

黑曲霉 D2-26 高温乳糖酶的酶学性质研究

李 宁¹ 李红飞² 柯晓静³ 于宏伟¹ 贾英民^{1*}

(1. 河北农业大学 食品科技学院 保定 071001)

(2. 石药集团河北中润制药有限公司研究所 石家庄 050041)

(3. 河北农业大学 研究生处 保定 071001)

摘 要: 为研究黑曲霉来源的高温乳糖酶的酶学性质, 对黑曲霉 D2-26 发酵液进行分离纯化使酶蛋白达到电泳纯, 并对其进行酶学性质研究。结果表明: 乳糖酶的最适温度 70℃, 在 30℃~60℃ 有较高的耐受性; 最适 pH 为 2.5, pH 稳定范围在 2.0~9.0; Mn^{2+} 对乳糖酶活性有显著的激活作用, Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 对酶活有较强的抑制作用; SDS 严重抑制了酶活性; 以 ONPG 为底物采用双倒数做图法测得 V_{max} 为 97 nmol/min, K_m 为 8.77 mmol/L; 单亚基蛋白的分子量为 116.978 kD; 糖基化程度为 11.3%。

关键词: 黑曲霉, 乳糖酶, 酶学性质

Studies on the Characterization of a Thermostable Lactase from *Aspergillus niger* D2-26

LI Ning¹ LI Hong-Fei² KE Xiao-Jing³ YU Hong-Wei¹ JIA Ying-Min^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

(2. Shijiazhuang Pharm Group Hebei Zhongrun Pharmaceutical Co.Ltd., Shijiazhuang 050041)

(3. Postgraduate Department, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: The fermenting liquor from *Aspergillus niger* D2-26 was purified to obtain a single protein component, and then the characterization of thermostable lactase was studied. The enzyme had an optimum temperature of activity at 70℃ and an optimum pH of 2.5, and had good temperature tolerance from 30℃ to 60℃ and the pH stability at 2.0~9.0. Mn^{2+} had a significant activation on lactase activity, whereas the enzyme activity was inhibited strongly by Hg^{2+} 、 Pb^{2+} and SDS; the V_{max} , K_m , molecular mass of single sub-unit protein and glycosylation of Lactase was 0.097 nmol/min, 8.77 mmol/L, 116.978 kD and 11.3%, respectively.

Keywords: *Aspergillus niger*, Lactase, Characterization

乳糖酶(Lactase)又称β-D-半乳糖苷半乳糖水解酶(β-D-galactoside galactohydrolase, EC.3.2.1.23), 简称为β-半乳糖苷酶(β-galactosidase), 它能催化乳

糖水生成等摩尔量的葡萄糖和半乳糖^[1,2]。

牛乳是营养丰富的天然食品, 其中乳糖含量约占 4.7%~5.0%, 是乳中最主要的碳水化合物。对于

体内缺乏乳糖酶的人群,乳糖在小肠中不分解而直接进入大肠,被大肠中的细菌酵解产生多种气体及短链脂肪酸,导致腹胀,排气增多,腹痛和腹泻等不良病症,被称为乳糖不耐症^[3]。利用乳糖酶水解乳中的乳糖是解决乳糖不耐症的最佳途径,乳糖酶在低乳糖乳及乳制品中的应用对于乳品加工具有重要意义。

目前应用于牛乳中的来源于曲霉菌和酵母的乳糖酶作用温度较低,反应速度慢,作用时间长,在生产中易受杂菌的污染。因此,微生物来源的乳糖酶的研究日益受到人们的重视^[4-6]。特别是丝状真菌产生的乳糖酶因其合适的pH、良好的稳定性、细胞外分泌和表达量较高的特点而成为研究的热点。黑曲霉、米曲霉、青霉等的乳糖酶已经被分离纯化^[7-10]。本实验室保存的一株黑曲霉D2-26产胞外高温乳糖酶,此酶作用温度较高,反应速度快,可以有效地减少杂菌污染,且提取时不需要破壁处理。为了使此高温乳糖酶能够真正用于工业化生产,我们对黑曲霉D2-26产生的高温乳糖酶的最适温度、热稳定性、pH值、 V_{\max} 和 K_m 等酶学性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株:黑曲霉 D2-26(*Aspergillus niger* D2-26),由本实验室分离、保存。

1.1.2 主要试剂:邻硝基苯基- β -D-半乳糖苷(ONPG)(BBI 进口,上海生物工程有限公司分装,分析纯);牛血清白蛋白(上海长阳试剂厂);Sephadex G-100、G-25 (Whatman);DEAE-纤维素-32 (Pharmacia);PEG20000(日本进口分装);考马斯亮蓝 R-250 (Fluka, 进口分装);高分子量蛋白 Marker(大连宝生物公司);其它试剂均为分析纯和化学纯。

1.1.3 主要仪器:BioF-2010 型玻璃发酵罐(上海理工大学高机实业总公司);FD-1 冷冻干燥机(北京博医康技术公司);紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);UVIPro 凝胶成像仪(华粤企业集团有限公司)。

1.2 粗酶液的制备

4 层纱布过滤发酵液,除去黑曲霉菌丝体。用 pH 4.0 的 0.05 mol/L 的 HAc/NaAc 缓冲液洗涤菌丝体,洗涤液经 4 层纱布过滤后与过滤除菌的酶液合

并。合并液经双层滤纸抽滤去除孢子即得粗酶液。

1.3 提纯方法

粗酶液经过滤、超滤、硫酸铵分级盐析、Sephadex G-25 脱盐、DEAE-纤维素-32 离子强度梯度层析、Sephadex G-100 凝胶过滤、DEAE-纤维素-32 pH 梯度层析等分离纯化工艺后,经PAGE电泳鉴定得到单一条带,达到电泳纯^[7]。

1.4 酶活力测定

以ONPG为底物进行测定,取 0.7 mL, 0.6% ONPG溶液置于试管中,60 °C水浴中预热 5 min,加入适当稀释的待测液 0.1 mL,继续保温 10 min后取出,加入 0.8 mL 5% Na₂CO₃溶液显色,定容至 8 mL,于分光光度计 420 nm处比色。以加热灭活的待测液同样处理作为空白。在上述条件下,每分钟水解产生 1 μ mol 邻硝基苯酚(ONP)所需的酶量定义为 1 U^[11]。用已知浓度的ONP溶液做标准曲线(见图1),根据ONP的浓度 c 对应的OD值,利用最小二乘法建立回归方程: $OD=3.09\times 10^{-3}c-2.67\times 10^{-3}$,相关系数 $r=0.9997$; c 的测定范围为 0 μ g/mL~300 μ g/mL。

酶活力计算公式为: $E=2.062\times OD\times N(U/mL)$

2.062 代表当 OD 值为 1 时,每分钟产生 2.062 μ mol 的 ONP; N 为酶液的稀释倍数。

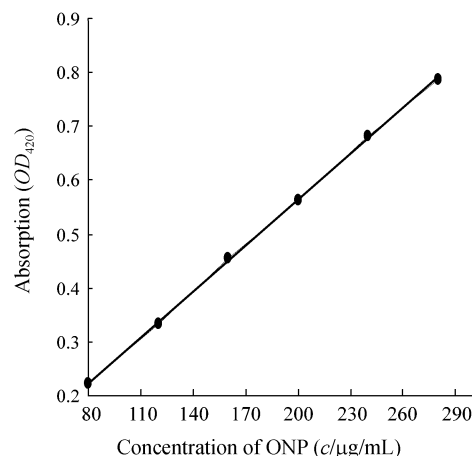


图1 ONP 校正曲线

Fig. 1 Calibration curve

1.5 乳糖酶酶学性质的测定

1.5.1 温度对酶活性的影响:将酶活力测定中的反应温度分别设在 30、40、50、60、70、80 °C,其他测定条件不变,按酶活测定方法对纯酶分别测定其酶活力。将 60 °C 时的乳糖酶活力设为

100%。

1.5.2 酶的热稳定性: 将纯酶液分别置于 30、40、50、60、70 条件下放置 2 h, 之后用流动水将其冷却至室温, 按酶活测定方法测定纯酶的酶活力。将 30 时的乳糖酶活力设为 100%。

1.5.3 酶的低温保存稳定性: 将纯酶液和粗酶液在 4 下保存, 每隔 10 d 按酶活测定方法测定纯酶的酶活力。将第 1 天的乳糖酶活力设为 100%。

1.5.4 pH 对酶活性的影响: 固定温度为最适温度, 其他条件不变, 设定 pH 1.0~9.0 缓冲溶液, 按酶活测定方法测定纯酶的酶活力。将 pH 2.5 时的乳糖酶活力设为 100%。

1.5.5 酶的 pH 耐受性: 将乳糖酶分别在 pH 为 1.0~9.0 的缓冲溶液中 25 下保存 2 d, 按酶活测定方法测定纯酶的酶活力。将 pH 6.5 时的乳糖酶活力设为 100%。

1.5.6 金属离子对酶活力的影响: 在酶活测定体系中分别加入 Li^+ 、 K^+ 、 Ag^+ 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 和 Fe^{3+} 离子使其终浓度为 2 mmol/L, 测定纯酶的酶活力。

1.5.7 其他试剂对酶蛋白的影响: 在酶活测定体系中分别加入半乳糖、葡萄糖、EDTA、SDS 使其终浓度为 8 mmol/L, 测定纯酶的酶活力。

1.5.8 乳糖酶动力学常数测定: 在最适温度和 pH 条件下, 底物 ONPG 的浓度分别设为 0.3%、0.15%、0.075%、0.0375%、0.01875% 来测定纯酶的酶活力, 采用双倒数做图法测定乳糖酶对 ONPG 的 K_m 、 V_{\max} 。

1.5.9 乳糖酶分子量及亚基数的测定: SDS-PAGE 垂直板电泳测定乳糖酶分子量, 浓缩胶浓度 4%, 分离胶浓度 10%, 交联度 3%, 电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-Gly-SDS 缓冲液。电泳条件为浓缩胶 80 V, 分离胶 140 V。高分子量标准蛋白质[肌球蛋白(212 kD)、 β -半乳糖苷酶B(116 kD)、磷酸化酶B(97.4 kD)、牛血清白蛋白(66.2 kD)、过氧化氢酶(57 kD)、醛缩酶(40 kD)]做标样^[12]。

1.5.10 乳糖酶蛋白糖基化程度的测定: 采用硫酸苯酚法, 以葡萄糖溶液为标准溶液, 制作标准曲线。取 1 mL 待测样品, 加入 1 mL 6% 苯酚和 5 mL 浓硫酸, 静置 10 min, 在 490 nm 下测定吸光值^[13], 见图 2。

利用最小二乘法, 根据葡萄糖浓度 c 对应的吸光值 OD 建立回归方程:

$$OD = 0.0075c + 0.0007 \quad (r = 0.9997)$$

OD 代表 490 nm 吸光值; c 为葡萄糖浓度 $\mu\text{g/mL}$, c 的测定范围为 10 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 。

$$\text{糖含量}(\%) = \frac{\text{葡萄糖}(\text{mg}) \times 0.9}{\text{蛋白}(\text{mg}) + \text{葡萄糖}(\text{mg}) \times 0.9} \times 100\%$$

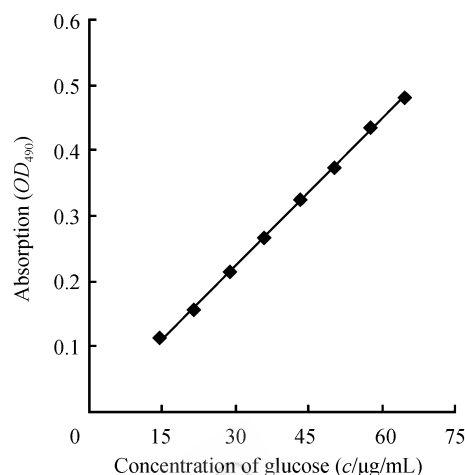


图 2 葡萄糖标准曲线

Fig. 2 Standard curve of glucose

2 结果与分析

2.1 温度对酶活性的影响

图 3 表明, 黑曲霉 D2-26 乳糖酶的最适作用温度为 70, 属于高温乳糖酶, 但在 80 时酶活很低, 只有最适酶活的 23.83%。

2.2 酶的热稳定性

由图 4 可知, 酶在 30 ~50 范围内处理 120 min, 相对酶活均在 90% 以上, 在 60 下处理相

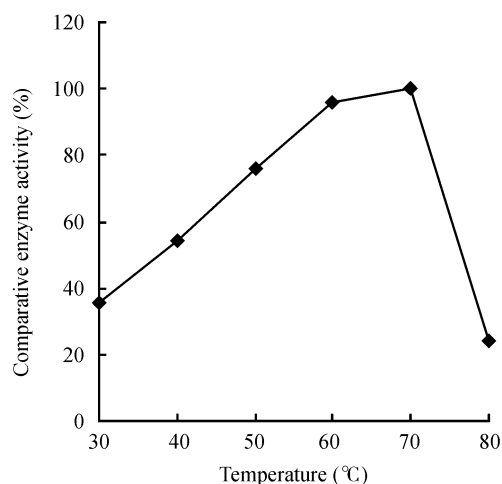


图 3 温度对酶活性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on activity of lactase

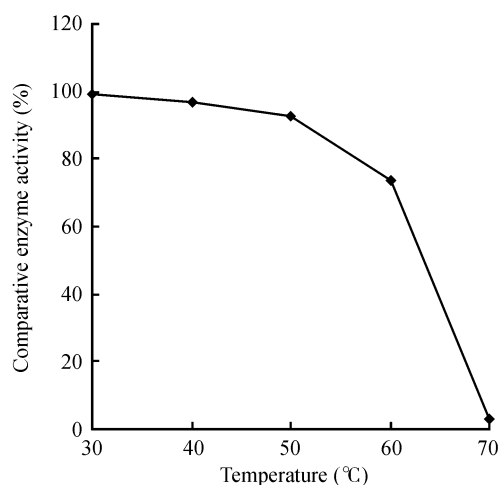


图4 酶的温度稳定性

Fig. 4 Temperature stability of lactase

同时其相对酶活为 73.42%，在 70℃ 下处理 120 min 其酶活几乎完全丧失。

2.3 酶的低温保存稳定性

由图 5 可以看出，粗酶液和纯酶液都具有较高的低温稳定性，但纯酶液在低温保存中的损失率要低于粗酶液，纯乳糖酶蛋白在低温贮存 20 d 后酶活才开始降低。

2.4 pH 对酶活性的影响

黑曲霉 D2-26 乳糖酶的最适作用 pH 为 2.5，作用 pH 较宽(2.0~4.5)。当 pH 超过 5.0 时酶活显著降低，结果见图 6。

2.5 乳糖酶蛋白的 pH 耐受性

pH 耐受性主要是反映酶蛋白耐受酸碱的能力，其耐受曲线如图 7 所示。

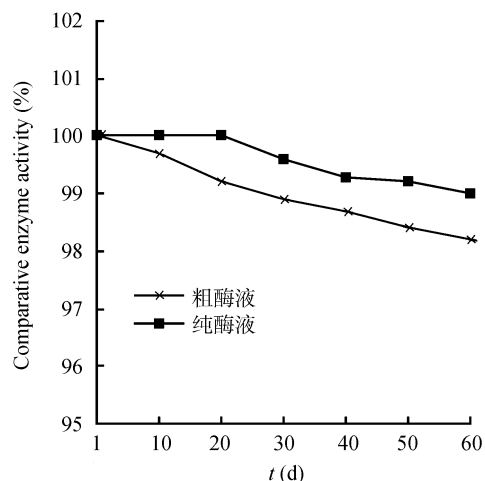


图5 酶的低温保存稳定性

Fig. 5 Stability of lactase kept in low temperature

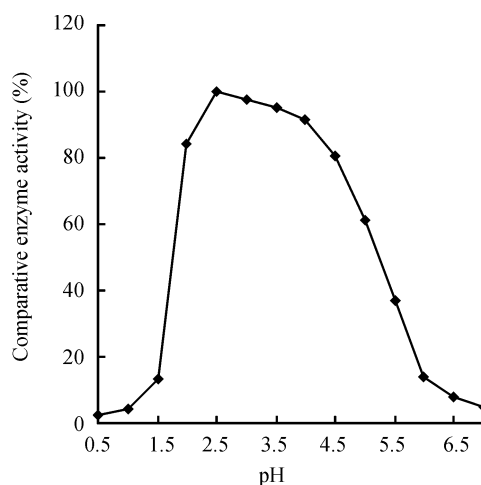


图6 pH 对酶活力的影响

Fig. 6 Effect of pH on activity of lactase

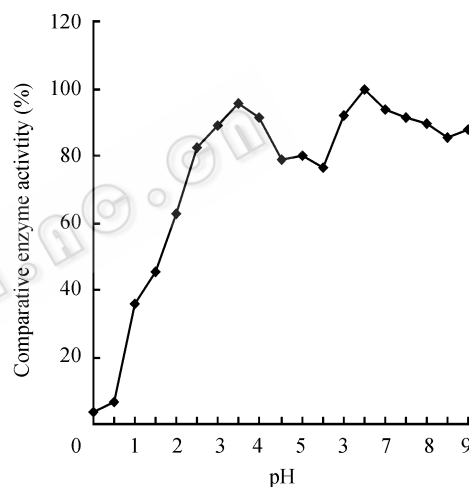


图7 酶的 pH 稳定性

Fig. 7 pH stability of lactase

黑曲霉 D2-26 乳糖酶在 70℃ 条件下对 pH 的耐受性呈双峰曲线，酶蛋白具有良好的 pH 稳定性，pH 稳定范围在 2.0~9.0，在 pH 6.5 时的耐受性最高，但在低于 pH 2 的条件下酶活迅速降低。

2.6 金属离子对酶活性的影响

在酶活测定体系中(HAc/NaAc 缓冲液)分别加入各种金属离子，测定乳糖酶相对活力，以对照为 100 计算(对照采用未加任何离子的纯酶液进行测定)，其酶活的相对值如表 1 所示：

从表 1 可以看出， Mn^{2+} 对乳糖酶活性有显著的激活作用， Ag^+ 、 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对酶活性均有一定的抑制作用，特别是 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 的抑制作用较强，可能是影响了酶活性中心的巯基，从而使蛋白质变性降低其酶活力。 Li^+ 、 K^+ 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、

表 1 金属离子对酶活的影响
Table 1 Effect of metal ions on activity of lactase

金属离子(Ion) (2 mmol/L)	相对酶活力 (Comparative enzyme activity)
对照(Comparison)	100
Li ⁺	106.54
Ag ⁺	97.47
K ⁺	109.09
Mn ²⁺	144.94
Al ³⁺	111.78
Fe ²⁺	116.67
Mg ²⁺	117.19
Zn ²⁺	112.57
Fe ³⁺	111.78
Pb ²⁺	48.52
Cu ²⁺	108.81
Ca ²⁺	107.24
Hg ²⁺	61.69

注：以上试验均做 2 次平行，重复 2 次，数值为试验结果的平均值

Ca²⁺、Al³⁺和Fe³⁺等离子对黑曲霉D2-26 乳糖酶均有不同程度的激活作用，这些金属离子可能会在酶蛋白中形成盐桥从而稳定酶蛋白的立体结构，在一定程度上提高了酶活性。

2.7 其它试剂对酶蛋白的影响

在反应体系中加入其他相应试剂(底物、金属离子络和剂、变性剂)，测定乳糖酶相对活力，以对照为 100 计算 (对照采用未加任何其他试剂的纯酶液进行测定)，其酶活的相对值如表 2 所示：

表 2 其他试剂对酶活的影响
Table 2 Effect of other reagents on activity of lactase

相关试剂(8 mmol/L) Reagents	相对酶活力 Comparative enzyme activity
对照 Comparison	100
葡萄糖 Glucose	106.19
EDTA	99.88
半乳糖 Galactose	89.44
SDS	14.14

注：以上试验均做 2 次平行，重复 2 次，数值为试验结果的平均值

从表 2 中可以看出，半乳糖对黑曲霉 D2-26 乳糖酶有一定抑制作用，葡萄糖在一定程度上提高了酶的活性，SDS 对乳糖酶活性有较为强烈的抑制作用。EDTA 对酶活性的影响不显著。

2.8 乳糖酶动力学常数测定

通过设定底物浓度梯度，测定在不同浓度下的反应速率，绘制酶动力学曲线图 8。由图可以计算出

乳糖酶以 ONPG 为底物时的 V_{max} 为 97 nmol/min, $K_m=8.77$ mmol/L。

2.9 乳糖酶分子量及亚基数的测定

纯乳糖酶的 SDS-PAGE 电泳检测为单一条带，说明该乳糖酶是由同一亚基组成的单聚体或多聚体。其单亚基分子量为 116.978 kD。

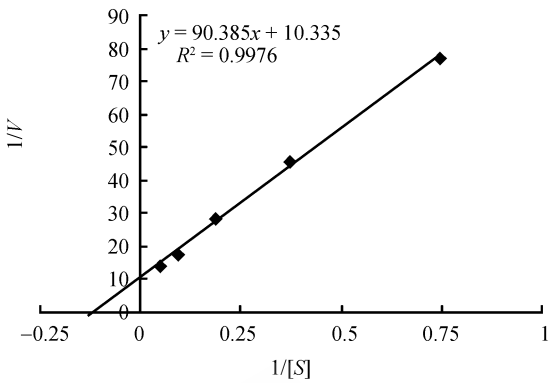


图 8 酶蛋白水解 ONPG 的动力学曲线
Fig. 8 Kinetic conic of ONPG hydrolysed by enzyme protein

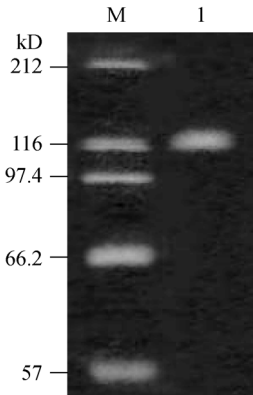


图 9 乳糖酶的 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 9 SDS-PAGE of lactase

2.10 乳糖酶蛋白糖基化程度的测定结果

直接由糖基化测定公式计算得到黑曲霉 D2-26 乳糖酶的糖基化程度为 11.3%，较高的糖基化可以在一定程度上对酶蛋白起稳定作用，或许这也是其作用最适温度较高的一个原因。

3 讨论

乳糖酶应用研究已开展多年，到目前为止还未达到商业化应用。限制乳糖酶大规模工业化生产

的因素有许多,其中之一就是乳糖酶的耐热性。

本试验采用的黑曲霉D2-26产生的乳糖酶的最适作用温度高,且作用温度较广,在30~60有较高的耐受性。但在80时酶活很低,可能是由于高温使酶蛋白分子中的非共价键断裂,破坏了酶蛋白的天然构象降低其酶活性。乳糖酶的最适作用pH为2.5,作用pH较宽。然而当pH超过5.0时酶活显著降低,主要原因可能是由于酸碱的变化影响酶蛋白活性中心氨基酸残基的解离情况所引起的。 Li^+ 、 K^+ 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 和 Fe^{3+} 等离子对黑曲霉D2-26乳糖酶均有不同程度的激活作用,可能是因为这些金属离子会在酶蛋白中形成盐桥以稳定酶蛋白的立体结构,因此在一定程度上提高了酶活性。

乳糖酶在医药领域的主要用途是制成口服制剂。目前国外市场上出售的剂型主要有片剂和滴剂两种类型,如美国的Lact Aid,意大利的Lacty ma等^[14]。而国内目前还没有此类产品。黑曲霉D2-26产生的乳糖酶具有良好的耐酸性pH,将其制成口服制剂将具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1998, p. 780.
- [2] 高秀容, 马力, 叶华. β -半乳糖苷酶的研究进展. 生物技术通报, 2005, 3: 18-20.
- [3] 何梅, 杨月欣. 乳糖酶缺乏和乳糖不耐受. 国外医学卫生学分册, 1999, 16(6): 339-342.
- [4] Boyer PD. The enzymes. 3th. New York: Academic Press Inc, 1972, pp. 618-665.
- [5] 史应武, 娄恺, 常玮, 等. 一株产高温 β -半乳糖苷酶低温菌株及其酶学性质研究. 食品与发酵工业, 2007, 33(2): 56-58.
- [6] Huang DQ, Prévost H, Diviès C. Principal characteristics of β -Galactosidase from *Leuconostoc* spp.. *International Dairy Journal*, 1995, 5(1): 29-43.
- [7] Brady D, Marchant R, McHale L, et al. Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, 17(8): 696-699.
- [8] Shaikh SA, Khire JM, Khan MI. Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp.. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1472(1-2): 314-322.
- [9] Van Casteren WHM, Eimermann M, Van den Broek LAM, et al. Purification and characterisation of a β -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39 and B891. *Carbohydrate Research*, 2000, 329(1): 75-85.
- [10] Nakkharat P, Haltrich D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with β -glucosidase and β -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. *Journal of Biotechnology*, 2006, 123(3): 304-313.
- [11] 李宁, 祝彦忠, 贾英民. 黑曲霉乳糖酶高产菌株的诱变选育. 中国食品学报, 2006, 6(5): 54-58.
- [12] 赵永芳. 生物化学技术原理及应用. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, pp. 358-364.
- [13] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1994, p. 16.
- [14] 谭树华, Hadeel A malek A Majid, 高向东, 等. 脆壁克鲁维酵母乳糖酶提取物性质研究. 药物生物技术, 2000, 7(3): 153-156.