

## 海枣曲霉 $\beta$ -葡萄糖苷酶的提纯与性质

曾宇成 张树政

(中国科学院微生物研究所,北京)

通过聚乙二醇 6000-磷酸钾缓冲液双相分离, Sephadex G-100 凝胶过滤、DEAE-Sephadex A-50 及 SE-Sephadex C-50 离子交换柱层析等提纯步骤, 从海枣曲霉 (*Aspergillus phoenicis*) 麦麸培养物抽提液中提纯到凝胶电泳均一的  $\beta$ -葡萄糖苷酶。该酶的最适 pH 5.0, 最适温度 60°C, 在 pH 4.0—7.5 之间及 55°C 以下稳定。Ag<sup>+</sup> 及 Hg<sup>2+</sup> 对该酶有强烈的抑制作用。用 SDS-凝胶电泳法及梯度凝胶电泳法测得该酶的分子量分别为 118000 及 195000 薄层凝胶等电聚焦法测得其等电点为 pH 3.95。

**关键词** 海枣曲霉;  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 提纯与性质

$\beta$ -葡萄糖苷酶 (EC. 3.2.1.21) 能协助纤维素酶将纤维素水解为葡萄糖<sup>[1]</sup>, 也能水解在生物体内有重要生理作用的  $\beta$ -葡萄糖苷<sup>[2]</sup>, 因而有重要的理论和实用价值。在海枣曲霉的培养物中, 我们发现存在着较高活力的木聚糖酶、 $\beta$ -木糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、 $\beta$ -D-岩藻糖苷酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶等多种糖苷酶。为了研究同一菌株产生的不同糖苷酶的性质, 我们分别对这些酶进行了提纯, 并研究了其性质。前文已报道了木聚糖酶<sup>[3]</sup>、及  $\beta$ -半乳糖苷酶的提纯与性质<sup>[4]</sup>, 本文则报道  $\beta$ -葡萄糖苷酶的提纯与性质。

### 材料和方 法

#### (一) 菌种

海枣曲霉 (*Aspergillus phoenicis*) AS.3.3143, 其来源与鉴定均同前文<sup>[3]</sup>。

#### (二) 主要化学试剂

羟基磷灰石, 上海生化所东风试剂厂产品。Sephadex G-100、DEAE-Sephadex A-50、SE-Sephadex C-50、高分子量标准蛋白 (HMW Kit Proteins, 用于梯度凝胶电泳), 及 Pharmalyte (pH 3—10), 均为 Pharmacia 公司产品。分子量标准蛋白(用于 SDS-凝胶电泳) 及对-硝基苯基- $\beta$ -葡

萄糖苷 (PNP- $\beta$ -glc), 均为 Sigma 公司产品。

#### (三) 分析方法

1. 酶活力的测定: 以 PNP- $\beta$ -glc 为底物, 其余条件同  $\beta$ -半乳糖苷酶活力测定法<sup>[4]</sup>。

2. 蛋白质的测定, 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), SDS-凝胶电泳 (SDS-PAGE), 梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳 (梯度 PAGE) 及薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦 (PAGEF), 其操作方法和所用仪器均同前文<sup>[4]</sup>。

### 结果和讨论

#### (一) 酶的制备与提纯

1. 粗酶液的制备和聚乙二醇 6000-磷酸钾缓冲液双相分离, 其操作条件同  $\beta$ -半乳糖苷酶提纯过程的 1—2 步<sup>[4]</sup>。

2. Sephadex G-100 凝胶过滤: 将上一步制备的样品脱盐后, 上到 pH 6.0, 0.02 mol/L 磷酸缓冲液平衡的 Sephadex G-100 柱上 (3.0 × 120 cm), 用同一缓冲液洗脱, 流速为 20 ml/h, 待流出 180 ml 后, 分部收集。测定收集各部份的 A<sub>280</sub> 和酶活力 (图 1)。  $\beta$ -葡萄糖苷酶的洗脱体积为 280 ml 左右。

本文于 1987 年 5 月 7 日收到。

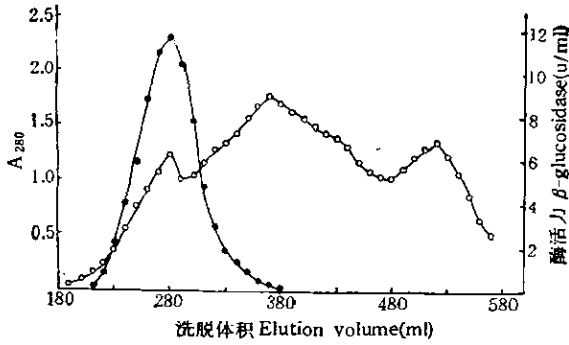


图1 β-葡萄糖苷酶的 Sephadex G-100 凝胶过滤图

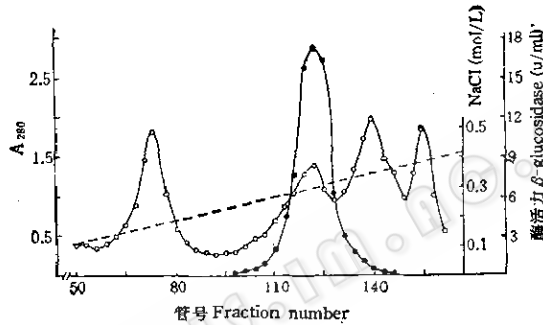
Fig. 1 Gel filtration of  $\beta$ -glucosidase on Sephadex G-100○—○ A<sub>280</sub>; ●—● 酶活力  $\beta$ -glucosidase activity

图2 β-葡萄糖苷酶的 DEAE-Sephadex A-50 柱层析图

Fig. 2 Chromatography of  $\beta$ -glucosidase on DEAE-Sephadex A-50○—○ A<sub>280</sub>; ●—● 酶活力  $\beta$ -glucosidase activity; ---- NaCl

3. DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱层析: 将上一步层析得到的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力峰合并液上到 pH 5.3, 0.02 mol/L 乙酸缓冲液平衡的 DEAE-Sephadex A-50 柱上 (2.8 × 30 cm), 用同一缓冲液充分洗涤, 最后以 0.02—0.45 mol/L NaCl (各 600 ml) 线性梯度洗脱, 流速为 17 ml/h, 分部收集每管约 10 ml。测定各管的 A<sub>280</sub> 及酶活力 (图 2)。 $\beta$ -葡萄糖苷酶在 NaCl 浓度达到 0.3 mol/L 左右即被洗脱下来。

4. SE-Sephadex C-50 离子交换柱层析: 将上一步层析得到的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力峰部份用 20% 聚乙二醇 6000(W/V) 沉淀, 离心, 取沉淀溶于 pH 3.6、0.02 mol/L 乳酸缓冲液中, 上到同一缓冲液平衡的

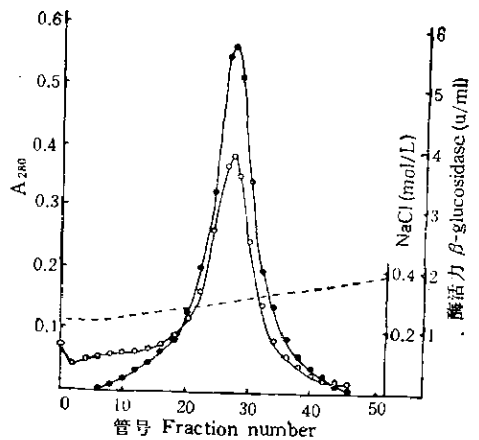


图3 β-葡萄糖苷酶的 SE-Sephadex C-50 柱层析图

Fig. 3 Chromatography of  $\beta$ -glucosidase on SE-Sephadex C-50○—○ A<sub>280</sub>; ●—● 酶活力  $\beta$ -glucosidase activity; ---- NaCl

表 1 海枣曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶的提纯Table 1 Purification of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus phoenicis*

提纯步骤 Step	总蛋白 Total protein (mg)	总酶活 Total activity (u)	比活 Specific activity (u/mg)	提纯倍数 Purification factor	收率 Recovery (%)
粗酶液 Crude enzyme	67060	4525	0.067	1	100
双相分离 Biphasic separation	18970	2873	0.15	2.2	63.5
Sephadex G-100	875	1883	2.2	32.8	41.6
DEAE-Sephadex A-50	178	1430	8.0	119.4	31.6
SE-Sephadex C-50	19	683	35.9	535.8	15.1

SE-Sephadex C-50 柱上 (2.8 × 28 cm), 将柱先用 0.2 mol/L NaCl 充分洗脱, 再以 0.2—0.4 mol/L NaCl (各 400 ml) 线性梯度洗脱, 流速为 15 ml/h。分部收集, 每管约 10 ml。测定各管的  $A_{280}$  及酶活力 (图 3)。 $\beta$ -葡萄糖苷酶在 NaCl 浓度达到 0.3 mol/L 左右即被洗脱下来。

$\beta$ -葡萄糖苷酶整个提纯过程如表 1。

## (二) 酶的纯度

将 SE-Sephadex C-50 柱层析提纯的  $\beta$ -葡萄糖苷酶用 7% 和 10% 凝胶浓度的 PAGE 分析, 结果都为均一成份 (图 4)。

## (三) 酶的基本性质

1. 最适 pH: 在不同 pH 的 0.05 mol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液中, 测定酶水解 PNP- $\beta$ -glc 的活力。该酶最适 pH 为 5.0。

2. 最适温度: 在 pH 5.0 及不同温度下, 测定酶的活力, 该酶在 60°C 时活力最大。

3. 酶在不同 pH 的稳定性: 将酶液在不同 pH 的 0.05 mol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液中, 于 40°C 保温 1h, 然后将 pH 调回 5.0 测剩余活力。该酶在 pH 4.0—7.5 之间稳定。

4. 酶的热稳定性: 将酶液在不同温度下保温 30 min 后测剩余活力, 并以剩余活力为 50% 时的温度作为半失活温度, 该酶



图 4  $\beta$ -葡萄糖苷酶在 7% 和 10% 凝胶上的 PAGE 图

Fig. 4 PAGE of purified  $\beta$ -glucosidase on 7% and 10% of polyacrylamide gel

在此条件下的半失活温度为 60°C。

从上述结果看, 该酶最适 pH 与稳定 pH 均偏酸, 这与米曲霉 (*Asp. oryzae*)<sup>[5]</sup> 等真菌来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶相似, 但其最适温度与热稳定温度则高于许多霉菌来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶。

5. 酶的抑制剂: 有各种金属离子、SDS 或脲存在时, 在 pH 4.0、按常法测酶活力。在所测定的各种试剂中,  $\text{Ag}^+$  对该酶有强的抑制作用,  $\text{Hg}^{2+}$  及 4 mol/L 脲也有较强的抑制作用, 而  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、SDS 及 EDTA 等常见的抑制剂对该酶活力无

明显影响(表 2)。

表 2 各种化学试剂对酶活力的影响

Table 2 Effect of various chemicals on  $\beta$ -glucosidase activity

化学试剂 Chemicals	浓度 Conc. (mmol/L)	相对活力 Relative activity (%)
对照 Control	—	100
AgNO <sub>3</sub>	1	7.8
HgCl <sub>2</sub>	1	53.8
AlCl <sub>3</sub>	1	101.9
BaCl <sub>2</sub>	1	97.1
CaCl <sub>2</sub>	1	96.3
MnCl <sub>2</sub>	1	90.3
CuSO <sub>4</sub>	1	102.2
ZnSO <sub>4</sub>	1	99.3
PbAc <sub>2</sub>	1	92.4
SDS	10	94.7
脲 Urea	4 × 10 <sup>3</sup>	41.8
	1 × 10 <sup>3</sup>	78.9
EDTA	1	98.0

6. 酶的分子量:

(1) SDS-PAGE 法: 电泳后, 根据标准样品的 Rm 值及分子量作出标准曲线, 然后由  $\beta$ -葡萄糖苷酶的 Rm 值求得其分子量为 118000 (图 5)。

(2) 梯度-PAGE 法: 电泳后, 同 SDS-PAGE 法作出标准曲线, 然后由  $\beta$ -葡萄糖苷酶在梯度凝胶上的 Rm 值, 求得其分子量为 195000 (图 6)。

SDS-PAGE 和梯度-PAGE 测到的分别是亚基和完整酶的分子量。由这两种方法测得  $\beta$ -葡萄糖苷酶的分子量相差近 1 倍, 因而该酶可能由两个分子量为 100000 左右的亚基构成, 其全酶分子量为 200000 左右。这与米曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶的分子量、亚基结构相近<sup>[5]</sup>, 而不同于烟曲霉 (*Asp. fumigatus*) 绿色木霉<sup>[7]</sup>等来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶。

7. 酶的等电点: 由薄层凝胶电聚焦法, 测得该酶的等电点为 pI 3.95。该值与

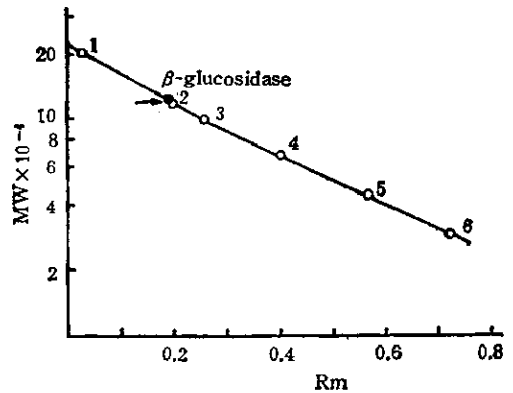


图 5 SDS-凝胶电泳法测定酶的分子量  
Fig. 5 Determination of molecular weight of  $\beta$ -glucosidase by SDS-PAGE

1. Myosinin (205000); 2.  $\beta$ -Galactosidase (116000); 3. Phosphorylase b (94000); 4. Serum albumin (67000); 5. Ovalbumin (45000); 6. Carbonic anhydrase (29000)

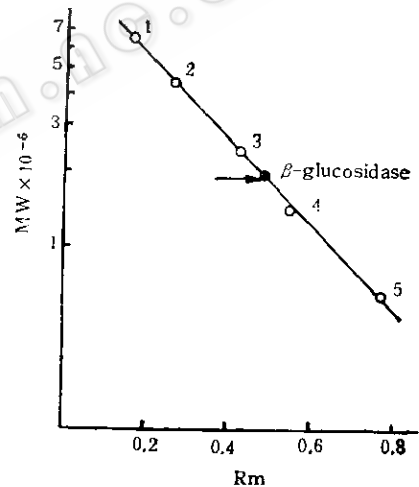


图 6 梯度凝胶电泳法测定酶的分子量  
Fig. 6 Determination of molecular weight of  $\beta$ -glucosidase by gradient-PAGE

1. Thyroglobulin (669000); 2. Ferritin (440000); 3. Catalase (232000); 4. Lactate dehydrogenase (140000); 5. Serum albumin (67000)

温特曲霉 (*Asp. wentii*)  $\beta$ -葡萄糖苷酶的等电点 (pI 3.8)<sup>[8]</sup> 接近, 低于米曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶的等电点 (pI 4.3)<sup>[5]</sup>。

8. 酶的紫外光谱: 将酶液用 pH 5.0、0.02 mol/L 乙酸缓冲液配成 0.5 mg/ml, 用 Hitachi 557 型双光束双波长分光光度

计测定紫外光谱。结果表明该酶显示的最大吸收为 279 nm 及低谷为 250 nm。由该酶在 280 nm 的光吸收, 计算其  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  为 18.6。

### 参 考 文 献

- [1] Shewale, J. G.: *Int. J. Biochem.*, 14: 435—443, 1982.  
 [2] Hoessel, W. et al.: *Trends Biochem. Sci.*, 7:

219—221, 1982.

- [3] 曾宇成等: 微生物学报, 27: 343—349, 1987。  
 [4] 曾宇成等: 生物化学杂志, 3: 552—560, 1987。  
 [5] Mega, T. et al.: *J. Biochem.*, 85: 335—341, 1979.  
 [6] Rudick, M. J. et al.: *J. Bacteriol* 124: 534—541, 1975.  
 [7] Gong, C. S. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 19: 959—981, 1977.  
 [8] Legler, G. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 257: 40—48, 1977.

## PURIFICATION AND PROPERTIES OF $\beta$ -GLUCOSIDASE FROM *ASPERGILLUS PHOENICIS*

Zeng Yucheng Zhang Shuzheng

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

A  $\beta$ -glucosidase has been purified to electrophoretically homogeneity from the wheat bran culture of *Aspergillus phoenicis* by PEG 6000-phosphate biphasic separation, column chromatography on Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50 and SE-Sephadex C-50. The enzyme showed optimal activity at pH 5.0 and 60°C. It was stable in the pH range of 4.0—7.5 and up to 55°C. The enzyme activity was strongly inhibited by  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Hg}^{2+}$ . The

molecular weight of the enzyme was 118000 as determined by SDS-PAGE and 195000 by gradient-PAGE. The isoelectric point was pI 3.95 as determined by PAGIF.

### Key words

*Aspergillus phoenicis*;  $\beta$ -glucosidase; Purification and properties