

## 海枣曲霉 $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的研究\*

曾宇成 李玉德<sup>1</sup> 顾雅君 张树政<sup>2</sup>

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

虽然  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶 (EC3.2.1.38) 已从多种动植物中分离纯化,但因它们的专一性均不高而难以确证。我们从海枣曲霉(*Aspergillus phoenicis*) 培养物中提取,经过 PEG6000-磷酸缓冲液双水相分离,相继用 DEAE-sephadex A-50、羟基磷灰石、Sephadex G-100 等柱层析分离,获得了凝胶电泳均一的  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶,比活力提高 500 倍。酶反应的最适条件为 40℃ 和 pH 6.0,在 35℃ 以下和 pH5.5—6.5 稳定。凝胶过滤法测分子量为 50000—60000,用 SDS-PAGE 测出分子量为 57000。酶的  $K_m$  值为 2.4mmol/L,  $V_{max}$  为 12.8  $\mu$ mol  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg<sup>-1</sup>。金属离子 Ag<sup>+</sup>、Hg<sup>2+</sup> 对酶有强抑制作用,巯基乙醇和牛血清清蛋白以及甘油和多种糖能提高酶活力。化学修饰结果表明,-SH、-COOH 基团和组氨酸、色氨酸残基为酶活力所必需。该酶只能水解 pNP- $\beta$ -D-岩藻糖苷,有严格的底物专一性,并能专一地受D-岩藻糖和D-岩藻糖酸- $\gamma$ -内酯所抑制,为迄今为止最专一的  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶,堪称该酶的典型代表。

**关键词** 特异的  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶;海枣曲霉

$\beta$ -D-岩藻糖苷酶( $\beta$ -D-fucosidase)为水解底物中  $\beta$ -D-岩藻糖苷键的酶。系统名为  $\beta$ -D-fucoside fucosidase (EC 3.2.1.38)。早在 1960 年 Levvy<sup>[1]</sup>即报道了某些哺乳动物组织中有较高活力的该酶,其后又报道在鼠附睾和牛肝中<sup>[2]</sup>以及植物如大麦和苦杏仁中<sup>[3]</sup>也存在该酶。但国际生化联合会 (IUB) 酶学委员会却未将该酶列入其第一本报告中<sup>[4]</sup>,因它被认为是  $\beta$ -半乳糖苷酶所兼有的活力。到 1964 年才被 IUB 列入酶命名中,编号为 EC 3.2.1.38<sup>[5]</sup>。但在 1972 年酶命名中又把它取消,并入  $\beta$ -半乳糖苷酶 EC3.2.1.23 中<sup>[6]</sup>。直到 1978 年又恢复其编号<sup>[7]</sup>保留至今<sup>[8]</sup>。但迄今为止所报道的该酶都兼具有  $\beta$ -D-半乳糖苷酶和  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活力。如酶命名 1978 年版中所列代表酶由 Weiderschain 等<sup>[9]</sup>报道的猪肾酶其  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶活力还低于  $\beta$ -D-半乳糖苷酶活力。

1984 年版所增列的 Rodriguez 等<sup>[10]</sup>报道的牛肝酶,其中  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶三酶活力比为 100:64:77。其它如 Colas<sup>[11,12]</sup>报道的非洲大蜗牛 (*Achatina batista*) 酶和 Calvo 等<sup>[13]</sup>报道的蜗牛 (*Helicella ericetorum*) 酶等,其三酶比值分别为 100:42:58 和 100:44:91。迄今较为专一的酶为 Calvo 等<sup>[14]</sup>报道的海螺 (*Littorina littorea*) 中的酶,上述三酶比值为 100:20:65,看来  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶还未能得到确证。

通常,曲霉中含有丰富的各种糖苷

本文于 1991 年 3 月 19 日收到。

\* 本研究受中国自然科学基金资助,生字 85-124 (授予张树政),并部分地受美国国家基金资助 DNB86-17033 (授予李玉德)。

1. 访问教授。现在地址: Dept. Biochem. School of Medicine, Tulane University, New Orleans, CA 70112, U.S.A.

2. 通讯负责人。

李梅同志参加部分实验工作,特此致谢。

酶类。我们发现海枣曲霉 (*Aspergillus phoenicis*) 的培养物中有多种糖苷酶活力,其中包括  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶和  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活力。为了查明这三种酶活力是否是结合在一起的,还是独立存在的酶,我们进行了三个酶的纯化,结果得到了凝胶电泳均一的,性质各不相同,并各有专一性的三个酶。关于  $\beta$ -半乳糖苷酶<sup>[15,16]</sup> 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[17,18]</sup> 的提纯、性质及底物专一性已进行了报道,本文报道  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的提纯及性质。本酶具有严格的底物专一性,以及对相关抑制剂的专一性,堪称  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的典型代表。

## 材料和方法

### (一) 菌种

海枣曲霉 (*Aspergillus phoenicis*) AS 3.3143 为我所纤维素酶组从海南岛分离到,由我所菌种保藏室提供,并经一室齐祖同先生鉴定。

### (二) 粗酶制备

800g 麦麸,按 1:1.5 加自来水,分装入 3 个 5L 三角瓶内,灭菌后接入培养好的海枣曲霉种曲,28℃ 培养 5 天,加蒸馏水 2500ml,于 15℃ 浸泡 4 小时,将抽提液过滤,得滤液 2000ml 左右,即为粗酶液。

### (三) 主要化学试剂

羟基磷灰石,上海生物化学研究所产品。DEAE-Sephadex A-50 和 Sephadex G-100 及低分子量标准蛋白 (LMW) 均为瑞典 Pharmacia 公司产品。对-硝基酚基  $\beta$ -D-岩藻糖苷 (pNP- $\beta$ -fuc) 及其它各种对-硝基酚糖苷,均为 Sigma 公司产品。

### (四) 酶活力的测定

反应体系为 pH6.0 的 0.1mol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液 200 $\mu\text{l}$ , 5mmol/L pNP- $\beta$ -fuc 100 $\mu\text{l}$ , 50% 甘油 50 $\mu\text{l}$ , 酶液 40—200

$\mu\text{l}$ , 加蒸馏水使终体积为 500 $\mu\text{l}$ , 40℃ 反应 15 分钟,加 3ml 0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  中止反应,测 405nm 的吸光度 A 值,在上述条件下每分钟形成 1 $\mu\text{mol}$  对-硝基酚为一个酶活力单位。在以天然物为底物时用葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖<sup>[19]</sup>, 或用 Somogyi-Nelson 法测定还原糖<sup>[20]</sup>。

### (五) 蛋白质浓度测定

柱层析时测定各收集部分的  $A_{280}$ , 一般测定则用 Lowry 法<sup>[21]</sup>。

### (六) 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

按 Davis 法<sup>[22]</sup>, 凝胶缓冲液为 Tris-HCl, pH8.9, 凝胶浓度 7% 或 10%。

### (七) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

按 Weber-Osborn 法<sup>[23]</sup>, 凝胶浓度 10%, 电极缓冲液为 pH7.0 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液。

## 结果和讨论

### (一) 粗酶液中的各种糖苷酶活力

海枣曲霉粗酶液中含有多种糖苷酶活力<sup>[24]</sup>, 其中  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶活力高于  $\beta$ -D-半乳糖苷酶活力。

### (二) 酶的提纯

除另有说明外, 提纯过程中所有操作均在 15℃ 进行。

1. 聚乙二醇 (PEG)6000-磷酸钾缓冲液双水相分离: 参考 Veide 等的方法<sup>[25]</sup>, 将粗酶液离心去不溶物后, 向粗酶液中慢慢加入固体  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  及  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (3:1), 使其最终浓度为 25% (W/V), 慢慢搅拌使充分溶解后, 最后溶液为 pH 6.0 左右。然后加入固体 PEG6000, 到最终浓度 5% (W/V), 在 15℃ 放置, 不久将自然分成双水相。活力测定表明, 绝大部分  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶

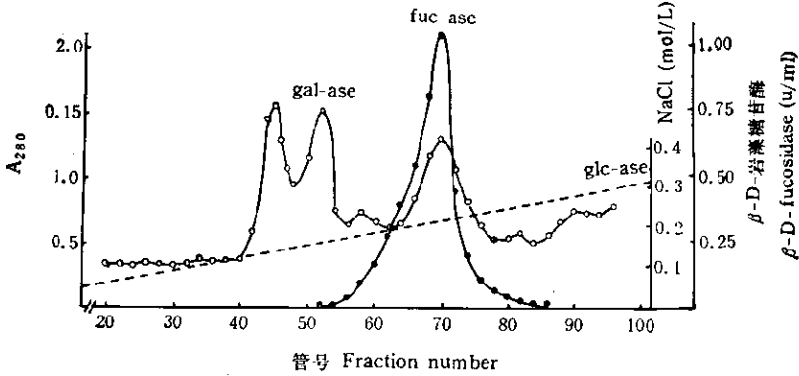


图1  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的 DEAE-Sephadex A-50 柱层析图

Fig. 1 Chromatography of  $\beta$ -D-fucosidase on DEAE-sephadex A-50  
○—○ A<sub>280</sub>; ●—●  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶活力  $\beta$ -D-fucosidase activity;  
----NaCl 梯度 NaCl gradient

及  $\beta$ -木糖苷酶活性均分配在磷酸缓冲液相,而那些小分子物质,特别是色素,均浓集在 PEG6000 相中。

在制备  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的粗酶液时,必须将海枣曲霉培养 5 天,才能得到较高的酶活力。由于培养时间长,制备的粗酶液中含有孢子及黑色素等。这些成份能被硫酸铵沉淀下来,并且易被吸附在羟基磷灰石、Sephadex 凝胶等层析介质上。吸附后又不容易被洗脱下来,影响层析效果和凝胶的再生。而用双水相分离时,各种糖苷酶均分配在缓冲液相,而黑色素则浓集在 PEG6000 相。而且用硫酸铵直接沉淀酶液中的蛋白时, $\beta$ -D-岩藻糖苷酶严重失活。而在双水相系统中,即使长期存放,该酶仍稳定,用硫酸铵沉淀,也不易失活。

因  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶很不稳定,在以下的提纯步骤中,所用缓冲液均含 5% 甘油及 20mmol/L 巯基乙醇。

2. DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱层析: 将双水相分离的磷酸缓冲液相用 60% 饱和度的硫酸铵沉淀,离心取沉淀,溶于 pH 6.0 的 0.2mol/L 乙酸缓冲液,用 Sephadex G-25 脱盐后,上到已用 pH 6.0

的 0.02mmol/L 乙酸缓冲液平衡的 DEAE-Sephadex A-50 柱 (2.9 × 24cm) 上,以同一缓冲液充分洗柱后,再以 0—0.35mol/L NaCl (各 600ml) 线性梯度洗脱,同时分部收集,40 分钟 1 管,每管约收集 10ml。测定各管的 A<sub>280</sub> 及酶活力,结果如图 1。 $\beta$ -D-岩藻糖苷酶与  $\beta$ -半乳糖苷酶及  $\beta$ -葡萄糖苷酶分别出现在不同的蛋白峰内,表明这些酶的层析性质互不相同。

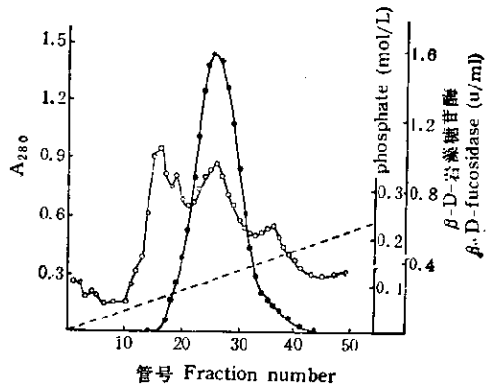


图2  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的羟基磷灰石柱层析

Fig. 2 Hydroxylapatite chromatography of  $\beta$ -D-fucosidase  
○—○ A<sub>280</sub>; ●—●  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶活力 Enzyme activity; ----磷酸缓冲液梯度 phosphate buffer gradient

3. 羟基磷灰石吸附柱层析: 将上一步层析得到的  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶活力峰部分合并, 上到已用 pH 6.0 的 0.001mol/L 磷酸缓冲液平衡的羟基磷灰石柱上 ( $1.7 \times 22\text{cm}$ ), 再以同一缓冲液充分洗柱后, 即用 0.001—0.3mol/L 磷酸缓冲液 (各 350ml) 线性梯度洗脱。按上一步层析的同样条件收集洗脱液, 并测  $A_{280}$  及酶活力。结果如图 2。 $\beta$ -D-岩藻糖苷酶出现在第二个蛋白峰内。由于  $\beta$ -半乳糖苷酶需 0.5mol/L 以上的磷酸缓冲液才被洗脱下来, 因而在这一步层析中,  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶得到完全分离。

4. Sephadex G-100 柱层析: 将羟基磷灰石层析得到的  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶活力峰尖上的 30ml 样品上到已用 pH 6.0 的 0.02mol/L 磷酸缓冲液平衡的 Sephadex G-100 柱 ( $3.0 \times 120\text{cm}$ ) 上, 再以同一缓冲液洗脱, 当流出 160ml 洗脱液后, 再按第 2 步层析的同样条件收集洗脱液, 并测  $A_{280}$  及酶活力, 结果如图 3。 $\beta$ -D-岩藻糖苷酶出现在第二个蛋白峰内。将  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的活力峰部分用 7% 和 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检查其纯度, 结果均表现为均一成分 (图 4)。

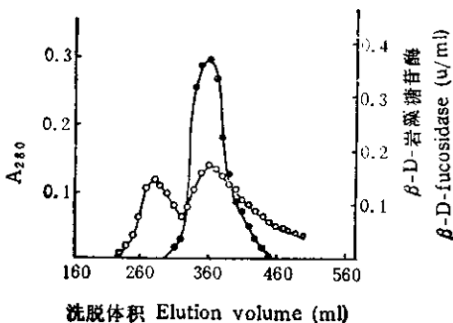


图 3  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的 Sephadex G-100 柱层析  
Fig. 3 Sephadex G-100 gel filtration of the  $\beta$ -D-fucosidase  
○—○  $A_{280}$ ; ●—● 酶活力 Enzyme activity



图 4  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶在 7% (左) 和 10% (右) 凝胶上的 PAGE 图  
Fig. 4 PAGE of purified  $\beta$ -D-fucosidase on 7% (left) and 10% (right) of polyacrylamide gel

酶的整个提纯过程如表 1。 $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的比活由 0.015 提高到 7.6, 提高了 500 多倍, 但酶活力收率较低, 不到 2%。这是因为只能取羟基磷灰石层析得到的  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶活力峰尖的三管作 Sephadex G-100 凝胶过滤, 才能得到均一样品。另外, 该酶很不稳定, 这也是导致酶活收率很低的原因之一。

### (三) 酶的基本性质

1. 最适 pH: 在 40℃, 不同 pH 的 0.05 mol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液中, 测定  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶水解 pNP- $\beta$ -fuc 的活力, 结果表明最适 pH 为 6.0 (图 5-A)。

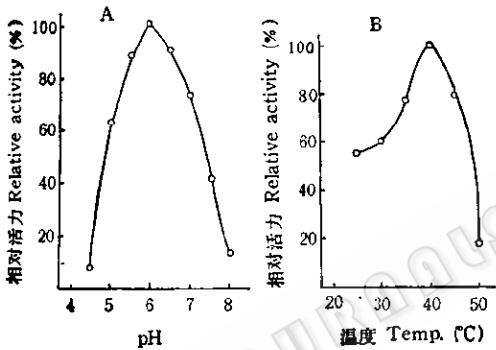
2. 最适温度: 于 pH 6.0 的 0.05mol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液中, 测定  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶在不同温度下水解 pNP- $\beta$ -fuc 的活力。结果表明该酶在 40℃ 左右活力最高 (图 5-B)。

3. 酶的 pH 稳定性: 将酶液在不同 pH 的 0.05mol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液中, 于 30℃ 保温 1 小时, 然后用 pH 6.0 的

表 1  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的提纯\*Table 1 Purification of  $\beta$ -D-fucosidase 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 extract	69000	1040	0.015	1	100
双水相分离 Aqueous-two-phase DEAE-sephadex A-50	24300	959	0.039	2.6	92.2
	175	204	1.17	78	19.6
羟基磷灰石 Hydroxy apatite	7.2	32.4	4.5	300	3.1
Sephadex G-100	2.5	18.8	7.6	507	1.8

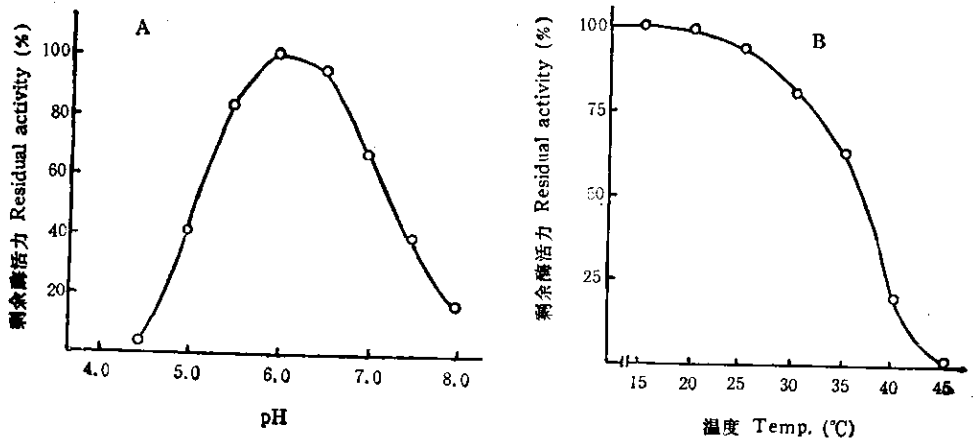
\* 由 800g 麦麸培养物  
From 800g wheat bran culture

图 5 pH(A) 和温度(B)对  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶活力的影响Fig. 5 Effect of pH(A) and temperature (B) on the activity of  $\beta$ -D-fucosidase

0.4mol/L 磷酸缓冲液调回 pH, 按常法测活力。该酶的稳定 pH 范围为 5.5—6.5(图 6-A)。

4. 酶的热稳定性: 将酶液在 pH6.0 的 0.05mol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液中, 于不同温度下保温 30 分钟, 按常法测剩余活力。该酶在 30°C 以下稳定, 在 40°C 严重失活, 在 45°C 则活力全部丧失(图 6-B)。

由上述结果看,  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的 pH 稳定性与热稳定性均较差。将该酶冰冻后再融化, 其活力全部丧失。稀释也会使该酶严重失活。而 Colas 从蜗牛中提纯

图 6  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的 pH(A) 和热(B) 稳定性Fig. 6 The pH stability (A) and heat stability (B) of  $\beta$ -D-fucosidase

的  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶专一性差, 但较稳定, 在 50℃ 仍稳定, 反复冰冻或高度稀释均不失活<sup>[40]</sup>, 因而与海枣曲霉  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的性质很不相同。

5. 酶的分子量: 由标准样品的分子量及在 SDS-凝胶电泳时的  $R_m$  值, 求得其分子量为 57000 (图 7)。该酶在 Sephadex G-100 凝胶过滤时, 其洗脱体积  $V_e$  在  $\beta$ -木糖苷酶 (MW95000) 和木聚糖酶 (MW 22000) 的  $V_e$  之间, 据此推测其天然酶的分子量为 50000—60000, 与 SDS-凝胶电泳的结果相近。因此, 该酶无亚基, 整个酶分子即由一条分子量为 57000 左右的肽链构成。非洲大蜗牛  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶 I 和 II 的分子量高达 300000 及 110000<sup>[40]</sup>, 海螺  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶分子量 300000<sup>[41]</sup>, 均比海枣曲霉  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶高得多。

6. 酶的动力学性质: 按常法测定该酶在 30℃, pH6.0 的 0.05 mol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液中水解 0.2—2.0mmol/L 的 pNP- $\beta$ -fuc 的活力。将结果按 Lineweaver-Burk 法作图 (图 8), 该酶水解上述底物的  $K_m$  值为 2.4mmol/L,  $V_{max}$  为  $12.8\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

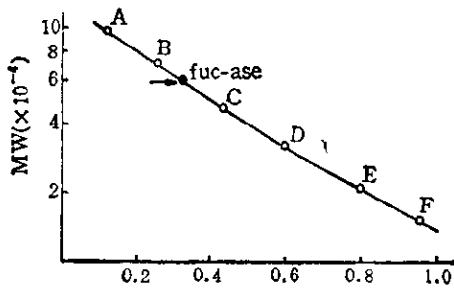


图 7  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶分子量测定

Fig. 7. Determination of molecular weight of  $\beta$ -D-fucosidase by SDS-PAGE

A. Phosphorylase b(94 000); B. Bovine serum albumin (67 000); C. Ovalbumin (43 000); D. Carbonic anhydrase (30 000); E. Soybean trypsin inhibitor (20 100); F.  $\alpha$ -Lactalbumin (14 400)

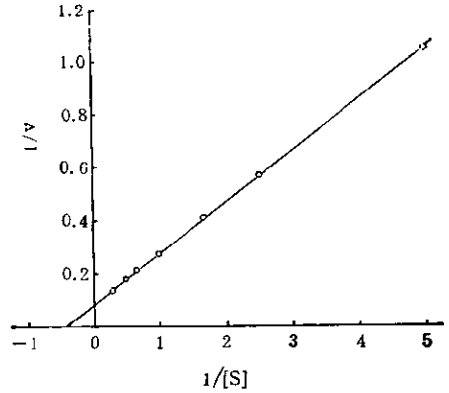


图 8  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶水解 pNP- $\beta$ -fuc 的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 8 Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of pNP- $\beta$ -fuc by  $\beta$ -D-fucosidase

7. 金属离子及其它化学试剂对酶活力的影响: 按标准方法(不加甘油)测定在反应体系中存在 1mmol/L 金属离子或其他化学试剂时,  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶水解 pNP- $\beta$ -fuc 的活力。结果表明,  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^+$  对

表 2 各种化学试剂对  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的影响

Table 2 Effect of various metallic ions on enzyme activity

化学试剂* Compounds	相对活力(%) Relative activity	化学试剂* Compounds	相对活力(%) Relative activity
对照 Control	100	$\text{FeSO}_4$	92.5
$\text{AgNO}_3$	14.8	$\text{NiAC}_2$	95.6
$\text{HgCl}_2$	4.8	$\text{PbAC}_2$	86.9
$\text{AlCl}_3$	91.7	$\text{CuSO}_4$	80.5
$\text{BaCl}_2$	86.8	$\text{ZnSO}_4$	91.5
$\text{CaCl}_2$	91.7	SDS	80.1
$\text{MgCl}_2$	106.9	EDTA	90.7
$\text{MnCl}_2$	95.3	2-巯基乙醇	
		2-Mercaptoethanol	147.7
$\text{FeCl}_2$	87.1	牛血清清蛋白	155.8
		Bovine serum albumin	

\* 各种试剂浓度除巯基乙醇为 10mmol/L、牛血清清蛋白为 2mg/ml 外, 其余均为 1mmol/L。Concentration of tested chemicals was 1mmol/L except mercapto ethanol 10mmol/L, BAS 2mg/L.

该酶表现强烈的抑制作用。其他均无明显影响。然而, 巯基乙醇、牛血清清蛋白对该酶有显著的激活作用(表 2)。因  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶容易稀释失活, 牛血清清蛋白的激活作用可能与增加蛋白质浓度及防止稀释失活有关。

表 3  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的化学修饰

Table 3 Chemical modification of  $\beta$ -D-fucosidase

试剂* Reagents	浓度(mol/L) Concn.	酶活力(%) Activity
无		100
PCMB	$2.5 \times 10^{-7}$	0
	$2.5 \times 10^{-8}$	17.2
	$2.5 \times 10^{-9}$	92.8
NEM	$1 \times 10^{-2}$	6.0
	$1 \times 10^{-3}$	30.4
	$1 \times 10^{-4}$	79.9
IAA	$1 \times 10^{-2}$	4.1
EDC	$4 \times 10^{-2}$	21.7
DEP	$4 \times 10^{-2}$	20.0
NBS	$1 \times 10^{-4}$	0
	$1 \times 10^{-6}$	14.1

\* 缩写 PCMB: p-chloromercuribenzoate  
 NEM: N-ethylmaleimide  
 IAA: Iodoacetic acid  
 EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimide 同时加乙二胺·HCl  
 DEP: Diethyl-pyrocyanate  
 NBS: N-bromosuccinimide

8. 酶的化学修饰: 各种试剂与  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶在 20mmol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液中, 在 25℃ 预先保温 30 分钟, 用 EDC 时加有亲核试剂乙二胺·HCl, 然后稀释测定酶活力, 结果见表 3。可以看出酶受巯基试剂 PCMB、NEM 和碘乙酸等强烈抑制, 也受 EDC、DEP 和 NBS 等抑制。由此可知, -SH 基、-COOH 基、组氨酸和色氨酸残基为酶表现活力所必需。

#### (四) 酶的高度专一性

1. 酶的底物专一性: 以各种对-硝基酚糖苷作底物时, 按常法测定产生的对-硝

基酚。以乳糖、纤维二糖及水杨素等为底物时, 反应体系总体积为 1ml, 底物浓度 0.25%, 含甘油 5%, 为 pH 6.0 的 0.05mol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液。反应后用葡萄糖氧化酶法<sup>[19]</sup>测定产生的葡萄糖。以 CMC 等多聚糖为底物时, 反应体系的条件同乳糖等。反应后用 Somogyi-Nelson 法<sup>[20]</sup>测定产生的还原糖, 结果见表 4。酶水解 pNP- $\beta$ -D-fuc 活力极强, 在同样条件下, 测不出对其它底物的水解活力, 即使酶浓度加倍, 保温时间延长 4 倍, 仍测不出其他活力。特别是在以 pNP- $\beta$ -L-Fuc 为底物时, 酶浓度增加 50 倍也测不出酶活力, 故表 5 中其相对活力均以“0”表示, 仅在大大延长保温时间后, 可表现出有微弱的水解 pNP- $\beta$ -D-glc 和纤维二糖的能力, 可知此酶有极为严格的底物专一性。

2. 酶的专一性抑制剂: 按常法测定  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶活力, 以各种糖类物质代替甘油, 以不加任何糖类物质者为对照, 结果见表 5。反应产物 D-岩藻糖和可能是过渡态类似物的 D-岩藻糖酸- $\gamma$ -内酯对酶有很强的抑制作用, D-半乳糖、D-半乳糖酸- $\gamma$ -内酯以及 D-葡萄糖、D-葡萄糖酸- $\gamma$ -内酯对该酶无抑制作用, 而它们却分别是由海藻曲霉中纯化的  $\beta$ -D-半乳糖苷酶<sup>[16]</sup>和  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶<sup>[18]</sup>的强抑制剂。在已报道的牛肝糖苷酶<sup>[12]</sup>中, 上述三种酶活力均受三种糖即: D-岩藻糖、半乳糖和葡萄糖所抑制, 并且 D-岩藻糖对三酶活力均是最强的抑制剂。在蜗牛糖苷酶<sup>[13]</sup>的情况是: D-岩藻糖、半乳糖和葡萄糖均能激活  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶活力, 但都能抑制另外两种酶的活力。D-葡萄糖酸- $\delta$ -内酯对  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶和  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶有较强的抑制作用, D-半乳糖酸- $\gamma$ -内酯则对  $\beta$ -D-半乳糖苷酶有强抑制作用, 提示该酶有两个活力部位, 一个为岩藻-葡萄糖苷部位,

表 4  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶的底物专一性  
Table 4 Substrate specificity of  $\beta$ -D-fucosidase

底物 Substrate	相对活力(%) Relative activity	底物 Substrate	相对活力(%) Relative activity
pNP- $\beta$ -D-fuc	100	乳糖 Lactose	0
pNP- $\beta$ -L-fuc	0	纤维二糖 Cellobiose	0
pNP- $\alpha$ -L-fuc	0	水杨素 Salicin	0
pNP- $\beta$ -D-gal	0	羧甲基纤维素 CMC	0
pNP- $\beta$ -D-glc	0	$\beta$ -1,2-葡聚糖 $\beta$ -1,2-glucan	0
pNP- $\beta$ -xyl	0	昆布多糖 Laminarin	0
pNP- $\alpha$ -D-gal	0	( $\beta$ -1,3-)	
pNP- $\alpha$ -D-glc	0	地衣多糖 Lichenin	0
pNP- $\beta$ -D-man	0	( $\beta$ -1,3-, $\beta$ -1,4-)	
pNP- $\alpha$ -D-ara	0	石脐素 Pustulan ( $\beta$ -1,6-)	0

表 5 碳水化合物对  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶活力的影响  
Table 5 Effect of carbohydrates on activity of  $\beta$ -D-fucosidase

碳水化合物(10mmol/L) Carbohydrate	活力(%) Activity	碳水化合物(10mmol/L) Carbohydrate	活力(%) Activity
对照 Control	100	纤维二糖 Cellobiose	43
D-阿拉伯糖 D-arabinose	107	蜜二糖 Melibiose	188
L-阿拉伯糖 L-arabinose	94	水杨素 Salicin	198
D-核糖 D-ribose	97	木糖醇 Xylitol	139
D-木糖 D-xylose	216	半乳糖醇 Galactitol	88
D-岩藻糖 D-fucose	97	肌醇 Inositol	180
D-半乳糖 D-galactose	131	甘油 Glycerin	210
D-葡萄糖 D-glucose	344	D-半乳糖酸- $\gamma$ -内酯 D-galactono- $\gamma$ -lactone	91
D-甘露糖 D-mannose	103	D-葡萄糖酸- $\gamma$ -内酯 D-glucono- $\gamma$ -lactone	93
乳糖 Lactose	90	D-岩藻糖酸- $\gamma$ -内酯 D-eucono- $\gamma$ -lactone	28

一个为半乳糖苷部位。由此可见，从酶的抑制剂角度来看，海枣曲霉的  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶也具有高度专一性，至于纤维二糖的抑制作用，可能与该酶具有微弱的分解纤维二糖的能力有关。

在表 5 中也可见  $\beta$ -D-岩藻糖苷酶能

被多种糖所激活，尤以葡萄糖和木糖可分别提高酶活 3 或 2 倍。Calvo 等<sup>[13]</sup>对糖激活作用的解释是可能与转苷作用有关。在本文试验中，除糖外，甘油及其它糖醇、巯基乙醇和牛血清清蛋白(表 2) 也对酶表现激活作用，我们推测它们可能都是对酶



活力有保护作用。

### 参 考 文 献

- [1] Levve, G. A.: *Nature*, **187**: 1027, 1960.
- [2] Levve, G. A. and McAllan, A.: *Biochem. J.*, **87**: 206—209; 361—367, 1963.
- [3] Conchie, J. et al.: *Biochem. J.*, **103**: 609—615, 1967.
- [4] IUB Report of the Commission in Enzymes, p. 111, Pergamon Press, Oxford, 1961.
- [5] Enzyme Nomenclature, p. 140, Recommendations (1964) of the IUBAC-IUB, Elsevier, Amsterdam, 1965.
- [6] Enzyme Nomenclature, p. 216, Recommendations (1972) of the IUBAC-IUB, Elsevier, Amsterdam, 1973.
- [7] Enzyme Nomenclature, p. 282, Recommendations (1978) of the IUPAC-IUB, Academia Press, New York, 1979.
- [8] Enzyme Nomenclature, p. 312, Recommendations (1984) of the IUPAC-IUB, Academia Press, New York, 1984.
- [9] Wiederschain, G. Y. and A. A. Prokopenkov: *Archs. Biochem. Biophys.*, **158**: 539—543, 1973.
- [10] Colas, B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **527**: 150—158, 1978.
- [11] Colas, B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **613**: 448—458, 1980.
- [12] Rodriguez, J. A. et al.: *Int. J. Biochem.*, **14**: 695—698, 1982.
- [13] Calvo, P. S.: *Int. J. Biochem.*, **15**: 685—693, 1983.
- [14] Calvo, P. et al.: Proceedings of the 7th International Symposium on Glycoconjugates, Lund-Rouneby, July 17—23, p. 463—464, 1983.
- [15] 曾宇成、张树政: 生物化学杂志, **3(6)**: 552—560, 1987.
- [16] 曾宇成、张树政: 生物化学杂志, **4(2)**: 109—115, 1988.
- [17] 曾宇成、张树政: 微生物学报, **29(3)**: 195—199, 1989.
- [18] 曾宇成: 博士研究生论文, 中国科学院微生物研究所, 1986.
- [19] Bergmeyer, H. U. and E. Bernt: *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. Bergmeyer, H. U.) p. 123—130, Academic Press, New York, 1963.
- [20] Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**: 19—28, 1952.
- [21] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275, 1951.
- [22] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404—427, 1964.
- [23] Weber, K. and Osborn, M.: *J. Biol. Chem.*, **255**: 4406—4412, 1969.
- [24] 曾宇成、张树政: 微生物学通报, **14(3)**: 111—114, 1987.
- [25] Viède, A. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**: 1789—1800, 1983.

## STUDIES ON THE $\beta$ -D-FUCOSIDASE FROM *ASPERGILLUS PHOENICIS*\*

Zeng Yucheng Li Yuteh<sup>1</sup> Gu Yajun Zhang Shuzheng<sup>2</sup>

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Although  $\beta$ -D-fucosidase ( $\beta$ -D-fucoside fucosylhydrolase, EC 3.2.1.38) has been isolated from various sources, the identity of this enzyme is still not settled. We have purified a specific  $\beta$ -D-fucosidase in electrophoretically homogeneous form from crude extracts of *Aspergillus phoenicis* by polyethyleneglycol 6000-phosphate buffer aqueous two-phase separation, and successive chromatography on DEAE-Sephadex A-50, hydroxyapatite and Sephadex G-100 columns. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 57000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and 50000 to 60000 by gel filtration on Sephadex G-100. The enzyme showed optimum activity at substrate concentrations of 2.4 mmol/L, and 1.28  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> at pH 5.5—6.5 and below 35°C. The  $K_m$  and the  $V_{max}$  values for pNP- $\beta$ -D-fucoside were 2.4 mmol/L, and 1.23  $\mu$ mol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> respectively. The enzyme was strongly

inhibited by sulfhydryl group reagents, PCMB, NEM and iodoacetate. It was also inhibited by EDC, DEP and NBS. Thus, -SH, -COOH groups, histidyl and tryptophyl residues were essential for enzyme activity. The purified  $\beta$ -D-fucosidase showed high specificity toward p-nitrophenyl  $\beta$ -D-fucoside. The enzyme was inhibited by D-fucose and D-fucono- $\gamma$ -lactone, but not by D-galactose, D-galactono- $\gamma$ -lactone, D-glucose or D-glucono- $\gamma$ -lactone; the latter compounds are specific inhibitors of  $\beta$ -D-galactosidase and  $\beta$ -D-glucosidase respectively. Thus, this enzyme is the most strictly specific  $\beta$ -D-fucosidase when compared with those previously reported.

### Key words

Specific  $\beta$ -D-fucosidase; *Aspergillus phoenicis*

\* This investigation was supported in part by Grant of National Natural Science Foundation, China, Bio 85-124 (to S. -z.Z.) and Grant DMB 86-17033 from National Science Foundation (to Y. -T.L.).

1. Visiting Professor Academia Sinica, Present Address: Department of Biochemistry, Tulane University, School of Medicine, New Orleans, LA 70112, U.S.A.
2. To whom requests for reprints should be addressed.