

分枝犁头霉 α -半乳糖苷酶的纯化和性质*

严自正 朱 静** 朱梅芳 徐桃献 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

刘 波

(黑龙江省应用微生物研究所, 哈尔滨)

分枝犁头霉菌丝体经金刚砂磨碎用水提取的粗酶液, 用两种方法纯化, 一是用制备垂直平板凝胶电泳; 另一是经硫酸铵分级沉淀、Sephadex G-200、DEAE-Sephadex A50 及羟基磷灰石等柱层析。这两种方法纯化后的样品经 PAGE 鉴定皆为均一带, 无其他糖苷酶活性。

酶反应最适温度为 55—60℃, 在 50℃ 保温 7h, 剩余活力为 50%, 70℃ 保温 10min, 则全部失活。最适 pH 为 5.0, pH 6.0—8.5 稳定。

紫外吸收峰最高在波长 272nm 处, 最低在 248nm。激发光谱高峰在波长 280nm, 荧光发射光谱在 300—400nm 之间, 最高在 336nm。

用浓度梯度 PAGE 测定分子量为 323000, SDS-PAGE 测亚基分子量为 81000。薄层凝胶等电聚焦测 pI 值为 4.2。

Pb²⁺ 和 Mn²⁺ 对酶有激活作用, Hg²⁺、Ag⁺ 及 Cu²⁺ 有强烈的抑制作用。4mol/L 尿素使酶活剩余 70%, 1.5mol/L 盐酸胍使酶活剩余 50%。2% SDS 使酶活剩余 25%。

关键词 分枝犁头霉; α -半乳糖苷酶; 糖苷酶

α -D-半乳糖苷酶 (α -D-galactoside galactohydrolase EC 3.2.1.22) 水解非还原性末端为半乳糖苷的化合物释放半乳糖, 因此它能水解密二糖、棉子糖或水苏四糖等。在制糖工业中, 由于甜菜中棉子糖造成糖蜜粘度增加而影响蔗糖结晶, 使糖产量降低, α -半乳糖苷酶能使棉子糖分解为半乳糖和蔗糖, 因而能提高蔗糖得率; α -半乳糖苷酶加入到大豆制品中, 分解人类所不能吸收的棉子糖和水苏四糖为半乳糖和蔗糖, 达到改进制品营养价值的目的。由于它的实用性, 国外从 60 年代即开始由微生物中筛选 α -半乳糖苷酶, 并进行纯化及性质研究^[1-10]。我国于 70 年代后期开始真菌 α -半乳糖苷酶的筛选及酶形成的研究^[11]。80 年代沈仁权等对嗜热脂肪芽孢杆菌耐热 α -半乳糖苷酶进行了纯化^[12]。本

文报道分枝犁头霉 α -半乳糖苷酶的纯化及性质。

材 料 和 方 法

(一) 酶制剂

振荡培养分枝犁头霉 (*Absidia ramosa*, 菌号 108-23), 收集菌体, 冷冻干燥成菌丝体球, 即为 α -半乳糖苷酶制剂。

(二) 酶活测定及活力单位定义^[13, 14]

取 0.2mol/L pH 5.0 乙酸缓冲液 0.25ml, 加 2mmol/L 的对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖苷 (缩写 pNPGal) 0.5ml, 再加酶液 0.25ml, 于 50℃ 反应 10—15min, 立即加入 1ml 1mol/L 的 Na₂CO₃ 终止反应, 在波长 400nm 处比色, 或者将

本文于 1988 年 1 月 26 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

** 现在地址: 北京农业工程大学农畜产品加工工程系化学教研室。

反应量均相应减少 1/5, 反应后加 3ml 0.2mol/L 的 Na_2CO_3 , 终止反应。在上述条件下, 将每分钟释放 $1\mu\text{mol}$ 的硝基酚所需的酶量定义为 1 个酶活单位 (u)。

(三) 其他分析方法

蛋白质测定用 Lowry 法^[15], 纯度鉴定用 disc 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)^[16], 分子量用浓度梯度 PAGE^[17] 及 SDS-不连续 PAGE^[18-19] 测定, 等电点用薄层等电聚焦方法^[20-21] 测定。

(四) 药品与仪器

557 型紫外分光光度计及 850 型荧光光度计 (Hitachi 产品), 721 型分光光度计 (上海分析第三仪器厂产品), 夹芯式垂直板电泳池 (苏州吴县科研仪器厂产品), pNPGal 及其他糖苷底物 (Sigma 产品), 已知分子量及测等电点的蛋白质、Sephadex G-200 及 DEAE-Sephadex A50 (Pharmacia 产品), 羟基磷灰石 (中科院生物物理所产品)。

结果和讨论

(一) 酶的纯化

将冷冻干燥的菌丝体球置于 10 倍的蒸馏水中浸泡 1h 以上, 然后加等量的 100 目金刚砂, 研磨成糊状, $7000 \times g$ 4°C 下离心 20min 收集上清液, 该清液中加入少量的核糖核酸酶及脱氧核糖核酸酶, 置冰箱中过夜。然后, 在 $8000 \times g$ 4°C 下离心 30 min, 上清液为粗酶液, 用两种方法纯化。一种是将粗酶液进行制备 PAGE, 电泳结束, 在胶两侧分别切下宽 0.5cm 的胶带, 放入盛有 1mmol/L pNPGal 及 0.1mol/L pH 5.0 的乙酸缓冲液的试管中, 50°C 保温, 当胶上出现黄色区带 (即酶带) 时, 即将胶放回原处, 切下相应于黄色区带的胶, 于蒸馏水中捣碎, 在冰箱中过夜, 过滤, 滤液对蒸馏水透析, 再用 disc PAGE 鉴定是否为均一带, 纯化前后 PAGE 结果见图 1。

另一种是将粗酶液用饱和度为 60—80% 的磺胺铵分级沉淀, 沉淀用蒸馏水溶

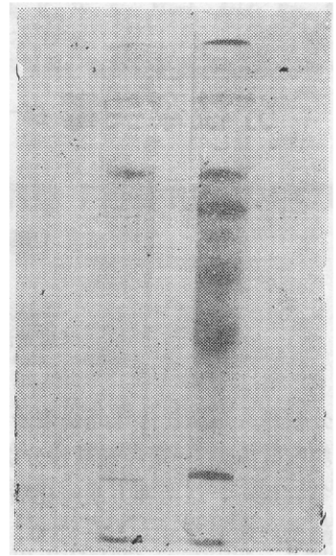


图 1 α -半乳糖苷酶纯化前后凝胶电泳图
Fig. 1 PAGE pattern of the purified α -galactosidase

右: 粗酶液; 左: 纯化样品

Right: crude extract; Left: purified sample

解, 上到用 0.02mol/L pH 5.8 的乙酸缓冲液平衡过的 Sephadex G-200 柱 ($1.5 \times 98\text{cm}$), 再用此缓冲液洗脱, 部分收集器收集, 流速为 24ml/h。测定洗脱液在 280nm 的吸收值及酶活, 将酶活力部分用 DEAE-Sephadex A50 柱 ($1.6 \times 30\text{cm}$) 层析, 用 0.02mol/L pH 5.8 的乙酸缓冲液平衡, 上样后用 NaCl 梯度 (下限 0.03mol/L, 上限 0.3mol/L) 在上述缓冲液中各 500ml 洗脱, 用部分收集器收集, 流速 15ml/h。测定洗脱液在 280nm 的吸收、酶活及电导 (图 2)。并选择不同部位洗脱液进行 disc PAGE。收集 α -半乳糖苷酶带为主的洗脱液, 并用同样条件再层析一次。将再层析后的洗脱液继续用羟基磷灰石柱 ($1 \times 6\text{cm}$) 吸附层析, 用 5mmol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液平衡, 上样后, 用相同缓冲液浓度梯度 (下限 0.1mol/L 300ml, 上限 0.3mol/L 300ml) 洗脱, 流速 15ml/h, 用部分收集器收集, 测定在 280nm 的吸收值、酶活、电

表 1 分枝犁头霉 α -半乳糖苷酶的纯化
Table 1 Purification of α -galactosidase from *Absidia ramosa*

纯化步骤 Step	体积 Volume (ml)	总活力 Total activity (u)	总蛋白质 Total protein(mg)	比活 Specific activity (u/mg)	纯化倍数 Purification (fold)	得率 Recovery (%)
Crude extract	*560	1736.0	1220.80	1.42	1.0	100.0
Ammonium sulfate	30	1076.1	155.40	6.92	4.9	62.0
Sephadex G-200	215	885.8	45.15	19.62	13.8	51.0
DEAE-Sephadex A 50 (1st)	78	393.1	5.46	72.00	50.7	22.6
DEAE-Sephadex A 50 (2nd)	342	256.5	2.05	125.00	88.0	14.8
Hydroxylapatite	28	11.5	—	—	—	0.7

* 菌丝体球 23.5g
Mycelium of *Absidia ramosa*

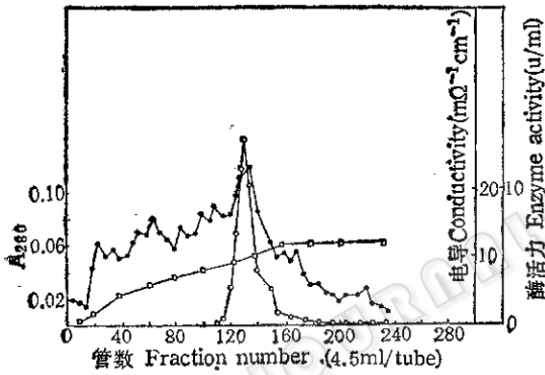


图 2 α -半乳糖苷酶 DEAE-Sephadex A50 第一次层析图

Fig. 2 Chromatogram of α -galactosidase on the first DEAE-Sephadex A50 column

● 光吸收 Absorbance at 280nm; ○ 酶活性 α -Galactosidase activity; □ 电导 Conductivity

导及进行 disc PAGE。收集在凝胶上呈均一带的洗脱液。经过以上各步, α -半乳糖苷酶纯化约 90 倍, 回收率为 0.7%, 比活约 125u/mg, 各步纯化结果及 disc PAGE 图谱分别见表 1 和图 3。

(二) 酶的纯度鉴定

检测了粗酶与纯酶液中 α/β -半乳糖苷酶、 α/β -葡萄糖苷酶、 α/β -甘露糖苷酶、 α/β -岩藻糖苷酶、 α/β -木糖苷酶、 α/β -乙酰氨基半乳糖苷酶和 β -乙酰氨基葡萄糖

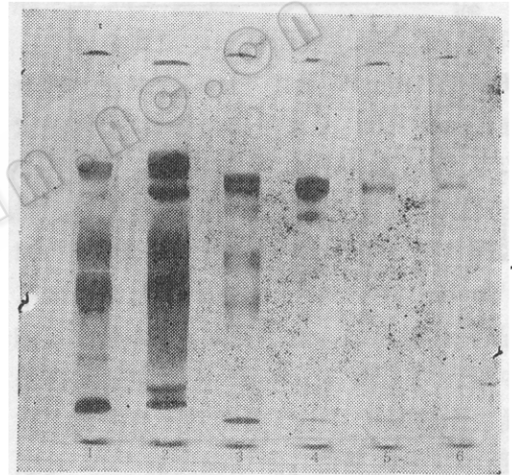


图 3 各步纯化样品的凝胶电泳图

Fig. 3 PAGE patterns from samples of different steps of purification

1.粗酶液 Crude extract; 2.硫酸铵分级 Ammonium sulfate fractionation; 3.凝胶过滤 Sephadex G-200 gel filtration; 4.层析 DEAE-Sephadex A50 chromatography; 5.第二次层析 2nd DEAE-Sephadex A50 chromatography; 6.羟基磷灰石层析 Hydroxylapatite chromatography

苷酶活性, 结果在粗酶液中除了 α -半乳糖苷酶活性外, 还有 β -半乳糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶, 其活力相对 α -半乳糖苷酶分别为 10.8 和 35.7%, 而在纯化后的样品中不再有这两种酶活; 不论在粗酶或纯酶液中均没有蔗糖酶活性。

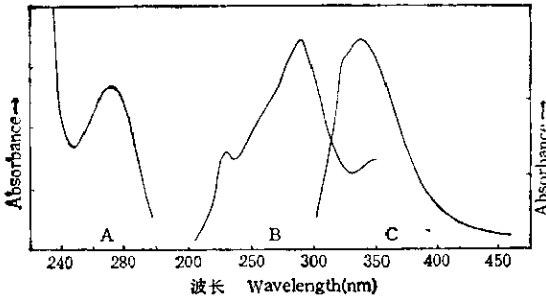


图 4 α -半乳糖苷酶紫外及荧光光谱

Fig. 4 UV and fluorescence spectrum of α -galactosidase

A. 紫外吸收光谱 UV absorption spectrum; B. 激发光谱 Excitation spectrum; C. 发射光谱 Emission spectrum

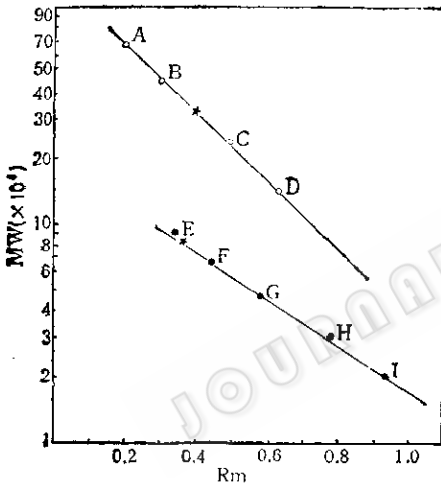


图 5 不同蛋白质分子量与相对迁移率的关系

Fig. 5 The logarithmic value of standard proteins molecular weight Vs relative mobility

A. Thyroglobulin (669000); B. Ferritin (440000); C. Catalase (232000); D. Lactate dehydrogenase (140000); E. Phosphorylase b (94000); F. Albumin (67000); G. Ovalbumin(67000); H. Carbonic anhydrase (30000); I. Trypsin inhibitor (20000); —○— Conc. gradient PAGE; —●— SDS PAGE; ○, ● Standard protein; ★ Sample protein

除了检查以上糖苷酶活性外, 还将纯酶液(约 16 μ g 蛋白质), 用 SDS-PAGE 和浓度梯度(30—40%)PAGE 及薄层凝胶等

电聚焦鉴定均为均一带。

(三) 酶的性质

1. 光谱学性质: 对纯化后 α -半乳糖苷酶进行紫外扫描, 其最高吸收在波长 272nm, 低谷在 248nm。激发光谱最高在 280nm, 荧光峰在 300—400nm 之间, 在 336nm 有一最大峰值, 且发射光谱与激发光谱呈镜象对称关系(图 4)。

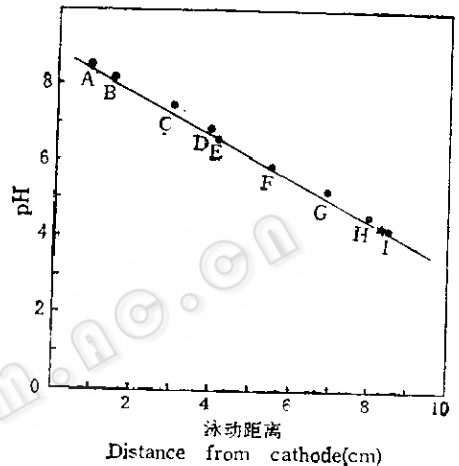


图 6 不同蛋白质等电点与泳动距离的关系

Fig. 6 the isoelectric point of the standard proteins Vs distance from cathode

A. Lentil lectin (8.45); B. Lentil lectin (8.15); C. Horse myoglobin (7.35); D. Horse myoglobin (6.85); E. Human carbonic anhydrase B (6.55); F. Bovine carbonic anhydrase B (5.85); G. β -Lactoglobulin A (5.20); H. Soybean trypsin inhibitor (4.55); I. Glucose oxidase (4.15)

● Standard protein; ★ Sample protein

2. 分子量测定: 用上述纯度鉴定时的浓度梯度 PAGE 及 SDS-PAGE 测定了 α -半乳糖苷酶天然分子量为 323000, 亚基分子量为 81000, 其 R_m 值与分子量关系见图 5。纯化后 α -半乳糖苷酶是一个由 4 个具相同分子量的亚基组成的, 这与 *Pycnoporus cinnabarinus*^[9] 的 α -半乳糖苷酶具有 4 个亚基相同, 但后者分子量为 210000, 亚基为 52000。

3. 等电点测定: 用上述纯度鉴定时的

表 2 不同金属离子对酶活力的影响

Table 2 Effect of various metallic ions on α -galactosidase activity

化合物 Compound	终浓度 Final conc. (mmol/L)	相对活力 Relative activity (%)
Control	0	100
HgCl ₂	1	0
	5×10 ⁻⁴	0
	5×10 ⁻⁵	66.0
	5×10 ⁻⁶	97.0
	5×10 ⁻⁷	100.0
AgNO ₃	1	0
CuCl ₂	1	26.9
Al ₂ (SO ₄) ₃	1	84.5
Cd(AC) ₂	1	86.9
FeSO ₄	1	88.0
ZnSO ₄	1	90.9
BaCl ₂	1	94.3
FeCl ₂	1	95.3
CaCl ₂	1	102.1
NaF	1	102.3
EDTA	1	104.8
KCl	1	106.8
MgSO ₄	1	108.6
Li ₂ SO ₄	1	111.8
Tris	1	115.6
Pb(AC) ₂	1	132.2
	1	142.3
	1×10 ⁻¹	114.3
MnSO ₄	1×10 ⁻²	102.3
	1×10 ⁻³	97.4
	1	135.0
	1×10 ⁻¹	114.4
	1×10 ⁻²	110.0
	1×10 ⁻³	99.5

薄层等电聚焦法测定,凝胶浓度 6%,两性载体(40%) pH3—10,根据样品的泳动距离,求出 α -半乳糖苷酶的 pI 值为 4.2(图 6)。

4. 温度与酶活力的关系: 粗酶或纯酶作用最适温度均在 55—60℃。

5. 热稳定性: 将粗酶与纯酶样品分别在不同温度保温一定时间,然后测其剩余

活力。结果表明,在 50℃ 保温 7h 纯酶活力保留 50%,粗酶 82%。在 60℃ 保温 2h,纯酶活力仅剩 20%,粗酶 50%,而在 70℃,仅 10min 不论纯酶或粗酶均全部失活,粗酶热稳定性比纯酶好。

6. pH 与酶活力关系: 不同 pH 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液与纯酶在 50℃ 反应 10min,测定酶活,酶作用最适 pH 为 5.0。

7. pH 稳定性: 将纯酶与不同 pH 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液分别在 20° 及 50℃ 保温 30min,然后测定酶剩余活力,结果在 20℃ pH5.0—8.5 稳定,在 50℃ 时在 pH 6.0—8.5 稳定,在这样 pH 范围内均能保持酶活力 50% 以上。

8. 金属离子对酶活力影响: 18 种化合物与纯酶在 30℃ 保温 30min,然后测定酶活力,详细结果见表 2。Hg²⁺、Ag⁺ 或 Cu²⁺ 强烈抑制酶活力。Pb²⁺ 或 Mn²⁺ 可以提高酶活,其他金属离子无显著影响。当 Mn²⁺ 浓度小于 1×10⁻²mmol/L 时对酶还不足以激活,浓度大于 1×10⁻²mmol/L 时,随着 Mn²⁺ 浓度增加,酶活逐渐升高,但当其浓度大于 1mmol/L 时,反应液中有大量白色絮状沉淀产生,干扰酶活力测定。Pb²⁺ 能使酶激活,目前尚未见报道。Hg²⁺ 浓度仅为 5×10⁻⁴mmol/L 时,酶即全部失活,表现出强烈抑制作用。

9. 变性剂对酶活力的影响: 将不同浓度的 SDS、盐酸胍或尿素分别与纯酶在 18℃ 或 50℃ 保温 30min,然后测定酶剩余活力。当 SDS 终浓度为 2% 时,在 18℃ 酶活力仍有 25%;若在 50℃,即使 SDS 为 0.062%,酶即全部失活。盐酸胍达 1.5 mol/L 时,在 18℃ 酶活力仍保持 50%;若 50℃,盐酸胍浓度为 0.75mol/L,酶几乎全部失活。当尿素为 2mol/L,不论在 18℃ 或 50℃,均能保持酶活 50% 以上(图 7)。

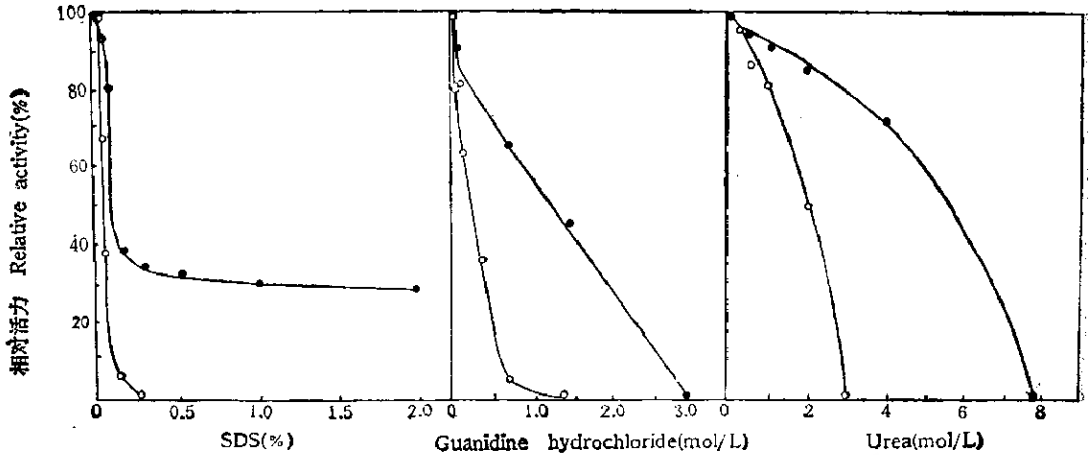


图7 SDS、盐酸胍和尿素对酶活力影响

Fig. 7 Effect of SDS, guanidine hydrochloride and Urea on activity respectively

● 18°C; ○ 50°C

参 考 文 献

- [1] Akiba, T. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 40(9): 1851—1855, 1976.
- [2] Kawamura, S. et al.: *Ibid.*, 40(4): 641—648, 1976.
- [3] Suzuki, H. et al.: *Ibid.*, 30(10): 1039—1046, 1966.
- [4] Smiley, K. L. et al.: *Appl. Envir. Micro.*, 31(4): 615—617, 1976.
- [5] Kaji, A. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 36(8): 1335—1342, 1972.
- [6] Suzuki, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 245(4): 781—786, 1970.
- [7] Oishi, K. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 39(11): 2129—2135, 1975.
- [8] Bahl, O. P. et al.: *J. Biol. Chem.*, 244: 1970, 1969.
- [9] Ohtakara, A. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 48(5): 1319, 1984.
- [10] Wong, H. C. et al.: *Appl. Envir. Micro.*, 52(5): 1147—1152, 1986.
- [11] 刘波等: *微生物学报*, 19(1): 225—227, 1979.
- [12] 沈仁权等: *复旦学报*, 20(2): 177—185, 1979.
- [13] Agrawal, K. M. L. et al.: *Methods in Enzymology*, 28: 720, 1972.
- [14] Li, Yu-teh et al.: *Ibid.*, 28: 714—720, 1972.
- [15] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- [16] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404, 1964.
- [17] 张龙翔等: *生化实验方法和技术*, 高等教育出版社, 北京, p.119—124, 1985.
- [18] Laemmli, V. K.: *Nature*, 227: 680, 1970.
- [19] Lugtenberg, B. et al.: *FEBS Lett.*, 58: 254, 1975.
- [20] Vesterberg, O.: *Methods in Enzymology*, 22: 389, 1971.
- [21] 杨寿钧: *酶制剂工业(上册)*(张树政主编), 科学出版社, 北京, p.307—313, 1984.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF α -GALACTOSIDASE FROM *ABSIDIA RAMOSA*

Yan Zizheng Zhu Jing Zhu Meifang

Xu Taoxian Zhang Zhuzheng

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

Liu Bo

(*Institute of Applied Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin*)

α -galactosidase extracted from mycelium of *Absidia ramosa* was purified with two methods, one by using preparative slab gel electrophoresis; the other using ammonium sulfate fractionation, followed with gel filtration on Sephadex G-200, chromatography on DEAE-Sephadex A50, re-chromatography on DEAE-Sephadex A50 and chromatography on hydroxyapatite. The purified enzyme was homogeneous on disc gel electrophoresis without other glycosidase activity.

The optimum reaction temperature of the enzyme was 55—60°C. The medium inactivity dose for this α -galactosidase was 50°C for 7 h and inactivated completely at 70°C for 10 min. This enzyme exhibited the optimum pH at 5.0 and was stable between pH 6.0 and 8.5.

The UV absorption and fluorescence spectra of α -galactosidase were determined. The maximum absorption wavelength was at

272 nm and minimum 248 nm. For fluorescent analysis the excitation spectra was at 280 nm. The emission spectra was at between 300—400 nm, maximum at 336 nm.

The molecular weight of purified α -galactosidase was determined to be about 323000 by concentration gradient PAGE and about 81000 by discontinuous SDS-PAGE. The isoelectric point was evaluated to be about 4.2 by polyacrylamide gel electrofocusing.

The α -galactosidase activity was activated by Mn^{2+} but was completely inhibited by Hg^{2+} , Ag^+ or Cu^{2+} ions. The α -galactosidase activity was remained 70% by 4 mol/L urea, 50% by 1.5 mol/L guanidine hydrochloride, and only 25% by 2% SDS.

Key words

Absidia ramosa; α -galactosidase; Glycosidase