

溜曲霉  $\beta$ -N-乙酰氨基己糖苷酶的催化特性\*

陶 勇 严自正 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

已纯化的溜曲霉  $\beta$ -N-乙酰氨基己糖苷酶(表现出  $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶和  $\beta$ -N-乙酰氨基半乳糖苷酶活力) 水解对硝基酚-N-乙酰氨基葡萄糖苷和对硝基酚-N-乙酰氨基半乳糖苷, 其  $K_m$  值分别为 0.44 和 2.0 mmol/L。  $V_{max}$  值分别为 740.0 和 476.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。 氨基葡萄糖、氨基半乳糖、GlcNAc 及 GalNAc 均为这两个酶的竞争性抑制剂, 对  $\beta$ -GlcNAcase 的  $K_i$  值分别为 34.9、62.5、16.9 及 38.2 mmol/L, 而对  $\beta$ -GalNAcase 的  $K_i$  值分别为 24.1、75.0、50.0 及 131.8 mmol/L。 将 pNPGlcNAc 和 pNPGalNAc 等量混合为底物, 其酶活力小于单独以 pNPGlcNAc 为底物的活力, 大于以 pNPGalNAc 为底物的活力。 两种底物以不同摩尔分数混合测活结果, 用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 均为直线, 求出表观  $V'_{max}$ , 将各个  $V'_{max}$  对摩尔分数  $f$  (从  $f = 0$  至  $f = 1$ ) 作图, 没有出现最大值。 由抑制作用及混合底物竞争动力学说明  $\beta$ -GlcNAcase 和  $\beta$ -GalNAcase 同存在于一个蛋白质, 并共用一个活力部位。

**关键词** 溜曲霉;  $\beta$ -N-乙酰氨基己糖苷酶; 糖苷酶; 共用同一活力部位

$\beta$ -N-乙酰氨基己糖苷酶 ( $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase EC3. 2.1.52) 具有  $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase EC 3.2.1.30) 及  $\beta$ -N-乙酰氨基半乳糖苷酶 ( $\beta$ -N-Acetylgalactosaminidase EC 3.2.1.53) 活力。 两酶的关系始终吸引着许多研究者的兴趣。 早在 60 年代, Wollen 等人<sup>[1]</sup>就发现来自于植物、动物和微生物的  $\beta$ -HexNAcase 均同时表现出  $\beta$ -GlcNAcase 和  $\beta$ -GalNAcase 活力, 仅两者活力比不同。 我们曾筛选了不同微生物, 没有得到仅产  $\beta$ -GlcNAcase 或 GalNAcase 的菌株<sup>[2]</sup>。 Frohwein 和 Gatt<sup>[3]</sup> 由牛脑中分离出三种不同性质的能水解  $\beta$ -糖苷键的  $\beta$ -GlcNAcase 和  $\beta$ -GalNAcase, 该作者企图将这两种酶活力分开, 结果是徒劳的。

Bedi 等<sup>[4]</sup>利用酶的性质和对混合底物竞争动力学证实了来自线虫 *Tarbatatrix aceti* 的  $\beta$ -GlcNAcase 和  $\beta$ -GalNAcase 活力存在于同一个蛋白质, 共用一个活力部位。

作者曾首次报道了溜曲霉  $\beta$ -HexNAcase 在纯化过程中, 始终存在着  $\beta$ -GlcNAcase 及  $\beta$ -GalNAcase 活力, 没有能得到专一性的  $\beta$ -GlcNAcase 或  $\beta$ -GalNAcase 活力,  $\beta$ -

本文于 1990 年 6 月 11 日收到。

\* 国家自然科学基金资助项目及中国科学院资助项目。

本文采用缩写符号:

$\beta$ -HexNAcase  $\beta$ -N-乙酰氨基己糖苷酶

$\beta$ -GlcNAcase  $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶

$\beta$ -GalNAcase  $\beta$ -N-乙酰氨基半乳糖苷酶

pNPGlcNAc 对硝基酚-N-乙酰氨基葡萄糖苷

pNPGalNAc 对硝基酚-N-乙酰氨基半乳糖苷

GlcNAc N-乙酰氨基葡萄糖

GalNAc N-乙酰氨基半乳糖

GlcNAcase/ $\beta$ -GalNAcase 比值由开始的培养液至最后纯化的酶,保持在 2.5—2.7 之间<sup>[5]</sup>,这和很多来源的  $\beta$ -HexNAcase<sup>[6-8]</sup> 在纯化过程中比值不变的结果是一致的。纯化的  $\beta$ -HexNAcase 经凝胶电泳、SDS 凝胶电泳、浓度梯度凝胶电泳及等电聚焦凝胶电泳后,蛋白质染色是均一带,凝胶电泳后将凝胶分别和两种底物 pNPGlcNAc、pNPGalNAc 反应,出现的黄色区带  $R_f$  值是相同的。此外,两酶的最适反应温度均为 60℃,两种酶的热稳定性及变性温度也是一致的<sup>[5]</sup>,各种化合物、金属离子<sup>[9]</sup>和蛋白质侧链修饰剂<sup>[10]</sup>对两酶活力的影响也都是平行的。根据这些结果,可以推断两种酶活力存在于同一蛋白质。

本文研究产物及其类似物对两酶活力的抑制作用,以及研究酶在两种底物混合时所表现出的竞争动力学特性,以查明两酶活力是否共用一个活力部位。

## 材料与方 法

### (一) $\beta$ -HexNAcase

按文献[5]纯化的凝胶电泳均一的样品。

### (二) 主要仪器与试剂

721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂), pNPGlcNAc、pNPGalNAc 及 GlcNAc (Sigma)、GalNAc (上海东风试剂厂),其他试剂均为分析纯。

### (三) $\beta$ -HexNAcase 活力测定

用 pNPGlcNAc 或 pNPGalNAc 为底物, pH5.0、50℃,方法见文献[2]。

## 结 果 与 讨 论

### (一) 底物或产物类似物对 $\beta$ -HexNAcase 活力影响

将葡萄糖、氨基葡萄糖、GlcNAc 及半乳糖、氨基半乳糖等 11 种化合物配成溶液,然后将这些溶液分别与酶液混合,使终浓度为 10mmol/L,在 30℃ 保温 30 分钟,然后按常规方法测定酶活力。结果(表 1)葡萄糖酸- $\delta$ -内酯对两酶活力均有相同程度的强力抑制作用,这种现象和很多糖苷酶受葡萄糖酸- $\delta$ -内酯抑制的现象是相同的。其次氨基葡萄糖、GlcNAc 和 GalNAc 对两酶活力均有一定的抑制作用,当氨基半乳糖浓度为 50 mmol/L 时,也呈现抑制作用(相对活力  $\beta$ -GlcNAcase 82.4%,  $\beta$ -GalNAcase 85%)。其他葡萄糖及半乳糖等对酶活力没有影响。

### (二) 产物及其类似物的抑制作用

采用不同浓度的 pNPGlcNAc 及 pNPGalNAc, 加入表 1 中所列出的抑制酶活力的一定浓度的部分化合物,如氨基葡萄糖、氨基半乳糖、GlcNAc 及 GalNAc 等,然后测定酶活力,用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,见图 1, 2。不加抑制剂时,求出  $\beta$ -GlcNAcase 及  $\beta$ -GalNAcase 的  $K_m$  及  $V_{max}$  值。pNPGlcNAc 和 pNPGalNAc 的  $K_m$  值分别为 0.44 和 2.0mmol/L。  $V_{max}$  值分别为  $5.88 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$  (相当于  $740.0 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) 及  $3.80 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$  (相当于  $476.5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )。当加入产物及产物类似物等抑制剂后,均能使  $K_m$  变大,  $V_{max}$  不变,说明这些化合物均为竞争性抑制剂,根据抑制动力学方程:  $K_i = \frac{K_m [I]}{[K'_m - K_m]}$ , 分别求出氨基葡萄糖、氨基半乳糖、

表 1 不同化合物对酶活力影响  
Table 1 Effects of various compound on activity

化 合 物 Compound	相对活力 Relative activity	
	$\beta$ -GlcNAcase	$\beta$ -GalNAcase
对照 Control	100	100
葡萄糖 Glucose	100.7	104.8
半乳糖 Galactose	99.5	99.4
氨基葡萄糖 Glucosamine	85.0	73.8
氨基半乳糖 Galactosamine	99.3	94.0
GlcNAc	77.3	88.7
GalNAc	88.8	95.2
葡萄糖酸- $\delta$ -内酯 $\delta$ -Gluconolactone	44.2	41.8
半乳糖酸- $\gamma$ -内酯 $\gamma$ -Galactonolactone	90.5	93.5
甲基葡萄糖苷 $\alpha$ -Methyl-glucoside	106.2	108.3
甲基半乳糖苷 $\alpha$ -Methyl-galactoside	85.0	84.0
乙酰胺 Acetamide	98.1	97.0

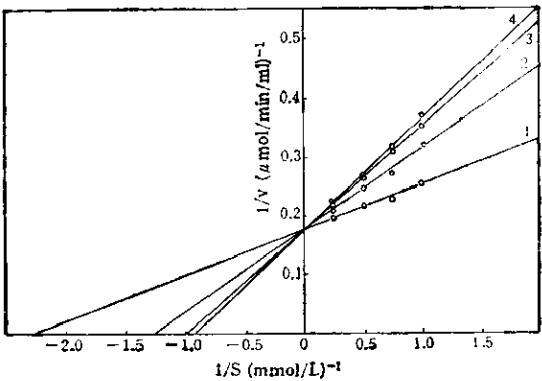


图 1 产物及其类似物对  $\beta$ -GlcNAcase 活力的抑制作用

Fig. 1 Inhibition of  $\beta$ -GlcNAcase by products and analogues.

1.不加抑制剂 No inhibitor; 2.氨基半乳糖 Galactosamine; 3. GalNAc;  
4.氨基葡萄糖 Glucosamine; 抑制剂浓度 Inhibitor concn. 为 50mmol/L

GlcNAc、GalNAc 对  $\beta$ -GlcNAcase 和  $\beta$ -GalNAcase 的  $K_i$  值(表 2)。由表 2 结果表

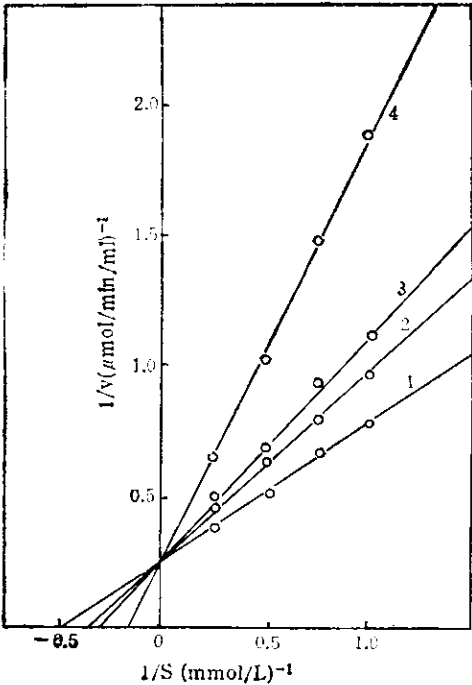


图 2 产物及其类似物对  $\beta$ -GalNAcase 活力的抑制作用  
Fig. 2 Inhibition of  $\beta$ -GalNAcase by products and analogues

1. 不加抑制剂 No inhibitor; 2. GalNAc; 3. 氨基半乳糖 Galactosamine; 4. 氨基葡萄糖 Glucosamine;  
抑制剂浓度 Inhibitor concn. 50 mmol/L

那么当底物 A + B 时的酶活力应该是叠加,而实际上是介于 A 和 B 之间,表现出两种底物竞争同一活力部位,下面再以两种底物竞争动力学进一步探讨两酶活力共用一个活力部位。

明,产物对酶活力抑制作用虽然不强,但可说明氨基葡萄糖、氨基半乳糖和 GlcNAc 及 GalNAc 这两类物质只要对  $\beta$ -GlcNAcase 活力有抑制作用的,就对  $\beta$ -GalNAcase 活力也有抑制作用,而且都是酶的竞争性抑制剂,这表明酶的活力部位对这两类物质的识别是相似的。比较这两类物质中,酶对氨基葡萄糖和 GlcNAc 要比对氨基半乳糖和 GalNAc 结合能力强,这和相应的  $\beta$ -GlcNAcase 活力要比  $\beta$ -GalNAcase 活力高 ( $\beta$ -GlcNAcase/ $\beta$ -GalNAcase = 2.5—2.7) 是一致的。

(三) 两种底物的竞争作用

设 pNPGlcNAc 为 A 底物, pNPGalNAc 为 B 底物, 1mmol/L 的 A 或 B 和 A + B, 然后按常规方法测定酶活力 (用  $(\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1})$  表示), 结果 A + B 时的酶活力小于单独以 A 为底物者, 大于单独以 B 为底物者, 当底物浓度改变为 0.5 和 2.0mmol/L 时, 结果也是一致的(表 3)。由此可见,  $\beta$ -GlcNAcase 和  $\beta$ -GalNAcase 的活力部位是相关的, 如果两酶是独立的,

表 2 产物及其类似物对黑曲霉  $\beta$ -HexNAcase 的抑制剂常数  $K_i$

Table 2 Inhibition constant of  $\beta$ -HexNAcase from *Aspergillus tamaris* by products and analogues

抑制剂 Inhibitor	Concn (mmol/L)	$K_i$ (mmol/L)	
		$\beta$ -GlcNAcase	$\beta$ -GalNAcase
氨基葡萄糖 Glucosamine	50	34.9	24.1
氨基半乳糖 Galactosamine	50	62.5	75.0
GlcNAc	10	16.9	50.0
GalNAc	50	38.2	131.8

表 3 底物 pNPGlcNAc 和 pNPGalNAc 之间竞争作用  
Table 3 The competition between pNPGlcNAc and pNPGalNAc

底物 Substrate Concn.(mmol/L)	酶 活 力 Activity ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ )		底物 Substrate Concn.(mmol/L)	酶 活 力 Activity ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) A + B
	A	B		
0.5	2.62	0.72	1.0	2.48
1.0	3.86	1.31	2.0	2.99
2.0	4.85	1.97	4.0	3.69

(四) 混合底物的竞争动力学

按 Bedi 等<sup>[4]</sup>方法设底物的摩尔分数为  $f, f = [A]/[A] + [B]$ 。分别使  $f=0, 0.25, 0.5, 0.75$  及  $1.0$  时,按常规方法测定酶活力,用 Lineweaver-Burk 法作图,结果在不同的  $f$  值时,  $1/v$  和  $1/s$  均呈直线关系,求出不同  $f$  值时的表现  $V'_{max}$ , 结果见图 3, 再将  $V'_{max}$  (用  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$  表示)对  $f$  作图,(图 3 左上角插图),从  $f=1(V'_{max}=5.88)$  到  $f=0(V'_{max}=3.80)$  之间,没有出现最大值。同样,如果用  $K'_m$  对  $f$  作图,其结果也是这样,这和 Bedi<sup>[4]</sup> 报道的线虫  $\beta$ -GlcNAcase 和  $\beta$ -GalNAcase 底物竞争动力学相同,说

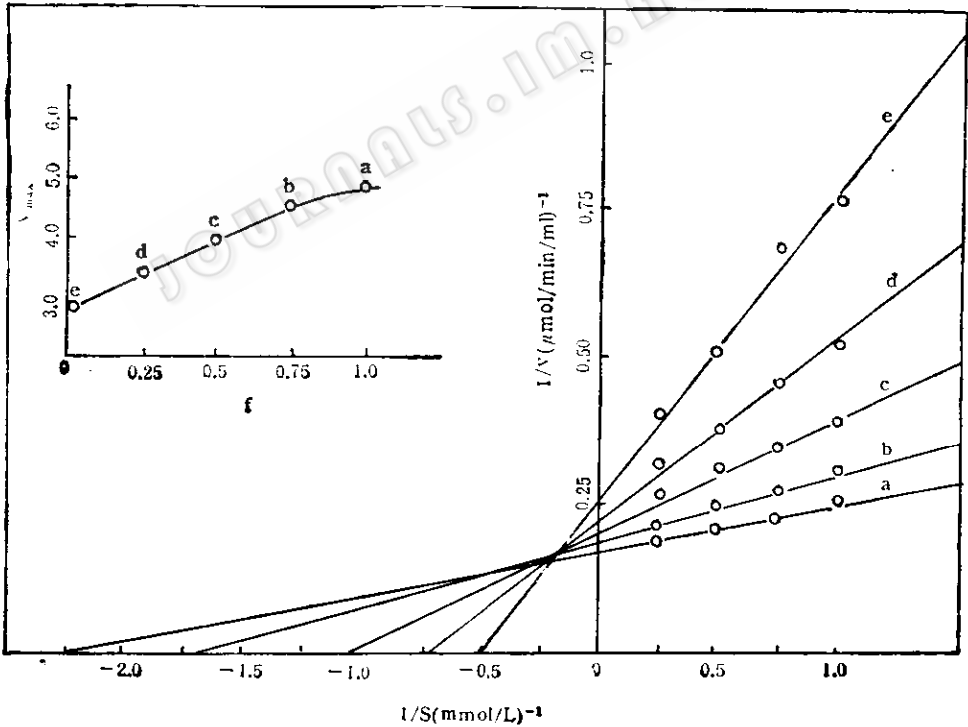


图 3 不同摩尔分数的 pNPGlcNAc 和 pNPGalNAc 之间的竞争动力学  
Fig. 3 The competition kinetics between pNPGlcNAc and pNPGalNAc in different molar traction

$$f = \frac{A}{A + B}; a, f = 1.0; b, f = 0.75; c, f = 0.50; d, f = 0.25; e, f = 0$$

明溜曲霉的  $\beta$ -GlcNAcase 和  $\beta$ -GalNAcase 同样符合由 Hiromi<sup>[10]</sup> 提出的单一活力部位的两种底物竞争动力学方程。

根据在纯化过程中两酶活力比不变,一般酶学性质相同、在凝胶电泳上呈一带,以及本文结果,推断溜曲霉的  $\beta$ -GlcNAcase 和  $\beta$ -GalNAcase 不但同存于一个蛋白质,还共用一个活力部位,即它的活力部位对底物糖基 C-4 没有立体专一性。虽然如此,我们认为溜曲霉  $\beta$ -HexNAcase 应以  $\beta$ -GlcNAcase 活力为主 ( $\beta$ -GlcNAcase/ $\beta$ -GalNAcase = 2.5—2.7),从抑制结果也可看出,相应的葡萄糖化合物比相应的半乳糖化合物对酶活力有较强烈的抑制作用。

至于  $\beta$ -HexNAcase 具有的  $\beta$ -GlcNAcase 和  $\beta$ -GalNAcase 之间的关系,除了上述线虫的  $\beta$ -GlcNAcase 及  $\beta$ -GalNAcase 共用一个活力部位外,还有一些类似的报道<sup>[11-13]</sup>,而 Rodriguez-Hernandez<sup>[14]</sup> 则证实鸡脑中的四个同功酶,其中两个同功酶表现出两个活力部位,因此这个酶只能称为  $\beta$ -HexNAcase。

### 参 考 文 献

- [1] Woollen, J. W. et al.: *Biochem. J.*, 79: 294—297, 1961.
- [2] 严自正等: *微生物学报*, 30: 122—128, 1990.
- [3] Frohwein, Y. Z. et al.: *Biochem.*, 6(9): 2775—2782, 1967.
- [4] Bedi, C. S. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 233(1): 251—259, 1984.
- [5] 陶 勇等: *微生物学报*, 30: 259, 1990.
- [6] Eriquez, L. A. et al.: *J. Bact.*, 137(19): 620—626, 1979.
- [7] Ohtakara, A. M. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 45(1): 239—247, 1981.
- [8] Yamamoto, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 49(3): 611—619, 1985.
- [9] 李 梅等: *微生物学报*, 32(2): 115—118, 1992.
- [10] Hiromi, K. et al.: *J. Biochem.*, 59: 411—418, 1966.
- [11] Woollen, J. W. et al.: *Biochem. J.*, 78: 111—116, 1961.
- [12] Muramatsu, T.: *J. Biochem.*, 64: 521—531, 1968.
- [13] Li, S. C. and Yu, T. Li: *Biol. Chem.*, 245: 5153—5160, 1970.
- [14] Rodriguez-Hernandez, J. A. et al.: *J. Biochem.*, 19(5): 449—453, 1987.

## CATALYTIC PROPERTIES OF $\beta$ -N-ACETYLHEXOSAMINIDASE FROM *ASPERGILLUS TAMARII*

Tao Yong Yan Zizheng Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing, 100080)

The purified  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from *Asp. tamarii* hydrolyzes both *p*-nitrophenyl  $\beta$ -N-Acetylglucosaminide and *p*-nitrophenyl  $\beta$ -N-Acetylgalactosaminide. The enzyme has  $K_m$  of 0.44 and 2.0 mmol/L and  $V_{max}$  values of 740.0 and 476.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  for the two substrates respectively. Glucosamine, galactosamine, GlcNAc and GalNAc competitively inhibited both enzymatic activities, the  $K_i$  values of the inhibitors to  $\beta$ -GlcNAcase were 34.9, 62.5, 19.9 and 38.2 mmol/L respectively. The  $K_i$  values of the inhibitors to  $\beta$ -GalNAcase were 24.1, 75.0, 50.0 and 131.8 mmol/L respectively. The enzyme activities toward pNPGlcNAc, pNPGalNAc, and mixtures were determined and activities toward mixtures were lower than that toward pNPGlcNAc and higher than that toward pNPGalNAc. When testing the two substrates mixtures in different molar fractions, the results obtained by Lineweaver-Burk plot showed linear relation. The diagram of apparent  $V_{max}$  versus the mole fractions showed a gradual change between  $f=1$  and  $f=0$  without maximum. From competitive inhibition of enzyme by products and analogues and from the competition between the two substrates, it may be concluded that  $\beta$ -GlcNAcase and  $\beta$ -GalNAcase activities were catalyzed by a common active site.

**Key words** *Aspergillus tamarii*;  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase; Glycosidase; A common active site for two activities