

分枝犁头霉 α -半乳糖苷酶的底物特异性*

朱 静** 严自正 张树政

(中国科学院微生物研究所,北京)

α -半乳糖苷酶作用于棉子糖后产物为半乳糖和蔗糖,作用于蜜二糖后产物为半乳糖和葡萄糖。对蜜二糖、棉子糖及水苏四糖的水解速率顺序为:蜜二糖(82.2%)>水苏四糖(13.7%)>棉子糖(7.5%)。

对于酶的不同底物 pNPGal、蜜二糖、棉子糖及 α -甲基-D-半乳糖苷,其 K_m 值分别为 0.29、5.0、79.4 及 55.5mmol/L, V_{max} 值分别为 1.43、0.23、0.21 及 0.16 μ mol \cdot min⁻¹ \cdot ml⁻¹。

测定了 43 种碳水化合物对酶活力的影响。其中半乳糖、甘油醛及纤维二糖使酶活力下降 50% 以上, D-阿拉伯糖、塔格糖、半乳糖醛酸、D-核糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖酸内酯、乳糖及蔗糖使酶活下降到 70% 左右;而二羟丙酮、2-脱氧-D-半乳糖及异丙基 β -D-硫代半乳糖苷使酶活提高 50% 左右;其余的碳水化合物对酶活无明显影响。

测定了 Hg²⁺、甘油醛及半乳糖对酶的抑制类型。结果表明, Hg²⁺ 是 α -半乳糖苷酶的非竞争性抑制剂,半乳糖及甘油醛是酶的竞争性抑制剂,后两者的 K_i 值分别为 8.3 及 12.5 mmol/L。

关键词 分枝犁头霉; α -半乳糖苷酶;糖苷酶

前文报道了分枝犁头霉 α -半乳糖苷酶的纯化及一般性质^[1], 本文则报道该酶的底物特异性及部分动力学特征。

用 Glc 氧化酶方法测定^[2],其他底物释放的半乳糖 (Gal) 用 Somogyi-Nelson 方法测定^[3]。

材 料 和 方 法

(一) 材料

凝胶电泳均一的分枝犁头霉 α -半乳糖苷酶^[1]。

(二) 酶活力测定

1. 以 pNPGal 为底物,测定方法同前文^[1]。

2. 以蜜二糖 (Mel)、棉子糖 (Raf)、水苏四糖 (Sta) 及 α -甲基-D-半乳糖苷 (α -Met-Gal) 为底物。测定方法如下: 取 0.2mol/L pH5.0 乙酸缓冲液 0.25ml, 分别加入 2% 的上述底物 0.5ml, 50℃ 保温 5min, 再加入酶液 0.25ml, 反应 15min, 立即置于沸水浴中 10min, 以终止反应。Mel 经酶水解后所释放的葡萄糖 (Glc)

结 果 和 讨 论

(一) 对各种合成糖苷底物的水解作用

将 2mmol/L 的各种合成糖苷底物在 pH5.0, 50℃ 下与酶作用 15min, 加 Na₂CO₃ 终止反应, 在波长 400nm 比色。结果表明, α -半乳糖苷酶只能水解 pNPGal, 而对其它的底物——pNP- β -D-Gal、pNP- α -D-Glc、pNP- β -D-Glc、pNP- α -D-甘露糖苷 pNP- β -D-甘露糖苷、pNP- α -L-岩

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。

藻糖苷, pNP- β -D-岩藻糖苷、pNP-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷、pNP-N-乙酰- β -D-氨基半乳糖苷、oNP-N-乙酰- α -D-氨基半乳糖苷均无作用。

(二) 酶的水解产物

10% 的 Raf 或 Mel 1ml, 加入 0.2 mol/L pH5.8 的乙酸缓冲液 1ml, 酶液 2ml (约 0.8u), 50 $^{\circ}$ C 保温 3h, 放沸水浴中 10min, 冷却后用新华 I 号滤纸层析、显色^[4], 结果见图 1。Raf 经酶解后, 产物为 Gal 和蔗糖 (Suc) (这两种糖的迁移率接近), 图谱上还有未作用完的 Raf, 产物中没有果糖 (Fru) 和 Glc, 这与测定无蔗糖酶活性结果是一致的^[1]。Mel 水解后, 其产物为 Glc 和 Gal, 同时还生成一种比 Mel 迁移率低的寡糖, 这种转糖苷现象曾有过报道, 如 *Pycnoporus cinnabarinus* 的 α -半乳糖苷酶^[5]水解 Raf 时, 用 HPLC

分析产物, 发现有 Sta 生成。 *Montierella vinacea* 菌丝体 α -半乳糖苷酶^[6]水解过量的 Raf 或 Mel 时, 也有新的寡糖生成。分枝犁头霉 α -半乳糖苷酶在水解 Raf 时, 没有发现有新寡糖生成。

(三) 不同底物的相对水解速率

摩尔数相同的 Mel、Raf 或 Sta 分别与酶在 50 $^{\circ}$ C 保温 2h。测定释放的 Glc 或 Gal, 并计算出水解百分率, 结果见表 1。在相同的水解条件下, 三种底物的水解速率顺序是 Mel > Sta > Raf。这与 *M. vinacea* α -半乳糖苷酶^[6]的结果一致, 而链霉菌的 α -半乳糖苷酶^[7]对这三种底物的水解速率顺序是 Raf > Sta > Mel, *Diplococcus pneumooniae* α -半乳糖苷酶^[8]是 Mel > Raf > Sta, 看来, 不同来源的 α -半乳糖苷酶, 其活性位区微环境存在着一定差异。

表 1 不同底物的相对水解速率

Table 1 The comparison of relative hydrolysis rates of various substrates

Substrate	Mel	Raf	Sta
Amount of substrate (mol)	5×10^{-7}	5×10^{-7}	5×10^{-7}
Gal or Glc released (mol)	4.11×10^{-7}	0.37×10^{-7}	1.37×10^{-7}
Gal or Glc released (%)	82.2	7.5	13.7

(四) K_m 及 V_{max} 值

不同浓度的 pNPGal (0.25—4.0 mmol/L)、Mel (0.94—7.5 mmol/L)、 α -Met-Gal (6.25—50 mmol/L) 或 Raf (5.0—80 mmol/L) 与酶反应, 按常规方法测定酶活, 用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 计算 K_m 值及 V_{max} 值 (图 2 和表 2)。在表 2 中还列出了其他微生物来源的 α -半乳糖苷酶的 K_m 及 V_{max} 值, 以便比较。分枝犁头霉 α -半乳糖苷酶对不同底物的水



图 1 α -半乳糖苷酶水解产物的纸层析图谱
Fig. 1 Paper chromatogram of substrates hydrolysis with α -galactosidase
A. Gal; B. Glc; C. Fru; D. Suc; E. Mel; F. Raf; G. Mel was incubated with α -galactosidase; H. Raf was incubated with α -galactosidase

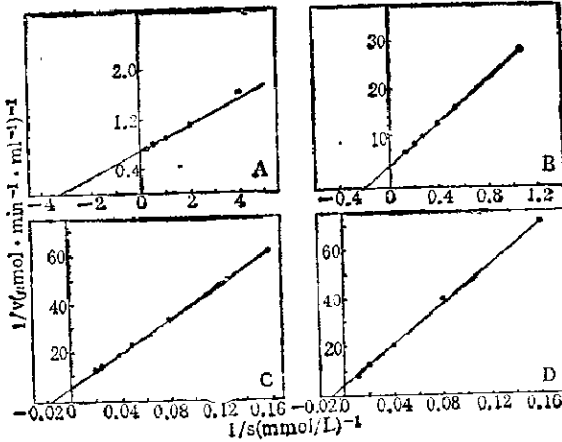


图2 对不同底物的 Lineweaver-Burk 图
Fig. 2 Lineweaver-Burk plots for different substrates A. pNPGal; B. Melibiose; C. α -Met-D-galactose; D. raffinose

解能力及亲和力与 *M. vinacea* α -半乳糖苷酶^[6] 比较接近, 而和其他微生物来源的 α -半乳糖苷酶稍有不同, 一般说, α -半乳糖苷酶对合成底物的亲和力远远大于天然底物。

(五) 不同碳水化合物对酶活力的影响

将 43 种碳水化合物用蒸馏水配成一定的浓度, 各取 0.05ml, 加入 0.2mol/L pH5.0 乙酸缓冲液 0.05ml 及酶液 0.05ml, 30℃ 保温 30min, 再加入底物 pNPGal 0.05ml (终浓度为 1mmol/L), 使碳水化合物终浓度为 50mmol/L, 按常规方法测酶活力, 以不加碳水化合物的酶活力作 100%。结果表明, D-Gal、甘油醛及纤维二糖对酶有抑制作用, 使酶的相对活力在 50% 以下; D-阿拉伯糖、塔格糖、D-半乳糖醛酸、D-核糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖酸内酯、乳糖及 Suc 使酶的相对活力下降至 70%; 葡庚糖、N-乙酰-D-氨基葡萄糖、L-山梨糖、L-岩藻糖、L-Glc、水杨素、景天庚醛糖、D-岩藻糖、山梨醇、 α -Met-Gal、D-Glc、D-木糖、D-阿拉伯糖醇、甘露醇、D-古洛糖酸内酯、氨基葡萄糖、木糖醇、 β -Met-Gal、D-半乳糖酸

-r-内酯、N-乙酰-D-氨基半乳糖、L-阿拉伯糖醇、海藻糖、半乳糖醇、L-半乳糖酸-r-内酯、肌醇、松三糖、D-木糖、 α -甲基-D-甘露糖苷及氨基半乳糖等对酶活力没有影响。而二羟丙酮、2-脱氧-D-半乳糖及异丙基- β -D-硫代半乳糖苷使酶相对活力提高至 150% 左右, 这种现象不仅在 α -半乳糖苷酶中出现, 在其他糖苷酶也有这种现象。

(六) 不同浓度的 Suc 对酶活力影响

考虑到在制糖工业中会使用 α -半乳糖苷酶处理糖蜜, 而糖蜜中存在有高浓度的 Suc, 因此用不同浓度的 Suc 在 30℃ 下与酶液保温 30min, 然后加入底物 pNPGal, 按常规方法测定酶活力, 结果见图 3。当 Suc 浓度为 50mmol/L 时, 酶的相对活力为 77.5%; 为 800mmol/L, 相对活力为 48.9%。

(七) Hg^{2+} 、Gal 或甘油醛对 α -半乳糖苷酶活力的影响及其抑制类型

微量的 Hg^{2+} 可使酶完全失活^[3], Gal 或甘油醛对酶活力也有很强的抑制作用, 当 Gal 浓度为 25mmol/L 时, 酶相对活力为 76.5%; 为 400mmol/L 时, 相对活力仅 10% 左右; 甘油醛浓度为 25mmol/L 时, 相对活力为 90%, 400mmol/L 时, 酶完全失活(图 4)。因此, 以 pNPGal 为底物, 测定 Hg^{2+} 、Gal 或甘油醛对酶的抑制类型。分别将各种抑制剂与酶(终浓度为 0.02u) 在 30℃ 保温 30min, 然后加入不同浓度的 pNPGal, 测定酶活力。用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法作图, 结果见图 5。加 Hg^{2+} 后, K_m 不变, 而 V_{max} 由 $1.43 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ 下降至 $0.83 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$, 因此 Hg^{2+} 为非竞争性抑制剂。加 Gal 或甘油醛后, K_m 增加, V_{max} 不变, 这两者应为竞争性抑制剂, 根据图 5 可求出 K_m 或 K_p 值, 用下列公

表 2 不同微生物 α - 半乳糖苷酶的 K_m 和 V_{max} 值比较

Table 2 K_m and V_{max} of galactosidase from various microorganisms

微生物 Microorganisms	K_m	V_{max}	<i>Aspidium ramosa</i>	K_m	V_{max}	<i>Bacillus stea ro- thermophilus</i>	K_m	V_{max}	<i>Streptomyces spp.101</i>	K_m	V_{max}	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	K_m	V_{max}	<i>Coriicium rolfsii</i>	K_m	V_{max}	<i>Mortierella vinacea</i>	K_m	V_{max}	<i>Monascus pilosus</i>	K_m	V_{max}	
substrate																								
	pNPGal	0.29	1.43																					
	oNPGal			1.30																				
	Phenyl- α -D-Gal	55.5	0.16																					
	Methyl- α -D-Gal	5.00	0.23																					
	Melilitiose									1.00														
	Raffinose	79.4	0.21																					
	Stachyose																							

* $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, others, $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

式^[13]

$$K_i = \frac{[I]}{\frac{K_p}{K_m} - 1}$$

分别计算出 Gal 和甘油醛的抑制常数 K_i 为 8.3 和 12.5mmol/L。

半乳糖为 α - 半乳糖苷酶的竞争性抑

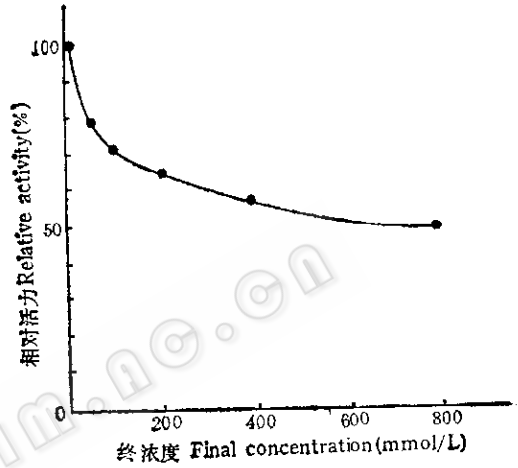


图 3 蔗糖对 α - 半乳糖苷酶活性的影响
Fig. 3 Effects of sucrose on α -galactosidase activity

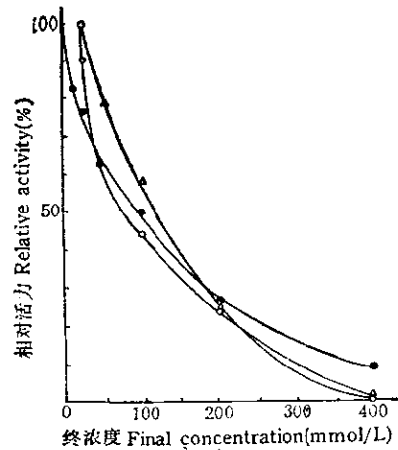
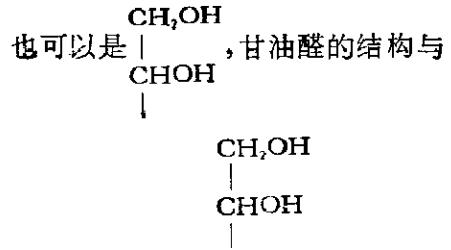


图 4 半乳糖和甘油醛对 α - 半乳糖苷酶活性的影响
Fig. 4 Effects of galactose/glyceraldehyde on α -galactosidase activity

- 半乳糖 Galactose;
- △ 甘油醛 DL-glyceraldehyde (BDH);
- 甘油醛 DL-glyceraldehyde

制剂有过报道^[5,6]。而甘油醛作为 α -半乳糖苷酶或其他糖苷酶的抑制剂，目前尚未见到过报道。Li 和 Shetlar^[14]认为 α -半乳糖苷酶对底物的要求是具有 D-Gal 的构型，同时半乳糖上的 C-1、C-2、C-4 和 C-6 的羟基位置也与结合有关。Pigman^[15]假定 D-甘油-D-半乳糖苷也可以作为酶的底物，此化合物与 α -D-半乳糖苷区别在于 C-6 上所连的基团不同，并用甜杏中的 α -半乳糖苷酶水解苯基-D-甘油- α -D-半乳糖，如果他的假定是正确的，则 α -半乳糖苷酶对 C-6 的结构要求可以是 CH_2OH ，



类似，并且具有一个活泼的醛基，分子小，与酶作用受到的空间障碍也小，因此，它遇到酶时，抢先结合到酶的活性位区上去，从而阻止了底物与酶的结合，这就可以解释为什么甘油醛是 α -半乳糖苷酶的竞争性抑制剂。

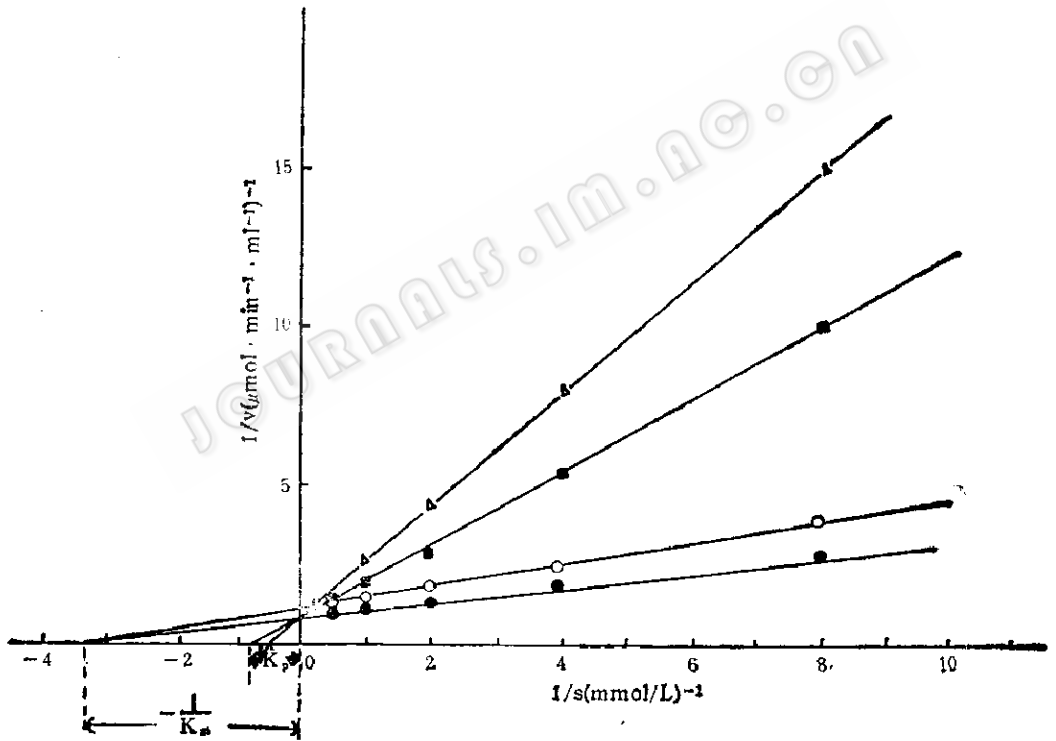


图 5 抑制剂存在时 pNPGal Lineweaver-Burk 图

Fig. 5 Lineweaver-Burk plots for the hydrolysis of pNPGal in the presence of various inhibitors
 —●—无抑制剂 No inhibitor; —○—汞离子 Hg^{2+} , 5×10^{-3} mmol/L;
 —△—半乳糖 Galactose, 50mmol/L; —■—甘油醛 DL-glyceraldehyde, 50mmol/L

参 考 文 献

[1] 严自正等：微生物学报, 29(5): 265-271, 1989。
 [2] 唐国敏：微生物学通报, 5(4): 33, 1978。

[3] Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 195: 19, 1952.
 [4] 王杨声等：微生物学报, 20(4): 398, 1980。
 [5] Ohtakara, A. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 48(5): 1319, 1984.
 [6] Suzuki, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 245: 781, 1970。

- [7] —: *Agri. Biol. Chem.*, **30**(10):1039, 1966.
 [8] Li, Yu-Teh et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**: 436, 1963.
 [9] 沈仁权等: 复旦学报, **20**(2): 177, 1981.
 [10] Oishi, K. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, **36**(4): 578, 1972.
 [11] Kaji, A. et al.: *ibid.*, **36**(8): 1335, 1972.
 [12] Wong, Hin-Chung et al.: *Appl. Environ. Micro.*, **52**(5): 1147, 1986.
 [13] 戈苏国等: 微生物学报, **22**(2): 126—131, 1982.
 [14] Li, Yu-Teh et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**: 523—530, 1964.
 [15] Pigman, W. W.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **62**: 1371, 1940.

STUDIES ON SUBSTRATE SPECIFICITY OF α -GALACTOSIDASE FROM *ABSIDIA RAMOSA*

Zhu Jing Yan Zhizhen Zhang Shuzheng

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

When melibiose or raffinose was incubated with the purified α -galactosidase on paper chromatogram it showed that the degradation products of the former were galactose and glucose, and the later sucrose and galactose.

From the results obtained from the substrates tested, the order of the α -galactosidase relative hydrolysis rate appeared as: melibiose (82.2%) > stachyose (13.7%) > raffinose (7.5%).

The K_m values of the α -galactosidase were 0.29, 5.00, 79.4 and 55.5 mmol/L with the values of V_{max} 1.43, 0.23, 0.21, 0.16 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ for pNPGal, melibiose, raffinose, and α -met-D-galactose respectively.

The effects of 43 kinds of sugars and related compounds on the activity of α -galactosidase have been investigated. Among thus compound, galactose, DL-glyceraldehyde, D-arabinose, galacturonic acid, D-ribose, L-ar-

abinose, tagatose, D-gluconolactone, lactose and sucrose exhibiting inhibiting effect with relative activity of 47—70%. Dihydroxy-acetone, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, 2-deoxy-D-galactose enhanced the activity of the enzyme. The remaining compound other than mentioned above showed no effect at all.

The inhibition model of some compound for α -galactosidase have been investigated. It showed that the galactose and DL-glyceraldehyde acted as competitive inhibitors with K_i values of 8.3 and 12.5 mmol/L respectively. The Hg^{2+} ion acted as noncompetitive inhibitor.

Key words

Absidia ramosa; α -galactosidase; Glycosidase