

纤维素酶系中 C_1 酶性质的研究

那 安 崔福绵 马建华 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

对康氏木霉白色变异菌株 AS 3.4001 的纤维素酶系中的 C_1 酶性质进行了研究。 C_1 酶是糖蛋白, 其碳水化合物含量约为 7%, 主要由甘露糖、半乳糖、葡萄糖及氨基葡萄糖组成。氨基酸分析表明, 酶分子中酸性及含羟基氨基酸含量均较高, 二者几乎占总残基数的一半。碱性氨基酸含量相对较低。每个酶分子中含有 20 个半胱氨酸残基。用 SDS 和 6M 盐酸胍处理均没有发现亚基存在。用巯基乙醇及碘醋酸处理未能拆链, 推测 C_1 酶分子仅由一条肽链构成。 C_1 酶冷冻干燥时有明显的聚合现象, 形成分子量不同的聚集体。 C_1 酶有相当高的耐热性。甚至在沸水浴中处理 30 分钟, 仍能保存原活力的 28%。

C_1 酶是纤维素酶系中的重要组成酶之一, 其性质的研究有助于揭示纤维素酶对纤维素的作用机理, 前一篇文章重点报道了 C_1 酶的分离纯化方法。本文将主要报道 C_1 酶的某些性质。

材 料 和 方 法

(一) 酶的来源 按前文报道的方法, 从康氏木霉白色变异菌株 AS 3.4001 获得的粗酶制剂, 通过 Sephadex G-75 凝胶过滤及 DEAE-sephadex A-50 离子交换层析后, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳及 SDS 电泳鉴定为单一带的 C_1 酶, 脱盐冷冻干燥后作为实验材料。

(二) 碳水化合物的分析 碳水化合物总量采用地衣酚及酚-硫酸两种方法测定^[2,3]。以葡萄糖为标准, 以酶总量中糖所占的重量百分比表示碳水化合物的量。碳水化合物的组成采用纸层析的方法鉴定。取 5mg C_1 酶脱盐冷冻干粉, 置于 5ml 安瓿管中, 加 2ml 4N 重蒸盐酸, 抽真空后密封在 100℃ 水解 4 小时。真空干燥后分做二份一份直接进行纸层析以鉴定氨基糖。一份用 Amberlite IR-120 树脂除掉氨基酸后进行纸层析, 分析中性糖。以正丁醇:吡啶:0.1N 盐酸 = 5:3:2 (V/V) 为展开剂, 在 Whatman 1 号滤纸 (20×25cm) 上进行上行二次展开, 每次层析 15 小时, 以苯胺-二苯胺-磷酸为显色液鉴定糖在纸谱上的位置^[4]。

以异戊醇:吡啶:0.1N 盐酸 = 2:2:1 为展开剂也得到了同样的结果。

(三) 氨基酸分析 每个安瓿管中包含 0.56mg C_1 酶脱盐干粉, 0.3ml 6N 重蒸盐酸, 抽真空后密封在 110℃ 分别水解 12、24、48、72 小时。用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪进行分析。半胱氨酸是按照 Scham 的方法^[5]以半胱氨酸的形式进行测定的。色氨酸是按 Matsubara 和 Sasaki 的方法^[6], 用含有 4% 巯基乙醇的 6N 盐酸水解 20 小时后进行测定。

(四) SDS 电泳 基本按照 Weber 的方法进行^[7]。

(五) 亚基及链的拆分

方法 1: 取二份 C_1 酶脱盐干粉 (每份 1mg) 分别溶在 1ml 0.01M, pH7.0 的磷酸钠缓冲液中 (含有 1% SDS 及 1% 巯基乙醇)。一份在 100℃ 热处理 5 分钟, 一份不进行热处理。另取一份 C_1 酶溶在 1ml 6M 盐酸胍中, 然后将三份样品分别进行 SDS 电泳。

方法 2: 取 1mg C_1 酶, 加入 1ml 8M 盐酸胍 (溶在 0.1M, pH8.5 的 Tris-盐酸缓冲液中) 在沸水浴上预热几分钟后, 加入 15μl 巯基乙醇, 加盖后继续煮沸 5 分钟, 降至 37℃ 加入 1ml 碘醋酸溶液 (260μg 碘醋酸溶于 1ml 1M 氢氧化钠溶液中)。

本文于 1980 年 12 月 9 日收到。

再用 2M 氢氧化钠调 pH 至 10.5, 放置 10 分钟, 加入 35 μ l 巯基乙醇, 调 pH 至 7—8。先对 8M 尿素 (溶在 0.01M, pH8.0 的 Tris-盐酸缓冲液中) 透析, 再对 1% SDS (溶在 0.01M, pH7.0 磷酸钠缓冲液中) 透析, 最后进行 SDS 电泳。

(六) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 基本按照 Davies^[8] 和 Hedrick 的方法进行^[9]。

(七) C_1 酶的热稳定性 取 0.2ml C_1 酶液置于带盖小试管中, 分别在 45、55、65、75、85、95℃ 及沸水浴中保温不同时间, 然后迅速放入冷水浴, 冷却后加入 1ml 磷酸膨胀纤维素 (溶于 0.1M pH4.6 醋酸缓冲液中, mg/ml) 在 45℃ 保温 5 小时, 按 Somogyi 法^[10]测定还原糖。以在实验条件下水解出的还原糖在 660nm 的吸光度 (A) 表示 C_1 酶活力。

结果和讨论

(一) 碳水化合物的含量和组成 用

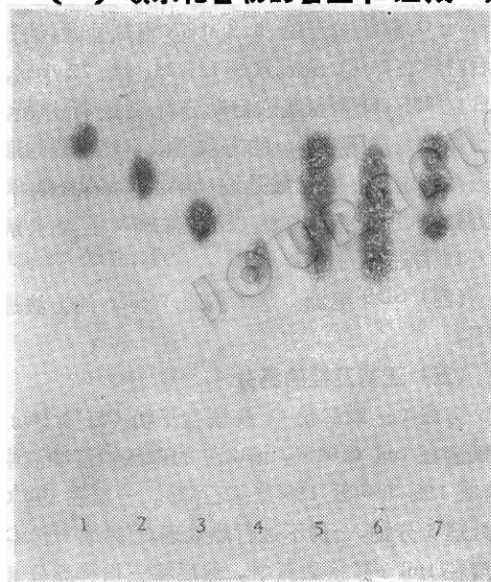


图 1 C_1 酶组分糖的层析图谱

Fig. 1 The paper chromatogram of constituent sugars of C_1 enzyme

展开剂: 正丁醇:吡啶:0.1N 盐酸=5:3:2

Solvent: n-butanol: pyridine: 0.1N

HCl = 5:3:2 (V/V)

1. 甘露糖 mannose 2. 葡萄糖 Glucose 3. 半乳糖 Galactose 4. 氨基葡萄糖 Glucosamine
5. 混合标准糖 Mixture of standard sugars 6. C_1 酶 C_1 enzyme 7. C_1 酶(去氨基酸) C_1 enzyme (after removal of amino acids)

地衣酚法测定 C_1 酶碳水化合物的含量为 7.2%。用酚-硫酸法测定为 6.6%。两种方法的结果比较接近。碳水化合物的组成见图 1 和图 2。

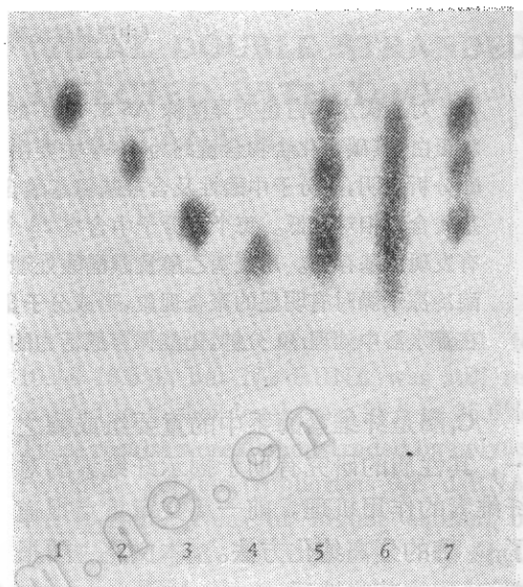


图 2 C_1 酶组分糖的层析图谱

Fig. 2 The paper chromatogram of constituent sugars of C_1 enzyme

展开剂: 异戊醇:吡啶:0.1N 盐酸=2:2:1

Solvent: iso-pentanol: pyridine: 0.1N

HCl = 2:2:1 (V/V)

1—7 同图 1 1—7 The same as in Fig. 1

由图 1, 2 可见 C_1 酶的组分糖主要是甘露糖、半乳糖、葡萄糖和氨基葡萄糖。

(二) 氨基酸分析 氨基酸分析结果见表 1。

由表 1 可见每分子 C_1 酶由 403 个氨基酸残基组成, 其中酸性氨基酸及含羟基氨基酸各占 21.5% 和 22%, 二者几乎占总残基数的一半, 碱性氨基酸含量相对较低。这与先前测得的 C_1 酶等电点偏酸性 (pH 4.0) 的结果是一致的^[1]。每分子 C_1 酶中含有 20 个半胱氨酸残基。

(三) 亚基及链的拆分 按方法部分处理过的样品进行 SDS 电泳, 结果见图 3、图 4。

表 1 C_1 酶的氨基酸组成*Table 1 Amino Acid Composition of C_1 enzyme

氨基酸 Amino acid	残基数/克分子 Residue/mol.	氨基酸 Amino acid	残基数/克分子 Residue/mol.
天冬氨酸 Asp	50	甲硫氨酸 Met	5
苏氨酸 Thr	44**	异亮氨酸 Ile	8
丝氨酸 Ser	44**	亮氨酸 Leu	22
谷氨酸 Glu	37	酪氨酸 Tyr	20
脯氨酸 Pro	20	苯丙氨酸 Phe	12
甘氨酸 Gly	51	赖氨酸 Lys	11
丙氨酸 Ala	24	组氨酸 His	4
半胱氨酸 Cys $\frac{1}{2}$	20	色氨酸 Trp	5
缬氨酸 Val	18	精氨酸 Arg	8

总残基数: 403

* 表中数据均为 48 小时水解结果

The data represent results for 48h. hydrolysis

** 外推到水解 0 时的数据

The value was obtained by extrapolating to zero time

图 3 C_1 酶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of C_1 enzyme

(a) 样品在 1% SDS, 1% 巯基乙醇中, 100°C 处理 5 分钟

Sample in 1% SDS and 1% mercaptoethanol, 100°C, 5min.

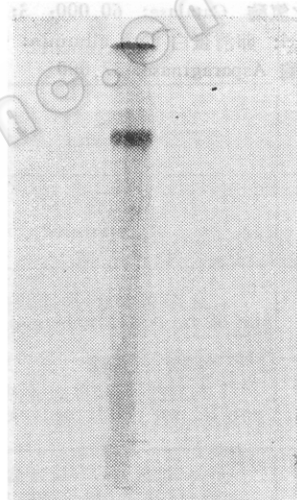
(b) 同上样品未经热处理

The same sample as in (a), unheated

(c) 6M 盐酸胍处理的样品

sample in 6M guanidine-HCl

由图 3、图 4 可见 C_1 酶经各种处理后, 在 SDS 电泳时仍显示为单一带, 且有近似的 R_m 值 (0.21、0.20、0.24、0.21) 从标准曲线上求得分子量均在 56,000—60,000 之间

图 4 C_1 酶经巯基乙醇及碘醋酸处理后的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of C_1 enzyme treated with mercaptoethanol and iodoacetate

(见图 5)。由此结果表明在本实验条件下未发现 C_1 酶有亚基存在或由一条以上的肽链组成。

(四) C_1 酶的聚合现象 从 DEAE-Sephadex A-50 柱上洗脱下来的 C_1 酶在聚丙烯酰胺凝胶电泳时显示为单一带, 冷冻干燥后在主带上方又出现一新带 (图 6)。用 Hedrick 作图法外推到凝胶浓度低于

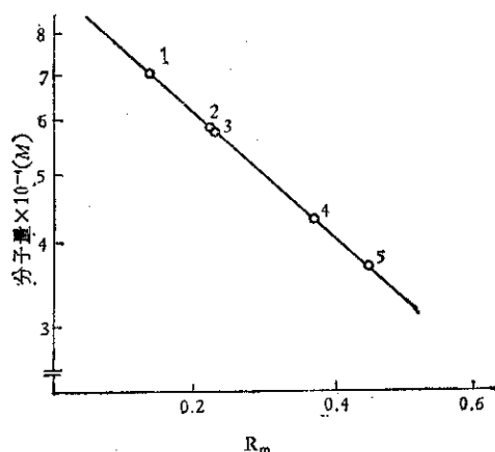


图5 用 SDS 电泳法测定 C_1 酶的分子量

Fig. 5 Estimation of the molecular weight of C_1 enzyme by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
1: 牛血清清蛋白 Bovine serum albumin: 70,000;
2: 过氧化氢酶 Catalase: 60,000; 3: C_1 酶 C_1 enzyme;
4: 卵清蛋白 Egg albumin: 43,000; 5: 天冬酰胺酶 Asparaginase: 37,000

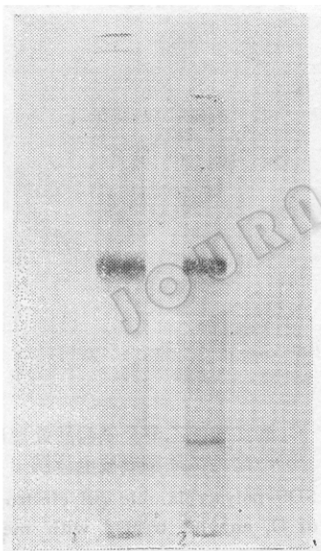


图6 C_1 酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 6 Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of C_1 enzyme

1. 冷冻干燥后的 C_1 酶样品
Sample after freeze-drying

2. 冷冻干燥前的 C_1 酶样品
Sample without freeze-drying

20 μ g 蛋白, 7% 凝胶, 5mA/每管, 2.5h.

20 μ g protein, 7% gel, 5mA/tube, 2.5h.

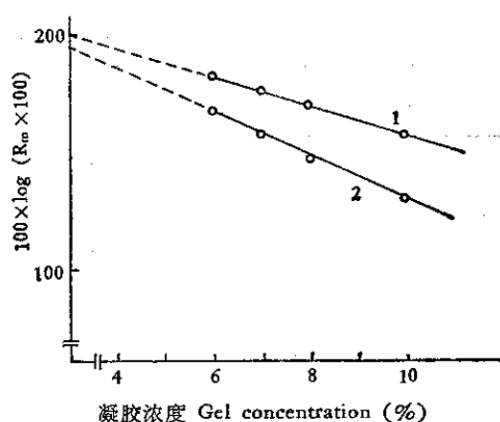


图7 凝胶浓度对 C_1 酶二带电泳迁移率 (R_m) 的影响
Fig. 7 Effect of gel concentration on relative mobility (R_m) of the two band of C_1 enzyme

1. C_1 酶新带, 斜率=0.30 The new band of C_1 enzyme, slope = 0.30
2. C_1 酶主带, 斜率=0.48 The main band of C_1 enzyme, slope = 0.48

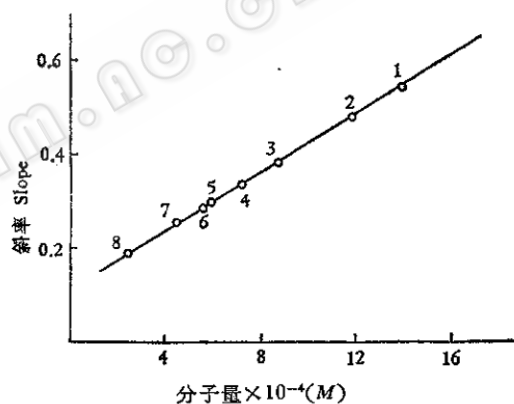


图8 用 Hedrick 的方法测定 C_1 酶的分子量

Fig. 8 Estimation of the molecular weight of C_1 enzyme by Hedrick method

- 1: 牛血清清蛋白二聚体 The dimer of bovine serum albumin
- 2: C_1 酶新带 The new band of C_1 enzyme
- 3: 卵清蛋白二聚体 The dimer of albumin
- 4: 牛血清清蛋白 Bovine serum albumin
- 5: C_1 酶主带 The main band of C_1 enzyme
- 6: 淀粉酶 Amylase
- 7: 卵清蛋白 Albumin
- 8: 胰蛋白酶 Trypsin

凝胶上电泳测分子量的方法, 测得新带分子量为 116,000, 主带分子量为 58,000, 新带为主带的二聚体 (见图 8)。

(五) C_1 酶的热稳定性 当以磷酸膨胀纤维素为底物时, C_1 酶作用最适温度为

2% 处可形成交点, 证明二带为分子量不同电荷相同的物质 (见图 7) 用在不同浓度

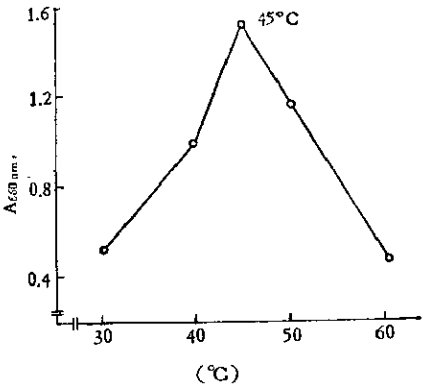


图 9 C₁ 酶的最适作用温度
Fig. 9 The optimal reaction temperature of C₁ enzyme

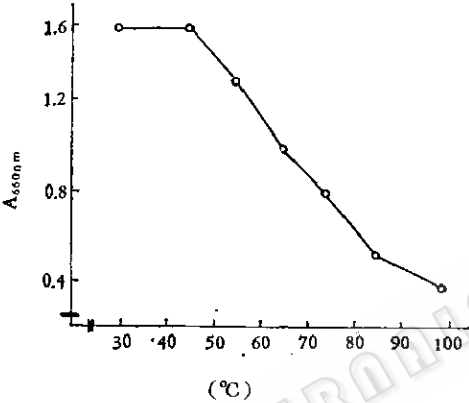


图 10 C₁ 酶在不同温度下的残存活力
Fig. 10 The residual activity of C₁ enzyme after heating at different temperature for 30 min

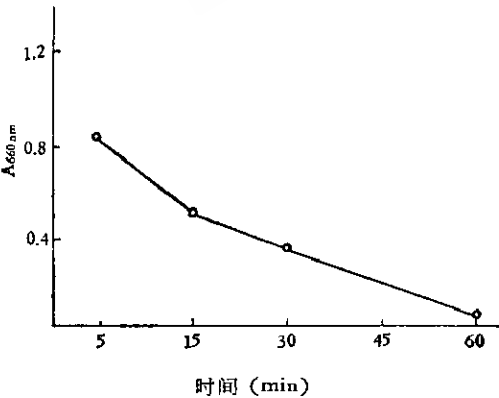


图 11 C₁ 酶在 100°C 热处理不同时间后的残存活力
Fig. 11 The residual activity of C₁ enzyme

11。由图 9 可见 C₁ 酶在高于 45°C 的条件下,对底物的作用能力迅速降低。从图 10, 11 可以看出 C₁ 酶有高的耐热性,甚至在 100°C 煮沸 30 分钟仍能残留 28% 的活力。一般认为底物对酶有保护作用,但从 C₁ 酶作用的最高温度极限低于 70°C,而酶本身的耐热温度可达 100°C 来看,似乎底物的存在使酶对热更为敏感。为了进一步研究温度及底物对 C₁ 酶活力的影响,我们设计了如下实验,结果见表 2。由表 2 可见 C₁ 酶与底物一起在 100°C 进行反应时, C₁ 酶

表 2 温度、底物对 C₁ 酶活力的影响

处 理 Treatment	活 力 Activity (A)
C ₁ 酶 C ₁ Enzyme	0
底 物 Substrate	0
100°C 热处理 30 分钟的 C ₁ 酶 C ₁ Enzyme treated at 100°C for 30 min	0
100°C 热处理 30 分钟的底物 Substrate treated at 100°C for 30 min	0
C ₁ 酶+底物 100°C 反应 30 分钟 C ₁ Enzyme + Substrate → at 100°C for 30 min	0.033
100°C 热处理后的 C ₁ 酶+底物 45°C 反应 30 分钟 C ₁ Enzyme treated at 100°C for 30 min + substrate → at 45°C for 30 min	0.84
C ₁ 酶+底物一起在 100°C 反应 30 分钟再降至 45°C 反应 30 分钟 C ₁ Enzyme + substrate at 100°C for 30 min → at 45°C for 30 min	0.83
C ₁ 酶+底物 45°C 反应 30 分钟 C ₁ Enzyme + substrate → at 45°C for 30 min	2.93

的活力几乎为 0,但降至 45°C 继续保温 30 分钟,其活力可达 0.83,此值与酶单独在 100°C 热处理后再在 45°C 测其残存活力的

结果一致。

讨 论

本文对 C_1 酶的部分性质进行了研究,其中最令人感兴趣的是 C_1 酶具有特殊的热稳定性,甚至在 100°C 煮沸 30 分钟,仍能残留 28% 的活力。联系到前一篇文章^[2]中所报道的 C_1 酶能在酸性(pH2.2)及碱性(pH8.0)条件下保存相当长的时间(408 小时)而不损失活力,推测 C_1 酶分子可能具有相当稳定的构象。这也与 C_1 酶分子中有较高含量的半胱氨酸的结果一致。此外酶与底物一起在 100°C 保温时, C_1 酶活力几乎为零,但降至 45°C 继续保温时,活力可提高到 0.83,说明酶在 100°C 几乎不表现活力并不意味着酶分子构象发生了完全不可逆的破坏,而只是发生了某种不利于与底物结合的变化。当温度降低时这种变化可以部分地恢复。酶与底物一起热处理

与酶单独热处理再加底物测其残存活力基本一致(分别为 0.83 和 0.84),说明底物对 C_1 酶构象的稳定没有保护作用。

参 考 文 献

- [1] 那安等:微生物学报, 21(3): 334—338, 1981.
- [2] Dubois, M.: *Anal. Chem.*, 28 (3): 350, 1956.
- [3] McKelvy, J. F. and Y. C. Lee: *Arch. Biochem. Biophys.*, 132 (1): 99, 1969.
- [4] Schwimmer, S. and A. Bevenue: *Science*, 123: 543, 1956.
- [5] Schram, E., S. Moore and E. J. Bigwood: *Biochem. J.*, 57: 33, 1954.
- [6] Matsubara, H. and R. M. Sasaki: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35: 175, 1969.
- [7] Weber, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 244: 4406, 1969.
- [8] 张树政、王杨声:化学通报, 1973年, 第1期, p. 30.
- [9] Hedrick, J. L. and A. J. Smith: *Arch. Biochem. Biophys.* 126: 155, 1968.
- [10] Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 195:19, 1952.

SOME PROPERTIES OF C_1 ENZYME FROM *TRICHODERMA KONINGII*

Na An Cui Fumian Ma Jianhua Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Some properties of C_1 enzyme from *Trichoderma koningii* white mutant AS 3.4001 have been studied. C_1 enzyme is a glycoprotein, it contains about 7% carbohydrate as mannose, galactose, glucose and glucosamine. Amino acid analysis showed a rather high content of acidic and hydroxyl amino acids, amounting to about one half of the total amino acid residues, while the content of basic amino acids is fairly low. Each enzyme molecule contains 20 cysteine residues.

Presence of subunits or multichains is not found by treatment with SDS or guanidine-HCl and mercaptoethanol and iodoacetate respectively. Presumably, C_1 enzyme molecule only consists of a single chain. Polymerization of C_1 enzyme took place during lyophilization. In addition, C_1 enzyme possessed surprising heat stability, after being treated for 30 min in a boiling water bath, it still retained 28% of the original activity.