

海枣曲霉糖苷酶类的化学组成

曾宇成 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文测定的海枣曲霉糖苷酶均为糖蛋白,含糖量分别为: 地衣多糖酶 7.7%, 木聚糖酶 X-II 5.8%, 木聚糖酶 X-III 3.3%, β -半乳糖苷酶 14.3%, β -葡萄糖苷酶 16.1%, β -木糖苷酶 15.5%。这几个酶的氨基酸组成有较大差异,但也有共同特点,即都含有较多酸性与羟基氨基酸,含 His, Met 较少。将这些酶的氨基酸组成作成星状图,结果这些酶的星状图互不相同,只有 β -葡萄糖苷酶和 β -木糖苷酶的星状图之间有一定的相似性。比较海枣曲霉糖苷酶和其他来源的糖苷酶的氨基酸组成的星状图。发现不同来源的同一种酶都有不同程度的相似性,且相似程度与产生菌之间的亲缘关系有很大的相关性。

关键词 氨基酸组成;星状图;糖苷酶;海枣曲霉

在海枣曲霉的麦麸培养物抽提液中,我们发现存在着多种糖苷酶活性。通过各种提纯方法,从中提纯到凝胶电泳均一的地衣多糖酶、木聚糖酶^[1]、 β -半乳糖苷酶^[2]、 β -葡萄糖苷酶^[3]和 β -木糖苷酶^[4],并研究了这些酶的各种性质。本文则进一步报道这些酶的糖含量,氨基酸组成等结果。

材料和方法

(一) 酶的制备与提纯

海枣曲霉地衣多糖酶(X-I)、木聚糖酶(X-II、X-III)、 β -半乳糖苷酶(β -gal)、 β -葡萄糖苷酶(β -glc)和 β -木糖苷酶(β -xyl)的提纯,均按前文方法^[1-4]。

(二) 总糖含量的测定

采用地衣酚-硫酸法^[5]。取冷冻干燥样品 1.0mg 左右,加水溶到 1ml,再加入预冷到 4℃ 的地衣酚-硫酸试剂,80℃ 保温 1h,测 A_{520} 。以甘露糖为标准计算样品中的总糖含量。

(三) 氨基酸组成分析

取冷冻干燥样品 1mg 左右,加入 6mol/L HCl 1ml,巯基乙醇 10 μ l,草酸(50mg/ml)10 μ l,充氮气后封管。105℃ 水解 24、48、72 h,然后敲开管口,抽干 HCl,用 Hitachi 835 型氨基酸自动分析仪分析其氨基酸组成。

结果和讨论

(一) 酶的总糖含量

测定结果表明,本文涉及的酶均为糖蛋白,含糖量分别为: X-I, 7.7%; X-II, 5.8%; X-III; 3.3%; β -半乳糖苷酶, 14.3%; β -葡萄糖苷酶, 16.1%; β -木糖苷酶, 15.5%。从这些结果看,X-I、X-II 和 X-III 的含糖量较低,远低于绿色木霉 (*Trichoderma virida*) 木聚糖酶(含糖 16.8%)^[6]及真菌 *Talromyces byssoclamydoides* 木聚糖酶 X-a, X-b-I, X-b-II (含糖量分别为 36.5, 31.5 和 14.2%)^[7] 的含糖量。 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶和 β -木糖苷酶的含糖量均比 X-I、X-II、和 X-III 高得多,但这三个酶的含糖量之间的差别不大。和其他来源的酶相比, β -半乳糖苷酶的含糖量与黑曲霉 (*Aspergillus niger*) β -半乳糖苷酶 1 和 2 (分别含糖 13.9%, 及 19.2) 的含糖量^[8]相近,高于米曲霉 (*Asp. oryzae*) β -半乳糖苷酶(含糖 10%)^[9]及菜

本文于 1988 年 3 月 26 日收到。

豆壳球孢菌 (*Macrophomina phaseii*) β -半乳糖苷酶(含糖 8.4%)^[10]的含糖量。 β -葡萄糖苷酶的含糖量则在温特曲霉 (*Asp. wentii*) β -葡萄糖苷酶(含糖 21%)^[11]及米曲霉 β -葡萄糖苷酶 (含糖 10%)^[9]的含糖量之间。 β -木糖苷酶的含糖量则与沃特曼青霉 (*Penicillium wortmanni*) β -木糖苷酶的含糖量 (16%)^[12]很接近。

(二) 酶的氨基酸组成

将 6mol/L HCl 水解不同时间的样品用 Hitachi 835 型氨基酸自动分析仪分析其氨基酸组成, 将分析结果按潘家秀等介绍的方法^[13]进一步加以处理。Ser, Thr 含量取水解时间外推为零时的值, Val, Ile 含量则取水解 72h 的值, 其余氨基酸的含量均取 24、48 及 72h 所得数据的平均值。因未作过甲酸氧化, 且在本实验条件下大部份 Trp 被破坏, 故 Cys 含量偏低, 且缺 Trp 数据。将各个样品的氨基酸组成均表达为 $\mu\text{mol}/100\text{mg}$ 蛋白, 结果如表 1。由表

1 可以看到, 这些酶的氨基酸组成有较大差异, 但也有一些共同之处, 即都含有较多的 Asx、Glx、Gly、Ser 和 Thr, 含较少的 Met 和 His。但 X-I、X-II 和 X-III 所含 Ser 和 Thr 的量比其余几个糖苷酶所含的更多一些。将这些酶的氨基酸组成作成比较直观的星状图, 则可以更清楚地看到, 不同酶的氨基酸组成星状图明显不同, 只有 β -葡萄糖苷酶与 β -木糖苷酶的氨基酸组成比较相似(图 1)。在 DEAE-Sephadex A-50 柱层析时, β -葡萄糖苷酶与 β -木糖苷酶的洗脱峰紧密相邻, 且有较多重叠。混杂于 β -木糖苷酶中的 β -葡萄糖苷酶, 经多步层析仍不易完全分开, 这正与二者的氨基酸组成很相似一致。

(三) 不同来源糖苷酶的氨基酸组成及比较

为了对比海枣曲霉糖苷酶与其他来源的糖苷酶氨基酸组成的异同, 将其他来源的木聚糖酶、 β -木糖苷酶、 β -半乳糖苷酶

表 1 海枣曲霉糖苷酶类的氨基酸组成
Table 1 Amino Acid Compositions of Glycosidases from *Aspergillus phoenis*
($\mu\text{mol}/100\text{ mg sample}$)

氨基酸 Amino acid	X-I	X-II	X-III	β -Xyl	β -Gal	β -Glc
Asx	79.1	88.0	91.8	81.8	77.4	90.3
Thr	75.5	61.5	108.4	47.4	53.8	38.0
Ser	95.7	73.4	78.1	45.7	50.9	42.1
Glx	76.7	61.8	54.3	66.2	57.9	78.8
Pro	26.4	27.7	18.1	29.1	36.8	39.1
Gly	76.8	67.5	121.2	85.5	87.5	80.1
Ala	55.4	60.4	39.6	72.5	47.5	63.4
Cys	3.7	6.6	2.1	1.4	2.5	—
Val	58.7	39.2	58.8	47.8	51.9	53.4
Met	9.3	10.5	3.6	3.5	3.2	7.5
Ile	26.3	25.7	28.8	37.6	38.7	28.2
Leu	35.7	52.5	17.4	62.1	67.5	59.7
Tyr	39.6	31.0	64.8	31.0	29.5	36.6
Phe	32.3	37.9	23.4	29.8	33.1	26.2
Lys	29.8	28.4	16.8	22.8	29.6	24.3
His	7.1	7.5	7.8	8.3	7.5	5.6
Arg	7.4	13.5	16.3	23.8	18.8	29.1

和 β -葡萄糖苷酶等的氨基酸组成也作成星状图。从这些星状图可以看到, X-II 与黑曲霉^[14], 链霉菌 (*Streptomyces sp.*)^[15] 及短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)^[15] 的木聚糖酶有不同程度的相似性。X-III 与另一黑曲霉^[15] 及裂褶菌 (*Schizophyllum commune*)^[15] 的木聚糖酶比较相似。X-I 与各种来源的木聚糖酶均没有多少相似性。X-I、X-II 和 X-III 与血痕韧革菌 (*Stereum sanguinolentum*)^[15] 和 *Talaromyces byssoclamydoides*^[7] 的木聚糖酶均不相似(图 2)。 β -木糖苷酶与短小芽孢杆菌 β -木糖苷酶^[16] 在星状图的酸性和羟基氨基酸区有些相似, 与沃特曼青霉 β -木糖苷酶^[17] 在疏水和碱性氨基酸区有些相似, 但星状图的总轮廓与这两个来源的 β -

木糖苷酶的相似处不多(图 3)。

β -半乳糖苷酶与菜豆壳孢菌^[18]、黑曲霉^[8] β -半乳糖苷酶星状图比较相似, 与米曲霉^[9]、多色青霉 (*Pen. multicolor*)^[13] 的 β -半乳糖苷酶也有一定程度的相似性。与脆壁克鲁维酵母 (*Kluyveromyces fragilis*)^[19]、独特掷孢酵母 (*Sporobolomyces singularis*)^[20]、大肠杆菌 (*E. coli*)^[20] 及产气单胞菌 (*Aeromonas formicans*)^[20] 的 β -半乳糖苷酶则相差甚远。但有趣的是大肠杆菌^[20]与产气单胞菌^[20] β -半乳糖苷酶的星状图之间, 及脆壁克鲁维酵母^[19]与独特掷孢酵母^[20] 的 β -半乳糖苷酶星状图之间均比较相似(图 4)。

β -葡萄糖苷酶则与温特曲霉 β -葡萄糖苷酶^[11] 非常相似, 与烟曲霉 (*Asp. fumigatus*)

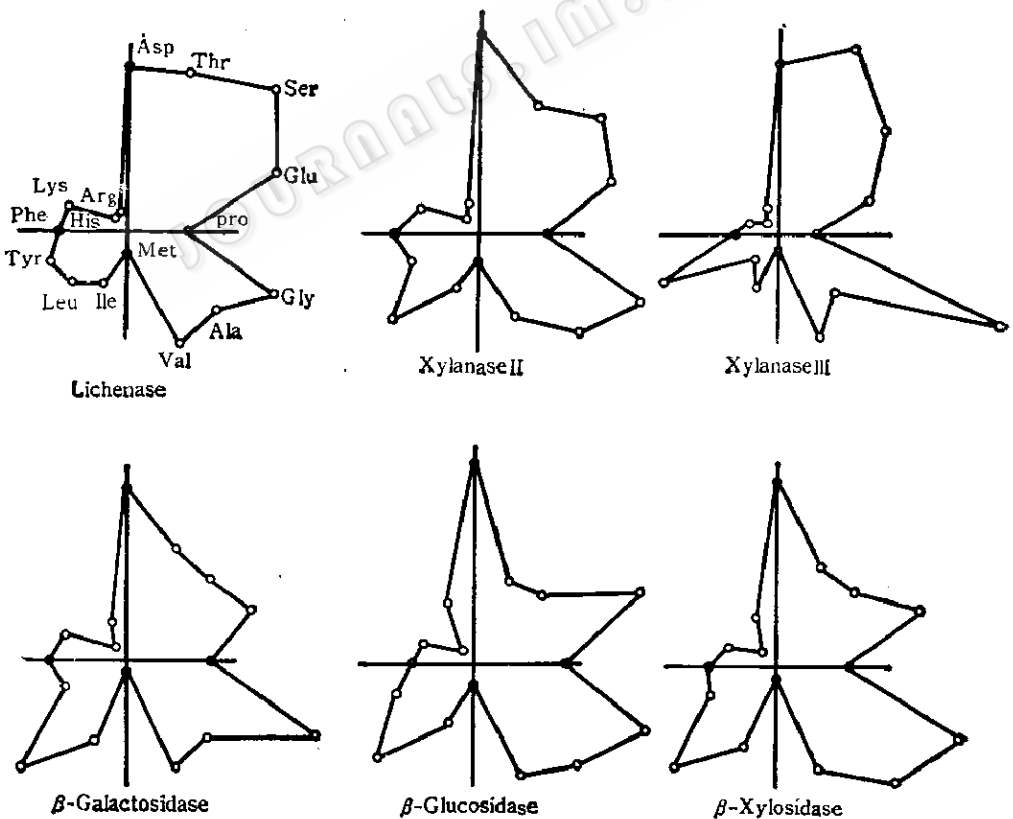


图 1 海枣曲霉糖苷酶类氨基酸组成星状图

Fig. 1 Star diagram of amino acid composition of glycosidases from *Asp. phoenicis*

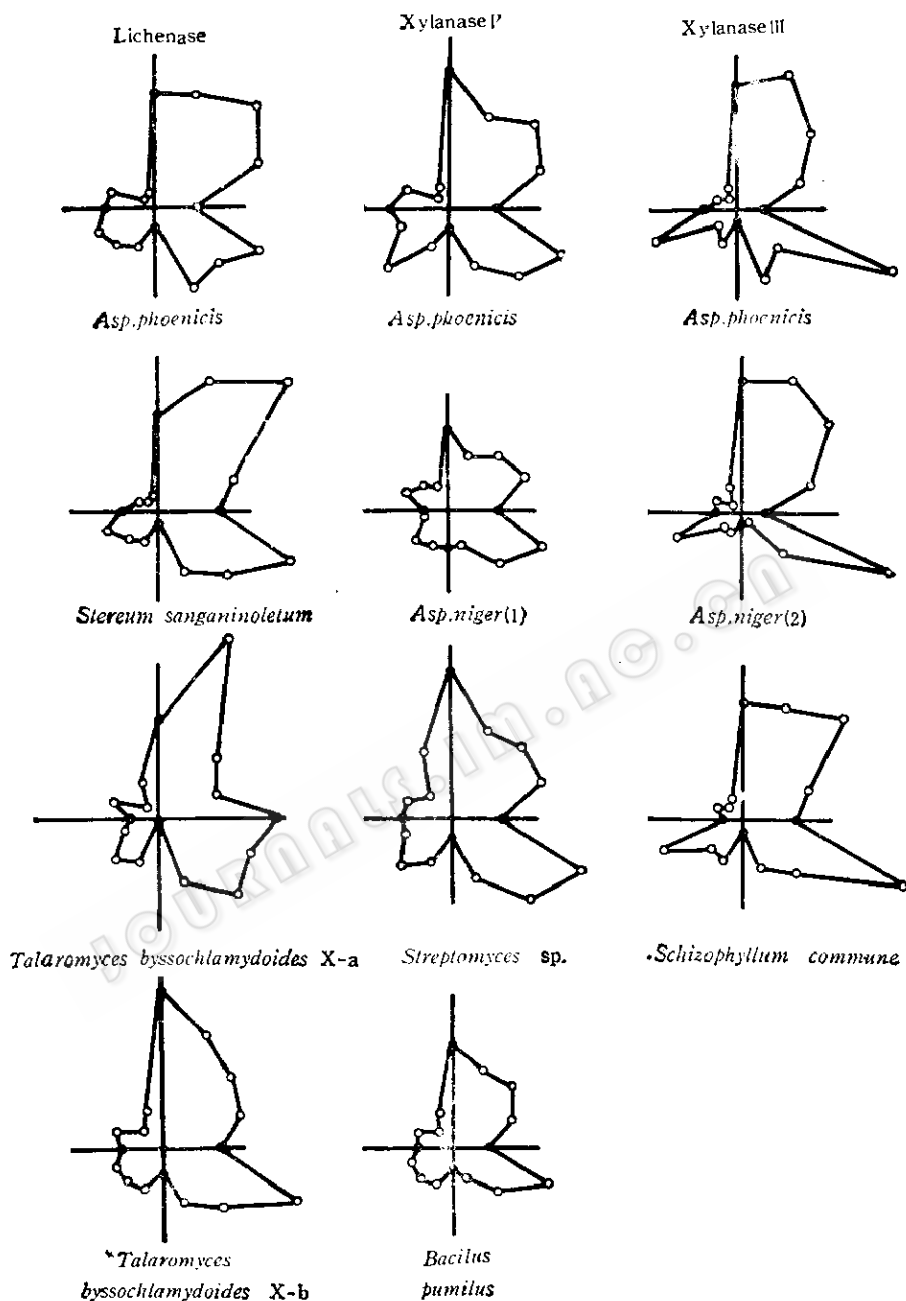


图2 不同来源木聚糖酶的氨基酸组成星状图

Fig. 2 Star diagram of amino acid compositions of xylanases from various sources

gatus)^[21]、米曲霉^[9]、棘孢曲霉 (*Asp. aculeatus*)^[22] 及绿色木霉^[23] 的 β -葡萄糖苷酶均有不同程度的相似性, 但与三侧毛壳菌 (*Chaetomium trilaterale*)^[24] β -葡萄糖苷

酶相似程度很小(图 5)。

上述结果表明, 尽管本文引用的是不同研究者的结果, 这些结果却表明, 不同来源的同一种酶的氨基酸组成星状图往往都

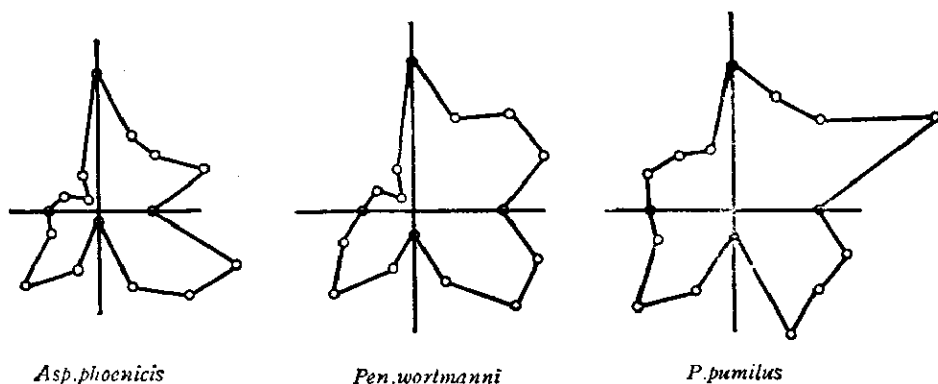


图3 不同来源 β -木糖苷酶的氨基酸组成星状图
Fig. 3 Star diagram of amino acid compositions of β -xylosidases from various sources

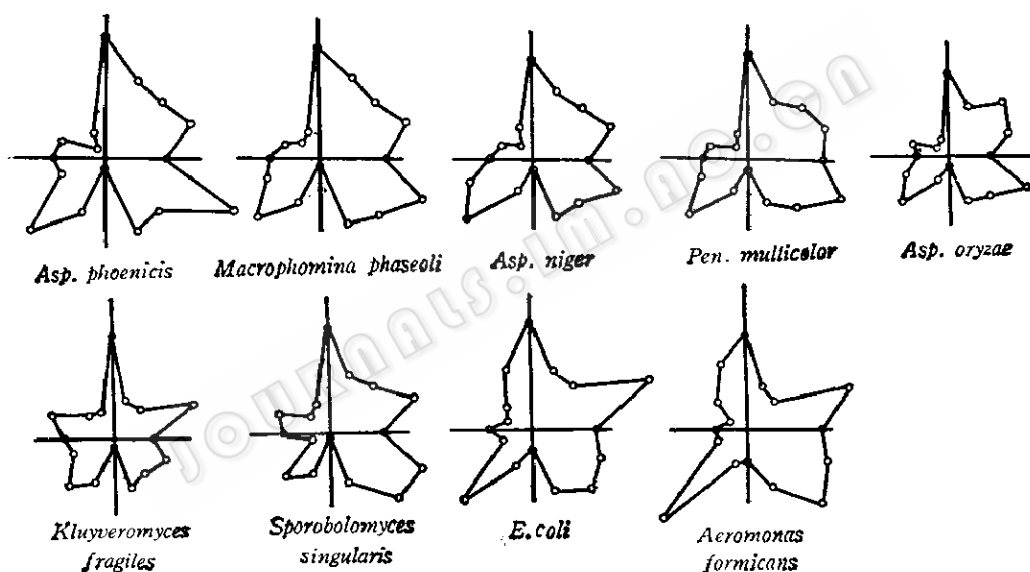


图4 不同来源 β -半乳糖苷酶氨基酸组成星状图
Fig. 4 Star diagram of amino acid compositions of β -galactosidases from various sources

有不同程度的相似性，相似程度与产生菌在分类学上的亲缘关系有很大的相关性。这说明，这些不同来源的同一种酶可能有共同的起源。

当然，用比较蛋白质一级结构的差异程度来研究生物在分类学上的亲缘关系可能有更大的可靠性。但是，现在要测定一个蛋白质的一级结构，还是一件很费时费力的事。相反，氨基酸组成分析简单易行，

现有的数据也较多，因而可相当方便地用来分析菌种间的亲缘程度。Cornish-Bowden 用统计学方法处理不同来源的同一种蛋白质氨基酸组成的相关性。结果表明，同一类蛋白质氨基酸组成之间的相似性与产生这类蛋白质的生物在进化上的亲缘程度密切相关。而且，用氨基酸组成分析的结果与用一级结构分析的结果颇为一致^[25]。虽然用统计法分析氨基酸组成得到

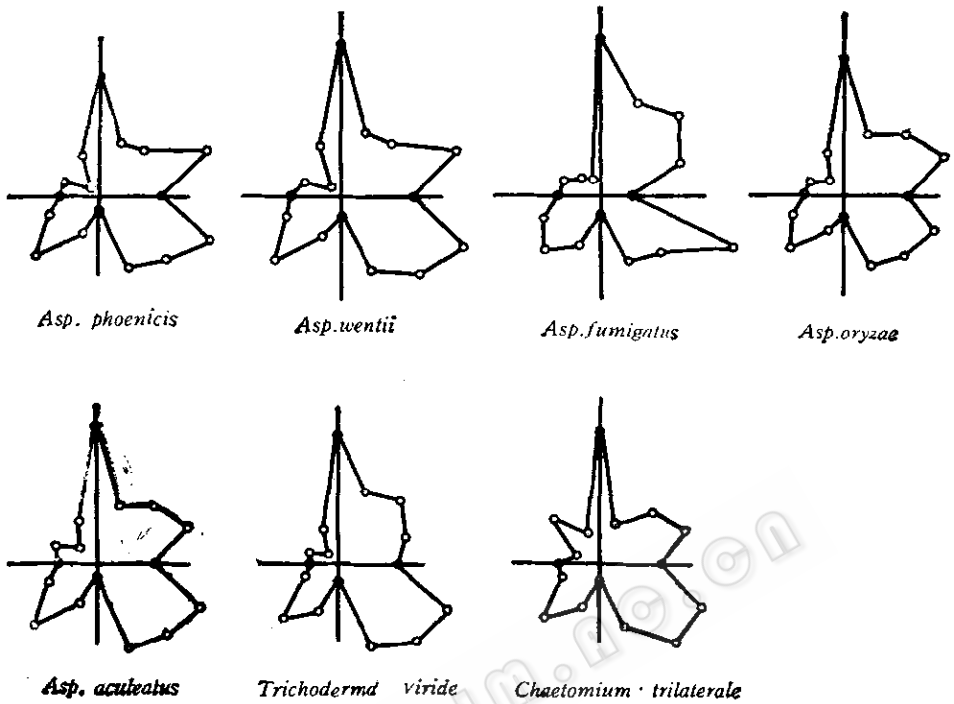


图5 不同来源 β -葡萄糖苷酶氨基酸组成星状图
Fig. 5 Star diagram of amino acid compositions of β -glucosidases from various sources

与本文同样的结论, 但本文的星状图法很直观, 不必用繁琐的数学处理方法, 其结果又与统计法一致, 因而有其优越之处。

参 考 文 献

- [1] 曾宇成等: 微生物学报, 27: 343—349, 1987。
- [2] 曾宇成等: 生物化学杂志, 3: 552—560, 1987。
- [3] 曾宇成等: 微生物学报, 28(3): 195, 1989。
- [4] 曾宇成博士论文, 1987 年。
- [5] Francois, B. et al.: *Biochem. J.*, 83: 335—341, 1962。
- [6] Toda, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 49: 499—521, 1971。
- [7] Yoshioka, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 45: 2425—2432, 1981。
- [8] Wiedner, F. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 100: 559—567, 1979。
- [9] Mega, T. et al.: *J. Biochem.*, 85: 335—341, 1979。
- [10] Sugiyama, M. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 57: 86—90, 1979。
- [11] Legler, G. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 257: 40—48, 1972。
- [12] Deleyn, F. et al.: *Methods in Enzymol.* (ed. Ginsburg, V.), Academic Press, New York, N. Y., Vol. 83, p. 639—644, 1983。
- [13] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 科学出版社, p. 34—94, 1973。
- [14] Gorbacheva, I. V. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 484: 79—93, 1977。
- [15] Frederick, M. M. et al.: *Carbohydr. Res.*, 91: 87—103, 1981。
- [16] Claessens, M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 405: 475—481, 1975。
- [17] Deleyn, F. et al.: *Can. J. Biochem.*, 56: 43—50, 1978。
- [18] Takenishi, S. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 47: 2533—2540, 1983。
- [19] Mahoney, R. R. et al.: *J. Food Sci.*, 43: 584—591, 1978。
- [20] Wallenfels, K. et al.: *The Enzymes* (ed. Boyer, P. D.), 3rd edn Academic Press, New York, 7: 615—663, 1972。
- [21] Rudick, M. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 248: 6506—6513, 1973。
- [22] Sakamoto, R. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 49: 257: 40—48, 1972。

- 1275—1280, 1985.
- [23] Berghem, L. E. R. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **46**: 295—305, 1974.
- [24] Uziie, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **49**: 1159—1166, 1985.
- [25] Cornish-Bowden, A.: *Methods in Enzymol.* (ed. Hirs, C. H. W. et al.), Academic Press, New York, **91**: 60—75, 1983.

CHEMICAL COMPOSITION OF GLYCOSIDASES FROM *ASPERGILLUS PHOENICIS*

Zheng Yucheng Zhang Shuzheng

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

The glycosidases purified from *Aspergillus phoenicis* were all glycoproteins, the carbohydrate contents of lichenase, xylanase II, xylanase III, β -galactosidase, β -glucosidase and β -xylosidase were 7.7%, 5.8%, 3.3%, 14.3%, 16.1% and 15.1%, respectively. Their amino acid compositions were quite different from one another, but all the seven glycosidases contained more acidic and hydroxylic amino acids, and less His, Met. The star diagrams of amino acid compositions of these glycosidases were also quite different from one another, except that of β -glucosidase and

β -xylosidase were similar to each other. Compared with the same glycosidases from other sources, we found that the star diagrams of amino acid compositions of the same glycosidases from different sources were similar to one another, and the extent of similarity were related to the relatedness between the glycosidase producing strains.

Key words

Amino acid composition; Star diagram; Glycosidases; *Aspergillus phoenicis*