

## 海枣曲霉 $\beta$ -葡萄糖苷酶的催化性质

曾宇成 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

本文研究了海枣曲霉 (*Aspergillus phoenicis*)  $\beta$ -葡萄糖苷酶的底物特异性以及不同化学试剂对酶活力的影响。该酶水解对-硝基酚基- $\beta$ -葡萄糖苷、纤维二糖和水杨素的相对活力分别为 100、180 和 67.3。水解对-硝基酚基  $\beta$ -葡萄糖苷和纤维二糖的  $K_m$  值分别为 0.97mmol/L 和 1.8mmol/L,  $V_{max}$  分别为  $576\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  和  $595\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。  $\text{Ag}^+$ 、D-葡萄糖和纤维二糖对酶活力有强烈的抑制作用。Lineweaver-Burk 作图法及 Dixon 作图法表明 D-葡萄糖对该酶显示竞争性抑制作用, 其  $K_i$  值分别为 3.0mmol/L 和 3.4mmol/L。

**关键词** 海枣曲霉;  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 底物特异性; 抑制剂

前文已报道了海枣曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶的提纯与性质<sup>[1]</sup>。本文报道该酶的催化性质。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 菌种

海枣曲霉 (*Aspergillus phoenicis*) AS 3.3143<sup>[1]</sup>。

#### (二) 主要化学试剂

纤维二糖, Fluka 产品。水杨素, B.D.H 产品。D-木糖, E.Merk 产品。对-硝基酚基- $\beta$ -葡萄糖苷 (pNP- $\beta$ -glc) 及其它对-硝基酚基- $\alpha$  或  $\beta$ -糖苷、D-葡萄糖- $\gamma$ -内酯等均为 Sigma 公司产品。 $\beta$ -1,2-葡聚糖、昆布多糖 ( $\beta$ -1,3-葡聚糖)、地衣多糖 ( $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖) 及石脐素等为 Miles 公司何方先生赠送。其余均为国产试剂。

#### (三) 酶的制备与提纯

按前文方法进行<sup>[1]</sup>。

#### (四) 酶活力测定

以 pNP- $\alpha$  或  $\beta$ -糖苷为底物时, 测定方法同文献 [2], 水解不同底物的其余反应条件与测定方法与文献 [3] 相同。

#### (五) 各种化学试剂对酶活力的影响

分别将各种金属离子或碳水化合物 (10—100mmol/L) 等试剂 50 $\mu$ l, pH5.0 的 0.1mol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液 200 $\mu$ l, 酶液 150 $\mu$ l 混合, 室温放置 30 分钟后, 加 pNP- $\beta$ -葡萄糖苷 100 $\mu$ l, 按常法测定酶活力。

## 结 果 和 讨 论

### (一) 金属离子及其他化合物对酶活力的影响

在所测定的各种试剂中,  $\text{Ag}^+$  对  $\beta$ -葡萄糖苷酶有强烈的抑制作用。 $\text{Hg}^{2+}$  的抑制作用较弱,  $4\text{mol/L}$  脲对酶活力也有一定的抑制作用。 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、EDTA 和 SDS 等常见的抑制剂对酶活力无明显影响(表 1)。表明该酶对金属离子不敏感, 其活力不需金属离子。

表 1 各种化学试剂对  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的影响

Table 1 Effect of various chemicals on the activity of  $\beta$ -glucosidase

化学试剂 Chemicals	浓 度 Concn.(mmol/L)	相对活力 Relative activity (%)
对照 Control	—	100
$\text{AgNO}_3$	1	7.8
$\text{HgCl}_2$	1	53.8
$\text{AlCl}_3$	1	101.9
$\text{BaCl}_2$	1	97.1
$\text{CaCl}_2$	1	96.3
$\text{MnCl}_2$	1	90.3
$\text{CuSO}_4$	1	102.2
$\text{ZnSO}_4$	1	99.3
$\text{PbAc}_2$	1	92.4
SDS	10	94.7
Urea	$4 \times 10^3$	41.8
	$1 \times 10^3$	78.9
EDTA	1	98.0

### (二) 碳水化合物对酶活力的影响

测定结果表明,  $\beta$ -葡萄糖苷酶受其产物 D-葡萄糖和底物纤维二糖的强烈抑制。水杨素、D-葡萄糖酸- $\gamma$ -内酯对该酶的抑制作用较弱, 甘油及所测定的其他碳水化合物对该酶活力无明显影响(表 2)。据报道, D-葡萄糖对土曲霉(*Aspergillus terreus*)<sup>[4]</sup>、齐整小核菌<sup>[5]</sup>(*Sclerotium rolfsii*) $\beta$ -葡萄糖苷酶均有较强的抑制作用, 这与本试验结果一致。D-葡萄糖酸- $\delta$ -内酯对齐整小核菌、粉状侧孢霉(*Sporotrichum pulverulentum*)<sup>[6]</sup>等的  $\beta$ -葡萄糖苷酶均有极强的抑制作用, 我们所试的 D-葡萄糖酸- $\gamma$ -内酯对海枣曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶的抑制作用则不大。后来又补测了 D-葡萄糖酸  $\delta$ -内酯,  $1\text{mmol/L}$  完全抑制酶活力。

### (三) 酶的底物特异性

以  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解 pNP- $\beta$ -glc 的活力为标准, 计算酶对其他底物的相对水解活力(表 3)。结果表明,  $\beta$ -葡萄糖苷酶对纤维二糖的水解活力最高, 对 pNP- $\beta$ -glc、水杨素等葡萄糖苷也有较高的水解活力。该酶对 pNP- $\beta$ -xyl、pNP- $\beta$ -gal 等多种对-硝基酚基糖苷, 对 CMC、 $\beta$ -1,2-葡聚糖、地衣多糖、昆布多糖、石脐素及木聚糖均无水解作用, 因而为一种专一水解寡聚  $\beta$ -葡萄糖及  $\beta$ -葡萄糖苷底物中的  $\beta$ -葡萄糖苷键的酶。该酶的底物特异性与粉状侧孢菌<sup>[6]</sup>、黑曲霉(*Asp. niger*)<sup>[7]</sup>等来源的对纤维二糖、pNP- $\beta$ -glc 均有水解作用的  $\beta$ -葡萄糖苷酶相似, 而不同于只能水解纤维二糖的如血痕韧革菌

(*Stereum sanginolentum*)<sup>[8]</sup>β-葡萄糖苷酶, 或只水解芳基β-葡萄糖苷的某些酵母<sup>[9]</sup>β-葡萄糖苷酶。葡萄穗霉 (*Stachybotrys atra*)<sup>[10]</sup>、三侧毛壳菌 (*Chaetomium trilaterale*)<sup>[11]</sup> 等来源的β-葡萄糖苷酶对纤维二糖、木二糖、pNP-β-glc、pNP-β-xyl 等底物均有较高的水解作用, 这与海枣曲霉β-葡萄糖苷酶的底物特异性不太相同。Sternberg 等也报道从海枣曲霉中提纯到β-葡萄糖苷酶, 但该酶对地衣多糖等β-葡聚糖也有水解作用<sup>[12]</sup>, 比本实验的β葡萄糖苷酶的底物特异性要宽。

表 2 各种碳水化合物对酶活力的影响

Table 2 Effect of various carbohydrates on the activity of β-glucosidase

碳水化合物 Carbohydrate(10mmol/L)	相对活力 Relative activity(%)
对照 Control	100
D-阿拉伯糖 D-arabinose	102.9
L-阿拉伯糖 L-arabinose	99.6
D-木糖 D-xylose	104.1
L-岩藻糖 L-fucose	97.4
D-半乳糖 D-galactose	100.5
D-葡萄糖 D-glucose	24.1
纤维二糖 Cellobiose	15.0
乳糖 Lactose	99.3
麦芽糖 Maltose	82.6
木糖醇 Xylitol	99.7
山梨醇 Sorbitol	89.6
半乳糖醇 Dulcitol	100.2
水杨素 Salicin	65.3
D-葡萄糖酸-γ-内酯 D-glucono-γ-lactone	77.2
D-半乳糖酸-γ-内酯 D-galactono-γ-lactone	95.6
甘油 Glycerin	93.2

(四) 酶的动力学参数

分别于 60℃和 pH5.0 的 0.05mol/L 柠檬酸-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液中测定该酶水解不同浓度的 pNP-β-glc 和纤维二糖的活力, 将测定结果按 Woolf 法作图 (图 1—2) 求得β-葡萄糖苷酶水解上述两种底物的 K<sub>m</sub> 值分别为 0.97mmol/L 和 1.8mmol/L; 最大反应速度 V<sub>max</sub> 分别为 576μmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> 蛋白和 595μmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> 蛋白。

表 3 酶的底物特异性

Table 3 Substrate specificity of β-glucosidase

底物 Substrate	相对活力 (%) Relative activity	底物 Substrate	相对活力 (%) Relative activity
pNP-β-glc	100	CMC	0
pNP-β-xyl	0	β-1,2-葡聚糖 β-1,2-glucan	0
pNP-β-gal	0	地衣多糖 Lichenin	0
pNP-β-fuc	0	昆布多糖 Laminarin	0
pNP-α-gal	0	石脐素 Pustulan	0
pNP-α-glc	0	半乳甘露聚糖 Galactomannan	0
纤维二糖 Cellobiose	180	稻草木聚糖 HB	0
水杨素 Salicin	67	Rice straw xylan HB	

(五) D-葡萄糖的抑制类型与抑制常数

1. Lineweaver-Burk 作图法：按测  $K_m$  值的同样方法测定存在抑制剂与否时 (抑制剂的终浓度为 2.5mmol/L, pNP- $\beta$ -glc 的浓度为 0.2-5mmol/L) 酶的水解活力, 并计算反应速度。将结果按 Lineweaver-Burk 法作图 (图 3)。反应体系中存在不存在 D-葡萄糖时,  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解 pNP- $\beta$ -glc 的双倒数曲线显示, D-葡萄糖对  $\beta$ -葡萄糖苷酶有竞争性抑制作用, 抑制常数  $K_i$  为 3.0mmol/L。

2. Dixon 作图法：按常法于 65℃测定反应体系中存在 0-15mmol/L D-葡萄糖时  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解 1mmol/L 和 2mmol/L pNP- $\beta$ -glc 的活力。将结果按 Dixon 法作图 (图 4)。结果表明, D-葡萄糖对  $\beta$ -葡萄糖苷酶显示竞争性抑制作用, 其  $K_i$  值为 3.4mmol/L。

上述结果表明, 由 Lineweaver-Burk 作图法与 Dixon 作图法所得结果基本一致。

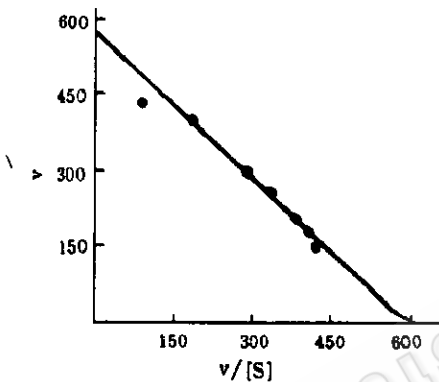


图 1  $\beta$ -葡萄糖苷酶对 pNP- $\beta$ -glc 水解的 Woolf 图  
Fig. 1 Woolf plot for the hydrolysis of pNP- $\beta$ -glc by  $\beta$ -glucosidase

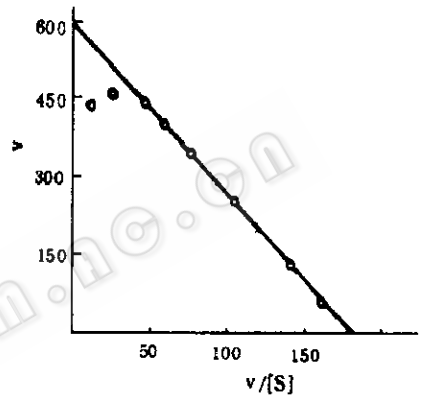


图 2  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解纤维二糖的 Woolf 图  
Fig. 2 Woolf plot for the hydrolysis of cellulose by  $\beta$ -glucosidase

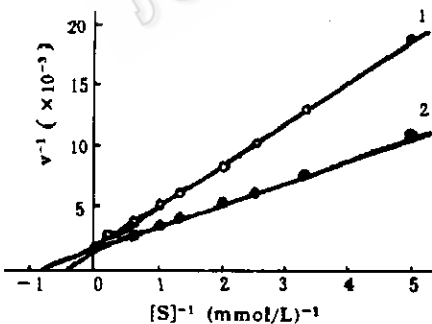


图 3 D-葡萄糖存在时,  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解 pNP- $\beta$ -glc 的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 3 Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of pNP- $\beta$ -glc by  $\beta$ -glucosidase in the presence of D-glucose

1. D-葡萄糖 D-glucose; 2. 对照 Control

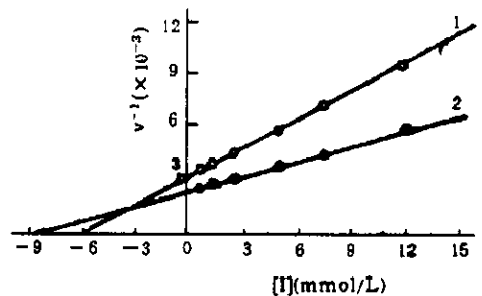


图 4 D-葡萄糖对  $\beta$ -葡萄糖苷酶抑制作用的 Dixon 图  
Fig. 4 Dixon plot for the inhibition of D-glucose on  $\beta$ -glucosidase

pNP- $\beta$ -glc concentration: 1. 1mmol; 2. 2mmol/L

参 考 文 献

[1] 曾宇成、张树政：微生物学报, 20(3), 195-199, 1989。

- [2] 曾宇成、张树政: 生物化学杂志, 3, 552—560, 1987.
- [3] 曾宇成、张树政: 生物化学杂志, 4(2), 109—115, 1988.
- [4] Warkman, W. E. and D. F. Day: *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:1289—1295, 1982.
- [5] Shemale, J. G. and J. C. Sadana: *Archs. Biochem. Biophys.*, 207:185—196, 1981.
- [6] Deshpande, V. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 90:191—198, 1978.
- [7] King, K. W. et al.: *Appl. Microbiol.*, 11:315—319, 1963.
- [8] Bucht, B. and K. E. Eriksson: *Archs. Biochem. Biophys.*, 129:419—420, 1969.
- [9] Woodward, J.: *Enzyme Microb. Technol.*, 4:73—79, 1982.
- [10] Gussem, R. D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 529: 142—153, 1978.
- [11] Uziie, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 49: 1159—1166, 1985.
- [12] Sternberg, D. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 23:139—147, 1977.

## CATALYTIC PROPERTIES OF $\beta$ -GLUCOSIDASE FROM *ASPERGILLUS PHOENICIS*

Zeng Yucheng      Zhang Shuzheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Substrate specificities and inhibitors of the purified  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus phoenicis* were investigated. The relative activity of  $\beta$ -glucosidase toward p-nitrophenyl  $\beta$ -glucoside, cellubiose and salicin were 100, 180 and 67.3. The  $K_m$  values for p-nitrophenyl  $\beta$ -glucoside and cellubiose were 0.97mmol/L and 1.8mmol/L, respectively. The  $V_{max}$  values were  $576\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  and  $595\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , respectively. The enzyme activity was inhibited by  $\text{Ag}^+$ , D-glucose, cellubiose. The  $K_i$  for D-glucose was 3.0 mmol/L (3.4 mmol/L) as determined by Leneweaver-Burk plot (Dixon plot). The enzyme was strongly inhibited by D-glucono- $\delta$ -lactone.

**Key words** *Aspergillus phoenicis*;  $\beta$ -glucosidase; Substrate specificity; Inhibitors