

木霉 LE02 β -1,3-葡聚糖酶酶学特性的研究

唐治玉, 段会轲, 熊善柏

(华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉, 430070)

摘要 对木霉菌株 LE02 所产 β -1,3-葡聚糖酶的酶学特性进行了研究。结果表明, 该酶最适反应温度为 55℃、最适反应 pH 值为 5.0。 Co^{2+} 、 K^{+} 、 Zn^{2+} 、 Li^{+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 以及 1.0 mmol/L 的 Fe^{2+} 对该酶没有影响, Cd^{2+} 和 10.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 对酶具有部分抑制作用, 而低浓度的 Hg^{2+} 、5.0 mmol/L 以上的 Mn^{2+} 和 10.0 mmol/L 的 Fe^{3+} 能强烈抑制该酶的活性。该酶只能作用于 β -1,3-糖苷键, 以 Larinami 为底物时其米氏常数 K_m 值为 128.34 $\mu\text{g/mL}$, 最大反应速度 V_m 为 23.01 $\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。经过 SDS-PAGE 测定的分子质量近似为 80.137 ku。

关键词 木霉 LE02, β -1,3-葡聚糖酶, 酶学特性

β -1,3-葡聚糖酶(β -1,3-glucanase, EC3.2.1.39)是一类能特异作用于 β -葡聚糖中 β -1,3-糖苷键的水解酶, 可应用于啤酒和饲料工业^[1]、制备酵母原生质体^[2]、多糖改性增溶^[3]、植物有害真菌防治与真菌细胞壁结构分析^[4]等方面。该酶广泛存在于动物、植物、微生物中, 目前已从真菌、细菌以及放线菌等微生物中分离到产 β -1,3-葡聚糖酶的菌株, 但得到的大多数菌株产酶量都偏低, 最高的也仅 42.13 IU/mL^[5]。不同来源的酶在性质上存在很大的差异, 大多数分子质量在 20~80ku, 最适反应 pH 值 4.0~6.5, 最适反应温度 50~65℃, 等电点集中在 4.0~8.0 之间。

木霉 LE02 是研究室从土样中分离得到的产胞外 β -1,3-葡聚糖酶的菌株, 其液态发酵酶活力 71.09 IU/mL^[6], 固态发酵酶活力则高达 583.02 IU/g \cdot ssc^[7], 且具有专一性强, 酶活力高, 易分离纯化, 发酵周期短等优点, 是一种非常具有开发潜力的 β -1,3-葡聚糖酶产生菌。本试验对木霉菌株 LE02 所产胞外 β -1,3-葡聚糖酶的酶学特性进行了研究, 为该酶的实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌种: 木霉 (*Trichoderma*) LE02 由本研究室分离得到; Laminarin from *Laminaria digitata*; Sigma Co., U. S. A; Pustulan from *Umbilicaria papullosa*; Calbiochem。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基和培养方法

液态发酵培养基: 酵母粉 3 g, NaNO_3 0.3 g, KCl 0.05 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g, 蒸馏水 100 mL, 自然 pH 值。

液态产酶培养方法: 在 250mL 三角瓶中装入 50mL 液态产酶培养基, 于 121℃ 灭菌 20min, 冷却后接种 1 环木霉孢子, 30~32℃, 150 r/min 摇床中培养 4 d。

1.2.2 β -1,3-葡聚糖酶的制备与分离纯化^[8]

取发酵液用滤布过滤后, 4 500 r/min 离心 25 min, 得上清液即为粗酶液。粗酶液经 30%→80% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分段盐析, 透析, 再用聚乙二醇 8000 浓缩后, 取 4 mL 上 DEAE-Sepharose CL-6B 层析柱, 收集酶活组分即为纯酶液, 4℃ 低温下贮藏备用。

1.2.3 β -1,3-葡聚糖酶的 Native-PAGE 纯度鉴定^[8]

将收集的酶活组分用聚乙二醇浓缩后, 加入 20% 甘油, 0.5% 的溴酚蓝溶液少许后, 采用垂直板电泳进行纯度鉴定。电泳条件: 分离胶浓度 7.5%, 浓缩胶浓度 4%, 电极缓冲液为 Tris-Gly 缓冲液 (pH8.3), 电流 30mA, 电泳时间 3~4h; 考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.4 β -1,3-葡聚糖酶的分子质量测定^[8]

将收集的酶活组分用聚乙二醇浓缩后, 溶于含 1% SDS、5% β -巯基乙醇、50% 甘油、0.0025% 溴酚蓝的缓冲液中, 加热 5 min, 然后用 SDS-PAGE 电泳法测定酶蛋白的分子质量。电泳条件: 采用垂直板电泳, 分离胶浓度 7.5%, 浓缩胶浓度 4%; 电极缓冲液为 Tris-Gly 缓冲液 (pH8.3), 电流 30 mA, 电泳时间 3~4 h; 考马斯亮蓝 R-250 染色。标准分子质量蛋白包括肌球蛋白 (200 ku)、钙调素结合蛋白 (130

第一作者: 硕士研究生(熊善柏教授为通讯作者)。
收稿日期: 2006-06-23, 改回日期: 2007-03-19

ku)、兔磷酸化酶 B(97.4 ku)、牛血清白蛋白(66.2 ku)和兔肌动蛋白(43 ku)。

1.2.5 β -1,3-葡聚糖酶活力的测定

对 Susumu Nagasaki 等人所报道的方法进行适当调整。取用 pH 5.0 的 HAc-NaAc 缓冲液配制的 250 μ g/mL 的 β -1,3-葡聚糖溶液 0.9 mL,加入 0.1 mL 酶液,50℃反应 10 min,沸水浴 5 min 灭酶活,取上清用 Somogyi-Nelson^[9]法测定酶水解液中的还原糖量。以灭活酶为空白。酶活力定义:在上述反应条件下,每分钟从底物中降解释放 1 μ mol 还原糖所需的酶量为 1 个活力单位(U)。

1.2.6 β -1,3-葡聚糖酶最适反应 pH 值的确定

分别将 0.025 g 的 Laminarin 溶解于 pH3.0~8.0 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液中,配制成不同 pH 值、浓度为 250 μ g/mL 的底物溶液,测定酶活力。

1.2.7 β -1,3-葡聚糖酶的酸碱稳定性

经过纯化的 β -1,3-葡聚糖酶液用不同 pH 值的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液稀释至适当的浓度,混合均匀后,于 50℃保温 1 h,取出后立即冰浴,测定残余酶活力。

1.2.8 β -1,3-葡聚糖酶最适反应温度的确定

将 Laminarin 溶于 pH5.0 的 HAc-NaAc 缓冲液配成 250 μ g/mL 的溶液,加入 β -1,3-葡聚糖酶液,分别置于 20、30、40、50、55、60、65、70 和 80℃水浴中反应,反应前底物在各反应温度下预热 5 min,测定各温度下的酶活力。

1.2.9 β -1,3-葡聚糖酶的热稳定性

纯化的酶液分别置于 40、50、55、60、70℃恒温水浴锅中保温,每隔 10 min 取样 1 次,取出的样品立即冰浴,然后测定 β -1,3-葡聚糖酶的残余酶活力。

1.2.10 离子强度对 β -1,3-葡聚糖酶活力的影响

取纯化后的酶液 0.1 mL,加入 0.4 mL 不同浓度的 NaCl 溶液和 0.5 mL 450 μ g/mL 的底物,使 NaCl 的终浓度分别为 50、125、250、375 和 500 mmol/L,然后测定酶活力,以不加 NaCl 的反应体系为空白。

1.2.11 金属离子对 β -1,3-葡聚糖酶活力的影响

取纯化后的酶液 0.1 mL,加入 0.4 mL 不同浓度的金属离子溶液和 0.5 mL 450 μ g/mL 的底物,使各金属离子的终浓度分别为 1.0 mmol/L、5.0 mmol/L 和 10.0 mmol/L,然后于 50℃反应,测定酶活力,以不加任何金属离子的反应体系为空白。

1.2.12 β -1,3-葡聚糖酶的底物专一性

选择不同糖苷键键型的 Dextran、CMC-Na、

Laminarin、Pustulan 和可溶性淀粉为底物,与酶液在 50℃反应,测定酶活力。

1.2.13 β -1,3-葡聚糖酶的动力学性质

取用 50 mmol/L pH5.0 的 HAc-NaAc 缓冲液配制的浓度分别为 0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL 的 Laminarin 溶液 0.9 mL,加入 0.1 mL 的酶液,于 50℃反应,测定 β -1,3-葡聚糖酶活力,采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,计算出该酶在上述底物时的 K_m 和 V_m 值。

2 结果与分析

2.1 β -1,3-葡聚糖酶的纯度鉴定及分子质量测定

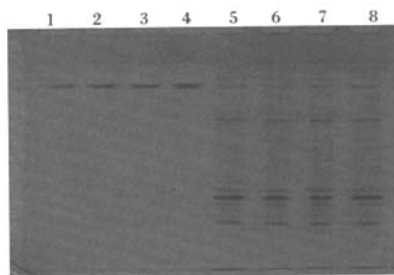


图1 β -1,3-葡聚糖酶的纯度鉴定图

1,2,3,4 泳道为纯化后的酶蛋白;5,6,7,8 泳道为经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀透析后的酶蛋白

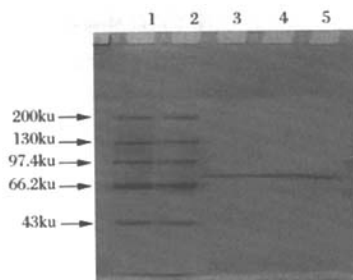


图2 β -1,3-葡聚糖酶的分子质量图

1,2 泳道为标准分子质量蛋白;3,4,5 泳道为纯化后的酶蛋白

收集经 DEAE-Sephacrose CL-6B 层析分离纯化的含酶组分,经聚乙二醇浓缩后采用 Native-PAGE 进行纯度鉴定,分离所得含酶组分在 Native-PAGE 图上呈单一谱带;分离所得含酶组分经聚乙二醇浓缩后,用 SDS-PEAG 测定分子质量,其在 SDS-PEAG 图谱上也呈单一带,迁移率为 0.461,其分子质量近似为 80.137 ku^[8],结果见图 1,图 2。

2.2 β -1,3-葡聚糖酶最适反应 pH 值的确定

由图 3 可知, β -1,3-葡聚糖酶在 pH 4.0~6.0 酶活力较高,在 pH 5.0 时酶活力最高,pH 值<4 或>6, β -1,3-葡聚糖酶活力明显下降,当 pH3 时,残余酶

活力为 7.38%，pH8 时，残余酶活力仅为 2.68%。

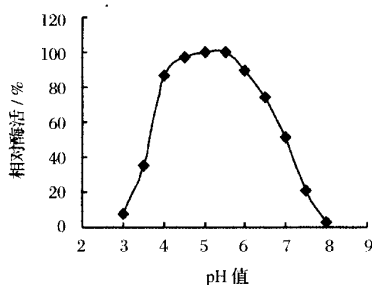


图3 β -1,3-葡聚糖酶的最适反应 pH 值

2.3 β -1,3-葡聚糖酶的酸碱稳定性

从图4中可以看出,50℃条件下, β -1,3-葡聚糖酶在 pH4.5~6.0 比较稳定,在 pH5.0 时稳定性最佳。该酶稳定 pH 与最适反应 pH 一致,有利于该酶的利用和保存。

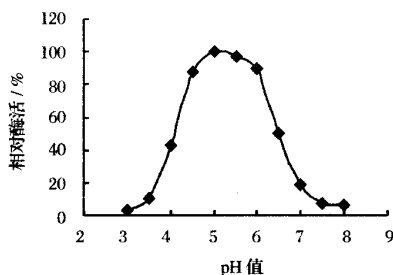


图4 β -1,3-葡聚糖酶的酸碱稳定性

2.4 β -1,3-葡聚糖酶最适反应温度的确定

图5表明, β -1,3-葡聚糖酶在 50~55℃ 酶活力较高,相对酶活力在 90% 以上,其最适反应温度为 55℃,超过 60℃ 时酶活力下降较大,至 65℃ 时相对酶活力仅为 4.25%。

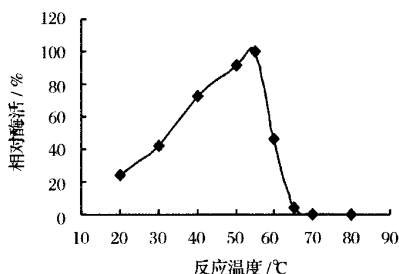


图5 β -1,3-葡聚糖酶的最适反应温度

2.5 β -1,3-葡聚糖酶的热稳定性

从图6可以看出,在 40℃ 和 50℃ 下保温 30 min, β -1,3-葡聚糖酶基本不会失活,但随着保温时间的延长,酶活力呈下降趋势;在 55℃ 下,随着保温时间的延长,酶活力逐渐丧失,保温 60 min 时,残余酶活力

为 66.7%;而在 60℃ 和 70℃ 保温 10 min,残余酶活力分别为 36.2% 和 0。

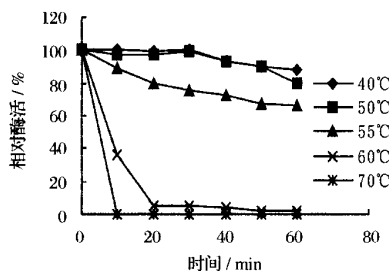


图6 β -1,3-葡聚糖酶的温度稳定性

2.6 离子强度对 β -1,3-葡聚糖酶活力的影响

离子强度对 β -1,3-葡聚糖酶活力的影响见图7。从图7可知,离子强度对 β -1,3-葡聚糖酶的活力影响不大,相对酶活力均在 96% 以上,当反应体系中 NaCl 的浓度为 50mmol/L 时, β -1,3-葡聚糖酶的活力最大,达到 115.9%。

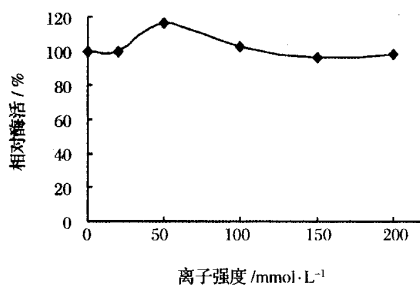


图7 离子强度对 β -1,3-葡聚糖酶活力的影响

2.7 金属离子对 β -1,3-葡聚糖酶活力的影响

金属离子对 β -1,3-葡聚糖酶活力的影响见表1。

表1 金属离子对 β -1,3-葡聚糖酶活力的影响

金属离子	相对酶活力/%		
	1.0 mmol/L	5.0 mmol/L	10.0 mmol/L
空白	100.00	100.00	100.00
Co ²⁺	101.33	101.20	93.97
Fe ²⁺	110.79	74.60	41.32
Ba ²⁺	98.65	95.50	94.08
Li ⁺	98.21	92.55	95.08
K ⁺	94.22	94.75	95.20
Zn ²⁺	95.73	90.71	85.02
Cu ²⁺	90.00	84.99	84.35
Cd ²⁺	88.06	73.41	77.96
Mg ²⁺	92.02	91.18	69.12
Fe ³⁺	86.49	74.84	15.09
Mn ²⁺	52.72	13.98	3.24
Hg ²⁺	9.04	4.35	3.57

从表1可知,Co²⁺、K⁺、Zn²⁺、Li⁺、Ba²⁺、Cu²⁺以及 1.0 mmol/L 的 Fe²⁺ 对 β -1,3-葡聚糖酶活力的影

响不大,5 mmol/L 和 10 mmol/L 的 Cd^{2+} 和 10.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 对该酶具有部分抑制作用, Fe^{3+} 和 Mn^{2+} 则具有明显的抑制作用,当 Fe^{3+} 的浓度为 10 mmol/L 时,残余酶活力仅为 15.09%, Mn^{2+} 浓度为 5 mmol/L 和 10 mmol/L 时,残余酶活分别为 13.98% 和 3.24%;而 Hg^{2+} 对 β -1,3-葡聚糖酶具有强烈的抑制作用,在 Hg^{2+} 存在下,酶失去活性。

2.8 β -1,3-葡聚糖酶的底物专一性

选择含不同糖苷键型的 Dextran、CMC-Na、Laminarin、Pustulan 和可溶性淀粉为底物,与酶液反应,测定各自的酶活力,结果如表 2 所示。

表 2 β -1,3-葡聚糖酶的底物选择性

底物	单体	键型 ^[10]	相对酶活力/%
Laminarin	葡萄糖	β -1,3-1,6	100
Pustulan	葡萄糖	β -1,6	0
Dextran	葡萄糖	α -1,6	0
CMC-Na	葡萄糖	β -1,4	0
可溶性淀粉	葡萄糖	α -1,4	0

从表 2 可知,此 β -葡聚糖酶只作用于含 β -1,3 糖苷键的 Laminarin 底物,而对含有 α -1,6 糖苷键的 Dextran、含 β -1,6 糖苷键的 Pustulan、含 β -1,4 糖苷键 CMC-Na 和含有 α -1,4 糖苷键的可溶性淀粉都没有作用,说明此酶对 β -1,3 糖苷键有很强的专一性,是一种 β -1,3-葡聚糖酶。

2.9 β -1,3-葡聚糖酶的反应动力学

根据 β -1,3-葡聚糖酶的底物选择性,以 Laminarin 为底物,采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,测定该酶在上述底物时的 K_m 和 V_m 值。

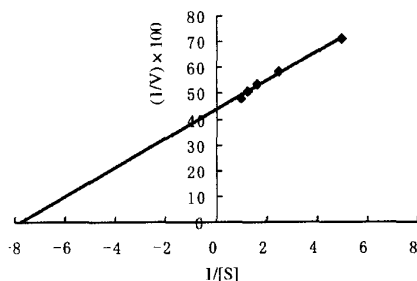


图 8 底物为 Laminarin 时的动力学曲线

图 8 结果表明,当以 Laminarin 为底物时,根据 Lineweaver-Burk 双倒数方程 $y=5.598 2x+43.464$ ($R^2=0.991 3$), β -1,3-葡聚糖酶的米氏常数 K_m 值为 128.34 $\mu\text{g/mL}$,最大反应速度 V_m 值为 23.01 $\mu\text{g/min} \cdot \text{mL}$ 。

3 结 论

木霉菌株 LE02 所产胞外 β -1,3-葡聚糖酶经 SDS-PAGE 测定的分子质量近似为 80.137 ku。其最适反应温度为 55℃、最适反应 pH 值为 5.0,不超过 50℃、pH 4.5~6.0 时酶活稳定。 Co^{2+} 、 K^{+} 、 Zn^{2+} 、 Li^{+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 以及 1.0 mmol/L 的 Fe^{2+} 对该酶基本没有影响, Cd^{2+} 和 10.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 对该酶具有部分抑制作用,而低浓度的 Hg^{2+} 、5.0 mmol/L 以上的 Mn^{2+} 和 10.0 mmol/L 的 Fe^{3+} 能强烈抑制该酶的活性。该酶只能作用于 β -1,3-糖苷键,以 Laminarin 为底物时其米氏常数 K_m 值为 128.34 $\mu\text{g/mL}$,最大反应速度 V_m 为 23.01 $\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。

参 考 文 献

- 1 张 洁,蔡敬民,吴 克,等. β -葡聚糖酶的研究与应用前景[J]. 安徽农业科学,2003,31(5):895~896
- 2 Pitson A M, Seviour R J, McDougall B M. Noncellulolytic fungal β -glucanase: their physiology and regulation [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1993, 15: 178~192
- 3 Kery V, Kogan G, Ajacova K Z, et al. Hydrolysis of yeast cell wall glucan by extracellular β - (1,3)-glucanase from *Aspergillus niger* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1991, 13(1):87~90
- 4 蔡应繁,叶鹏盛,张 利,等. β -1,3-葡聚糖酶及其在植物抗真菌病基因工程中的应用[J]. 西南农业大学学报,2001, 14(2):78~81
- 5 王旭丽,黄丽丽,康振生,等. 小麦全蚀病菌胞外 β -1,3-葡聚糖酶的产生和部分特性的研究[J]. 菌物系统,2003,22 (4):628~633
- 6 唐治玉,王 淮,熊善柏,等. β -1,3-葡聚糖酶产生菌的筛选及其产酶条件的研究[J]. 湖南农业大学学报,2006,32 (5): 552~556
- 7 易华西. 木霉 TP-24 固态发酵生产 β -1,3-葡聚糖酶产酶条件及酶学性质的研究[D]. 华中农业大学硕士学位论文, 2004,5
- 8 唐治玉,熊善柏. 木霉 LE02 β -1,3-葡聚糖酶的分离纯化 [J]. 生物技术, 2006,16(4):35~38
- 9 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版) [M]. 杭州:浙江大学出版社,1999
- 10 Brown GD, Gordon S. Immune recognition: A new receptor for β -glucans [J]. Nature, 2001, 413:36~37

Enzymatic Properties of β -1,3-Glucanase from *Trichoderma* Strain LE02

Tang Zhiyu, Duan Huike, Xiong Shanbai

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT Enzymatic properties of β -1, 3-glucanase derived from *Trichoderma* strain LE02 were investigated. The optimum reaction temperature and pH of the enzyme were 55°C and 5.0, respectively. The enzyme activity was stable below 50°C and between pH 4.5 and pH 6.0. The enzyme activity was not inhibited by Co^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Li^+ , Ba^{2+} , Cu^{2+} and 1.0 mmol/L Fe^{2+} , but was slightly inhibited by Cd^{2+} and 10.0 mmol/L Mg^{2+} , and was strongly inhibited by Hg^{2+} , Mn^{2+} over 5.0 mmol/L and 10.0 mmol/L Fe^{3+} . The enzyme only catalyzed the hydrolysis of β -1, 3-glucosidic linkages. The K_m values and V_{\max} of β -1, 3-glucanase were 128.34 $\mu\text{g/mL}$ and 23.01 $\mu\text{g/min} \cdot \text{mL}$ with the substrate of laminarin. The molecular weight estimated by SDS-PAGE was about 80.137 ku.

Key words Enzymatic properties, *Trichoderma* LE02, β -1, 3-glucanase

会
讯

CFE2007 观众质量保证展会质量

作为中国调味品行业的顶级盛会 2007'中国国际调味品及食品配料博览会(简称 CFE2007),继成功举办前 2 届调味品博览会之后,主办方中国调味品协会已经在观众促进和媒体宣传等方面积累了丰富的经验,早在 2006 年博览会一结束,就精心策划了 CFE2007 的展前宣传推广和观众促进工作,把此项工作当作组展工作的重中之重来开展。

这方面,主办方已经建立了一流的资料库,根据不同类型将专业观众进行分类,将在博览会举办前期,多次、定向地向相关专业观众通报博览会最新动向,发出邀请。在以问卷调查,参展注册或网上注册等方式充分收集和了解专业观众的职务、个性特点、年龄以及购买影响力等背景资料,然后用数据对观众的质量进行科学的分析,精心建造专业观众数据库的同时,长年坚持不懈地做好专业买家的资料收集、客户服务工作,并利用中国调味品协会庞大的定期发放观众邀请函及展前快讯,广泛吸引潜在观众的关注。主办方还透过与行业内外 100 多家媒体的良好合作与互动,扩大 CFE 的影响的同时,及时向目标观众传达博览会的各项最新动向。与此同时,CFE2007 主办方还充分利用展会营销这一有效的手段,注重与企业 and 观众的互动,比如刚刚过去的 3 月份的重庆糖酒会和上海的 FIA、FIC,主办方派专门力量去现场与目标观众进行零距离的接触,广泛听取他们对博览会的期望和要求,以期为其提供更为周到的人性化服务。

主办方中国调味品协会表示,CFE2007 一直以打造品牌的力度在筹办调味品行业的这一品牌展会,今年博览会的主题“与渠道共发展,与餐饮业共繁荣”,非常明确,为有志于在调味品流通渠道和餐饮行业上有所作为的企业邀请相应的连锁商超和餐饮企业到会参观采购洽谈合作。11 月的北京,CFE2007,又将是调味品人,一个盛大的节日。

第八届国际焙烤食品技术与市场发展高层论坛在上海召开

2007 年 5 月 16 日,由中国焙烤食品糖制品工业协会和山东保龄宝生物技术有限公司共同主办的“第八届国际焙烤食品技术与市场发展高层论坛”,在上海浦东通茂国际酒店成功召开。

保龄宝公司所产的“欧力多”——低聚异麦芽糖是以玉米淀粉为原料,经过特殊酶的作用而制成的,是食品行业、焙烤行业的功能性配料。低聚糖对酸、热非常稳定,具有较强的保持水分的能力和抗龋齿性。这种功能糖促进肠道内双歧杆菌的发育,抑制有害菌的生长,又可刺激肠道蠕动,缩短粪便在肠道内的停留时间,大大减少了其中的有害成分被肠道吸收的机会,并防止便秘发生,改善大肠对钙、镁等矿物元素的吸收,减少了其有毒代谢物的产生。总之,低聚糖不仅具有防龋齿、双歧杆菌增殖因子等生理功能,而且具有一系列良好的理化性能,如甜味温和、耐酸热、低粘度、保湿性好、防止淀粉老化、低水分活度等,从而使其能广泛应用于保健品、饮料和食品中。同时,保龄宝公司坚持“国际市场的跟进、国内市场的领先”,强化创新意识,第一个实现低聚糖的工业化生产、第一个开发出高纯度低聚糖、第一个实现赤藓糖醇工业化生产等,靠专家领航和持续创新,塑造了“功能性配料专家”的市场形象。