

Armillariella tabescens EJLY2098 β -甘露聚糖酶 *atMAN47* 的纯化及酶学性质分析

何艳喜 宋影 曹红 刘大岭 姚冬生*

(暨南大学微生物生物技术研究所 广东 广州 510632)

摘要: 以魔芋精粉为唯一碳源,对假蜜环菌(*Armillariella tabescens*) EJLY2098 进行培养,诱导其产生 β -甘露聚糖酶。经 DEAE-阴离子交换层析后,分离纯化出 β -甘露聚糖酶 *atMAN47*。酶学性质分析:该酶分子量约为 47 kD,酶的最适反应温度为 50°C,在 pH 5.0~6.5 之间该酶的稳定性较好;Na⁺ 和 Ba²⁺ 对该酶有激活作用,用 TLC 对酶产物分析,表明该酶为内切 β -甘露聚糖酶。该酶为偏酸性的内切甘露聚糖酶,适合发展为饲料的酶制剂,具有良好的应用前景。

关键词: β -甘露聚糖酶, *Armillariella tabescens* EJLY2098, 纯化, 酶学性质

Purification and Characterization of β -mannanase *atMAN47* from *Armillariella tabescens*

HE Yan-Xi SONG Ying CAO Hong LIU Da-Ling YAO Dong-Sheng*

(Institute of Microbial Biotechnology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: *Armillariella tabescens* EJLY2098 was induced to produce β -mannanase with konjac fine flour (*Amorphophallus rivieri*) as single carbon source. This induced enzyme was then purified using DEAE ion exchange chromatography and named *atMAN47*. Zymologic analysis showed that the molecular weight of this β -mannanase was approximately 47 kD. The enzyme was stable when pH ranged from 5.0 to 6.5 and could be activated by Na⁺ and Ba²⁺. With an optimal temperature of 50°C. Action mode analysis of TLC revealed that the enzyme belonged to the endo- β -mannanase family. Being a meta-acid endo- β -mannanase, it was suitable to be applied to feed industry with a promising future as an enzyme preparation.

Keywords: β -mannanase, *Armillariella tabescens* EJLY2098, Purification, Characterization

β -甘露聚糖酶(β -1,4-D-mannan mannanohydrolase, EC 3.2.1.78), 即 β -1,4-D 甘露聚糖酶,属于半纤维素酶类^[1],是一类能够水解含 β -1,4-D-甘露吡喃糖苷键的甘露寡糖和甘露多糖的内切酶。 β -甘露聚糖酶已被广泛应用于食品、医药、饲料、造纸、纺织印染、

石油开采、精细化工及生物技术等诸多领域^[2-4]。

假蜜环菌(*Armillariella tabescens*)为白蘑科的可食用真菌,寄生于树干基部或根部,引起多种树木腐病,并有一定药用价值。本实验室先前的研究表明:*Armillariella tabescens* 是一个能分泌甘露聚糖酶

基金项目:广东省科技攻关计划(No. 2005B20601004)

*通讯作者: Tel: 86-20-85228422; ✉: dsyao2001@263.net

收稿日期: 2009-02-22; 接受日期: 2009-04-14

的新菌种, 已经从 *Armillariella tabescens* EJLY2098 分离到两个有甘露聚糖酶活性组分, 并且纯化出分子量为 78.9 kD β -甘露聚糖酶^[5]。本文则主要报道从该菌株 *Armillariella tabescens* EJLY2098 的菌液上清中分离纯化得到的另一个分子量的偏酸性的内切 β -甘露聚糖酶 *atMAN47*, 并对其酶学性质分析。

1 实验材料与方 法

1.1 菌种与培养

Armillariella tabescens EJLY2098 为本实验室保藏。

一级培养基(W/V): 蛋白胨 1%, 土豆汁 25%, 魔芋精粉^[6]1%, KH_2PO_4 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%, 维生素 B1 少许; 培养条件为 26.5°C, 160 r/min 振荡培养 6 d。二级培养基(W/V): 蛋白胨 1%, 土豆汁 25%, 魔芋精粉 2%, KH_2PO_4 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%(W/V), 维生素 B1 少许; 培养条件为 26.5°C, 180 r/min 振荡培养 4 d。三级培养基(W/V): 蛋白胨 1%, 土豆汁 25%, 魔芋精粉 2%, KH_2PO_4 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%, 维生素 B1 少许; 培养条件为 27°C, 200 r/min 振荡培养 3 d。

1.2 酶的纯化

经三级培养的发酵液于 4°C、5000 r/min 离心 30 min 除菌体和残渣, 上清冻干, 将冻干品溶于少量的 pH 5.0 含 0.02 mol/L 醋酸钠-0.02 mol/L 醋酸缓冲液计算回收率^[7]。采用 AKTA explorer-100 蛋白质纯化系统将上清过 DEAE - SepharoseTM Fast Flow 阴离子交换柱, 收集产物, 测定酶活和蛋白含量。

1.3 甘露聚糖酶的活力测定

测活方法按文献^[7]略作修改; 酶活力单位定义(U): 在上述条件下, 每分钟底物被酶解产生 1 μmol 还原糖(以甘露糖计)所需酶量定义为 1 个酶活力单位。蛋白浓度用 Bradford 法测定, 以牛血清白蛋白标准曲线。

1.4 *atMAN47* 的酶作用产物分析

参照文献^[8]报道方法, 多糖酶解后用硅胶薄层层析(TLC)方法分析产物。以甘露糖和麦芽糖(2 mg/mL)的混合液 2 μL 作标准, 另取经过柱层析峰 V 收集物的反应液 15 μL 点于已活化的 TLC 薄层层析板上。以正丁醇: 乙醇: 水=5: 3: 2 混合溶液作展开剂, 展完后用 50%硫酸(浓硫酸: 纯水=1: 1)喷洒薄板, 于 110°C 烘干 3 min 显色。

1.5 *atMAN47* 的酶学性质分析

1.5.1 酶分子量: 采用变性不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE 电泳法), 参考文献^[9]的方法: 分离胶质量分数为 14%, 浓缩胶质量分数为 5%, Tris-HCl 缓冲体系, 考马斯亮蓝 R-250 染色。最后用 AlphaEaseFCTM 软件分析 β -甘露聚糖酶 *atMAN47* 的分子量。

1.5.2 温度和 pH 对酶活力的影响: 在不同温度(30°C~80°C)的水浴中按常规法测定酶活力, 以未处理的酶液活力为 100%, 计算不同温度下处理的各组酶的相对活力。以不同 pH(3.0~9.0)缓冲液配制魔芋精粉溶液, 按常规法测定 *atMAN47* 的酶活力。以未处理的酶液活力为 100%, 计算各组酶的相对活力。

1.5.3 酶的 pH 稳定性和热稳定性: 在 pH 5.5 条件下, 将酶液在不同的温度(30°C~80°C)下保温 30 min, 按常规法测定酶活力, 以未处理的原酶液活力为 100%, 计算各组酶的相对活力。酶液与上述不同 pH(3.0~8.0)缓冲液于 60°C, 保温 30 min 后, 按常规法测定酶活力, 以未处理的原酶液活力为 100%, 计算各组酶的相对活力。

1.5.4 金属离子对酶活力的影响: 酶促反应体系中分别加入终浓度为 2×10^{-3} mol/L 的各种金属离子, 按常规法测定酶活力, 以未处理的原酶液活力为 100%, 计算各组酶的相对活力。

2 实验结果及分析

2.1 β -甘露聚糖酶 *atMAN47* 的纯化

用产酶培养基培养 *Armillariella tabescens* EJLY2098 产 β -甘露聚糖酶, 并进行分离纯化。将菌液上清冻干粉重新用缓冲液(0.02 mol/L 醋酸-0.02 mol/L 醋酸钠缓冲液)溶解后经 4°C, 10000 r/min 离心 30 min, 利用 AKTA explorer-100 纯化系统, 进行一次阴离子交换层析纯化后, 即得到了 4 个具有酶活力的峰: 峰 I, 峰 II, 峰 III, 峰 V, 结果如图 1。经过 SDS-PAGE 电泳分析, 峰 V 为电泳纯的一条带, 结果如图 2 所示。

2.2 *atMAN47* 的酶作用产物分析

以魔芋精粉为底物反应后, HPTLC 分析结果如图 3。酶解的产物为连续的甘露寡糖, 具有内切的 β -甘露聚糖酶特性, 说明该酶为内切的 β -甘露聚糖酶。

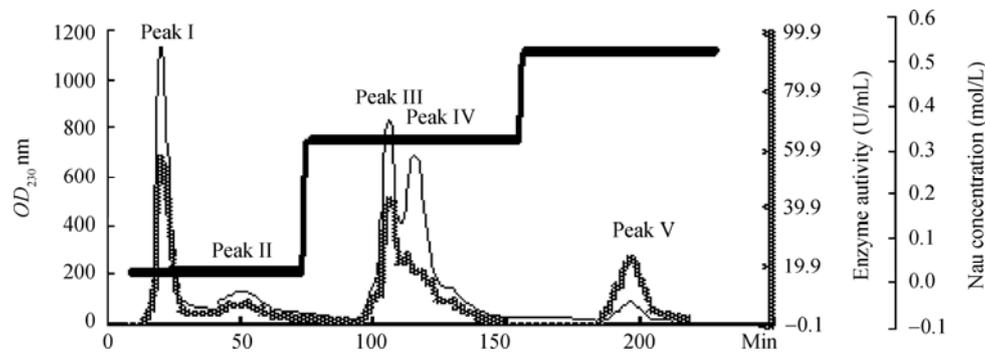
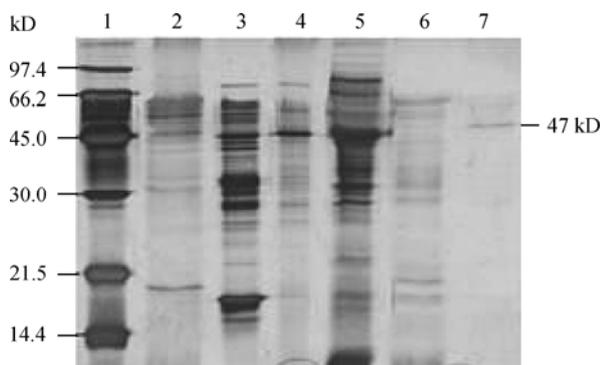


图1 DEAE-Sepharose™ Fast Flow 阴离子层析洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of DEAE-Sepharose™ Fast Flow ion exchange chromatogram

注: —: OD_{280} ; ○: 酶活力(U/mL); ■: NaCl 浓度(mol/L).

Note: —: OD_{280} ; ○: Enzyme activity (U/mL); ■: NaCl density (mol/L).

图2 *atMAN47* SDS-PAGE 电泳(银染)Fig. 2 SDS-PAGE on purification of *atMAN47*

注: 1: Marker; 2: 原液; 3: 峰 I; 4: 峰 II; 5: 峰 III; 6: 峰 IV; 7: 峰 V.

Note: 1: Marker; 2: Crude enzyme; 3: Peak I; 4: Peak II; 5: Peak III; 6: Peak IV; 7: Peak V.

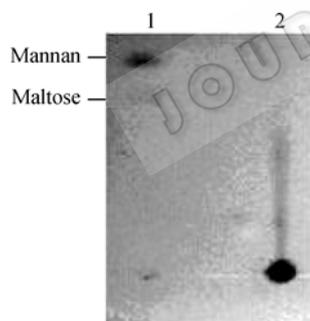


图3 酶解产物的高效薄层层析分析

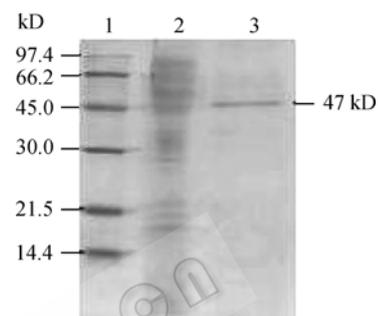
Fig. 3 HPTLC of enzymolized production by β-mannanase

注: 1: 麦芽糖和甘露糖; 2: β-甘露聚糖酶 *atMAN47*.

Note: 1: Maltose and mannan; 2: β-mannanase *atMAN47*.

2.3 β-甘露聚糖酶 *atMAN47* 酶学性质分析

2.3.1 分子量分析: 对峰 V 的 β-甘露聚糖酶组分经 SDS-PAGE 电泳后, 用 AlphaEaseFC™ 软件分析 *atMAN47* 的分子量约为 47 kD, 对其进行酶活力测定, 测定结果显示具有 β-甘露聚糖酶活性。电泳结果如图 4 所示。

图4 *atMAN47* SDS-PAGE 电泳Fig. 4 SDS-PAGE of β-mannanase *atMAN47*

注: 1: Marker; 2: 原液; 3: 峰 V.

Note: 1: Marker; 2: Crude enzyme; 3: Peak V.

2.3.2 温度和 pH 对酶活力的影响、酶的热稳定性和 pH 稳定性: 如图 5a pH 值为 5.5 时具有最高酶活力, 到 pH 值 9.0 时, 酶活力等于零。从图 5b 反应温度在 40°C~70°C 时该酶具有较高的活性, 该酶的最适反应温度为 50°C。由图 6a 可以看出, 在 pH 5.0~6.5 之间 β-甘露聚糖酶 *atMAN47* 的稳定性较好。从图 6b 可以看出, 30°C~60°C 区间酶的稳定性最好。70°C 时, 酶活力已经降到 30°C 时酶活性的 10%, 到 80°C 基本失活。

2.3.3 金属离子对 *atMAN47* 酶活力的影响: 加入终浓度为 2×10^{-3} mol/L 的各种金属离子后经测活发现, 如图 7 所示: Na^+ 和 Ba^{2+} 对酶起激活作用; K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 和 NH_4^+ 对酶有抑制作用, Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 对酶有完全抑制作用。

3 讨论

β-甘露聚糖酶的分离纯化大多是利用硫酸铵沉淀, 再经过离子交换, 分子筛等层析技术多步骤, 才可以分离得到电泳纯的产品。但是, 如果在总蛋

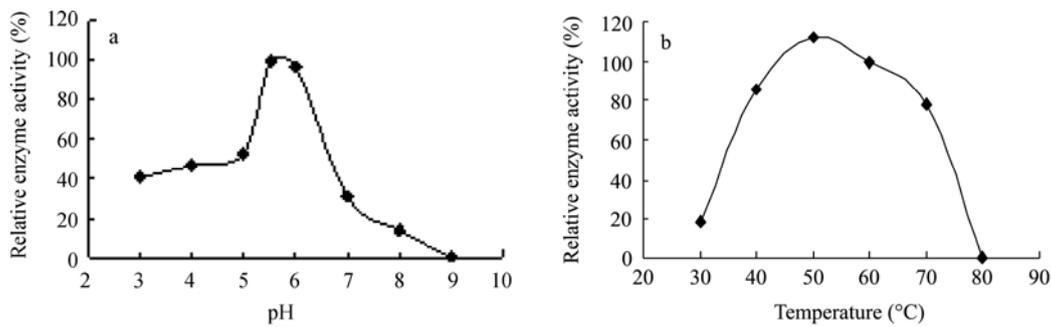


图5 pH(a)和温度(b)对 β -甘露聚糖酶 *atMAN47* 的活力的影响
Fig. 5 Effect of pH (a) and temperature (b) on activity of β -mannanase *atMAN47*

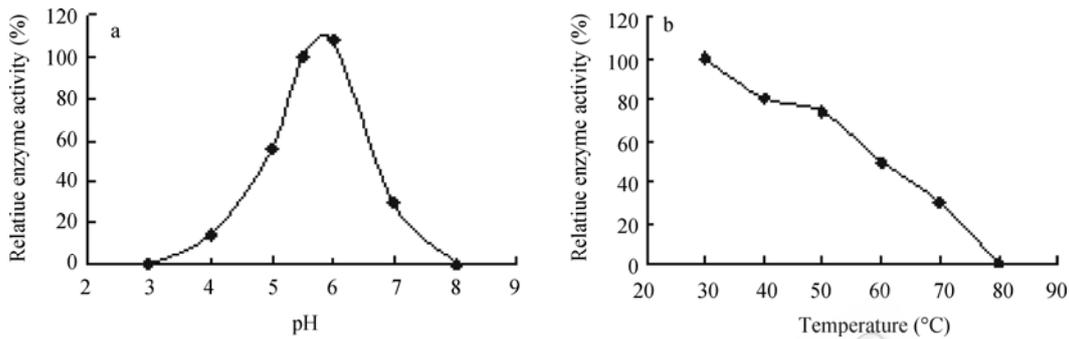


图6 β -甘露聚糖酶 *atMAN47* 的 pH (a)和温度(b)的稳定性
Fig. 6 Effect of pH (a) and temperature (b) on β -mannanase *atMAN47* stability

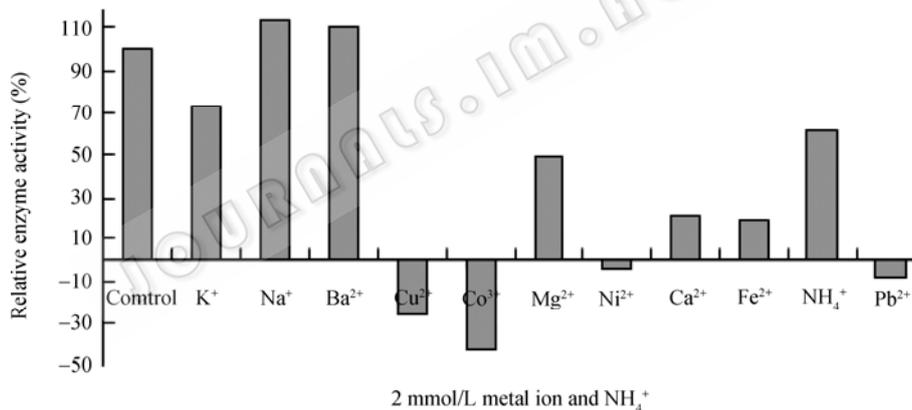


图7 金属离子和 NH_4^+ 对 β -甘露聚糖酶 *atMAN47* 酶活力的影响
Fig. 7 Effect of metal ion and NH_4^+ on β -mannanase *atMAN47* activity

白中含有多种蛋白质,而且相互之间的分子量,等电点或者理化特征比较相似,尤其是天然菌产生的蛋白质,更是由于每次培养条件的不可能完全相同,这就更加大了分离纯化的难度^[10,11]。本论文的目的之一就是将 *Armillariella tabescens* EJLY2098 产生的 β -甘露聚糖酶组分之一分离纯化出来,先后尝试了 1) 分子筛 Sephadex G-25、疏水层析与离子交换组合方案; 2) 分子筛 Sephadex G-25、离子交换与分子筛 Sephadex G-75 组合方案; 3) 单独使用离子交换

层析。3 种方案对目的蛋白酶进行分离纯化。最后确定在方案 3 的纯化条件下,实现了 β -甘露聚糖酶组分的分离纯化。

真菌 *Armillariella tabescens* EJLY2098 分泌的 β -甘露聚糖酶有 2 个活性峰,其中 1 个组分(79 kD)已完成了纯化和酶学性质的分析^[11]。本实验的工作为从该菌株分离纯化的第 2 个 β -甘露聚糖酶(47 kD)。本文仍然采用了 DEAE 弱阴离子交换层析,但与黄

小葵 79 kD 蛋白的纯化工艺相比,省去了样品的硫酸铵沉淀和透析两个处理步骤。考虑到离子交换层析本身可以浓缩富集样品的特点,我们将 47 kD 蛋白的纯化工艺设计为用诱导的培养基上清过 DEAE 阴离子交换层析,简化了纯化步骤,使工艺更加简单、易操作。为了得到理想的蛋白纯化效果,与黄小葵的纯化工艺比较,在柱层析的具体实验参数方面,更换了纯化的缓冲体系,改变了层析的 pH 值,但仍然采用了阶段洗脱的洗脱方式。结果用含 0.5 mol/L NaCl 的 pH 5.0 的醋酸缓冲液洗脱时得到了电泳纯的甘露聚糖酶 47 kD 蛋白。实验结果表明该酶活力最适作用 pH 为 5.0~6.5,在温度为 30°C~60°C, pH 5.0~6.5 之间时该酶的稳定性较好。畜禽类动物体温一般为 37°C~40°C 左右,小肠 pH 为 5.8~6.0,所以该酶有饲用的潜在价值^[12,13]。该结果为用基因工程方法高效表达重组 β -甘露聚糖酶,分子体外定向进化改造该酶提供了新的材料,并为构建有完整自主知识产权生产 β -甘露聚糖酶的菌株和半纤维素酶类的系列研究做了重要的基础工作^[14]。

参 考 文 献

- [1] 齐军茹, 廖劲松, 彭志英. β -甘露聚糖酶的制备及其应用研究进展. 中国食品添加剂, 2002, 18(6): 12-16.
- [2] Paice MG, Gumagual N, Page DH, *et al.* Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of Kraft pulps. *Enzyme Microb techno*, 1992, 14(4): 272-276.
- [3] 乔欣君, 邹晓庭. β -甘露聚糖酶的营养功能及在动
- [4] 许牡丹, 杨伟东, 许宝红, 等. 微生物 β -甘露聚糖酶的制备与应用研究进展. 动物医学进展, 2006, 9(27): 31-34.
- [5] 姚冬生, 黄小葵, 刘大岭, 等. *A. tabescens* EJLY2098 产生的 β -甘露聚糖酶的诱导、纯化及酶学性质分析. 中国生物工程杂志, 2006, 26(7): 57-63.
- [6] 余红英, 杨幼慧, 孙远明. β -甘露聚糖酶作用魔芋胶条件研究. 食品工业科技, 2003, 24(7): 33-35.
- [7] 范志恒. 甘露聚糖酶的酶学性质研究. 饲料工业, 2008, 29(16): 19-21.
- [8] Jiang ZQ, Wei Y, Li DY, *et al.* High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 66: 88-96.
- [9] 张树政主编. 酶学研究技术. 北京: 科学出版社, 1987, pp.42-54, 195-200.
- [10] Hashem AM, Ismail AM, El-Refai MA, *et al.* Production and properties of beta-mannanase by free immobilized cells of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488. *Cytobios*, 2001, 105(409): 115-130.
- [11] 李文玉, 董志扬, 崔福绵. 枯草芽孢杆菌中性内切 β -甘露聚糖酶的纯化及性质. 微生物学报, 2000, 40(4): 420-424.
- [12] 李富伟, 周响艳. 饲用 β -甘露聚糖酶的研究及应用. 饲料工业, 2007, 28(2): 16-19.
- [13] 廖贵芹. β -甘露聚糖酶的研究与应用现状. 武汉生物工程学院学报, 2008, 4(4): 226-229.
- [14] 谭秀华, 武玉勇, 马立新, 等. 耐碱性甘露聚糖酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达. 微生物学报, 2005, 45(4): 543-546.

栏目介绍

显 微 世 界

“显微世界”栏目将刊出一些精美清晰的显微照片,带您走进显微镜下的微生物世界,希望在阅读期刊相关科学新进展的同时,给您带来一种愉悦的科学艺术视觉享受。同时欢迎广大作者、读者朋友积极为我们推荐或提供高质量、高清晰的显微照片(提供者保证该图片无任何知识产权问题)。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>