

嗜热栖热菌 HB 8 耐热 α -葡萄糖苷酶的提纯和性质*

杨寿钧 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

嗜热栖热菌 HB 8 (*Thermus thermophilus* HB 8) 的耐热 α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase EC. 3.2.1.20) 经硫酸铵分步沉淀、DEAE-纤维素柱层析和垂直板制备凝胶电泳提纯, 经盘状凝胶电泳鉴定为单一区带, 比活提高 17 倍。酶作用最适温度 80℃, 最适 pH 5.8, 分子量 67000, 等电点 pI 为 4.5。该酶能够水解对硝基酚- α -D-葡萄糖苷 (PNPG)、蔗糖和麦芽糖, 但不水解纤维二糖、蜜二糖、可溶性淀粉。酶作用于 PNPG 的米氏常数 (K_m) 为 0.4 mmol/L, 最大反应速度 V_{max} 为 0.29 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。金属离子 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 对酶有激活作用, Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 有强烈抑制作用。酶表现出极好的热稳定性, 在 90℃ 保温 10 小时后, 仍保留 90% 的原始酶活力, 在 95℃ 的失活半寿期 ($t_{1/2}$) 为 108 分钟。经蛋白质侧链化学修饰研究表明, 羧基和组氨酸残基为其表现活力所必需。

关键词 嗜热栖热菌 HB 8; α -葡萄糖苷酶; 提纯和性质

α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase EC. 3.2.1.20) 专一性水解寡聚糖分子中的 α -1,4-糖苷键, 已从不同的微生物来源分离了此酶^[1-3], Suzuki 等人^[6,7]和 Kelly 等人^[8]分别报道了耐热 α -葡萄糖苷酶的提纯和性质。已报道的耐热 α -葡萄糖苷酶最适作用温度都低于 65℃。我们从嗜热栖热菌 HB 8 (*Thermus thermophilus* HB 8) 中分离到热稳定性极好的 α -葡萄糖苷酶, 并进行了酶的提纯和性质的研究。

200 r/min 高温摇床 (NBS 公司) 中培养 24 小时, 于 4℃ 8000 r/min 离心收集菌体, 将菌体用蒸馏水洗涤二次, 用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH 7.2 内含有 10 mmol/L 2-巯基乙醇溶液洗涤二次, 置于 -20℃ 冰箱中直到使用。

(三) 酶活力测定

0.1 ml PNPG (Sigma 产品, 浓度为 5 mg/3 ml 蒸馏水), 0.1 ml 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 5.8) 和 0.2 ml 蒸馏水于 80℃ 水

材料和方法

(一) 菌种

嗜热栖热菌 HB 8 (*Thermus thermophilus* HB 8), 日本东京工业大学大岛泰郎教授赠送。

(二) 培养基和细胞培养

培养基成分 (g/L) 为: 蛋白胨 (polypepton) 5; 酵母粉 (yeast extract) 3; NaCl 2; 葡萄糖 1, pH 7.0—7.2。

将菌接种于上述培养基中, 于 65℃,

本文于 1990 年 8 月 22 日收到。

* 本课题得到国家自然科学基金资助。

东京工业大学大岛泰郎 T. Oshima 教授赠送嗜热栖热菌 HB 8, 特此致谢。

本文引用缩写名词

PNPG: p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside
DTNB: 2, 2'-Dinitro-5, 5'-dithio-dibenzoic acid

NEM: N-Ethylmaleimide

NAl: N-Acetylimidazole

HNBB: 2-Hydroxyl-5-nitrobenzyl bromide

DEPC: Diethylpyrocarbonate

EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride

浴中保温 5 分钟, 加入 0.1 ml 经适当稀释的酶液, 反应 10 分钟, 立即加入 3.0ml 0.2 mol/L 硼酸钠溶液终止反应, 于 400nm 测定吸光度。在上述条件下, 每分钟水解 1 μ mol 对硝基酚所需的酶量为一个酶活力单位。

(四) 其它分析方法

蛋白质测定用 Lowry 法^[9], 以牛血清白蛋白为标准。盘状电泳按 Davis 法^[10]。聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦按杨寿钧报道的方法^[11], 两性载体电解质 (Pharmalyte pH 3—10, Pharmacia 产品)。分子量测定用 SDS-凝胶电泳法^[12], 标准分子量(低分子量)试剂盒为 Pharmacia 产品。

结 果

(一) 酶的提纯

将 50g 湿菌体悬于 150ml 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.2) 内含有 10 mmol/L 的 2-巯基乙醇的溶液中, 于 4 $^{\circ}$ C 超声破碎 15 分钟, 超声破碎液在 Beckman J2-21 冷冻离心机上 4 $^{\circ}$ C 15000r/min 离心 30 分钟, 取上清液作为无细胞提取液。

在冰浴中, 加固体硫酸铵到无细胞提取液中, 使终饱和度为 50%, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中放置过夜, 于 4 $^{\circ}$ C 15000 r/min 离心 30 分钟, 将沉淀溶于上述缓冲溶液中, 并对缓冲液充分透析到无 NH₄⁺ 检出。

将已透析后的酶液 25ml (酶蛋白约 180mg) 施于经相同缓冲液充分平衡的 DEAE-纤维素 DE 32 柱 (ϕ 1.8 \times 50cm) 上, 进行柱层析提纯, 酶蛋白用 250ml 缓冲溶液和 0.6mol/L NaCl 在 250ml 缓冲液中进行直线浓度梯度洗脱, 流速为 20ml/h, 每 10ml 收集一管, 结果见图1。酶的活性集中在第 2 个蛋白吸收峰的前半部分, 合并活性分段, 对蒸馏水充分透析, 冷冻干燥。

冻干粉溶于适量的蒸馏水中, 取 5.0ml

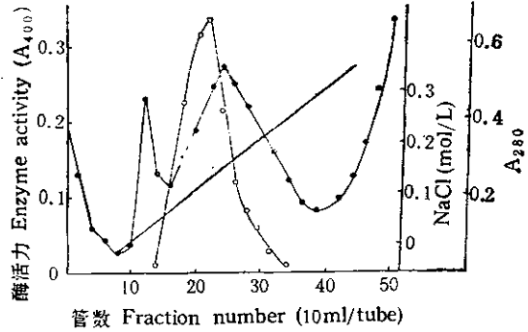


图1 α -葡萄糖苷酶的 DEAE-纤维素 DE 32 柱层析
Fig. 1 DEAE-cellulose DE-32 column chromatography of α -glucosidase

- 280nm 吸光度 A₂₈₀;
- - -□- - α -葡萄糖苷酶活力 Activity;
- ▲— NaCl 浓度 Concentration of NaCl

施于垂直板制备型聚丙烯酰胺凝胶电泳仪上进行电泳, 凝胶浓度为 7%, 待溴酚蓝前沿泳动到距凝胶边缘 1.0 cm 处时停止电泳, 从凝胶两侧各切一条宽约 0.5cm 的凝胶带, 用 PNPg 进行酶的活性染色, 待黄

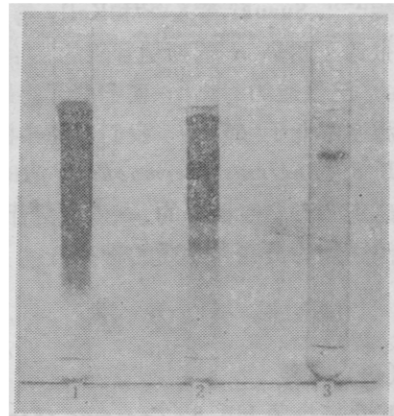


图2 α -葡萄糖苷酶的凝胶电泳

1. 硫酸沉淀样品;
2. DEAE-纤维素柱层析样品;
3. 垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 2 PAGE patterns of α -glucosidase

1. After ammonium sulfate fractionation;
2. After DEAE-cellulose column chromatography;
3. After slab PAGE

表 1 耐热 α -葡萄糖苷酶的提纯
Table 1 Purification of α -glucosidase

提纯步骤 Step	总蛋白 Total protein (mg)	总酶活 Total activity (u)	比活 Specific activity (u/mg)	回收率 Recovery (%)		提纯 Purification fold
				蛋白 Protein	酶活 Activity	
无细胞提取液 Cell-free extract	560	2290	4.1	100	100	1
50%硫酸铵沉淀 (NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	180	1917	10.3	33.2	84	2.5
DEAE-纤维素柱层析 DEAE-cellulose column chromatography	66	1487	22.5	12.5	65	5.5
垂直板凝胶电泳 Slab PAGE	0.7	48.75	69.6	0.13	21.3	16.9

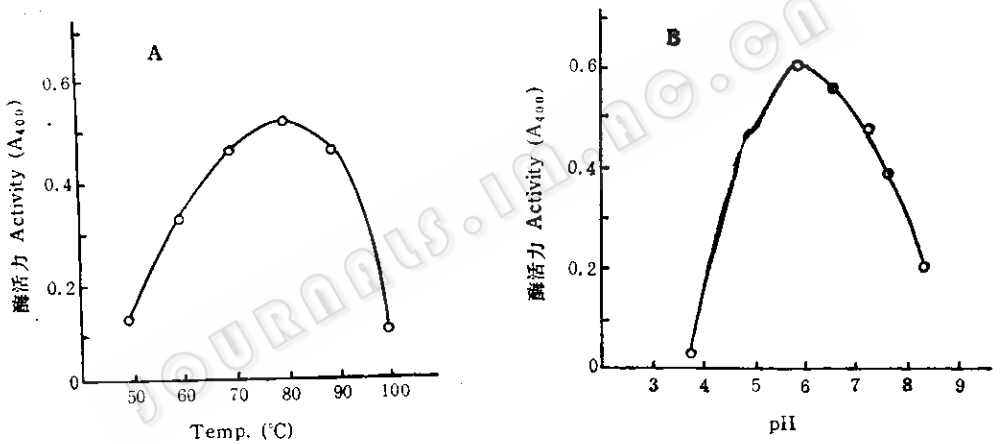


图 3 温度 (A) 和 pH (B) 对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature (A) and pH (B) on the activity of α -glucosidase

色酶带显现后,将凝胶条放回原来的位置,按酶带的位置将不染色的凝胶切下相应的凝胶带,用 3.0ml 蒸馏水浸泡过夜,离心除去凝胶,浸泡液进行盘状凝胶电泳鉴定,各步提纯的结果列于表 1 中。酶的比活提高 17 倍,经盘状电泳鉴定为均一的酶带(图 2)。

(二) 酶的性质

1. 酶作用最适温度: 在不同温度下测定酶活力,结果见图 3-A,酶作用的最适温度为 80 $^{\circ}\text{C}$ 。

2. 酶作用最适 pH: 在不同 pH 值的缓冲液中测定酶活力,结果见图 3-B。酶作用最适 pH 为 5.8。

3. 酶的热稳定性: 将酶液和 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH5.8) 在不同温度下保温不同时间,不同时间取出的样品立即在冰浴中冷却,在 80 $^{\circ}\text{C}$ 测定酶活力,以不经过保温的酶液活力为 100%,结果见图 4。嗜热栖热菌 HB 8 的 α -葡萄糖苷酶有很好的热稳定性,酶在 90 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 小时,仍保留 90% 的原始酶活力,在上述条件下,酶在

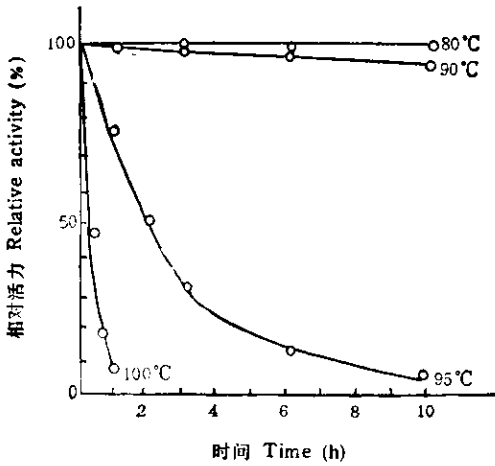


图 4 α -葡萄糖苷酶的热稳定性

Fig 4 Thermostability of α -glucosidase

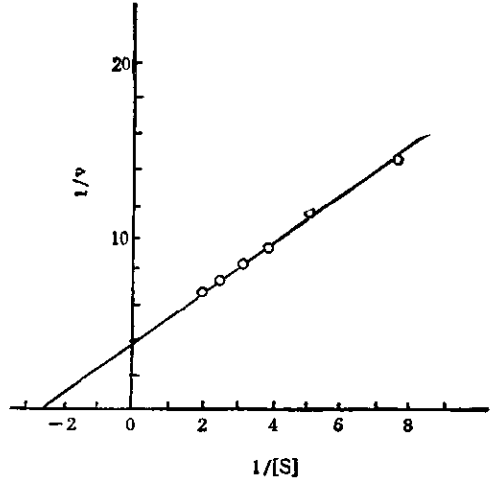


图 5 α -葡萄糖苷酶作用于 PNPG 的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 5 Lineweaver-Burk plot of α -glucosidase for PNPG

95°C 的失活半寿期($t_{1/2}$)为 108 分钟。

4. 酶的底物专一性: 嗜热栖热菌 HB 8 的 α -葡萄糖苷酶的底物专一性列于表 2 中, 该酶能水解对-硝基苯- α -D-葡萄糖苷、蔗糖和麦芽糖, 水解 PNPG 和蔗糖的速度大于麦芽糖。不能水解纤维二糖、蜜二糖和可溶性淀粉。

表 2 α -葡萄糖苷酶的底物特异性

Table 2 Substrate specificity of the α -glucosidase

底物 Substrate	相对活力 Relative activity(%)
PNPG	100
蔗糖 Sucrose	90
麦芽糖 Maltose	23
纤维二糖 Cellobiose	0
蜜二糖 Melibiose	0
可溶性淀粉 Soluble starch	0

5. 酶作用于 PNPG 的米氏常数(K_m)和最大反应速度 V_{max} : 以 PNPG 为底物, 在不同的底物浓度下, 从 0.1 到 0.5mmol/L 测定酶活力, 以酶活力表示初速度, 按 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 结果见图

5. 作用于 PNPG 的米氏常数 K_m 为 0.4 mmol/L, 最大反应速度 V_{max} 为 $0.29 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

6. 酶的分子量: 酶的分子量用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定, 用已知分子量的蛋白试剂盒 (低分子量 Phamacia 产

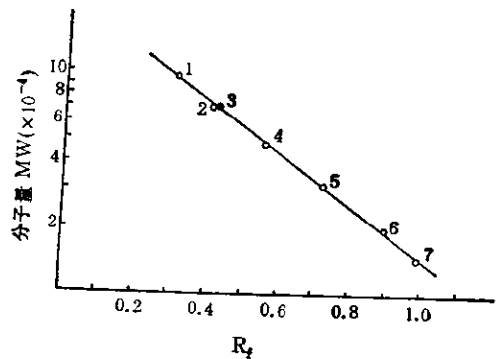


图 6 α -葡萄糖苷酶分子量的测定

Fig. 6 Molecular weight determination of α -glucosidase by SDS-PAGE molecular weight calibration kit (kD)

- 1. Phosphorylase b (94); 2. Albumin(67);
- 3. α -glucosidase; 4. Ovalbumin (43); 5.
- Carbonic anhydrase (30); 6. Trypsin inhibitor (20); 7. α -lactalbumin (14)

品)作为标准,结果见图 6。酶的分子量为 67000。

7. 酶的等电点 pI: 用聚丙烯酰胺薄层凝胶等电聚焦法测定,两性载体 pH 3—10 (Pharmacia 产品),结果见图 7。酶的等电点 pI 为 4.5。

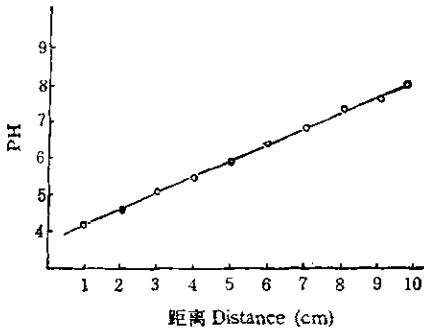


图 7 α -葡萄糖苷酶的聚丙烯酰胺薄层凝胶等电聚焦
Fig. 7 pI value determination of α -glucosidase by PAG-IEF

表 3 不同金属离子对酶活力的影响

Table 3 Effect of metal ions on the activity of α -glucosidase

金属离子 Metal ion	相对活力 Relative activity (%)
None	100
MgCl ₂	114
MnCl ₂	109
CaCl ₂	107
BaCl ₂	105
CoCl ₂	89
FeCl ₃	82
NiCl ₂	82
ZnCl ₂	45
PbAc ₂	45
CuCl ₂	0
HgCl ₂	0

8. 不同金属离子对酶活力的影响: 在测定系统中加入不同的金属离子,使其浓度为 10 mmol/L, 在标准条件下测定酶

表 4 蛋白质侧链化学修饰剂对酶活力的影响

Table 4 Effect of modification reagents on the activity of α -glucosidase

试剂 Reagent	浓度 Concentration (mmol/L)	反应条件 Condition	相对活力 Relative activity (%)
None	—	—	100
DTNB	10	50mmol/L 磷酸缓冲液 pH8.0 50mmol/L phosphate buffer pH 8.0	67
NEM	10	50mmol/L 磷酸缓冲液 pH8.0 50mmol/L phosphate buffer pH 8.0	89
NAI	10	50mmol/L 磷酸缓冲液 pH8.0 50mmol/L phosphate buffer pH 8.0	100
HNBB	10	0.1mol/L 醋酸溶液 0.1mol/L Acetic acid	100
DEPC	6.9	50mmol/L 磷酸缓冲液 pH6.0 50mmol/L phosphate buffer pH 6.0	0
EDC	1.0	20mmol/L TEMED-HCl 缓冲液 pH4.7 + 10mmol/L 甘氨酸乙酯 20mmol/L TEMED-HCl buffer pH 4.7 + 10mmol/L glycine ethyl ester	76.5
	5.0	20mmol/L TEMED-HCl 缓冲液 pH4.7 + 50mmol/L 甘氨酸乙酯 20mmol/L TEMED-HCl buffer pH 4.7 + 50mmol/L glycine ethyl ester	36
	10.0	20mmol/L TEMED-HCl 缓冲液 pH4.7 + 100mmol/L 甘氨酸乙酯 20mmol/L TEMED-HCl buffer pH 4.7 + 100mmol/L glycine ethyl ester	0

活力,以不加金属离子的酶液活力为 100%,结果列于表 3 中。 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活力有强烈的抑制作用, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 有激活作用。

9. 不同蛋白质侧链化学修饰剂对酶活力的影响: 酶液和不同的蛋白质侧链化学修饰剂于 30℃ 保温 30 分钟, 以不加修饰剂的酶液活力为 100%, 在标准条件下测定剩余酶活力。测定巯基修饰剂 DTNB、色氨酸修饰剂 HNBB 对酶活力影响时用葡萄糖氧化酶法^[13]。反应条件和结果列于表 4 中。结果表明羧基修饰剂 EDC 随着修饰剂浓度的增加剩余活力减小, 当浓度为 10mmol/L 时, 酶活力全部丧失。组氨酸修饰剂 DEPC 在 6.9mmol/L 的浓度下也导致全部酶活力的丧失。表明羧基和组氨酸残基是嗜热栖热菌 HB 8 α -葡萄糖苷酶活力所必需。

讨 论

不少作者的研究表明不同来源的 α -葡萄糖苷酶有不同的底物专一性^[14-17]。Chiba 等人^[15]根据底物专一性的不同, 将 α -葡萄糖苷酶分为三类: 第一类为水解芳烃- α -葡萄糖苷(如苯基- α -D-葡萄糖苷, 对硝基苯- α -D-葡萄糖苷等)和蔗糖的速度大于水解麦芽糖的速度。第二类则相反, 水解麦芽糖的速度大于芳烃- α -葡萄糖苷, 这类 α -葡萄糖苷酶也称麦芽糖酶。第三类则除了水解寡聚糖中的 α -1,4-葡萄糖苷键外, 还能水解可溶性淀粉和肝糖。在我们的试验中, 嗜热栖热菌 HB8 的 α -葡萄糖苷酶水解 PNPG 的速度大于麦芽糖, 与酵母的葡萄糖苷酶相似^[18]。

我们曾经报道^[19]红曲霉 α -葡萄糖苷酶的最大反应速度与 pH 值的相关性研究表明, 酶分子中有两个解离常数 (pK) 分别为 4.1 和 5.8 的基团参与酶-底物复合物

中, 通过自杀性底物 conduritol B epoxide 对酶的失活作用以及蛋白质侧链化学修饰剂对酶的化学修饰研究表明 pK 4.1 的基团为酶的活性中心天冬氨酸或谷氨酸; 而 pK 5.8 的基团为酶活性所必需的组氨酸残基。嗜热栖热菌耐热 α -葡萄糖苷酶的化学修饰研究表明, 羧基和组氨酸残基为其表现活力所必需, 与常温酶的结果相似。耐热酶和常温酶相比较, 二者的物理化学性质、酶学特性都很相似^[20]。但耐热酶表现出极好的热稳定性, 酶在 90℃ 保温 10 小时, 仍保留 90% 以上的酶活力, 而常温酶在 60℃ 1 小时, 酶活力几乎全部丧失。深入探索耐热酶的分子机制, 将有利于微生物酶的开发和应用, 具有重大的理论及实际意义。进一步的研究还在进行中。

参 考 文 献

- [1] Flores-Carreón, A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 258: 496—505, 1972.
- [2] Yamasaki, Y. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 37: 251—259, 1973.
- [3] Yamasaki, Y. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 41: 1451—1458, 1977.
- [4] Wang, L. H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 31: 108—118, 1976.
- [5] Needleman, R. B. et al.: *Biochemistry*, 17: 4657—4661, 1978.
- [6] Suzuki, Y. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 56: 8—14, 1978.
- [7] Suzuki, Y. et al.: *J. Biochem.*, 87: 745—751, 1980.
- [8] Kelly, C. T. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22: 352—358, 1985.
- [9] Lowry, O. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951.
- [10] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404, 1969.
- [11] 杨寿钧: 微生物学通报, 9: 186—191, 1982.
- [12] Weber, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 244: 4405, 1969.
- [13] Kaplan, N. O.: *Methods in Enzymology*, 3: 107—109, (Eds S. P. Colowick and N. O. Kaplan), Academic press, New York, 1957.
- [14] Legler, G. et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 354: 243—254, 1973.

- [15] Chiba, S. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**: 1831—1837, 1973.
- [16] Kelly, C. T. et al.: *Process Biochem.*, **18**: 6—12, 1983.
- [17] Matsusaka, K. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **41**: 1917—1923, 1977.
- [18] Kawai, F. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**: 1660, 1971.
- [19] Yang Shou-jun et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **828**: 236—240, 1985.
- [20] 曾宇成等: 微生物学论文集, 第59—66页, 科学出版社, 北京, 1985年。

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF α -GLUCOSIDASE FROM AN EXTREME THERMOPHILE, *THERMUS* *THERMOPHILUS* HB 8

Yang Shoujun Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

A highly thermostable α -glucosidase (E C.3.2.1.20) from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB 8, was purified to homogeneous by ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose chromatography and preparative slab gel electrophoresis. The enzyme was purified 17 fold with 21% recovery of activity. The enzyme had a molecular weight of 67000 by SDS-PAGE. The isoelectric point was pH4.5 by IEF on PAG. The enzyme hydrolyzed p-nitrophenyl- α -glucoside (PNPG), sucrose and maltose, but not cellobiose, melibiose and soluble starch. The k_m value for PNPG was 0.4mmol/L, the V_{max} was 0.29 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. The enzyme exhibited hi-

gh thermostability. After incubation at 90°C for 10 h in 50 mmol/L acetate buffer pH 5.8, the enzyme retained 90% of its original activity. The half-life ($t_{1/2}$) at 95°C was 108 min. The enzyme was activated by Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} and strongly inhibited by Hg^{2+} , Cu^{2+} . Modification of the enzyme by EDC or DEPC led to complete loss of activity, which suggests that carboxyl group(s) and histidine residue(s) are essential for activity of α -glucosidase.

Key words

Thermus thermophilus HB 8; α -Glucosidase; Purification and characterization