葡四糖,但葡寡糖转化率有较大差别,水解燕麦麸皮

葡寡糖转化率为 70%, 水解内源酶失活后的燕麦麸皮葡寡糖转化率达 90%。故以下所提到的燕麦麸皮均为内源酶失活燕麦麸皮。

首先考察不同燕麦麸皮底物质量浓度对制备葡寡糖的影响(图 4(a))。固液质量体积比为 1 g:15 mL 时, 葡寡糖转化率为 80%, 提高固液质量体积比至 1 g:20 mL 时, 葡寡糖转化率(90%)达到最高, 再提高固液质量体积比对葡寡糖转化率影响不大。其次研究水解温度对制备葡寡糖的影响(图 4(b))。水解温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 时, 葡寡糖转化率最高, 水解温度高于 55 $^{\circ}\text{C}$, 葡寡糖转化率则出现明显下降。加酶量对

制备葡寡糖的影响如图 4(c)所示。加酶量为 50 U/g 底物时, 葡寡糖转化率为 75%, 提高至 100 U/g 底物时, 葡寡糖转化率为 90%, 再提高加酶量, 则对葡寡糖转化率影响不大。

在最优水解条件基础上, 考察了 AaBglu29 水解燕麦麸皮制备葡寡糖的水解历程(图 5)。随着水解时间的增加, 葡三糖和葡四糖得率不断提高, 当酶解时间为 4 h 时, 葡寡糖转化率达到最高(90%), 此时葡三糖和葡四糖的得率分别为 53.3% 和 33.8%。酶解时间继续增至 8 h 时, 葡寡糖转化率不再变化。

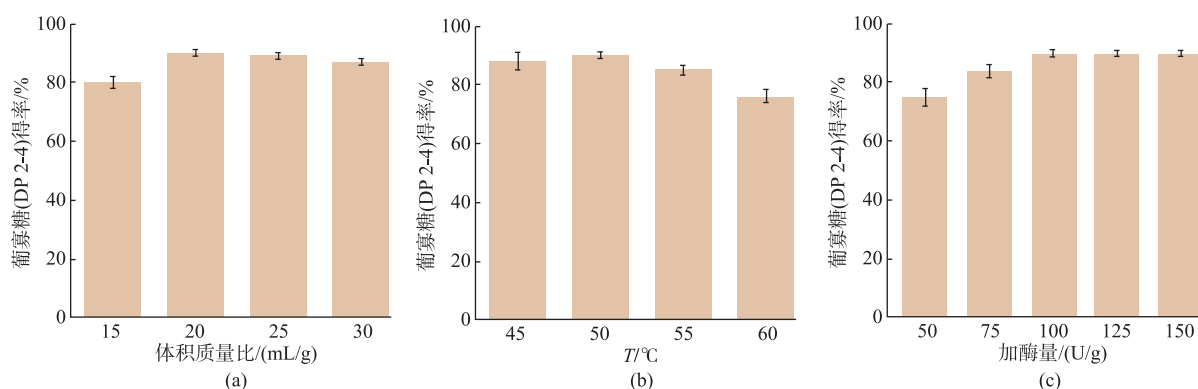


图 4 AaBglu29 酶解燕麦麸皮制备葡寡糖条件优化

Fig. 4 Optimization of conditions for production of glucooligosaccharides from oat bran by AaBglu29

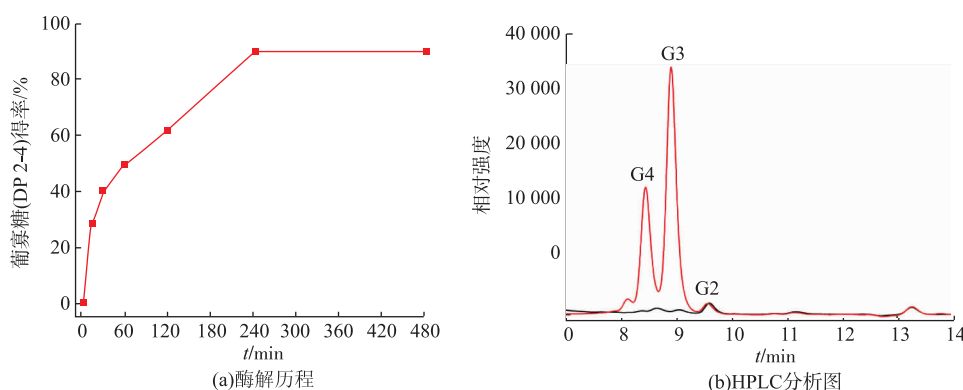


图 5 AaBglu29 酶解燕麦麸皮产葡寡糖酶解历程及 HPLC 分析图

Fig. 5 Time course profile of glucooligosaccharides production from oat bran by AaBglu29

3 讨论

β -1,3-1,4-葡聚糖酶在食品和饲料等领域具有广泛的应用并受到很多研究者的关注^[5]。目前, 已经有很多细菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的纯化和性质报道, 但真菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶报道较少^[5]。作

者从泡盛曲霉液体发酵液中分离纯化出一个酸性 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(AaBglu29), 并对其酶学性质和应用进行了研究。

粗酶液经 3 步纯化得到电泳级纯酶, 比酶活(9 500 U/mg) 高于绝大多数微生物 β -1,3-1,4-葡聚糖酶, 如来源于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* LC-

9,3 502 U/mg)^[8]、甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus* 363.55 U/mg)^[22]、巴伦葛兹类芽孢杆菌(*Paenibacillus barengoltzii* 431 U/mg)^[10]、碎囊毛霉(*Mucor petrsularis* 225.02 U/mg)^[16]、樟绒枝霉(*Malbranchea cinnamomea* 52.7 U/mg)^[13]和嗜热拟青霉(*Paecilomyces thermophila* 6 241.6 U/mg)^[11]的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶,但低于黑曲霉(*Aspergillus niger* 12 450.6 U/mg)^[14]、嗜热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus* 13 527 U/mg)^[23]和米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei* 28 818 U/mg)^[12]的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶。AaBglu29的相对分子质量为 29×10^3 ,低于多数真菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶,如:嗜热拟青霉(38.6×10^3)^[11]、米黑根毛霉(35.4×10^3)^[12]、樟绒枝霉(44.7×10^3)^[13]和黑曲霉(52×10^3)^[14]来源的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶,但高于碎囊毛霉(17.2×10^3)的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶^[16]。

一般说来,酸性和耐热性的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶更加适合应用于啤酒酿造和饲料加工工业中^[5]。但已报道的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的最适pH大多处在中性范围内(pH 6.5~7.5),如碎囊毛霉(pH 6.0)^[16]、嗜热子囊菌(pH 6.0)^[23]、枯草芽孢杆菌(pH 6.5)^[8]、嗜热拟青霉(pH 7.0)^[11]和甲基营养型芽孢杆菌(7.5)^[22]的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶,均高于本研究的AaBglu29(pH 5.0)。另外,樟绒枝霉 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的最适pH为10.0,是目前真菌来源报道中最为耐碱的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶^[13]。AaBglu29的最适温度为55℃,高于碎囊毛霉(40℃)^[16]和枯草芽孢杆菌(45℃)^[8]的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶,与樟绒枝霉^[13]、甲基营养型芽孢杆菌^[22]和巴伦葛兹类芽孢杆菌^[10]的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(55℃)相同,但低于少数嗜热真菌的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(嗜热拟青霉70℃和嗜热子囊菌75℃)^[11,23]。AaBglu29对 β -1,3-1,4-葡聚糖表现出严格的底物专一性,与嗜热拟青霉^[11]、樟绒枝霉^[13]、碎囊毛霉^[16]和枯草芽孢杆菌^[8]的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶是相似的。但也有一些 β -1,3-1,4-葡聚糖酶表现出较宽泛的底物特异性,

如米黑根毛霉的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶不仅对 β -1,3-1,4-葡聚糖表现出活力,还对昆布多糖(β -1,3-葡聚糖)表现出较高酶活力^[12]。黑曲霉和甲基营养型芽孢杆菌的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶不仅对 β -1,3-1,4-葡聚糖表现酶活力,还对羧甲基纤维素钠(β -1,4-葡聚糖)呈现酶活力^[14,22]。AaBglu29水解大麦葡聚糖的产物为葡三糖和葡四糖,与樟绒枝霉^[13]、米黑根毛霉^[12]和枯草芽孢杆菌^[8]的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶相似,但与嗜热拟青霉(葡二糖和葡三糖)^[11]和嗜热子囊菌(葡二糖和葡三糖)^[23]的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶不同。综合比较而言,AaBglu29在食品和饲料领域具有很大的工业应用潜力。

燕麦麸皮作为一种 β -1,3-1,4-葡聚糖含量丰富的农业废弃物,其利用价值较大。目前国内外研究大多集中于寻找从中提取 β -1,3-1,4-葡聚糖的廉价、高效且环保的方法^[23]。但随着 β -葡寡糖越来越多的功能活性报道^[2-4],利用燕麦麸皮制备葡寡糖的研究受到一些研究者的关注。如:Zhang等^[10]利用巴伦葛兹类芽孢杆菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶水解燕麦麸皮制备以葡三糖和葡四糖为主的葡寡糖,转化率为77.2%。Yan等^[23]利用嗜热子囊菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶水解燕麦麸皮制备以葡二糖、葡三糖和葡四糖为主的葡寡糖,转化率为47.1%。作者利用AaBglu29水解燕麦麸皮制备葡寡糖,经优化 β -1,3-1,4-葡聚糖转化率达90%,终产物为葡三糖和葡四糖。因此,AaBglu29在制备葡寡糖工业中具有较大的应用潜力。

4 结 语

泡盛曲霉液体发酵液经硫酸铵沉淀和两步阴离子交换层析纯化后,可得到一个比酶活为9 500 U/mg的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(AaBglu29)。该酶最适pH和最适温度分别为5.0和55℃,其底物特异性专一,高效水解燕麦麸皮90%的 β -1,3-1,4-葡聚糖转化为葡寡糖。该酶优良的酶学性质说明其工业应用潜力较大。

参考文献:

- [1] YOO D, LEE B, CHANG P, et al. Improved quantitative analysis of oligosaccharides from lichenase-hydrolyzed water-soluble barley beta-glucans by high-performance anion-exchange chromatography [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(5): 1656-1662.
- [2] JASKARI J, KONTULA P, SIITONEN A, et al. Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium*

- and *Lactobacillus* strains[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1998, 49(2): 175-181.
- [3] CHAARI F, BELGHITH-FENDRI L, ELLOUZ-CHAABOUNI S. Production and in vitro evaluation of oligosaccharides generated from lichenan using immobilized *Penicillium occitanis* lichenase [J]. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, 2015, 116: 153-158.
- [4] BODE L. Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond[J]. **Nutrition Reviews**, 2009, 67(11): S183-S191.
- [5] GOLDENKOVA-PAVLOVA I V, TYURIN A D, MUSTAFAEV O N. The features that distinguish lichenases from other polysaccharide-hydrolyzing enzymes and the relevance of lichenases for biotechnological applications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018, 102(9): 3951-3965.
- [6] BI Jing. Application of β -glucanase in beer production[J]. **China Brewing**, 2011(9): 105-106. (in Chinese)
- [7] FERNANDES V O, COSTA M, RIBEIRO T, et al. 1,3-1,4-beta-Glucanases and not 1,4-beta-glucanases improve the nutritive value of barley-based diets for broilers[J]. **Animal Feed Science and Technology**, 2016, 211: 153-163.
- [8] Juanjuan, WU Bin, HE Bingfang. Enzymatic and catalytic properties of β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* LC-9[J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, 2012(27): 13243-13246. (in Chinese)
- [9] GAO Z. Purification and characterization of a novel lichenase from *Bacillus licheniformis* GZ-2 [J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2016, 63(2): 249-256.
- [10] ZHANG B, LIU Y, YANG H, et al. Biochemical properties and application of a novel β -1,3-1,4-glucanase from *Paenibacillus barengoltzii*[J]. **Food Chemistry**, 2017, 234: 68-75.
- [11] YANG S, YAN Q, JIANG Z, et al. Biochemical characterization of a novel thermostable β -1,3-1,4-glucanase (Lichenase) from *Paecilomyces thermophila*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2008, 56(13): 5345-5351.
- [12] TANG Y, YANG S, YAN Q, et al. Purification and characterization of a novel β -1,3-1,4-glucanase (Lichenase) from thermophilic *Rhizomucor miehei* with high specific activity and its gene sequence [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012, 60(9): 2354-2361.
- [13] YANG S, XIONG H, YAN Q, et al. Purification and characterization of a novel alkaline β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea* [J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2014, 41(10): 1487-1495.
- [14] HAN Bing, WANG Shilan, DE Qingmeiduo, et al. Gene cloning, expression and characterization analysis of a highly thermal stable β -glucanase gene from *Aspergillus niger*[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2018: 1-11. (in Chinese)
- [15] LIU Lu, CHEN Zhou, CHEN Yaoyao, et al. Optimization of fermentation conditions for β -1,3-1,4-glucanase production by *Aspergillus flavus*[J]. **Journal of Food Science and Technology**, 2018: 1-10. (in Chinese)
- [16] DING Yemei, YUN Jianmin, WEI Long, et al. Purification and enzymatic properties of β -1,3-1,4-glucanase produced by *Mucor petriularis*[J]. **Food Science**, 2014, 35(11): 143-148. (in Chinese)
- [17] ELGHARBI F, HMIDA-SAYARI A, SAHNOUN M, et al. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lichenase from *Aspergillus niger* US368[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2013, 98(1): 967-975.
- [18] LIU Erwei, YANG Shaoqing, YAN Qiaojuan, et al. Optimization of liquid-state fermentation conditions for β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) production by *Aspergillus awamori*[J]. **Food Science**, 2017, 38(16): 29-35. (in Chinese)
- [19] LIU Erwei, LIU Xueqiang, YANG Shaoqing, et al. Optimization of fermentation conditions for β -1,3-1,4-glucanase production from *Aspergillus awamori* CAU33 by solid state fermentation[J]. **Biotechnology & Business**, 2018(3): 80-86. (in Chinese)
- [20] 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.
- [21] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4[J]. **Nature**, 1970, 227(5259): 680.
- [22] NIU Q, ZHANG G, ZHANG L, et al. Purification and characterization of a thermophilic 1,3-1,4-beta-glucanase from *Bacillus methylotrophicus* S2 isolated from booklice[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2016, 121(5): 503-508.
- [23] YAN Q, YANG H, JIANG Z, et al. A novel thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Thermoascus aurantiacus* and its application in oligosaccharide production from oat bran[J]. **Carbohydrate Research**, 2018, 469: 31-37.