

海枣曲霉产生的糖苷酶类

曾宇成 张树政

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 以木聚糖酶、 β -D-岩藻糖苷酶活力较高的海枣曲霉作为试验菌株。该菌株的粗酶液含有多

本所齐祖同教授鉴定菌种,特此致谢。

种糖苷酶,活力较高的有木聚糖酶、地衣多糖酶、 β -木糖苷酶、 α -半乳糖苷酶、 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、 β -D-岩藻糖苷酶及 β -半乳糖苷酶等。其 β -D-岩藻糖苷酶活力还高于 β -半乳糖苷酶。将海枣曲霉培养不同时间后测活力,表明木聚糖酶在培养的第2天即大量产生,第3天达到高峰。 β -D-岩藻糖苷酶在第4天开始产生,第5天达到高峰。培养不同时间的粗酶液的盘状凝胶电泳分析结果表明,培养2天时,可检测到木聚糖酶等少数 R_m 值较大的组份,到第3天,即出现各种 R_m 值的组份。

关键词 糖苷酶类;海枣曲霉

霉菌是糖苷酶的一个重要来源。现在广泛应用的葡萄糖淀粉酶、纤维素酶和果胶酶等,都是由霉菌产生的。霉菌还产生很多其他的糖苷酶,这些酶还没有得到应有的重视和研究,但其潜在的应用价值不可低估。为了深入探讨真菌产生的糖苷酶,比较了一些霉菌产生糖苷酶的能力。从中挑选出木聚糖酶和 β -D-岩藻糖苷酶活力较高,蛋白酶活力低的海枣曲霉作为糖苷酶的产生菌,并对其产生的糖苷酶种类、产酶条件及培养过程中凝胶电泳图谱的变化进行了初步研究。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

海枣曲霉(*Aspergillus phoenicis*) AS 3.3143及其他菌株,均由我所八室提供。

(二) 主要化学试剂

对-硝基酚基- β -D-岩藻糖苷(PNP- β -fuc)、对-硝基酚基- α 或 β -半乳糖苷(PNP- α 或 β -gal)、对-硝基酚基- α 或 β -葡萄糖苷(PNP- α 或 β -glc)、对-硝基酚基- α 或 β -甘露糖苷(PNP- α 或 β -man)、对-硝基酚基- β -木糖苷(PNP- β -Xyl)、对-硝基酚基- α 或 β -N-乙酰氨基半乳糖苷(PNP- α 或 β -galNAC)及对-硝基酚基- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷(PNP- β -glcNAC),均为Sigma公司产品。羧甲基纤维素(CMC),中国长红塑料厂产品。 β -1,2-葡聚糖、昆布多糖(Larminarin, β -1,3-葡聚糖)、地衣多糖(lichenin, β -1,3-1,4-葡聚糖)及石脐素(Pustulan, β -1,6-葡聚糖)为Miles公司何方先生赠。木聚糖,为本所方一澄同志从稻草中制备。

(三) 酶活力的测定

1. 以各种对-硝基酚基- α 或 β -糖苷作底物时,反应系统为酶液50 μ l,0.1M柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液(pH6.0)100 μ l,5mM底物100 μ l,加蒸馏水到终体积500 μ l。40 $^\circ\text{C}$ 反应15分钟,加3ml 0.2M Na_2CO_3 ,测 A_{400nm} 。在此条件下,每分钟形成1 μ mol对-硝基酚为1个酶活力单位。

2. 以木聚糖、 β -葡聚糖等为底物时,则取适当稀释的酶溶液0.5ml,1%底物(溶于pH6.0,0.1M柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液)0.5ml,40 $^\circ\text{C}$ 反应15分钟后,用Somogyi-Nelson法^[1]测定产生的还原糖。以木糖或葡萄糖为标准,在本实验条件下,每分钟形成1 μ mol还原糖为1个酶活力单位。

(四) 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

按Davis法^[2],凝胶浓度7%,缓冲液pH8.3。

结 果 和 讨 论

(一) 海枣曲霉产生的糖苷酶类

在对霉菌*Aspergillus* AS 3.3143、3.324、3.3165及*Monascus* AS 3.897、3.887、3.2160等菌株的麦麸培养物抽提液中的木聚糖酶、 β -D-岩藻糖苷酶和蛋白酶的活力进行初步比较后,本实验即以木聚糖酶、 β -D-岩藻糖苷酶活力较高、蛋白酶活力较低的*Aspergillus* AS 3.3143作为糖苷酶的产生菌。经鉴定,该菌株为海枣曲霉(*Asp. phoenicis*)。

将海枣曲霉在含10g麦麸,15ml水的培养基上,于28 $^\circ\text{C}$ 培养5天,再用50ml蒸馏水浸泡后,过滤,滤液即为粗酶液。按标准条件测定此粗酶液对各种底物的水解活力。结果表明,该粗酶液含有的糖苷酶种类很多,其中活力较高

的有木聚糖酶、地衣多糖酶、CMC 酶及 β -木糖苷酶、 α -半乳糖苷酶、 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、 β -D-岩藻糖苷酶及 β -半乳糖苷酶等(表 1)。由于该粗酶液中的木聚糖酶、地衣多糖酶的活性很高, β -D-岩藻糖苷酶的活性还高于 β -半乳糖苷酶,因而很有深入研究的价值。

表 1 海枣曲霉粗酶液对不同底物的水解活性

| 底物 | 活力 (u/ml) | 底物 | 活力 (u/ml) |
|--------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| 木聚糖 | 26 | PNP- β -gal | 0.22 |
| β -1,2-葡聚糖 | 0.04 | PNP- α -glc | 0.03 |
| 昆布多糖 | 0.78 | PNP- β -glc | 0.53 |
| 地衣多糖 | 8.20 | PNP- α -man | 0 |
| 石脐素 | 0.10 | PNP- β -man | 0.06 |
| CMC | 2.16 | PNP- β -xyl | 1.06 |
| 菊糖 | 0.27 | PNP- α -galNAC | 0.02 |
| PNP- β -fuc | 0.49 | PNP- β -galNAC | 0.35 |
| PNP- α -gal | 0.61 | PNP- β -glcNAC | 0.56 |

(二) 菌的培养时间与其产木聚糖酶、 β -D-岩藻糖苷酶活力的关系

将海枣曲霉按常法培养 1.5、2、3、4 和 5 天,加蒸馏水抽提,制备粗酶液。再按标准条件测定木聚糖酶、 β -D-岩藻糖苷酶的活力。结果表明,该菌株培养 2 天即开始大量产生木聚糖酶、第 3 天达到较高值。第 4 天开始大量产生 β -D-岩藻糖苷酶,第 5 天达到较高值(图 1)。据观察,培养 2 天时,海枣曲霉的菌丝开始大量生长,第 3 天整个培养基内布满菌丝,并开始形

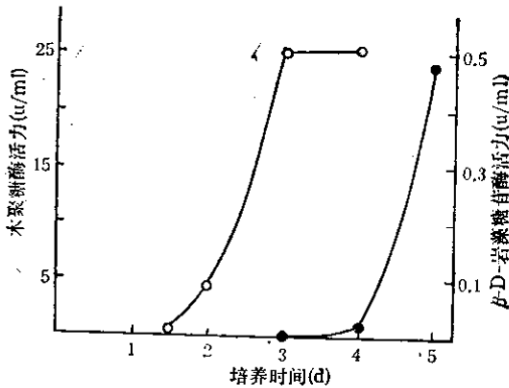


图 1 培养不同时间海枣曲霉产生的木聚糖酶和 β -D-岩藻糖苷酶

○—○ 木聚糖酶; ●—● β -D-岩藻糖苷酶

成少量孢子,第 4 天则大量形成孢子。从海枣曲霉的菌丝生长情况与产酶关系看,木聚糖酶在菌丝生长前期即大量产生,表明该酶可能涉及为菌丝的生长提供营养物质。在海枣曲霉菌丝的旺盛生长期,一直很少产生 β -D-岩藻糖苷酶,直到营养生长几乎停止,大量形成孢子时,才可在培养基内测到较高活力的 β -D-岩藻糖苷酶。这些结果可能说明,在麦麸内有些多糖或糖蛋白,其分子内含有 β -D-岩藻糖苷键。随着菌丝的生长,含有该键的大分子被降解,产生一些小分子的 β -D-岩藻糖苷,进而诱导该菌产生 β -D-岩藻糖苷酶。也有可能是在菌的生长期间, β -D-岩藻糖苷酶存在于菌丝体内,只是到菌丝生长后期,部份菌丝自溶,才能在培养基中测到该酶。由于在菌丝生长几乎停止时, β -D-岩藻糖苷酶才大量出现在培养基内,这意味着由该酶的水解作用为菌丝的生长提供营养物质的可能性较小。但粗酶液中 β -D-岩藻糖苷酶活性比 β -半乳糖苷酶等许多酶的活性都高,这又似乎表明该酶在海枣曲霉的生长、繁殖过程中是起到某种作用的。

(三) 不同时间培养的粗酶液的凝胶电泳图谱与糖苷酶谱

将上述不同时间培养的粗酶液样品进行盘状凝胶电泳,然后染色,观察凝胶上蛋白质区带

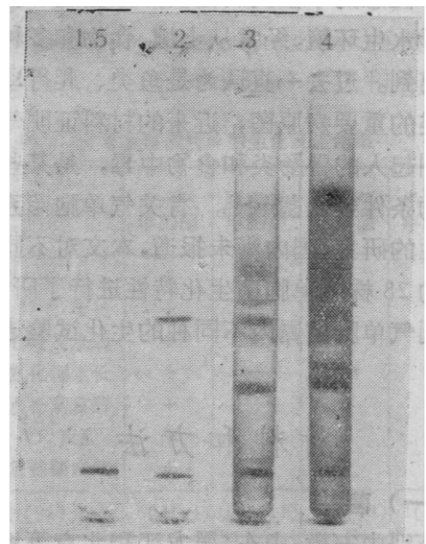


图 2 培养不同时间的海枣曲霉粗酶液的盘状凝胶电泳图谱
培养时间(从左至右)分别为 1.5、2、3、4 天

的变化。并将同样条件下电泳后的凝胶切成 0.5cm 宽的小段,放试管内搅碎,加蒸馏水浸泡后,取少量浸泡液测各种糖苷酶活力,并将剩余的浸泡液进行电泳,以确定糖苷酶在凝胶上的区带位置。电泳结果表明,培养 36 小时,样品中只有一条比较清楚的带。第 2 天,即出现少数 R_m 较大的蛋白质区带。第 3 天,则可观察到大量不同 R_m 值的蛋白质的成份。第 4 天增加到更多。糖苷酶谱分析结果表明,培养 2 天的样品中只能检测到木聚糖酶、CMC 酶等 R_m 较大的内切型酶。培养到第 4 天,除了这些内

切酶外,还有大量 R_m 值较小的各种糖苷酶: β -葡萄糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、 β -木糖苷酶、地衣多糖酶等(图 2)。由此可见,海枣曲霉培养到第 3 天,产生的细胞外蛋白质已相当多,同时可测到多种糖苷酶,因而可以认为这些蛋白质中的很大部分为糖苷酶。

参 考 文 献

- [2] Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 195: 19—23, 1952.
- [2] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404—427, 1964.