

# 诺卡氏菌形放线菌 $\beta$ -甘露聚糖酶的水解特性\*

吴 襟<sup>1</sup> 段子渊<sup>2\*\*</sup> 高启禹<sup>1</sup> 沈 文<sup>3</sup> 马延和<sup>1</sup>

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)<sup>1</sup>

(中国科学院遗传与发育生物学研究所 北京 100028)<sup>2</sup> (新疆石河子大学 石河子 832003)<sup>3</sup>

**摘要:** 诺卡氏菌形放线菌 (*Nocardioform actinomycetes*) NA3-540 产生的  $\beta$ -甘露聚糖酶 (ManNA) 能不同程度地水解槐豆胶、瓜胶、田菁胶和魔芋胶等甘露多聚糖为组分的植物胶, 生成系列甘露寡糖; 该酶只轻微地水解香豆胶, 不能水解  $\beta$ -甘露聚糖、黄原胶、海藻胶; ManNA 对槐豆胶、瓜胶和魔芋胶多糖的  $K_m$  值和  $V_{max}$  分别为 1.75、6.13、3.9 mg/mL 和 2485、1303、853  $\mu\text{mol}/(\text{min}/\text{mg})$ , 表明槐豆胶是该酶的理想水解底物。ManNA 水解几种植物胶的明显差异, 表明甘露聚糖的糖链组成和空间结构明显地影响着  $\beta$ -甘露聚糖酶的水解活性。

**关键词:**  $\beta$ -甘露聚糖酶, 水解, 甘露聚糖

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0031-05

## Hydrolytic Properties of $\beta$ -Mannanase from *Nocardioform actinomycetes*\*

WU Jin<sup>1</sup> DUAN Zi-Yuan<sup>2\*\*</sup> GAO Qi-Yu<sup>1</sup> SHEN Wen<sup>1,3</sup> MA Yan-He<sup>1</sup>

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)<sup>1</sup>

(Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100028)<sup>2</sup>

(Shihezi University, Shihezi 832003)<sup>3</sup>

**Abstract:** Endo-1, 4- $\beta$ -D-mannanase (ManNA) from a *Nocardioform actinomycetes* NA3-540 was capable of hydrolyzing locust bean gum, guar gum, tian-jing gum, konjak gum and cassia tora gum to product serial manno-oligosaccharides in different velocity and degree, but it hydrolyzed the cassiafora gum in a slight limit and hardly hydrolyzed  $\alpha$ -mannan, xanthan, alginates and carrageenan. Michaelist constants ( $K_m$ ) of the ManNA for locust bean gum, guar bean gum and konjak gum were 1.75, 6.13, 3.9 mg/mL, and maximum velocity ( $V_{max}$ ) of the enzyme for these saccharides were 2485, 1303, 853  $\mu\text{mol}/(\text{min}/\text{mg})$  respectively. It suggested that Locust bean gum was the better hydrolysis substrate for the enzyme. It was observed that there were significant different for the ManNA in the hydrolysis of several mannan gums. It suggested that the hydrolysis progress was affected by the composition and structure of these polysaccharides.

**Key words:**  $\beta$ -mannanase, Hydrolysis, Mannan

$\beta$ -1, 4-D-甘露聚糖酶 ( $\beta$ -1, 4-D-mannan mannanohydrolase, EC. 3.2.1.78), 又简称为  $\beta$ -甘露聚糖酶 ( $\beta$ -mannanase), 是一类能够水解含有  $\beta$ -1, 4-D-甘露糖苷键的甘露聚糖的内切水解酶<sup>[1]</sup>。这些甘露聚糖主要包括槐豆胶、瓜胶、香豆胶和田菁胶等植物籽胶, 常作为增稠剂在食品、石化等诸多工业中广泛应用, 是一类有很好开发前景的丰富植物资源。该类植物胶分子量大, 结构复杂, 粘度高, 较难加工处理; 而用  $\beta$ -甘露聚糖酶对其进行适当水解, 能降低其分子量和粘度, 增加其溶解性, 提高了甘露多

\* 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (No. KSCX2-SW-323)

\*\* 通讯作者 Tel: 010-62652018, E-mail: zyduan@cashq.ac.cn

收稿日期: 2005-10-08, 修回日期: 2005-11-30

聚糖植物胶的综合利用效果。随着近来对甘露寡糖药用价值的发现,  $\beta$ -甘露聚糖酶的研究和开发又进入一个新高潮, 现已在食品、医药、造纸、农业饲料、纺织印染、石油开采及生物研究技术等多方面广泛运用<sup>[2]</sup>。诺卡氏菌 NA3-540 产生的  $\beta$ -甘露聚糖酶 (ManNA), 具有热稳定性好, 耐碱性强, 降粘效果明显的优点, 应用于中低温油井压裂液的破胶和保健食品低聚寡糖的生产中, 已取得了很好的经济效益。本文对该酶水解特性作了详细研究, 并对  $\beta$ -甘露聚糖酶水解机制进行一些探讨和研究, 希望其能更好地应用于生产实践中。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌的培养和酶的提取: 分别参见文献 [3]。

1.1.2 主要试剂: 槐豆胶、 $\alpha$ -甘露聚糖和甘露寡糖 (Sigma 公司); 田菁胶 (江苏盐城双洋植物胶厂); 瓜胶、香豆胶 (印度产); 魔芋胶 (成都魔芋精粉厂); 羟丙基瓜胶、黄原胶、海藻胶 (东营油田化学制剂厂); 卡拉胶 (英国 AB 公司); 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 酶活力测定: ManNA 的测定参见文献 [3], 底物植物胶分别用 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 配制, 本实验中酶液 (ManNA) 活力为 1u/mL。

1.2.2 糖的高压液相色谱分析法: 色谱柱, Suger-park-I 糖分析柱; 检测器, 示差检测器; 流动相, H<sub>2</sub>O; 流速: 0.7 mL/min, 柱温: 90℃。

1.2.3 糖的硅胶板薄层色谱分析法: 按 Powning 的方法<sup>[4]</sup>, 展开剂为: 正丁醇: 乙酸: 水 = 2: 1: 1, 上行展开 4 次。显色剂为 4g 二苯胺和 4mL 苯胺溶于 200 mL 丙酮和 20 mL 85% 的磷酸的混合液。硅胶板浸泡显色剂后, 在红外烤箱中 90℃ 烘 10 ~ 15min 可见层析结果。

1.2.4 还原糖的测定: DNS 法<sup>[5]</sup>。

2 结果

2.1 不同甘露聚糖底物胶酶解速度的比较

分别向 0.9mL 0.5% (W/V) 的各种植物胶中加入 0.1mL 酶液, 60℃ 保温 10min, 测定生成的还原糖量, 以水解槐豆胶的还原糖生成值为 100%, 对比计算其他植物胶的相对反应初速度 (表 1)。

表 1 酶对不同底物相对反应初速度的比较

底物	反应初速度 (%)	底物	反应初速度 (%)
槐豆胶	100	香豆胶	2.4
瓜胶	33.7	卡拉胶	0
羟丙基瓜胶	25.8	海藻酸胶	0
田菁胶	41.2	$\alpha$ -甘露聚糖	0
魔芋胶	12.2	黄原胶	0

从表 1 可以看出, 几种甘露聚糖中, ManNA 对槐豆胶的水解初速度最大, 其后依次是田菁胶、瓜胶、羟丙基瓜胶、魔芋胶、香豆胶。

2.2 不同植物胶酶解程度的比较

向 5mL 1% (W/V) 植物胶中加入 5mL 酶液, 60℃ 保温 24 h, 反应完全后, 分别用高压液相分析法和硅胶板薄层色谱法检测其水解产物; 测定生成的还原糖量并用酸水解法测定总糖量, 算出其最终水解率<sup>[5]</sup>。结果如图 1、图 2、表 2 所示。

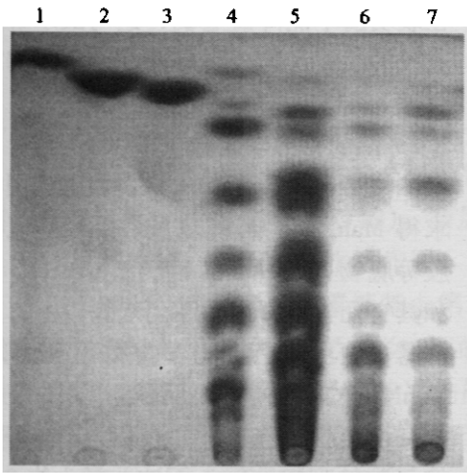


图 1 ManNA 水解几种植物胶产物的薄层图谱  
1 甘露糖, 2 葡萄糖, 3 乳糖, 4 槐豆胶水解产物, 5 魔芋胶水解产物, 6 田菁胶水解产物, 7 瓜胶水解产物

表 2 酶对几种植物胶的水解效果

底物	最终水解率 (%) *
槐豆胶	64.9
魔芋胶	56.6
瓜胶	34.8
田菁胶	55.8

\* 水解率 (%) = 酶解液还原糖量/总糖量 × 100 (%)

以上实验结果表明, ManNA 不能彻底水解这些植物胶, 其水解终产物均为一系列寡糖, 其中槐豆胶和魔芋胶的产物主要是六糖以下的小分子寡糖及单糖, 而瓜胶、田菁胶的除含有部分小分子寡糖, 更多组分是七糖以上的大分子寡聚糖。ManNA 对槐豆胶的水解率最大, 其后依次是魔芋胶、田菁胶和瓜胶。

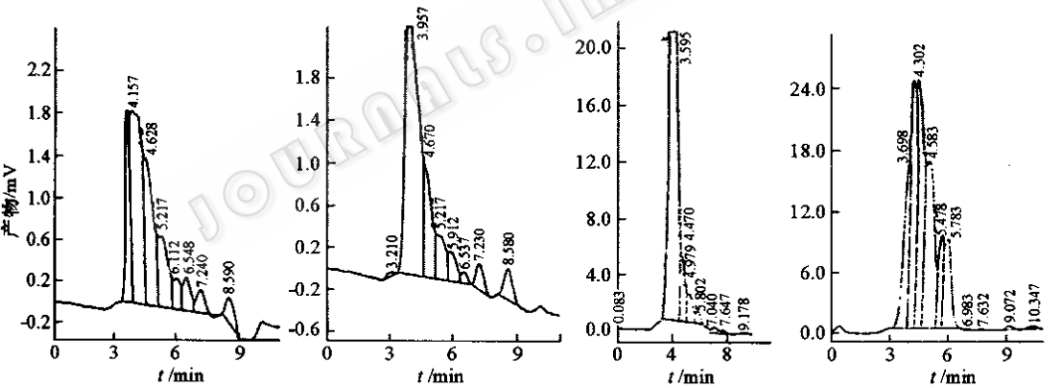


图 2 ManNA 水解几种植物胶产物的高压液相图谱

1 槐豆胶水解产物, 2 田菁胶水解产物, 3 瓜胶水解产物, 4 魔芋胶水解产物

2.3 不同时间槐豆胶酶解程度的变化

向 0.5% (W/V) 槐豆胶中加入适量酶液, 60℃ 保温反应, 在不同时间后分别取样, 分析测定不同时间胶液水解产物的变化组成。

如图 3 所示, 在 ManNA 的水解过程中, 初始产物中就含有一系列不同分子量的寡糖, 并随着反应的进行, 所有寡糖的生成量几乎逐渐同步增加, 这表明酶对槐豆胶半乳糖聚糖的水解是一个随机的内切过程; 参考标准糖的位置, 从图中推测出槐豆胶水解 24 h 后, 主要终产物从上到下依次为甘露糖、甘露二糖、半乳糖、半乳糖二糖 (上方有微量的甘露三糖)、半乳糖三糖等, 产物中不含有葡萄糖和半乳糖, 这个结果和文献[6, 7]中报道的基本相符; 此外在水解初期, 产物中有少量甘露三糖存

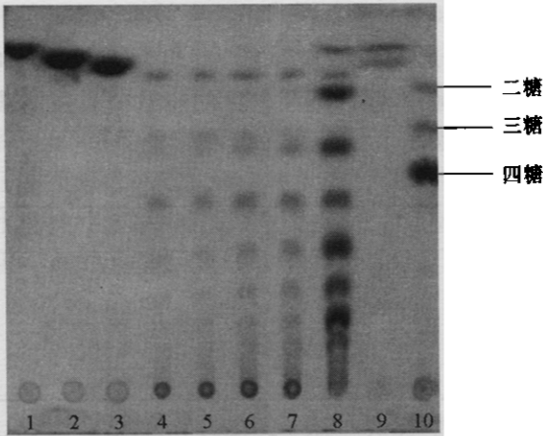


图3 不同时间 ManNA 水解槐豆胶产物的薄层图谱  
1 甘露糖, 2 葡萄糖, 3 乳糖, 4 槐豆胶水解 5 min, 5 槐豆胶水解 10 min, 6 槐豆胶水解 30min, 7 槐豆胶水解 1h, 8 槐豆胶水解 24 h, 9 槐豆胶酸水解产物, 10 标准寡糖 (甘露二糖、三糖、四糖)

在, 但无甘露糖; 而至水解后期, 甘露糖出现, 甘露三糖却几乎没有了, 表明它可能被进一步水解为甘露糖和甘露二糖。而其它半乳甘露低聚寡糖的稳定存在表明酶不能降解它们, 这与酸水解槐豆胶的最终产物全是单糖 (半乳糖和甘露糖) 有着明显差别。

### 2.4 酶的动力学常数

按 Lineweaver-Burk 双倒数法作图法求得 ManNA 水解槐豆胶、瓜胶和魔芋胶等底物时的  $K_m$  和  $V_{max}$  值 (见表 3)。和其它几种已报道的不同来源微生物  $\beta$ -甘露聚糖酶的酶动力学常数比较表明, ManNA 水解槐豆胶的  $K_m$  值最小, 表明它和槐豆胶有着很好的亲和力, 是降解槐豆胶的理想选择。而这些微生物  $\beta$ -

甘露聚糖酶对几种甘露聚糖底物水解初速度和亲和力的不同差异也表示, 不同来源的酶对不同类型的甘露聚糖具有各自的水解优势。

表 3 几种不同来源  $\beta$ -甘露聚糖酶的酶动力学常数的比较

酶来源	$K_m$ (mg/mL)			$V_{max}$ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )		
	槐豆胶	瓜胶	魔芋胶	槐豆胶	瓜胶	魔芋胶
诺卡氏菌形放线菌 NA3-540	1.75	6.13	3.9	2485	1303	853
嗜碱性芽孢杆菌 N16-5 <sup>[8]</sup>	1.86	/	2.9	29000	/	27500
嗜碱性芽孢杆菌 AM-001 <sup>[9]</sup>	3.8	/	7.7	1470	/	1880
地衣芽孢杆菌 NK-27 <sup>[10]</sup>	5.56	/	7.14	157.45	/	200.53
瘤曲霉 IP1017-10 <sup>[11]</sup>	2.0	4.0	/	43.5	50	/
烟曲霉 IMI 385708 <sup>[7]</sup>	3.07	/	/	1935	/	/

## 3 讨论

田菁胶、槐豆胶、香豆胶和瓜胶的主要组分是半乳甘露聚糖, 主要来源于豆科植物种子, 主链由 D-甘露吡喃糖通过  $\beta$ -1, 4-糖苷键连接而成, 在部分 C<sub>6</sub> 位连接有数量不等的  $\alpha$ -D-吡喃半乳糖侧链 (见图 4); 魔芋胶是由葡萄糖和甘露糖通过  $\beta$ -1, 4-糖苷键混合连接而成的葡萄糖甘露聚糖, 来源于魔芋球茎。这些植物胶都有较大的分子量。其中田菁胶和魔芋胶分子量一般常在 80 万以上, 槐豆胶、瓜胶和香豆胶分子量一般在 30 万以下。这些植物胶多糖分子主链一般都有较多自由羟基, 并伴有不同程度的糖基侧链连接。它们易与水分子形成氢键, 所以一般易溶于水而难溶于有机溶剂, 其胶溶液在 pH 4 ~ 10 范围内稳定并有较高的粘度。通过前面的一系列实验表明, 由于这些植物多糖的结构、组成相差较大, 使得  $\beta$ -甘露聚糖酶在水解它们时, 结果有相似, 但也存在一些差异; 总结后可以得到以下两点推论。

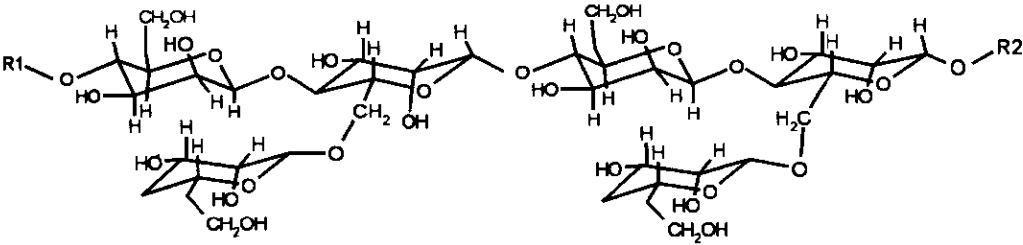


图 4 半乳甘露聚糖的结构示意图

(1)  $\beta$ -甘露聚糖酶对底物有严格的键专一性 ( $\beta$ -1, 4-甘露糖苷键)。如酶对酵母甘露聚糖 (含  $\alpha$ -1, 4-甘露糖苷键)、黄原胶 (含  $\beta$ -1, 3-甘露糖苷键)、卡拉胶 (含  $\beta$ -1, 4-半乳糖苷键) 没有任何水解作用。

(2) 甘露聚糖主链的甘露糖基上第 6 位自由羟基可能是酶结合底物的重要位点, 其被修饰或取代, 能不同程度地影响酶的水解速度, 如羟丙基瓜胶 (瓜胶主链上部分甘露糖基 6 位羟基被修饰为羟丙基) 的酶解速度低于瓜胶; 而海藻胶 (其主链上甘露糖基 6 位羟基为糖醛酸基团代替) 则完全不能被水解; 半乳甘露聚糖 (部分甘露糖基上 6 位羟基被半乳糖基取代) 主链上半乳糖基数量越多、空间分布越密 (香豆胶) 瓜胶) 田菁胶) 槐豆胶, 见表 4), 其被酶作用的水解速度和程度就越低。

表 4 常见甘露聚糖平均糖残基组成之比 (Man: Gal)

香豆胶	瓜胶	田菁胶	槐豆胶
1.3	2.0	2.5	4.1

同时由于构成这些甘露多聚糖的单糖类型、聚合度、糖键连接及排列方式等情况各异, 导致不同的多糖在溶解度、粘度、稳定能力等性质上存在着明显的差别。这些因素也都极大影响了  $\beta$ -甘露聚糖酶的水解。将以上这些实验结果运用到具体工作中, 一般可以认为: 难溶性的甘露多聚糖一般较可溶性的难水解; 糖组份复杂的一般较组份简单的难水解; 主链糖基上 6 位自由羟基数量少的一般较多的难水解; 多分支侧链的甘露聚糖一般较少分支线状的难水解。

参 考 文 献

[1] Schomburg D, Salzmann M. Enzyme Handbook (4). -NY: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1991. 1 ~ 5.  
[2] 吴 襟, 何秉旺. 微生物学通报, 1999, 26 (2): 134 ~ 136.  
[3] 吴 襟, 何秉旺. 微生物学报, 2000, 40 (1): 69 ~ 74.  
[4] Powning R F. J Chromatogr, 1967, 29: 115 ~ 119.  
[5] 张惟杰编. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1994. 155 ~ 158.  
[6] McCleary A V, Nurthen E, Taravel F R, et al. Carbohydrate Research, 1983, 118 (1): 91 ~ 109.  
[7] Pucharta V, Vranska M, Svoboda P, et al. Biochimica Biophysica Acta, 2004, 1674 (3): 239 ~ 250.  
[8] 田新玉, 徐 毅, 马延和, 等. 微生物学报, 1993, 32 (2): 115 ~ 121.  
[9] Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. Agric Biol Chem, 1988, 52 (3): 773 ~ 779.  
[10] 杨文博, 修树敏, 沈 庆. 微生物学通报, 1995, 22 (6): 338 ~ 342.  
[11] Civas R, Eberhard P, Petek F. Biochem J, 1984, 219: 857 ~ 863.