

根霉 A03 α -半乳糖苷酶的分离 及其酶学性质初步研究

王剑锋, 余志坚, 李江, 饶军

(东华理工大学 生物系, 江西 抚州 344000)

摘要: 根霉(*Rhizopus* sp. A03)发酵豆渣产 α -半乳糖苷酶, 粗酶液依次经过三相分离、Sephadex G-100 凝胶过滤获得了电泳纯的 α -半乳糖苷酶, 纯化了2.3倍, 总酶活回收率达到25.9%, SDS-PAGE显示其相对分子质量为168.8 kDa。该酶水解对硝基苯- α -D-吡喃半乳糖苷的最适pH值为4.5, 最适温度为45 $^{\circ}$ C, 表观 K_m 值为 0.340 ± 0.026 mmol/L, 表观 k_{cat}/K_m 值为 2.866×10^4 mol $^{-1}$ /(L \cdot s); 水解蜜二糖和棉子糖的表观速率均为10.0 μ mol/(h \cdot mg); 水解活性受 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Hg^+ 等离子的强烈抑制, 但 Fe^{2+} 对酶活性具有显著的激活作用。该酶活性在pH4.0~8.9保持稳定, 在45 $^{\circ}$ C时保温60 min, 残余酶活达到了77.4%。

关键词: 三相分离; 蜜二糖; 对硝基苯- α -D-吡喃半乳糖苷; α -半乳糖苷酶

中图分类号: Q939.97 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)03-0590-05

Purification and Characterization of α -galactosidase from *Rhizopus* sp. A03

WANG Jian-feng, YU Zhi-jian, LI Jiang, RAO Jun

(Department of Biology, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000, China)

Abstract: Using three-phase partitioning followed by filtration chromatography with Sephadex G-100, a form of α -galactosidase from *Rhizopus* sp. A03 grown on soya bean dreg broth was purified to homogeneity with a 2.3-fold increase in specific activity and 25.9% of recovery. The enzyme showed a monomer with apparent molecular mass of 168.8 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and gel filtration. The α -galactosidase showed high activity against p-nitrophenyl- α -d-galactopyranoside (pNPGal) but had slight activity for melibiose and raffinose, and the optimal activity was observed at pH 4.5 and 45 $^{\circ}$ C. The kinetic parameters of K_m and k_{cat}/K_m were 0.340 ± 0.026 mmol/L and 2.866×10^4 mol/(L \cdot s) with pNPGal, and the rate of hydrolysis for melibiose was 10.0 μ mol/(h \cdot mg) as much as that for raffinose. The enzyme activity was activated by Fe^{2+} , but strongly inhibited by Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} and Hg^+ at 5.0 mmol/L. The α -galactosidase was highly stable over pH range of 4.0-8.9 at 25 $^{\circ}$ C, and its activity retained approximately 77.4% of the original activity after incubation for 60min at 45 $^{\circ}$ C.

Key words: three-phase partitioning; melibiose; p-Nitrophenyl- α -d-galactopyranoside; α -galactosidase

豆渣是大豆加工的弃余物, 含有蛋白质 19%~22%、木质纤维素 51%~61%、磷、钾、钙、镁等灰分 3%、少量的维生素 B 和大豆黄酮苷等^[1]营养成分, 来源广泛, 是食品和饲料加工的重要原料^[2]; 但豆渣中同时存在的许多抗营养因子却降低了豆渣的生物可利用度。含有末端 α -半乳糖残基的棉子糖同系物是植物糖类的转运和贮存形式, 广泛分布于植物界, 几乎存在于植物的各个部分^[3]; 它们在单胃动物消化道中不能被内源消化酶消化利用, 却被肠道产气微生物发酵利用, 致使单胃动物出现肠胀气、

收稿日期: 2011-10-21 修回日期: 2012-04-04

基金项目: 江西省教育厅科技项目 (GJJ11142)

作者简介: 王剑锋(1980—), 男, 讲师, 硕士, 主要从事微生物酶工程研究, E-mail: wangjianfeng68@126.com.cn.

腹泄等症状,最终导致食物的消化利用率大幅下降^[4],因而蜜二糖、棉子糖等是一类普遍存在的抗营养因子,在大豆中约占 7.1%左右^[3]。已有研究表明^[5],在食品和饲料中添加或利用 α -半乳糖苷酶 (α -galactosidase, α GAL, EC 3.2.1.22) 加工能显著降低这类抗营养因子的不利影响,原因在于 α GAL 能以外切方式水解非还原端的 α -半乳糖苷键,而且对多种具有末端 α -半乳糖残基的寡糖、糖脂均有水解活性。许多传统发酵豆制品的制作提示,利用产 α GAL 的菌株发酵豆渣也是去除 α -半乳糖苷类胀气因子的有效途径。基于豆渣固态发酵的工艺要求和菌株安全性的考虑,文中利用分离自市售甜酒曲的一株根霉菌 *Rhizopus* sp.A03 发酵豆渣制取 α -半乳糖苷酶,结合三相分离和凝胶过滤对 *Rhizopus* sp.A03 产生的胞外 α -半乳糖苷酶— α GAL-R3 进行了分离纯化和酶学性质研究,以期理解利用根霉去除豆渣中 α -半乳糖苷类胀气因子的机制提供资料,也为食品饲用 α GAL 的开发应用提供实验依据。

1 材料与方方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 根霉 A03 (*Rhizopus* sp. A03), 实验室分离自市售甜酒曲。

1.1.2 豆渣和药品试剂 豆渣取自东华理工大学学生食堂,经高速离心取渣、65 °C 烘干备用;蛋白质分子量标准购自上海生工,其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 根霉 A03 α -半乳糖苷酶的制备与分离 (1) α -半乳糖苷酶的制备: *Rhizopus* sp.A03 孢子接种在豆渣培养基 (2%豆渣, pH6.5) 中 28 °C、100 r/min 培养 3 d; 发酵醪液经丝网过滤收集滤液即得粗酶液。

(2) α -半乳糖苷酶的分离: 取一定体积冷藏粗酶液,高速离心 (12 000 r/min, 10 min) 取上清液; 上清液中溶入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 15% (w/v), 加入等体积叔丁醇,混匀、静置 10 min, 高速离心 (12 000 r/min, 10 min) 后去掉中间相; 下相中再次溶入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 25% (w/v), 与上相的等体积叔丁醇重新混匀、静置 10 min, 高速离心 (12 000 r/min, 10 min) 后取中间相,并溶解在适量 pH7.5、20 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液中,即得 α GAL-R3 酶液; 取 1.0 mL α GAL-R3 酶液进行凝胶过滤 (Sephadex G-100), 以 pH7.5、20 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液洗脱,流速 9.0 mL/h, 每 3.0 mL 收集一管,检测蛋白峰各管酶活。

1.2.2 分析方法 (1)蛋白质浓度的测定: 依据 Bradford 法^[6]。

(2)蛋白质相对分子质量的测定及酶纯度鉴定^[7]: SDS-PAGE 条件: 浓缩胶 4%、分离胶 10%, 染色剂: Coomassie brilliant blue R-250。

(3) α -半乳糖苷酶活的测定: pNPGal (4-硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷) 法: 5 mmol/L pNPGal 溶液 0.2 mL、pH4.5、100 mmol/L NaAc -HAc 缓冲液和适量酶液 0.8 mL, 设定温度下反应 4 min, 2 mL Na_2CO_3 (2%) 终止反应,以 Na_2CO_3 灭活酶液作对照, 400 nm 处比色。酶活单位: 每 1 min 产生 1 μmol 对硝基苯所需酶量为 1 IU。比活力: 每毫克蛋白质含有的 α -半乳糖苷酶酶活单位数。

DNS (3,5-二硝基水杨酸) 法: 1%蜜二糖 (棉子糖) 溶液 0.3 mL, pH4.0、100 mmol/L NaAc -HAc 缓冲液和适量酶液 0.7 mL, 一定温度下准确反应 12 h; 加入 DNS 试剂 1.0 mL 终止反应,沸水浴显色 5 min, 流水速冷,适当稀释并测定 482 nm (反应产物经波长扫描所得) 处光吸收值,以 DNS 试剂灭活酶液作对照。酶活单位: 每 1 h 产生 2 μmol (1 μmol) 葡萄糖还原当量所需酶量为 1 U。

(4)酶的最适反应温度及热稳定性的测定: 在不同温度下以 pNPGal 法测定酶活,以酶活最高时的反应温度为最适反应温度; 酶液在不同温度下分别保温 20、40 和 60 min 后测定残余酶活,以未保温酶液的酶活为 100%, 比较不同温度下酶活的半衰期。

(5)酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性的测定: 在不同 pH 的缓冲液中按照 pNPGal 法测定酶活,以酶活最高时的反应 pH 为最适反应 pH; 将酶液用不同 pH 的缓冲液同等倍数稀释, 25 °C 保温 12 h, 依 pNPGal 法测定残余酶活。

(6)无机离子对酶活的影响: 在含不同浓度待考察离子的酶促反应体系中以 pNPGal 为底物测定酶活,以去离子水透析的酶液的酶活为 100%。

(7)酶促动力学参数的测定: 酶液在 45 °C、pH4.5、100 mmol/L NaAc -HAc 缓冲液中与不同浓度 (0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 mmol/L) pNPGal 反应,测定酶活并用 Excel 2007 对测定数值进行非线性拟合,求出酶水解底物的 K_m 、 V_{max} , 测定酶蛋白量计算 k_{cat} 。

(8)数据分析: 采用统计软件 DPS v3.01 专业版, SSR 检验显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 根霉 A03 α -半乳糖苷酶的分离与纯化

发酵液过滤、离心后所得粗酶液依次经过三相分离和凝胶过滤,凝胶色谱图上只显示1个蛋白峰,该峰为 α GAL-R3活性峰,并且在SDS-PAGE图谱上显示单一条带(图1),相对分子质量为168.8 kDa; α GAL-R3被纯化了2.28倍、酶活收率为25.9%(表1)。

2.2 根霉 A03 α -半乳糖苷酶的酶学性质

2.2.1 pH对 α -半乳糖苷酶活性及稳定性的影响 在pH值4.0~6.0内, α GAL-R3对pNPGal均有明显的水解活性(图2),其中pH值为4.5、5.0时,酶的水解活性最高;酶活性随pH变化而下降,pH值由4.5下降至3.0时,相对酶活由100%下降到3.1%,pH值由5.0上升至5.5时,相对酶活由100%下降到66%,而后随着pH上升,酶活下降速度趋缓,说明在较低的pH范围内,酶活性对酸度的变化更明显。在25℃、pH4.0~8.9内, α GAL-R3的活性近乎完全保留(图2),但在pH小于4.0时残余酶活迅速下降,说明该酶对酸的耐受性差。

表1 α -半乳糖苷酶的分离纯化

Tab.1 Purification of α -galactosidase from *Rhizopus* sp. A03

纯化步骤 Purification step	总酶活/U Total activity	总蛋白/mg Protein	比活力/(U·mg ⁻¹) Specific activity	纯化倍数 Purified fold	收率/% yield
粗酶液 Crude extract	2.31	1.191	1.94	1.00	100
三相分离 Three-phase partitioning	1.22	0.280	4.33	2.23	52.8
凝胶过滤 Sephadex G-100	0.60	0.135	4.43	2.28	25.9

2.2.2 温度对 α -半乳糖苷酶活性及稳定性的影响 以pNPGal为底物研究了温度对 α GAL-R3活性和稳定性的影响(图3)。 α GAL-R3在30~50℃均有水解活性,最适作用温度为45℃,但反应温度高于50℃时,酶活性急剧下降,55℃时酶的反应活性只有最大酶活的4.3%。 α GAL-R3在45℃保温60min,酶活保留了77.4%,而在50℃保温60min,酶活保留了55.4%,因此, α GAL-R3热稳定性较差。

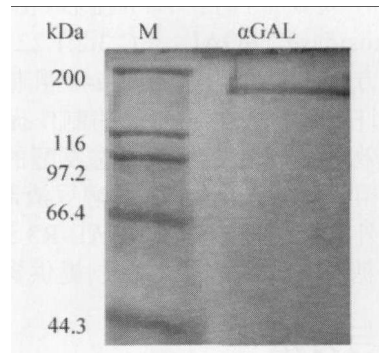


图1 α -半乳糖苷酶的 SDS-PAGE 图谱
Fig.1 α -galactosidase from *Rhizopus* sp. A03 on SDS-PAGE

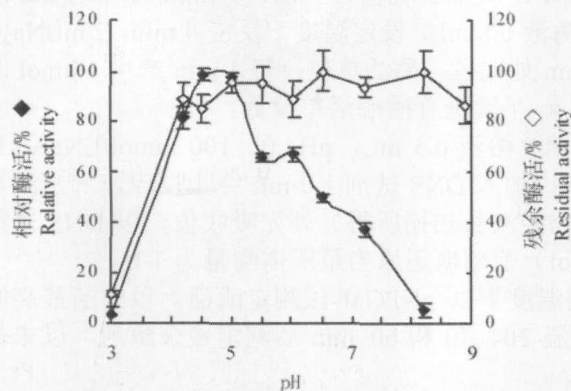


图2 pH对 α -半乳糖苷酶活性及稳定性的影响
Fig.2 Effect of pH on α -galactosidase activity and stability

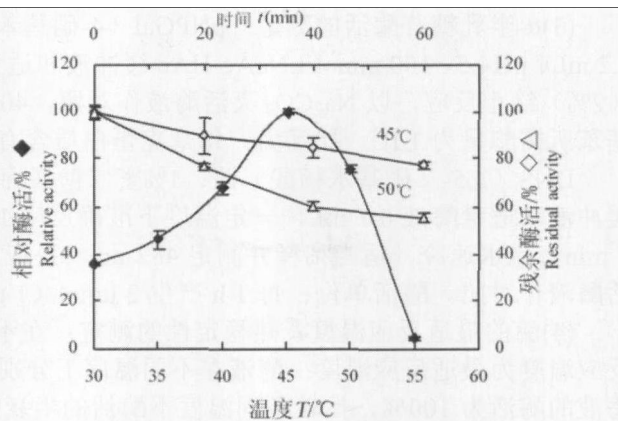


图3 温度对 α -半乳糖苷酶活性和稳定性的影响
Fig.3 Effect of temperature on α -galactosidase activity and stability

2.2.3 金属离子对 α -半乳糖苷酶活性的影响 α GAL-R3水解pNPGal的活性受金属离子的影响(表2)。被试离子(5 mmol/L)中 Zn^{2+} 对酶活性无显著影响; Fe^{2+} 对酶活性具有显著的激活作用; K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^+ 等离子抑制酶活性,其中 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^+ 等的抑制作用极为显著。

2.2.4 α -半乳糖苷酶的底物特异性及催化效率 在pH4.5、45℃的反应条件下, α GAL-R3水解pNPGal

的动力学常数分别为: $K_m=0.340\pm 0.026$ mmol/L, $V_{max}=3.464\pm 0.106$ IU/mgPr, $k_{cat}=9.745\pm 0.298$ s, $k_{cat}/K_m=2.866\times 10^4$ mol⁻¹·L·s⁻¹; 在 pH4.5、40 °C 时 α GAL- R3 能水解蜜二糖、棉子糖, 水解速度相当, 依次为 10.05 U/mgPr、10.31 U/mgPr。因此, α GAL- R3 能高效催化 pNPGal 的水解, 而对蜜二糖、棉子糖的水解能力较弱。

表2 金属离子对 α -半乳糖苷酶活性的影响Tab.2 Effect of metal ions on α -galactosidase hydrolyzing pNPGal

离子 Ions (5 mmol·L ⁻¹)	相对酶活/% Relative activity	离子 Ions (5 mmol·L ⁻¹)	相对酶活/% Relative activity
H ₂ O	100±2.5 ^b	Ca ²⁺	85.6±0.2 ^{cd}
K ⁺	86.7±3.6 ^c	Mg ²⁺	87.4±2.0 ^c
Ba ²⁺	79.2±6.5 ^d	Cu ²⁺	39.7±1.8 ^e
Fe ²⁺	106.5±1.4 ^a	Fe ³⁺	43.3±5.0 ^e
Zn ²⁺	97.3±4.7 ^b	Mn ²⁺	21.2±6.3 ^f
Hg ⁺	8.6±1.8 ^g		

3 讨论

围绕适用于豆类食品和饲料加工的 α -半乳糖苷酶, 多种微生物源 α GAL 得到了研究, 它们的酶学性质和分子特性因菌种、菌株不同而有较大差异。一般细菌分泌的 α GAL 的最适反应 pH 为 5.0~7.5, 最适反应温度在 37~40 °C^[1], 但 *Rhodothermus marinus*^[7] 的最适温度为 85 °C; 丝状真菌及酵母分泌的 α GAL 的最适反应 pH 为 4.5~8.0, 最适温度在 50~60 °C^[1]。 α GAL 的 pH 稳定范围多为 pH5.0~9.0^[4, 8-10], 热稳定范围常小于 60 °C^[1], 也有 *Absidia* sp.^[12], *Penicillium* sp.^[13] 和 *Aspergillus terreus* GR^[11] 等菌株达到 65 °C, *Rhodothermus marinus*^[8] 达到 75 °C。产自细菌的 α GAL 常由同种亚基形成多聚体蛋白^[1] 如 *Bifidobacterium bifidum* (表观分子相对质量 243 kDa、亚基 85 kDa)^[14]、*Bifidobacterium breve* (同二聚体、表观分子相对质量 160 kDa)^[15]、*Rhodothermus marinus* (四聚体表观分子相对质量 200 kDa、亚基 50 kDa)^[8], 部分真菌源 α GAL 也形成多聚体, 如源于 *Rhizopus* sp.、*Gibberella* sp. (亚基相对分子质量 82.0 kDa、82.9 kDa)^[1]。SDS-PAGE 测得 α GAL-R3 的表观相对分子质量为 168.8 kDa, 结合该酶的凝胶过滤保留时间推知, α GAL-R3 是 168.8 kDa 的单体蛋白, 这在相关文献中鲜见报道。 α GAL-R3 在反应温度 40~50 °C、pH4.0~6.0 显示较高酶活性, 最适反应温度为 45 °C、最适反应 pH 为 4.5, 与源于 *Aspergillus oryzae* 的 α GAL (pH4.8、50 °C)^[16] 相似。 α GAL-R3 在 pH4.0~8.9 内 25 °C 保温 12 h, 酶活性近乎完全保留, pH 小于 4.0 时酶活仅保留了 11%; 在 50 °C 保温 1 h, 酶活保留了 55.4%, 由此可知, 该酶的酸热稳定性仍在已有文献报道的范围内。

α GAL-R3 对 pNPGal、蜜二糖、棉子糖都能水解, 水解 pNPGal 的能力最强, 其 K_m 值与源于 *Aspergillus terreus* GR 的 α GAL^[11] 近似; α GAL 催化 pNPGal 水解的活性常受金属离子的抑制, Cu²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺、Hg⁺ 等常强烈抑制酶活性, 而 Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 等常对酶活性抑制较弱^[1, 4, 10-11, 17], 但是 α GAL-R3 水解的活性却受 Fe²⁺ 的激活。许多 α GAL 对蜜二糖、棉子糖的水解活性很弱, 常需要在酶活测定条件下反应 24 h 方能检测到反应产物^[1], α GAL-R3 水解蜜二糖、棉子糖的活性也较弱, 但水解活性较其他来源的 α GAL 强, 反应 12 h 即可检测到反应产物, 反应速度分别为 10.05 U/mgPr、10.31 U/mgPr。因此, 实验菌株根霉 A03 发酵豆渣能有效去除其中的蜜二糖、棉子糖等物质, 该菌株在发酵法消除食品和饲料中的胀气因子方面具有较大的实际应用价值。

参考文献:

- [1] 刘传富,董海洲,张瑞霞,等.挤压膨化豆渣理化性质的研究[J].中国粮油学报,2009,24(2):56-58.
- [2] 李宏睿,袁利兵,张文波,等.大豆多糖提取工艺优化[J].江西农业大学学报,2009,31(6):1146-1151.
- [3] 王镜岩,朱圣庚,徐长法.生物化学[M].北京:高等教育出版社,2002:39.
- [4] 曹雅男.微生物来源 36 家族 α -半乳糖苷酶的基因克隆与性质研究[D].北京:中国农业科学院,2008.
- [5] 王璇琳,李素波,章扬培.重组 α -半乳糖苷酶消除大豆低聚糖引起的小鼠肠胃胀气的研究[J].营养学报,2006,28(5):434-437.

- [6] 李建武,袁明秀.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,2000:89-130.
- [7] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,2001:161-191.
- [8] Blücher A, Karlsson E N, Holst O. Substrate-dependent production and some properties of a thermostable, α -galactosidase from *Rhodothermus marinus*[J].Biotechnology Letters, 2000,22(8):663-669.
- [9] Ibrahim S A, Alazzeah A Y, Awaisheh S S, et al. Enhancement of α - and β -Galactosidase activity in *Lactobacillus reuteri* by different metal ions[J].Biological Trace Element Research, 2010,136(1):106-116.
- [10] 刘彩琴,何国庆.臭曲霉 ZU-G1 α -半乳糖苷酶的分离纯化及酶学性质[J].中国食品学报,2009,9(4):70-75.
- [11] Shankar S K, Dhananjay S K, Mulimani V H.Purification and characterization of thermostable α -galactosidase from *Aspergillus terreus* GR[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2009,152(2):275-285.
- [12] Li H, Liang W Q,Wang Z Y, et al.Enhanced production and partial characterization of thermostable α -galactosidase by thermotolerant *Absidia* sp.WL511 in solid-state fermentation using response surface methodology[J].World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006,22(1): 1-7.
- [13] 李孝辉,竺莉红,吴吉安,等.青霉 α -半乳糖苷酶的纯化及酶学特征的研究[J].浙江农业学报,2003,15(2):99-102.
- [14] Goulas T,Goulas A,Tzortzis G, et al. A novel α -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with transgalactosylating properties: gene molecular cloning and heterologous expression[J].Applied Microbiology and Biotechnology, 2009,82(3):471-477.
- [15] Xiao M, Tanaka K, Qian X M, et al. High-yield production and characterization of α -galactosidase from *Bifidobacterium breve* grown on raffinose[J].Biotechnology Letters, 2000,22(9):747-751.
- [16] Girigowda K, Mulimani V H. Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soymilk by κ -carrageenan-entrapped α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*[J].World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006,22(5):437-442.
- [17] Ferreira J G, Reis A P, Guimarães V M, et al. Purification and characterization of *Aspergillus terreus* α -galactosidases and their use for hydrolysis of soymilk oligosaccharides[J].Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011,164(7): 1111-1125.

(上接第 561 页)

- [11] Playford R J,Hoyd D N,Macdonald C E,et al.Bovine colostrum is a health food supplement which prevent NSAID induced gut damage[J].Gut,1999,44:653-658.
- [12] 王建平,阿里木·帕塔尔,张丹凤,等.牛初乳粉的保健功能研究[J].新疆农业科学,2002,39(2):91-94.
- [13] 万善霞,滑静,张淑萍.牛初乳对仔猪血清抗氧化酶活性及丙二醛水平的影响[J].北京农学院学报,2008,23(4):38-40.
- [14] 陈新霞,石根勇,吕中明,等.牛初乳提取物对小鼠免疫功能的影响[J].江苏预防医学,2001,12(3):3-4.
- [15] Sugisawa H,Itou T, Sakai T.Promoting effect of colostrum on the phagocytic activity of bovine polymorphonuclear leukocytes in vitro[J].Biology of the Neonate,2001,79:140-144.
- [16] 曹劲松,王晓琴.牛初乳功能食品的开发现状和前景[J].食品科学,1999(5):14-17.
- [17] Yamanaka H,Hagiwara K,Kirieawa R,et al.Proinflammatory cytokines in bovine colostrum potentiate the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from newborn calves through IL-2 and CD25 Expression[J].Microbiology and immunology,2003,47(6):461-468.
- [18] Baumrucker C R,Hadsell D I. Effects of dietary insulin-like growth factor I on growth and insulin-like growth factor receptors in neonatal calf intestine[J].J Anim Sci,1994,72:428-433.
- [19] 许光武,俞茂华,叶红英,等.小剂量牛初乳短链胰岛素样生长因子-1 可改善糖尿病大鼠周围神经病变[J].中华内分泌代谢杂志,2000,16(4):231-234.
- [20] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范[S].2003.