

## 黑曲霉(*Aspergillus niger*)纤维素酶系中 内切 $\beta$ -葡聚糖酶性质的研究

王 沁

赵学慧

(厦门大学生物系, 厦门 361005) (华中农业大学食品科学系, 武汉 430070)

对黑曲霉菌株 W 25 纤维素酶系中内切 $\beta$ -葡聚糖酶组分(I-2a、I-2b、I-2c、I-2d、I a、I b、I a)的性质进行了研究。I-2a、I-2b、I-2c、I-2d、I a、I b 和 I a 的最适 pH 分别为 5.5、5.5、5.0、5.5、5.0、5.5 和 5.5; 均在 pH2.0—7.0 之间稳定; 最适温度分别为 50、50、55、55、55 和 60 $^{\circ}$ C; 保温 1 小时的半失活温度  $t_{1/2}$  分别为 49、61、63、52、57、47 和 67 $^{\circ}$ C。SDS-凝胶电泳法测得 I-2a、I-2b、I-2c、I-2d、I a、I b 和 I a 的分子量分别为 53 000、48 000、57 000、60 000、44 500、48 000 和 34 000。聚丙烯酰胺等电聚焦法测得其等电点分别为 5.5、5.3、5.0、4.8、5.8、5.1 和 4.1。比较它们对羧甲基纤维素钠(CMC-Na)的糖化力及液化力表明, 在作用方式的随机性上 I-2b>I a>I-2a>I-2c>I a>I-2d>I b。在所测定的化学试剂中,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$  和  $\text{Hg}^{2+}$  对酶均有较强的抑制作用。

关键词 黑曲霉; 内切 $\beta$ -葡聚糖酶; 性质

内切 $\beta$ -葡聚糖酶(Endo  $\beta$ -1,4-glucanase, EC. 3.2.1.4)为一类以内切方式水解纤维素分子中 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键的酶, 其水解产物主要为纤维二糖与寡聚葡萄糖及少量葡萄糖。该酶广泛存在于各种微生物中, 对于降解自然界大量存在的纤维素起着重要作用<sup>[1,2]</sup>。但目前对内切 $\beta$ -葡聚糖酶的研究大多不够深入, 且多以木霉纤维素酶为材料<sup>[3-5]</sup>, 对其它来源的酶研究较少。为了深入了解微生物来源的葡聚糖酶的性质、作用机制及可能的应用价值, 我们从黑曲霉中提纯到七个凝胶电泳均一的内切 $\beta$ -葡聚糖酶, 对其性质进行了较为深入的研究。本文报道这些酶的基本性质。

### 材料和方法

#### (一) 酶的来源

从黑曲霉菌株 W 25 获得的粗酶制剂, 通过 Sephadex G-100 凝胶过滤及 DEAE-Sephadex A-25(A-50) 离子交换层析后, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一带的七种内切 $\beta$ -葡聚糖酶(EG)组分<sup>[6]</sup>, I-2a、I-2b、I-2c、I-2d、I a、I b、I a, 脱盐冷冻干燥后作为实验材料。

#### (二) 测定方法

1. 还原糖用 DNS 法<sup>[7]</sup>测定。
2. 酶活力测定: 内切 $\beta$ -葡聚糖酶糖化力的测定见参考文献[8]; 用奥氏粘度计测定液

化力,取 1ml 酶液与 5ml 0.5% CMC-Na(溶在 0.1mol/L pH4.6 乙酸缓冲液中)45 C 保温 5 分钟,以反应液流经毛细管所需时间(秒)表示内切  $\beta$ -葡聚糖酶的液化力。

3. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):按 Weber-Osborn 法<sup>[9]</sup>测定,凝胶浓度 10%,电极缓冲液为 pH8.3,0.05mol/L Tris-氨基乙酸缓冲液。

4. 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳:按文献[10]进行,等电聚焦电泳使用 pH3.5—10.0 的 Ampholine 作两性载体。

## 结果和讨论

### (一) 酶的最适 pH

在不同 pH 的 0.1mol/L 乙酸缓冲液中分别测定 I-2a、I-2b、I-2c、I-2d、I a、I b 和 I a 的酶活,它们的最适 pH 分别为 5.5、5.5、5.0、5.5、5.0、5.5 和 5.5(表 1)。

表 1 pH 对内切  $\beta$ -葡聚糖酶活力的影响  
Table 1 Effect of pH on endo- $\beta$ -glucanase activity

相对酶活 (%) Relative activity	EG 组分 EG component						
	I-2a	I-2b	I-2c	I-2d	I a	I b	I a
pH							
2.5	60.6	80.7	59.2	40.3	84.1	60.7	76.3
3.0	71.4	88.9	67.3	60.1	88.2	77.8	81.4
3.5	89.5	89.3	72.4	70.3	89.1	80.1	89.3
4.0	91.7	90.1	90.9	84.2	89.3	88.2	91.9
4.5	95.6	93.2	98.4	90.1	90.2	90.7	97.1
5.0	98.2	99.2	100.0	97.3	92.7	96.1	100.0
5.5	100.0	100.0	96.7	100.0	100.0	100.0	90.1
6.0	92.3	99.5	83.6	97.2	98.3	92.1	82.1
6.5	81.3	91.3	80.2	90.2	90.7	90.3	70.2
7.0	64.3	82.3	70.4	80.2	74.3	62.1	59.3
7.5	28.3	60.1	43.2	59.1	40.3	20.6	31.3

### (二) 酶的最适温度

分别在不同温度下测定上述内切  $\beta$ -葡聚糖酶的活力。I-2a、I-2b、I-2c、I-2d、I a、I b 和 I a 的最适温度分别为 50、50、55、55、55、55 和 60 C (表 2)。

### (三) 酶在不同 pH 的稳定性

将酶液于不同 pH 的 0.01mol/L 乙酸缓冲液中,25 C 下放置 12 小时,然后将 pH 调回各组分的最适反应 pH。按常法测活力。七种酶组分的稳定 pH 范围均为 2.0—7.0(表 3)。

表2 温度对内切 $\beta$ -葡聚糖酶活性的影响Table 2 Effect of temperature on endo- $\beta$ -glucanase activity

相对酶活 (%) Relative activity	EG 组分 EG component						
	1-2a	1-2b	1-2c	1-2d	I a	I b	II a
温度 Temp. (C)							
40	84.1	88.6	80.3	82.1	84.3	86.6	80.4
45	87.4	96.3	92.4	90.1	90.6	89.4	82.3
50	100.0	100.0	98.2	97.3	99.1	98.6	92.8
55	99.1	98.4	100.0	100.0	100.0	100.0	99.7
60	90.3	90.6	96.3	97.2	94.4	95.6	100.0
65	82.1	80.3	82.3	84.5	80.7	80.6	92.3
70	78.1	70.3	72.6	69.3	71.2	77.4	78.4

表3 内切 $\beta$ -葡聚糖酶在不同 pH 的稳定性Table 3 Stability of endo- $\beta$ -glucanase on different pH

相对酶活 (%) Relative activity	EG 组分 EG component						
	1-2a	1-2b	1-2c	1-2d	I a	I b	II a
pH							
2.0	90.9	85.2	88.3	86.6	82.7	91.6	92.3
3.0	95.2	92.3	96.3	93.4	90.6	95.4	99.3
4.0	99.1	98.7	100.0	98.4	97.3	99.6	100.0
5.0	100.0	100.0	97.2	100.0	100.0	100.0	98.2
6.0	94.5	93.2	91.6	95.4	94.3	95.6	90.1
7.0	81.4	80.2	83.1	84.3	80.6	82.7	79.3
8.0	42.7	56.8	60.3	59.2	43.4	40.7	36.7
9.0	22.4	19.6	34.8	40.3	17.2	15.3	8.64

#### (四) 酶的热稳定性

将酶液分别于 30—80°C 保温 1 小时,立即冰浴,然后按常法测剩余活力。将剩余活力对温度作图,并以剩余活力为 50% 时的温度作为半失活温度( $t_{1/2}$ ),则 I-2a、I-2b、I-2c、I-2d、I a、I b 和 II a 的  $t_{1/2}$  分别为 49、61、63、52、57、47 和 67°C (图 1)。

从以上结果可以看到,内切 $\beta$ -葡聚糖酶各组分的最佳 pH 均在 5.0—5.5 左右,其稳定 pH 却在 2.0—7.0,即酶反应的最佳 pH 在酶的稳定 pH 范围内,虽然酶的最佳 pH 与稳定的 pH 范围是酶两种不同性质,但二者之间存在着内在联系,只有在酶稳定的 pH 范围内,酶才能发挥其最大的催化作用。另外,黑曲霉在生长过程中产酸较多,其合成的酶也应在较酸性的环境下稳定,并在偏酸的环境中发挥最大的催化功能。从酶的最佳反应温度和热稳定性结果可以看出两者之间存在着一定的相关性,II a 在七种组分中具有较高的热稳定性,同时又具有较高的最佳反应温度。据报道<sup>[3,11]</sup>,大多数微生物来源的内切 $\beta$ -葡聚糖酶的最佳 pH 和 pH 稳定范围、最佳温度与热稳定温度基本上一致。

(五) 酶的抑制与激活

将酶液与终浓度为 1mmol/L (SDS 为 10mmol/L, 脲为 15mmol/L) 的各种化学试剂于 25℃ 保温 1 小时, 再按常法测活力(表 4)。Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup> 和 Fe<sup>2+</sup> 对酶的各组分都有明显的激活作用; Cu<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup> 和 Hg<sup>2+</sup> 对酶组分均有强烈的抑制作用; Sn<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup> 及 EDTA 对酶组分也有明显的抑制作用; K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup> 和 Cd<sup>2+</sup> 对酶组分无明显影响; SDS 和脲对酶组分有明显的抑制作用。

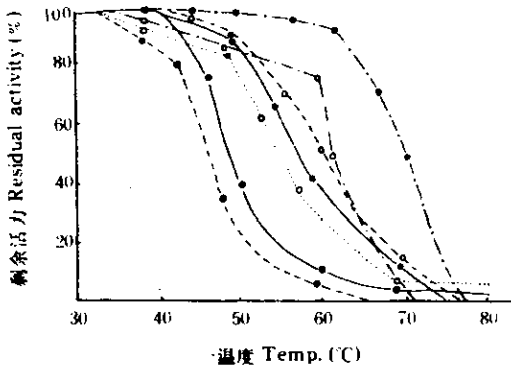


图 1 内切β-葡聚糖酶的热稳定性

Fig. 1 Heat stability of endo-β-glucanase

●- - -○ I-2a; ●- - -● I-2b; ●- - -● I-2c; ●- - -● I-2d;  
●- - -● Ia; ●- - -● Ib; ●- - -● IIa

表 4 各种化学试剂对酶活力的影响

Table 4 Effect of various chemicals on enzyme activity

相对酶活 (%) Relative activity	EG 组分 EG component						
	I-2a	I-2b	I-2c	I-2d	Ia	Ib	IIa
化学试剂 Chemicals							
CK	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
MnCl <sub>2</sub>	153.0	167.7	154.2	132.0	109.7	160.8	152.4
CoSO <sub>4</sub>	116.7	123.1	144.5	112.2	110.6	115.2	132.0
FeSO <sub>4</sub>	99.8	112.0	113.4	109.2	110.2	120.3	107.8
KCl	115.1	99.1	93.1	100.0	99.8	91.2	90.3
NaCl	95.3	93.2	101.0	94.2	92.6	93.2	101.1
ZnSO <sub>4</sub>	98.9	97.8	96.2	103.2	100.0	99.1	97.8
CaCl <sub>2</sub>	97.7	99.1	90.2	96.3	94.2	95.1	90.3
PbAc <sub>3</sub>	79.6	92.1	99.3	90.2	89.1	91.2	94.5
CdSO <sub>4</sub>	95.6	89.7	92.4	95.7	77.2	78.9	101.0
BaCl <sub>2</sub>	82.3	77.6	79.3	72.6	74.8	69.4	62.2
FeCl <sub>3</sub>	72.4	70.9	80.2	77.3	74.1	72.5	75.6
SnCl <sub>2</sub>	32.9	70.8	65.2	54.3	66.6	70.9	53.2
AlCl <sub>3</sub>	67.8	53.1	54.3	42.6	60.1	62.3	66.7
HgCl <sub>2</sub>	34.8	18.0	19.2	0	0	14.8	0.6
AgNO <sub>3</sub>	0.1	3.4	7.6	2.7	2.4	9.8	4.2
CuSO <sub>4</sub>	12.1	0	0.6	0	0	0	0
EDTA	70.9	64.2	59.3	72.1	94.3	70.2	77.1
SDS	64.3	54.2	74.1	72.3	80.3	84.2	88.2
Urea	89.5	65.5	70.8	78.4	86.6	101.3	90.8

(六) 酶的底物特异性及其对 CMC-Na 的作用方式

由表 5 可见, 酶各组分均不能水解天然纤维素棉花, 但可不同程度的水解其它几种不

溶性纤维素(纤维素粉、滤纸及磷酸膨胀纤维素)。

表 5 各组分的底物特异性

Table 5 Substrate specificities of various component

底物 Substrate	还原糖( $\mu\text{g}$ ) Reducing sugar						
	I-2a	I-2b	I-2c	I-2d	I a	I b	I a
脱脂棉花 Absorbent cotton	0	0	0	0	0	0	0
纤维素粉 Cellulose powder	7.2	4.4	1.2	0.9	10.7	12.8	0
滤纸 Filter paper	7.3	5.4	2.3	1.2	14.6	16.9	1.0
磷酸膨胀纤维素 Phosphoric acid swollen cellulose	11.2	9.3	5.2	1.2	20.1	17.8	3.2

分别测定各酶组分对 CMC-Na 的糖化力和液化力; 并计算产生单位还原糖相应的粘度变化来表示它们对 CMC-Na 作用方式的随机性(表 6)。可见, 在作用方式的随机性方面,  $I-2b > I a > I-2a > I-2c > I a > I-2d > I b$ 。

表 6 酶对 CMC-Na 的糖化力和液化力

Table 6 Saccharifying and liquifying power of endo- $\beta$ -glucanase to CMC-Na

活力 Activity EG 组分 EG component	糖化力( $\text{OD}_{530\text{nm}}$ ) Saccharifying power		液化力(sec) Liquifying power		粘度变化/还原糖 Viscosity change/ Reducing sugar
	0	5 min	0	5 min	
I-2a	0	0.49	120	42	85.7
I-2b	0	0.52	120	114	276.5
I-2c	0	0.47	120	40	85.1
I-2d	0	0.68	120	39	57.3
I a	0	0.87	120	93	106.9
I b	0	0.96	120	35	36.4
I a	0	0.44	120	33	75.0

### (七) 酶的分子量

用 Weber-Osborn SDS-PAGE 法测定。电泳后, 根据标准样品的  $R_m$  值及分子量绘出标准曲线, 据此由待测样品的  $R_m$  值求出其分子量。I-2a、I-2b、I-2c、I-2d、I a、I b 和 I a 的分子量分别为 53 000、48 000、57 000、60 000、44 500、48 000 和 34 000(图 2)。

### (八) 酶的等电点

由聚焦后酶蛋白在凝胶上的位置, 绘出 pH-距离曲线。从图 3 查得 I-2a、I-2b、I-2c、I-2d、I a、I b 和 I a 的等电点分别为 5.5、5.3、5.0、4.8、5.8、5.1 和 4.1。

### (九) 酶的紫外吸收光谱

样品溶在 pH5.0, 0.02mol/L 乙酸缓冲液中, 用岛津 UV-265 型紫外光谱仪测定。I-2a、I-2b、I-2c、I-2d、I a、I b 和 I a 分别在 279、277、280、281、279、275 和 277nm 处显示最大吸收峰, 而在 250、248、252、254、251、249 和 247nm 处显示低谷, 均为典型蛋

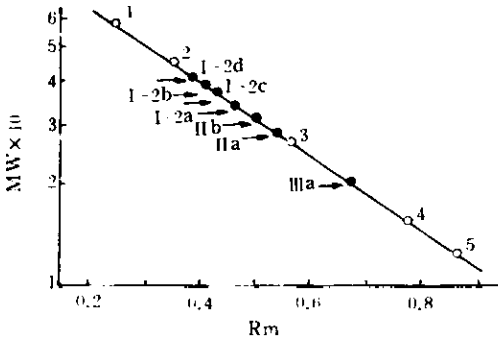


图2 SDS-PAGE 法测定内切β-葡聚糖酶分子量

Fig. 2 Determination of molecular weights of endo-β-glucanase by SDS-PAGE

1. 磷酸化酶 a Phosphorylase a (94 000);
2. 牛血清蛋白 Albumin (67 000);
3. 卵清蛋白 Ovalbumin 43 000;
4. 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase (30 000);
5. TMV 外壳蛋白 Outside shell protein of TMV 17 500

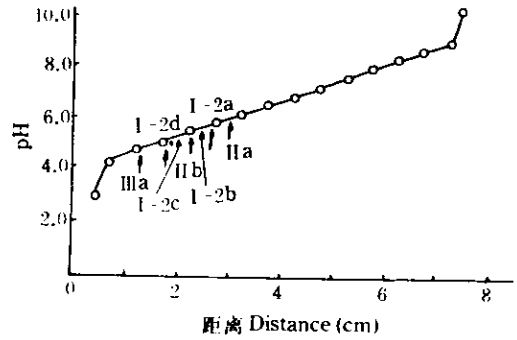


图3 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦法测定酶的等电点

Fig. 3 Determination of isoelectric point of endo-β-glucanase by PAGIF

白质吸收峰。由其在 280nm 处的吸收度计算它们的  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  分别为 21.4、13.2、16.7、14.4、27.3、10.2 和 20.5。

### 参 考 文 献

[1] Lachke, A. H.; *Microbiol. Rev.*, **54**(3):177-194, 1988.

[2] Maria, H. et al.; *Enzyme Microb. Technol.*, **10**:509-517, 1988.

[3] Ng, Tk. et al.; *Appl. Env. Microb.*, **42**:231-240, 1981.

[4] Saddler, J. N.; *Microbiol. Sciences*, **3**(3):84-87, 1986.

[5] Schurz, J.; *Holzforchung*, **40**(4):225-232, 1986.

[6] 王 沁, 赵学慧; *微生物学通报*, **20**(1):13-15, 1993.

[7] 张龙翔等; *生化实验方法和技术*, 第 9 页, 人民教育出版社, 北京, 1982 年.

[8] Selby, K.; *Adv. Chem. Ser.*, **95**:34-39, 1969.

[9] Webwe, K. and M. Osborn; *J. Biol. Chem.*, **244**:4406-4412, 1969.

[10] 莽克强等; *聚丙烯酰胺凝胶电泳*, 第 33 页, 科学出版社, 北京, 1975 年.

[11] Centaro, O.; *Agric. Biol. Chem.*, **49**(5):1257-1265, 1985.

## STUDIES ON PROPERTIES OF ENDO- $\beta$ -GLUCANASE FROM *ASPERGILLUS NIGER*

Wang Qin

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Zhao Xuehui

(Department of Food Science, Hua Zhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Some properties of endo- $\beta$ -glucanase (I-2a, I-2b, I-2c, I-2d, Ia, Ib, IIIa) from *Aspergillus niger* W25 have been studied. I-2a, I-2b, I-2c, I-2d, Ia, Ib, IIIa showed optimal activity at pH 5.5, 5.5, 5.0, 5.5, 5.0, 5.5, 5.5 and 5.0, 5.0, 5.5, 60°C, respectively. I-2a, I-2b, I-2c, I-2d, Ia, Ib and IIIa were stable in the pH range 2.0-7.0. The temperature for loss half activity ( $t_{1/2}$ ) in 1hr were: I-2a, 49°C; I-2b, 61°C; I-2c, 63°C; I-2d, 52°C; Ia, 57°C; Ib, 47°C; IIIa, 67°C. The molecular weights of I-2a, I-2b, I-2c, I-2d, Ia, Ib and IIIa were 53 000, 48 000, 57 000, 60 000, 44 500, 48 000 and 34 000 as estimated by SDS gel electrophoresis and their isoelectric points were 5.5, 5.3, 5.0, 4.8, 5.8, 5.1 and 4.1 as estimated by polyacrylamide gel isoelectric focusing. The order in randomness of the hydrolysis of sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na), expressed as the ratio between the decrease in viscosity of CMC-Na and increase in reducing sugar was I-2b > Ia > I-2a > I-2c > IIIa > I-2d > Ib.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Hg}^{2+}$  ion showed potent inhibitory effect on I-2a, I-2b, I-2c, I-2d, Ia, Ib, IIIa.

**Key words** *Aspergillus niger*; Endo- $\beta$ -glucanases; Properties