

微生物源 α -半乳糖苷酶的研究进展

李孝辉¹ 陈声明²

(浙江农业科学院微生物研究所 杭州 310021)¹ (浙江大学生命科学院 杭州 310029)²

摘要:介绍了微生物源 α -半乳糖苷酶的生理生化特性、合成调控机制的研究进展情况及其在食品、饲料、医药工业等领域的一些应用。 α -半乳糖苷酶均是糖蛋白,不同来源的 α -半乳糖苷酶的作用基质特异性差别较大,作用基质特异性差别是由蛋白质部分N-末端氨基酸序列决定的。不同微生物来源的 α -半乳糖苷酶其最佳作用条件、pH稳定性及耐热性差异较大。微生物 α -半乳糖苷酶是一种诱导酶,其合成受多个基因的调控,高浓度的葡萄糖能抑制其合成。

关键词: α -半乳糖苷酶,蜜二糖酶,研究进展

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2002)02-0071-04

α -半乳糖苷酶(α -Galactosidase, EC 3.2.1.22)也称蜜二糖酶,是催化 α -半乳糖苷键水解的酶类。它能水解非还原性末端以 α 键结合的半乳糖苷化合物,因此它能水解蜜二糖、棉子糖、水苏糖和毛蕊花糖等低聚糖,还能水解含有 α -半乳糖苷键的杂多糖。

现今对 α -半乳糖苷酶的研究表明,该酶在食品、饲料、医药工业等领域具有广泛的应用前景。国外从60年代即开始从微生物中筛选产 α -半乳糖苷酶的菌种,并对 α -半乳糖苷酶进行纯化及性质的研究^[1]。我国于70年代后期开始进行微生物产 α -半乳糖苷酶及酶性质的研究^[2]。

1 产 α -半乳糖苷酶的微生物

在微生物中,细菌、真菌、放线菌、酵母等都能合成 α -半乳糖苷酶。

细菌有大肠杆菌、腊状芽孢杆菌、德氏杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、乳杆菌、梭状芽孢杆菌、牛链球菌等。酵母菌有假丝酵母、毕赤氏酵母、卡尔斯伯酵母、啤酒酵母、意大利酵母、八孢裂殖酵母等。真菌有泡盛酒曲霉、烟曲霉、黑曲霉、米曲霉、栖土曲霉、蝇缢霉、青霉、葡萄酒被孢霉、根霉、毛霉等。放线菌有费氏链霉菌、橄榄色链霉菌、玫瑰多刺链霉菌、脆弱链霉菌等。

2 α -半乳糖苷酶的生理生化特性

2.1 α -半乳糖苷酶的作用方式与基质特异性 一般的研究认为 α -半乳糖苷酶的作用方式是断裂非还原性末端的 α -D-半乳糖苷键,产生一分子的 α -D-半乳糖,但在90年代以

来的研究表明,有些微生物 α -半乳糖苷酶还能水解侧链基团是 α -半乳糖苷键连接的杂多糖,同时还发现同一种微生物的几种 α -半乳糖苷酶的作用方式不一样。

Reiji Kaneko^[3]在研究 *Aspergillus niger* 5-16 的 α -半乳糖苷酶的作用基质特异性时发现,粗酶液能分解对硝基苯基- α -半乳糖 (pNP-Gal)、蜜二糖。将粗酶液先用硫酸铵沉淀,然后经 DEAE-纤维素柱和 SP-Sephadex G-50 柱和亲和色谱柱进行纯化得到一种 α -半乳糖苷酶,它能水解 pNP-Gal,但不能水解蜜二糖。一方面说明此酶至少存在两种同工酶,另一方面说明不同的 α -半乳糖苷酶具有不同的基质特异性。以甘露半乳糖低聚糖作底物的酶解研究中,甘露糖为骨架的低聚糖中还原性末端 α -半乳糖能够被裂解下来。如 M-M* (Gal), 还原性末端甘露糖-M* 上连接的半乳糖 Gal 能够被裂解下来。这与以前只认为水解非还原性末端的 α -半乳糖键的看法有所不同。

Elina Luonteri^[4]在研究 *Penicillium simplicissimum* 的 α -半乳糖苷酶基质特异性时发现, *P. simplicissimum* 能产生 3 种 α -乳糖苷酶: AGL I、AGL II、AGL III。这 3 种酶的最佳底物是棉子糖。AGL I 能将蜜二糖中的 87% α -半乳糖苷键断裂,能将棉子糖中的 95% 的 α -半乳糖苷键断裂,只能断裂毛蕊花四糖中 35% 的 α -半乳糖苷键; AGL II 酶它对蜜二糖、棉子糖、毛蕊花四糖等棉子糖家族低聚糖中的 α -半乳糖苷键的断裂达 90% ~ 100%; 对 AGL III 而言,它对蜜二糖和棉子糖家族低聚糖中的 α -半乳糖苷键的断裂能力明显要弱。进一步研究表明, AGL II 对棉子糖家族低聚糖的链的长度不敏感。

2.2 α -半乳糖苷酶的物理及化学结构 α -半乳糖苷酶与其它的糖苷酶一样都是糖蛋白^[5]。将纯化的 α -半乳糖苷酶用凝胶电泳显示的是均一带,用考马斯亮蓝和 Schiff 碱染色,证明了 α -半乳糖苷酶是一种糖蛋白。将产 α -半乳糖苷酶的细胞放在 ^{14}C 的果糖溶液中培养,再将所产生的 α -半乳糖苷酶进行凝胶电泳。 ^{14}C 标记的酶显示出一个单一的放射性带,再将放射性的酶用一种 Pronase 的酶进行充分水解,通过 Sephadex G-25 柱分离,进一步证明 α -半乳糖苷酶是由蛋白质和糖两部分组成。从 α -半乳糖苷酶这种糖肽分离下来的糖进一步分析,这种连接于多肽上的糖基是由 6~8 个单糖组成的。它们是甘露糖和乙酰葡萄糖胺,并且甘露糖和乙酰葡萄糖胺的比例大约是 2.8:1。

在研究此低聚糖与蛋白质的连接方式时,通过弱碱和强碱在 NaBH_4 存在的条件下进行水解等一系列后处理,发现 α -半乳糖苷酶中的蛋白质和糖苷的连接方式是通过低聚糖中的乙酰葡萄糖胺和蛋白质中的天冬氨酸残基相连接的。不同的微生物产生的同一种酶具有不同的催化特性,这主要是和蛋白质的结构有关,而蛋白质的结构是由肽链的氨基酸序列决定的,不同微生物产生的 α -半乳糖苷酶的 N-末端氨基酸序列也证实了这一点。研究表明 *P. simplicissimum* 的 AGL III 酶的 N-末端氨基酸序列与 *M. vinacea* 和 *S. carlsbergiensis* α -半乳糖苷酶 N-末端氨基酸序列具有高度的相似性,而 AGL II 的 N-末端氨基酸序列与其它几种 α -半乳糖苷酶的 N-末端氨基酸序列相似性很小。N-末端氨基酸序列高度相似的几种酶它们的作用底物的特异性相同,而 N-末端氨基酸序列相似性很小的几种酶其作用的底物的特异性相差很大。

2.3 α -半乳糖苷酶的最佳作用条件及稳定性 α -半乳糖苷酶的活性可用蜜二糖及棉子糖,也可利用对硝基苯酚- α -D-半乳糖苷作为底物来测定。不同的微生物产生的 α -半乳糖苷酶的最适 pH 和温度的范围各不相同^[6]。一般细菌分泌的最适 pH 范围在 6.5~7.5 之间,最适温度在 37℃~40℃;丝状真菌及酵母分泌的 α -半乳糖苷酶的最适温度范围

比细菌要高,一般在 $50^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ 之间, pH 范围变化很大,在 $4.5 \sim 8.0$ 之间。一般来说,同一种微生物的粗酶和纯化后的酶其作用最适温度相同,但其热稳定性有差异。在对分枝犁头霉产生的 α -半乳糖苷酶的性质研究时表明,分枝犁头霉 α -半乳糖苷酶在 50°C 保温 7h, 纯酶活力保留 50%, 粗酶活力保留 82%, 在 60°C 保温 2h, 纯酶活力保留 20%, 粗酶能保留 50%。同工酶之间的稳定性也有差异, *Mortierella vinacea* 产生两种同工酶 α -半乳糖苷酶: α -gal I、 α -gal II。其中 α -gal II 在 pH3.0 ~ 4.0、温度在 60°C 对 pNP-Gal 具有最大活性,而 α -gal I 在中偏碱性条件下稳定,在 pH7.0、 50°C 极其稳定。另一个有趣的问题是:同一种微生物在不同的培养基上生长时其产生的 α -半乳糖苷酶的热稳定性和 pH 稳定性也不一样。Richard^[7] 等人对黑曲霉在不同培养基上生长产生的 α -半乳糖苷酶的性质进行研究,发现黑曲霉在麸皮和米糠上生长产生的 α -半乳糖苷酶的最佳酶作用条件是: pH: 5.0, 温度 50°C , 在 $35^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ 两种酶都稳定,在超过 50°C 时,在米糠的培养基上的 α -半乳糖苷酶的稳定性要高些, 60°C 时,麸皮为培养基的 α -半乳糖苷酶的活力损失 55%, 而以米糠为培养基的 α -半乳糖苷酶活力只损失 14%。

3 微生物合成 α -半乳糖苷酶的调控

3.1 微生物产 α -半乳糖苷酶的诱导与抑制 微生物合成的 α -半乳糖苷酶为诱导酶^[8], 不同种类的微生物合成 α -半乳糖苷酶需要不同的诱导物。一般的诱导物是酶作用的底物或底物类似物,有时还可能是 α -半乳糖苷的分解产物。大肠杆菌 (*E. coli*, subsp. *communor* IAM1217) 在水苏糖或棉子糖诱导下能产生大量的胞内 α -半乳糖苷酶。红曲 (*Monascus*, sp) 能被半乳糖诱导。葡萄酒色被孢霉合成 α -半乳糖苷酶除能被蜜二糖、棉子糖诱导外,还能被它的底物类似物乳糖所诱导。Ruben Cruz^[8] 等人在研究米曲霉合成 α -半乳糖苷酶时,比较了不同糖类物质的诱导作用。在淀粉、水苏糖、棉子糖、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蜜二糖、豆粕碳水化合物这些物质中,只有水苏糖、棉子糖、豆粕碳水化合物具有诱导作用。

高浓度的葡萄糖对微生物 α -半乳糖苷酶的合成具有抑制作用。对红曲霉 α -半乳糖苷酶合成的动力学研究亦发现:红曲细胞生长环境中存在葡萄糖和半乳糖(诱导剂)时,首先利用的是葡萄糖,细胞生长曲线是双峰的。当葡萄糖的浓度超过 2.25×10^{-4} g/mL 时,葡萄糖就抑制了半乳糖的利用和 α -半乳糖苷酶的合成。

3.2 微生物源 α -半乳糖苷酶的分子调节机理 微生物合成 α -半乳糖苷酶时可能受到多个各自独立的基因控制。Ima F. den Herder^[9] 在研究黑曲霉产生的一种分子量为 82KD 的 α -半乳糖苷酶时,根据 N-末端氨基酸序列,利用黑曲霉的 λ embl3 基因库的低聚核苷酸作探针来克隆相应的基因 *aglA*。结果发现当 *aglA* 基因缺失时,黑曲霉不产生分子量为 82KD 的 α -半乳糖苷酶,含多拷贝 *aglA* 基因的菌株会超量生产分子量为 82KD 的 α -半乳糖苷酶。当在基本培养基上生长时, *aglA* 基因缺失的黑曲霉产 α -半乳糖苷酶的总活性受到的影响不大,进一步研究表明含此多拷贝基因的黑曲霉产生的 α -半乳糖苷酶的总活性也没有多大的变化。后来的研究才发现 *aglA* 所编码的分子量为 82KD 的 α -半乳糖苷酶只占黑曲霉胞外 α -半乳糖苷酶酶活性的一小部分。在黑曲霉中由其它基因编码的 α -半乳糖苷酶占酶活的主要部分。

在大肠杆菌中也存在两种与 α -半乳糖苷酶合成有关的操纵子,即位于染色体上的蜜二糖操纵子 (*mel*) 和位于质粒的棉子糖操纵子 (*raf*)。raf 操纵子由位于结构基因上

游的调节基因 R 及一个由 3 个基因即 A、B、D 组成的多顺反子所构成。raf 为编码 α -半乳糖苷酶的结构基因, 这种 raf 编码的 α -半乳糖苷酶是一种诱导酶, 在棉子糖操纵子的调控中诱导占主导地位。但此棉子糖操纵子对诱导物具有很强的立体结构选择性。与染色体上的蜜二糖操纵子不同, 棉子糖操纵子编码的 α -半乳糖苷酶不需 NAD 作辅酶, 从棉子糖操纵子的序列分析表明, 该操纵子并没有典型的“CAP-box”, 但存在代谢降解物阻遏和以 cAMP-CAP 复合体为媒介的调控。当存在 0.4% 的葡萄糖时, cAMP 含量降低而影响 cAMP-CAP 复合体的形成, α -半乳糖苷酶的表达下降到原来的 $1/2 \sim 1/3$ ^[10]。

4 α -半乳糖苷酶的应用

4.1 α -D-半乳糖苷酶在食品工业上的应用 纠尔豆胶是一种食品胶, 含有 38% ~ 40% α -半乳糖, 半乳糖是以残基形式连接于甘露糖为主链的甘露聚糖上。半乳糖侧链的存在, 它对半乳糖甘露聚糖的特性影响很大。 α -D-半乳糖基侧链的多少及位置, 决定其在水中的溶解度和胶凝能力。纠尔豆胶与刺槐胶相比, 其胶凝能力要弱, 如用 α -半乳糖苷酶来进行改性处理, 适量除去侧链的半乳糖残基而不使甘露聚糖主链断裂, 可提高水溶性, 也极大地提高纠尔豆胶的胶凝能力, 提高其商品性^[11]。在制糖工业中, 由于甜菜中棉子糖的存在, 造成糖蜜黏度增加而阻碍蔗糖结晶析出, 以致产生大量的废糖蜜, 使糖产率降低。应用 α -半乳糖苷酶处理废糖蜜能将阻碍蔗糖结晶的棉子糖清除, 在分解一分子棉子糖的同时, 还产生一分子的蔗糖, 因而能提高蔗糖的得率。同时酶法制糖可使蔗糖的粒状结晶的均匀性、色泽和纯度得到改善^[12]。

4.2 在饲料工业中的应用 在饲料工业中, 豆粕及其它豆类是主要的蛋白质来源, 在豆类饼粕饲料中, 含有 5% ~ 6% 的单胃动物不能消化的 α -半乳糖苷的低聚糖和多聚糖, 是一种抗营养因子。其中低聚糖主要是游离的水苏糖、棉子糖等, 在单胃动物的肠道内缺乏 α -半乳糖苷酶, 较高浓度的此类游离的水溶性低聚糖可能造成食糜黏度增高, 对营养物的吸收和消化产生不利影响。多聚糖主要是 α -半乳糖和果胶类似物组成大豆、羽扇豆等细胞壁的组成部分, 它们形成一个坚硬的网状结构, 将营养物质包裹其中, 这也是导致豆粕的利用率不高的原因, 加入 α -半乳糖苷酶及果胶酶、蛋白酶能有效地改善消化和提高豆粕蛋白能量利用率^[13]。

4.3 在医疗方面的应用 在医学界已查明人体如果缺乏半乳糖苷酶, 就会引起所谓的法布里氏病 (Fabry's disease)。这种病是由于分子水平的变异引起的, 是一种糖代谢缺陷遗传病。所谓酶法治疗, 就是以医疗为目的的应用半乳糖苷酶。 α -半乳糖苷酶还是一种可结合于特异血型的酶, 在人体血液中, 血液 B 细胞是含有半乳糖苷, 细菌及放线菌分泌的 α -半乳糖苷酶能转化 B 细胞为 O 细胞表示了 H 抗原性。半乳糖是这个反应中释放出的唯一糖, 人细胞可释放出大约 3×10^6 分子半乳糖。通过此酶的作用不仅了解到 B 细胞活性的决定因子, 而且也可估计抗原部位的数目^[14]。

参 考 文 献

- [1] Akiba T. Agric. Biol. Chem, 1976, 40 (9): 18511 ~ 855.
- [2] 刘 波, 彭万霖, 赵淑贞, 等. 微生物学报, 1979, 19 (1): 225 ~ 226.
- [3] Reiji Kaneko, Isao Kusakabe, Eriko Ida, et al. Agric Biol Chem, 1991, 55 (1): 109 ~ 115
- [4] Elina Luonteri, Maija Tenkanen and Liisa Viikari. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22: 192 ~ 198.
- [5] Poloma Manzanares and Leo H. de Graaff. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22: 383 ~ 390.

- [6] Somiari R I, Balogh E. Enzyme Micro Technol, 1995, 17: 311 ~ 316.
- [7] Richard I, Somiari, Esteher Bologh, Enzyme Micro Technol., 1995, 17: 311 ~ 316.
- [8] Ruben Cruz, Yong K. Park: J Food Sci. 1982, 47: 173 ~ 175.
- [9] Irma F. Mol Gnet 1992, 23: 404 ~ 410.
- [10] 苏梯之, 运文慧, 徐 玲, 等. 微生物学报, 1989, 29 (3): 180 ~ 186.
- [11] Nielsen. R. I. European Patent 0 19 ~ 2401.
- [12] 张树政主编. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1984.
- [13] Brenes, A. Poultry Sci, 1993, 72: 2281 ~ 2293.
- [14] Muller, G. Biol Rundsch, 1985, 23: 345 ~ 366.