

日本根霉 IFO5318 胞外 β -葡萄糖苷酶的纯化及部分特性*

陈 向 东

藤尾雄策

(武汉大学生命科学院 武汉 430072)

(九州大学食粮化学工学科 日本 812)

摘 要 采用硫酸铵沉淀及柱层析等步骤纯化了日本根霉 IFO5318 的 β -葡萄糖苷酶, 回收率为 22%。该酶分子量约为 4.0×10^5 , 由四个相同大小的亚基组成; 最适反应温度 55℃, 最适反应 pH5.5; 对热较敏感, 但能在较大的 pH 范围内保持稳定。用对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷为底物, 测得的 K_m 和 V_{max} 值分别为 $0.825 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $135.4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。该酶对纤维二糖的水解能力最强, SDS、 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} 等对酶活力有抑制作用。

关键词 日本根霉, β -葡萄糖苷酶, 纯化

根霉属于腐生性真菌, 是引起瓜果、蔬菜、粮食和食品等在运输和储藏过程中霉变或腐烂的重要原因^[1], 同时它也在一些酶制剂工业及亚洲、非洲的许多传统食品发酵中应用广泛^[2]。对根霉分泌的多种胞外酶的研究有助于了解它在上述这些生化过程中的作用, 并为酶制剂工业开拓新的酶源。我们曾对多株根霉的发酵生长和产各种胞外酶的情况进行报道^[3,4], 并对其中日本根霉 (*Rhizopus japonicus*) IFO5318 所产胞外多聚半乳糖醛酸酶、羧甲基纤维素酶等进行了提纯和性质研究^[5,6]。本文则将报道对该菌株所产胞外 β -葡萄糖苷酶的纯化和部分特性研究。

1 材料和方法

1.1 微生物及发酵产酶

日本根霉 IFO5318 由日本九州大学食品制造工学实验室提供。菌株培养及粗酶液的制备同文献 [6]。

1.2 酶活力测定及酶的底物特异性

以对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (pNPG) 为底物, 测定 β -葡萄糖苷酶的活力, 在实验条件下每分钟释放 $1 \mu\text{mol}$ 对硝基苯被定义为 1 个活力单位^[7]; 酶的底物特异性按文献 [8] 所述方法, 通过测定酶作用于不同底物产生的还原糖量来进行比较。

1.3 蛋白质含量的测定

柱层析时, 洗脱液的蛋白质含量以其在 280nm 的吸光度衡量。样品中蛋白质的实际含量用改进的 Lowry 法, 以牛血清白蛋白为标准进行测量^[9]。

1.4 分子量测定

纯酶的分子量分别采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)^[10] 及 Sephacryl S-300 凝

* 联合国教科文组织 (UNESCO) 资助。

本文于 1996 年 8 月 22 日收到。

胶过滤柱层析进行测定^[11]。

1.5 主要试剂来源

对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)、对硝基苯基- β -木糖苷、对硝基苯基- β -半乳糖苷、对硝基苯基- α -葡萄糖苷、羧甲基纤维素、微晶纤维素及考马氏亮兰均为日本 Nacalai Tesque 公司产品; 纤维二糖、水杨苷及昆布多糖为美国 Sigma 公司产品; DEAE-Sephadrose CL-6B、Sephadex G-100、Sephadex G-75、Sephacryl S-300、分子量标准蛋白等均购自瑞典的 Pharmacia 公司。

2 结果和分析

2.1 酶的纯化

2.1.1 酶的纯化操作都在 4℃ 下进行, 样品的浓缩采用超滤法或冷冻干燥法。

2.1.2 粗酶液中缓慢加入硫酸铵至 90% 饱和度, 4℃ 下静置过夜后离心弃去上清液, 沉淀用少量蒸馏水溶解后对 pH5.4 的 0.01 mol · L⁻¹ 二甲胂酸钠-HCl 缓冲液透析。

2.1.3 透析后所得样品上样于已用 pH5.4 的 0.01 mol · L⁻¹ 二甲胂酸钠-HCl 缓冲液平衡的 DEAE-Sephadrose CL-6B 层析柱(1.6 × 90cm), 用相同缓冲液充分洗脱至无蛋白质洗出后进行 0~0.3 mol NaCl 梯度洗脱, 流速 36 ml · h⁻¹, 每管收集 6ml。从图 1 可见, 有二个酶活力峰被依次洗脱, 其中酶峰 2 由于含有较多的杂蛋白, 未对其进行进一步纯化。

2.1.4 上一步收集的酶峰 1 先后用 Sephadex G-100 和 G-75 凝胶过滤层析柱(1.6 × 90cm)进行提纯。平衡及洗脱液: pH5.0、0.05 mol 柠檬酸缓冲液, 流速 5~8 ml · h⁻¹, 每管收集 4~7 ml。从图 2 可见, 在后一步柱层析时酶活力峰与蛋白峰完全重合, 且峰形对称, 说明已得到了纯化。

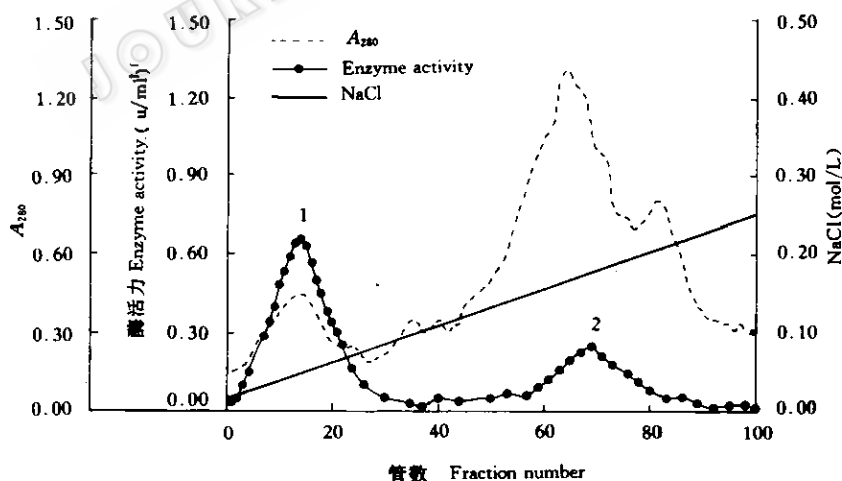
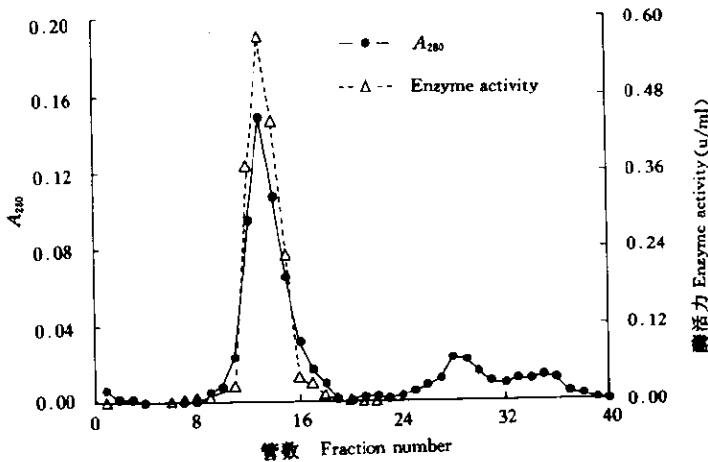


图 1 β -葡萄糖苷酶 DEAE-Sephadrose CL-6B 柱层析

Fig.1 DEAE-Sephadrose CL-6B column chromatography of β -glucosidase

从表 1 列出的酶纯化结果可见, 日本根霉 IFO5318 的 β -葡萄糖苷酶的主要组分以 22% 的得率被纯化了 336 倍, 比活力达到 53.8 u · mg⁻¹。

图2 β -葡萄糖苷酶 Sephadex G-75 柱层析Fig.2 Sephadex G-75 column chromatography of β -glucosidase表1 日本根霉IFO5318 β -葡萄糖苷酶的纯化Table 1 Purification of β -glucosidase from *Rhizopus japonicus* IFO5318

纯化步骤	体积 Volume	总蛋白 Total protein	总活力 Total activity	比活力 Specific activity	得率 Recovery	纯化倍数 Purification factor
Purification step	(ml)	(mg)	(u)	(u · mg ⁻¹)	(%)	
粗酶液	600	2618.0	415.5	0.16	100	1
Crude enzyme						
硫酸铵沉淀	140	647.0	343.0	0.53	83	3.3
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting out						
DEAE-Sephacrose CL-6B						
酶峰1 Activity peak 1	178	13.2	172.0	13.0	41.4	81.4
酶峰2 Activity peak 2	78	77.8	73.9	0.95	17.8	5.9
Sephadex G-100	26	3.5	123.4	35.3	29.7	220.3
Sephadex G-75	40	1.7	91.4	53.8	22.0	336.0

2.2 酶的纯度及分子量

图3显示纯化的 β -葡萄糖苷酶在SDS-PAGE上只显示一条蛋白带,其大小约为 1.05×10^5 ,而采用Sephacryl S-300凝胶过滤柱层析法测得的酶分子量约为 3.9×10^5 ,说明该酶是由四个分子量约为 1.0×10^5 的相同大小的亚基所组成。

2.3 酶的动力学参数

按照Lineweaver-Burk作图法^[12],以pNPG为底物,测得 β -葡萄糖苷酶的 $K_m = 0.825 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\max} = 135.4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (图4)。

2.4 温度对酶稳定性及酶活性的影响

在pH5.0及不同温度下测定酶活力,实验表明其最适反应温度为55℃;将酶经不同的温度下分别处理10、20、40、60min后在pH5.0、50℃条件下测其残余活力,从图5可见,该酶的热稳定性较差,仅能在40℃保存20min而维持活力不变,在60℃仅

10 min 酶就基本失活了。此结果与其它大多数真菌的 β -葡萄糖苷酶的热稳定性类似^[13]。

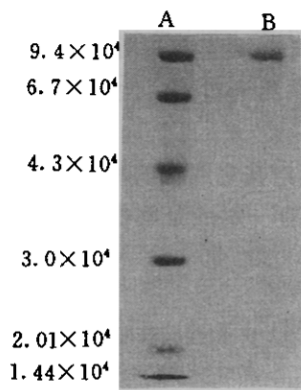


图3 β -葡萄糖苷酶的 SDS-PAGE 图谱

A. 分子量标准蛋白; B. β -葡萄糖苷酶样品。

Fig.3 SDS-PAGE pattern of β -glucosidase

A. Standard marker proteins;

B. β -glucosidase sample.

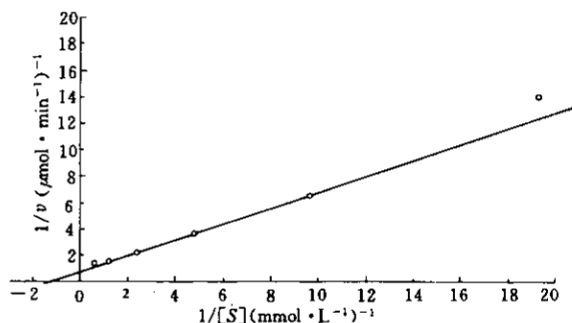


图4 β -葡萄糖苷酶的 Lineweaver-Burk 图

Fig.4 Lineweaver-Burk polts of β -glucosidase

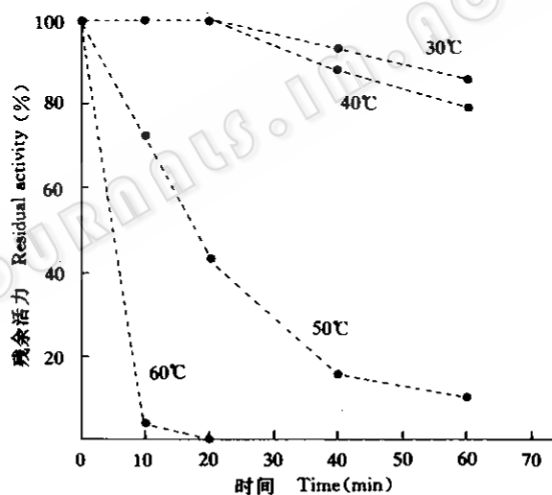


图5 温度对 β -葡萄糖苷酶稳定性的影响

Fig.5 Effect of temperature on the stability of β -glucosidase

2.5 pH 对酶活性及酶稳定性的影响

采用 0.05 mol 如下缓冲溶液: Na_2HPO_4 -柠檬酸 (pH2.2~8.0); Tris-HCl (pH7.5~8.9); 甘氨酸-NaOH (pH8.6~10.6) 配制底物溶液和酶液, 在 50℃ 不同 pH 的条件下测量酶活力, 结果表明其最适反应 pH 在 5.5 左右; 将酶在上述不同 pH 的缓冲液中 4℃ 保存 24h 后在 pH5.0、50℃ 条件下测量酶的剩余活力, 结果表明该 β -葡萄糖苷酶在 pH3.0~8.5 范围内稳定。

2.6 各种化学试剂对酶活力的影响

在反应体系中加入各种金属离子或抑制剂并调节其终浓度为 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。从表 2 可见, EDTA 对酶活力没有影响, 说明该酶不需要金属离子维持其活性; SDS 及 Hg^{2+} 和 Fe^{3+} 等对该酶有一定的抑制作用, 而其它被测定的金属离子对酶活性的影响不大。

2.7 酶的底物特异性

以 β -葡萄糖苷酶水解 $p\text{NPG}$ 的能力为标准, 计算其对其它底物的相对水解活力。从表 3 可见该酶对纤维二糖的水解能力最强, 对水杨苷也有一定的分解作用, 而对其它类型的糖苷及纤维素类物质没有或几乎没有酶解能力。

表2 各种化学试剂对 β -葡萄糖苷酶活力的影响

Table 2 Effects of various chemicals on the β -glucosidase activity

化学试剂 Chemicals ($1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	相对活力 Relative activity (%)
~	100
Mg^{2+}	103.2
EDTA	99.5
Zn^{2+}	99.0
Li^+	98.7
Na^{2+}	98.7
Ca^{2+}	95.4
Cu^{2+}	93.4
Ba^{2+}	93.0
Mn^{2+}	89.8
SDS	67.4
Fe^{3+}	60.3
Hg^{2+}	36.7

表3 β -葡萄糖苷酶的底物特异性

Table 3 Substrate specificity of β -glucosidase

底物 Substrate	相对活力 Relative activity (%)
对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 p -nitrophenyl- β -D-glucosidase	100
对硝基苯基- β -木糖苷 p -nitrophenyl- β -D-xylosidase	1.6
对硝基苯基- β -半乳糖苷 p -nitrophenyl- β -galactosidase	0
对硝基苯基- α -葡萄糖苷 p -nitrophenyl- α -glucosidase	0
纤维二糖Cellobiose	130
水杨苷Salicin	27
昆布多糖Laminarin	0
微晶纤维素Avicel	0
羧甲基纤维素	0
Carboxymethyl cellulose	

3 讨论

一般而言, β -葡萄糖苷酶被认为属于纤维素酶系, 其主要作用是将酶系中其它酶作用于底物产生的纤维二糖等水解成葡萄糖分子^[14]。根霉能在许多种纤维素类物质上生长, 正是由于它能产生包括 β -葡萄糖苷酶在内的多种纤维素酶类所致。

在 DEAE-Sephrose CL-6B 柱层析步骤中, 收集到二个酶活力峰, 其中酶峰 2 由于含有较多的杂蛋白, 未能将其最终纯化。用部分纯化的粗酶液进行的酶学性质比较结果表明, 这二个酶组分仅在分子量大小及对底物的最大反应速度方面有较明显的差异, 而其它酶学性质包括 K_m 值均十分类似(结果未列出), 说明该二个酶组分有可能是由同一个酶经蛋白酶修饰或异型糖基化等因素造成的^[15]。

参 考 文 献

- [1] Harper K A, Beattie B B, Pitt J I et al. *J Sci Food Agric*, 1972, 23: 311~320.
- [2] Steinkraus K H. *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. New York: Marcel Dekker, 1983. 1~94.
- [3] Elegado F B, Fujio Y. *J Fac Agric Kyushu Univ*, 1993, 37(3, 4): 315~324.
- [4] Elegado F B, Fujio Y. *J Gen Appl Microbio*, 1993, 39: 409~418.

- [5] Chortip L, Elegado F B, Fujio Y. *J Fac Agric Kyushu Univ*, 1993, 37(3, 4): 297~305.
- [6] Zheng Z, Elegado F B, Fujio Y. *Ann Reports ICBiotech Osaka Univ*, 1993, 16: 223~232.
- [7] Taj-Aldeen S. *Mycol Res*, 1993, 97(3): 318~320.
- [8] Siernberg D, vijayakumar P, Reese E T. *Can J Microbiol*, 1977, 23: 139~147.
- [9] Hartree E F. *Anal Biochem*, 1972, 48: 422~427.
- [10] Hames B D. *Gel Electrophoresis of Proteins*. Second Edition. England: Oxford University Press, 1990.1~149.
- [11] Andrews P. *Biochem J*, 1964, 91: 222~233.
- [12] Lineweaver H, Burk D. *J Am Chem Soc*, 1934, 56: 658~666.
- [13] Unno T, Ide K, Yazaki T et al. *Biotech Bioeng*, 1993, 26: 41~45.
- [14] Stockton B C, Mitchell D J, Grohmann K et al. *Biotechnol Lett*, 1991, 13(1): 57~62.
- [15] Hofer F, Weissinger E, Mischak H et al. *Biochem Biophys Acta*, 1989, 992: 298~306.

PURIFICATION AND SOME PROPERTISE OF EXTRACELLULAR β -GLUCOSIDASE FROM RHIZOPUS JAPONICUS IFO5318

Chen Xiangdong

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Yusaku Fujio

(Dept. of Food Science & Technology, Kyushu University, Japan 812)

Abstract The β -glucosidase from *Rhizopus japonicus* IFO5318 was purified by Ammonium sulfate salting out and column chromatographies with the recovery of 22%. The molecular weight of the enzyme was about 4.0×10^5 , consisting of four identical subunits; The optimum reaction temperature and pH for the β -glucosidase were 55°C and pH 5.5, respectively; While the enzyme was sensitive to heat, it could be stable at a wide range of pH. The K_m and V_{max} values of the enzyme were $0.825 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ and $135.4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively, using *p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside as a substrate. The β -glucosidase exhibited strongest hydrolysis effect on cellobiose and some of its activity could be inhibited by SDS, Fe^{3+} and Hg^{2+} .

Key words *Rhizopus japonicus*, β -glucosidase, Purification