

微生物 β -甘露聚糖酶

吴 襟 何秉旺

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 β -甘露聚糖酶, 甘露多糖

分类号 Q93-936 文献标识码 C 文章编号 0253-2654(1999)-02-0134-36

β -1, 4-D-甘露聚糖酶 (β -1, 4-D-mannan mannanohydrolase, EC. 3. 2. 1. 78), 又简称为 β -D-甘露聚糖酶或 β -甘露聚糖酶 (β -D-mannanase, β -mannanase), 是一类能够水解含有 β -1, 4-D-甘露糖苷键的甘露寡糖、甘露多糖(包括甘露聚糖、半乳甘露聚糖、葡甘露聚糖等)的水解内切酶^[1], 它属于半纤维素酶类。

早在本世纪初, 就有分解植物甘露聚糖酶的最初报道^[2], 但直到 50 年代以后, 许多产 β -甘露聚糖酶的微生物陆续被发现报道, 其研究才逐渐深入起来, 步入了一个黄金时期。微生物 β -甘露聚糖酶的研究工作早期主要集中在菌种的筛选、诱变, 酶的诱导、提纯及性质, 酶水解底物方式等方面; 进入 90 年代后, 随着基因工程技术和蛋白质工程技术的广泛运用, 越来越多的工作

集中在酶基因的克隆表达和活性位点的研究方面; 到目前为止, 已有嗜高温细菌菌株 KM-THCJ^[3]、葡萄白地霉 (*Caldocellum saccharolyticum*)^[4]、变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 66^[5] 等多种微生物的 β -甘露聚糖酶基因被先后克隆和表达。特别近来随着对自然界半纤维素资源的开发及甘露寡糖药用价值的发现, 其研究更加令人瞩目, 微生物 β -甘露聚糖酶的开发和利用正在进入一个新时代。

1 β -甘露聚糖酶的来源和诱导

β -甘露聚糖酶广泛存在于自然界中。在一些低等动物, 如海洋软体动物 *Littorina brevicula* 的肠道分泌液中, 豆类植物如四棱豆、长角豆等萌发的种子中, 天

1997-12-30收稿, 1998-06-29修回

南星科(Araceae)植物魔芋萌发的球茎中都发现了酶活性的存在。而对于微生物,更是产生 β -甘露聚糖酶的主要来源。已报道的如细菌中的芽孢杆菌、假单胞菌、弧菌,真菌里的曲霉、木霉、酵母、青霉、梭孢菌、多孔菌、核盘菌和放线菌中的链霉菌等都是产 β -甘露聚糖酶的常见类群。微生物来源的 β -甘露聚糖酶具有活力高、成本低、来源稳定、提取方便等明显优点,已在实际生产和基础研究中得到广泛应用。

大部分研究资料表明, β -甘露聚糖酶一般以胞外诱导酶的形式存在于生物体中,只有很少的以结构酶形式存在。对于大部分产 β -甘露聚糖酶的微生物,在培养基中添加少量的甘露多糖或甘露寡糖,如魔芋粉、槐豆胶或其水解物等,就能极大地提高产酶水平;但有时其它一些半纤维素类物质或苯酚类化合物也能有效地增加某些微生物的 β -甘露聚糖酶的分泌水平。如植物病原菌野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*),在含有CM-纤维素、木聚糖的培养基上, β -甘露聚糖酶的合成量几乎与含有槐豆胶半乳甘露聚糖培养时相持平^[6];在培养基中添加微量的藜芦酸、阿魏酸及香草酸,能有效地提高分解木质素的真菌 *Phlebia radiata* Frivo 79的 β -甘露聚糖酶产量^[7]。据推测,这可能是由于多糖的分解一般需要多种糖苷酶类的参与,它们的诱导与合成常常互相影响、互相关联,因此不同的诱导物也会产生相类似的诱导效果。

2 β -甘露聚糖酶的分类、鉴定及酶活测定

长期研究中, β -甘露聚糖酶的分类和鉴定一直是一个困扰人的复杂问题。由于其水解底物甘露多糖结构和组成的复杂多样性,以及 β -甘露聚糖酶本身多分子型的普遍存在,在分类时,需要我们从其底物、产物的类型及产生方式等多方面加以综合考虑;最近Cristina Fanutti等人^[8]提出了根据 β -甘露聚糖酶氨基酸序列同源性差别进行分类的新方法,这为我们从分子水平上对该酶进行系统性研究提供了一个有益的借鉴。

酶活性的测定对确定 β -甘露聚糖酶的活性水平、特异性及分类有重要影响。测定 β -甘露聚糖酶活性的方法目前主要有:还原糖测定法(包括DNS法和Somogyi-Nelson法)、测粘法、刚果红染色法、查马雷亮蓝染色法。其中还原糖测定法由于操作简便,重复性好,最为常用;但因其专一性差,在确定 β -甘露聚糖

酶活时一般还需结合其它方法,如薄板色谱法、纸色谱法进行水解产物的鉴定;测定时特别要注意区分另两类外切型的甘露多糖水解酶类: β -1,4-D-甘露二糖酶(β -1,4-D-mannan mannohydrolase EC.3.2.1.100)和 β -D-甘露糖苷酶(β -D-mannoside mannohydrolase, EC.3.2.1.25),避免相互间的干扰带来的误差。

3 β -甘露聚糖酶的纯化及一般理化性质

由于 β -甘露聚糖酶常和其它糖苷酶共存且自身有时含有多种分子型,而它们之间的理化性质非常相似,故酶的纯化是有一定难度。目前一般采用的方式有:盐析、有机溶剂沉淀、离子交换、吸附层析、凝胶过滤、亲和层析及高压液相层析等。进入80年代后,许多来源的 β -甘露聚糖酶都获得了纯化,其中枯草杆菌和黑曲霉的 β -甘露聚糖酶还获得了蛋白结晶^[1]。

通过对纯酶性质的研究,可知这些酶的分子量,小的只有22000^[9],大的可到162000^[10],相差十分悬殊;最适反应pH值真菌来源的一般偏弱酸,细菌和放线菌的却常常为中性或偏碱;绝大多数 β -甘露聚糖酶的等电点都在2.5~6.5之间,对重金属离子及巯基修饰剂比较敏感,有较好的热稳定性。此外,研究还表明:许多真菌及某些放线菌的 β -甘露聚糖酶上都有不同程度的蛋白糖链,而在细菌及植物的 β -甘露聚糖酶中则很少发现。

许多微生物产生的 β -甘露聚糖酶为多分子型,如里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM9414^[11]产生两种同工酶,嗜碱性芽孢杆菌(*Bacillus alcalophilus*)AM-001^[12]有三种同工酶,弧菌(*Vibrio* spp.)MA-129^[13]、陆生梭孢菌(*Thielavia terrestris*)^[14]等则产生四种同工酶。这些酶组分可能在分子量或等电点上有着微小的差别,但在水解甘露多糖时活力却明显不同,有着一定的互补关系,这说明微生物 β -甘露聚糖酶的诱导和分泌是一个复杂的代谢调节过程。

4 β -甘露聚糖酶水解甘露多糖的影响因素

4.1 不同结构、不同组成的甘露多糖对酶水解的影响

由于构成多糖的单糖类型、聚合度、糖键连接及排列方式、糖基上羟基的取代情况等各异,导致不同的多糖在溶解度、粘度等性质上存在着明显的差别。这极大地影响了 β -甘露聚糖酶的水解。实验表明:难溶性的甘露多糖一般较可溶性的难水解;糖成份复杂的一般较成份

简单的难水解;糖基上羟基被取代的一般较未取代的难水解;多分支侧链的甘露多糖一般较线状的水解慢;聚合度低的一般较聚合度高的水解慢。

4.2 不同来源的 β -甘露聚糖酶对水解的影响 不同来源的 β -甘露聚糖酶对 β -甘露多糖具有不同的水解能力。研究表明:对于瓜胶半乳甘露聚糖,枯草杆菌K-50的 β -甘露聚糖酶的水解率为5%,而黑曲霉(*Aspergillus niger*)的水解率却为12%;对于咖啡豆半乳甘露聚糖,它们的水解率分别为36%和58%^[2]。

4.3 其它酶类对 β -甘露聚糖酶水解的影响 其它一些糖苷水解酶类与 β -甘露聚糖酶一起作用时,能有效地加快底物多糖的水解、提高多糖的水解率。如 β -甘露聚糖酶与 α -半乳糖苷酶、 β -甘露糖苷酶共同作用于半乳甘露聚糖时,水解会更加迅速、彻底。

5 β -甘露聚糖酶的应用和开发

在 β -甘露聚糖酶基础研究取得重要成果的同时,另一方面,它的应用研究也进入一个高潮。现在, β -甘露聚糖酶已在食品、医药、造纸、纺织印染、石油开采及生物研究技术等多方面得到广泛运用。如 β -甘露聚糖酶水解甘露多糖^[15],获得的甘露寡糖有很好的生物调节功能,能有效地降低人体胆固醇水平,减轻便秘、降低血糖、促进肠道中双歧杆菌的生长,是良好的食品添加剂,国外现已广泛用于保健食品中。在造纸工业中, β -甘露聚糖酶和 β -木聚糖酶等半纤维素降解酶类协同使用,处理纸浆,能明显改善纸质;用于纺织印染方面,能有效地去除产品上粘附的多余染料,降低了能耗和对环境的污染。 β -甘露聚糖酶还是油井石油压裂液的优质生物破胶剂,具有效率高,成本低,适用范围广、对地层伤害小等优点。此外, β -甘露聚糖

酶作为一种工具酶类,在糖工程、糖结构分析、植物基因工程等生物基础研究中有着重要用途。

参 考 文 献

- [1] Schomburg D, M Salzmann. *Ezyme handbook*(4). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1991, 1~5.
- [2] Firantas SHA. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 1985, **21**(3): 293~299.
- [3] Cann IKO, Mackie KR, White BA *et al*. *Abstr Gen Meet Am Soc Microbiol*, 1996, 96 Meet:359.
- [4] Gibbs MD, Saul DJ, LuthiE *et al*. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(12):3864~3867.
- [5] Arcand N, Kluepfel D, Paradis FW *et al*. *Biochem J*, 1993, **290**(3):857~863.
- [6] Rebert, F H *et al*. *Arch Microbiol*, 1979, **122**:297~299.
- [7] Rogalski J, Hatakka A, Longa B *et al*. *Acta - Biotechnol*, 1993, **13**(1):53~57.
- [8] Cristina F, Tamas P, Gary W *et al*. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**(49):29314~29322.
- [9] Emi S, J Fukumoto, T Yamamoto. *Agric Biol Chem*, 1972, **36**(6):991~1001.
- [10] Talbot G, Sygusch J. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**(11):3505~3510.
- [11] Macarron R, Acebal C, Casillon MP *et al*. *Biotechnol Lett*, 1996, **18**(5):599~602.
- [12] Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. *Agric Biol Chem*, 1988, **52**(3):773~779.
- [13] Courtois JE, Petek F, Kada T. *Bull Soc Chim Biol*, 1958, **40**:2031~2037.
- [14] Anaujo A, Ward OP. *J. Ind. Microbiol.*, 1990, **6**(4): 269~274.
- [15] 杨文博, 修树敏, 沈庆. *微生物学通报*, 1995, **22**(6):338~342.