

一种来源于青霉的新的 α -半乳糖苷酶的 分离纯化及其酶学性质

密士军 柏映国 孟 昆 王亚茹 姚 斌*

(中国农业科学院饲料研究所 北京 100081)

摘 要 从丝状真菌中筛选到一株产 α -半乳糖苷酶的菌株 F63,对该菌株进行了形态观察和 18S rDNA 序列分析,该菌株属于青霉属。采用硫酸铵沉淀、阴离子交换层析和分子筛层析等方法分离纯化了该菌株的一种 α -半乳糖苷酶。经过聚丙烯酰胺凝胶电泳,此酶蛋白的分子量约为 82kDa。该 α -半乳糖苷酶反应的最适 pH 为 5.0,最适温度为 45℃。此 α -半乳糖苷酶的热稳定性在 40℃ 以下,pH 稳定性为 pH5.0-6.0。与已报道的 α -半乳糖苷酶的活性都受到 Ag^+ 的强烈抑制不同的是,该 α -半乳糖苷酶受 Ag^+ 的抑制作用不显著。以 pNPG 为底物的 K_m 值为 1.4mmol/L 和 $V_{max} = 1.556\text{mmol/L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。该酶可以有效降解蜜二糖、棉子糖和水苏糖,但不能降解末端含 α -半乳糖苷键的多糖。通过利用质谱技术对纯化的 α -半乳糖苷酶进行鉴定以及内肽的 N 端测序证明该蛋白为一种新的 α -半乳糖苷酶。

关键词: 丝状真菌,青霉, α -半乳糖苷酶,纯化,酶学性质

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0156-05

α -半乳糖苷酶(α -galactosidase, EC3.2.1.22)即蜜二糖酶,属于外切糖苷酶类,能够专一性催化糖链非还原末端 α -半乳糖苷键的水解,它不仅能够水解含 α -半乳糖苷键的寡糖,例如蜜二糖、棉子糖、水苏糖、毛蕊花糖等,而且还能够水解含该键的多糖,如 α -半乳甘露聚糖等。

α -半乳糖苷是一类存在于豆类植物中的碳水化合物,它们是由一个或数个半乳糖残基与蔗糖中的葡萄糖组分以 α -1,6 糖苷键的形式连接而成,主要包括棉子糖、水苏糖和毛蕊花糖等。这些寡糖是一类抗营养因子,不能被单胃动物消化道内的内源酶降解,只有经过肠道内的产气微生物发酵后才能被利用,从而引起胀气等疾病,降低了动物对营养物质的消化与吸收。在豆类饲料中添加 α -半乳糖苷酶,可以提高豆类饲料的利用率和动物的生长性能^[1,2]。此外, α -半乳糖苷酶还广泛的应用于制糖、食品和医疗卫生行业^[3-5]。

α -半乳糖苷酶广泛存在于微生物、植物、动物和人体内。目前,微生物来源的 α -半乳糖苷酶研究的比较深入。特别是丝状真菌 α -半乳糖苷酶由于其合适的 pH、良好的稳定性、细胞外分泌和表达量较高的特点而成为研究的热点。黑曲霉、木霉、青霉、被孢霉等的 α -半乳糖苷酶已经被分离纯化,性质也进行了鉴定^[6-9]。

本文从本实验室分离的丝状真菌中筛选到一个产 α -半乳糖苷酶的青霉菌株,分离纯化了它的一个 α -半乳糖苷酶并对其酶学性质进行了研究,旨在为 α -半乳糖苷酶在饲料与食

品中的应用及分子生物学研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 本实验室从土壤中分离的 26 株丝状真菌。

1.1.2 试剂和仪器 酵母粉(Yeast extract)为英国 Oxoid 公司产品,pNPG(p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside)蜜二糖、棉子糖、水苏糖、角豆胶和牛血清白蛋白为美国 Sigma 公司产品;其余试剂为国产分析纯。立式冷冻离心机购自 Sorvall 公司;蛋白电泳仪、AKTA FPLC 蛋白纯化系统均购自 Amersham pharmacia biotech 公司,超滤膜包购自 Sartorius 公司。

1.1.3 培养基和培养条件 ①马铃薯汁培养基:20% 马铃薯汁,1% 葡萄糖,2% 琼脂,pH6.8。②产酶培养基:4% K_2HPO_4 ,0.28% $(NH_4)_2SO_4$,0.12% $CaCl_2$,0.12% Urea,0.12% $MgSO_4$,0.02% Mannanose,0.02% Yeast extract,3% 的豆粕作为碳源和诱导物。挑取 1 环丝状真菌接种于产酶培养基中,30℃、250 r/min 振荡培养 7d。

1.2 PCR 扩增

1.2.1 丝状真菌 DNA 的制备 取 30℃ 培养 6~7d 后的菌液 6000r/min 离心 10min。取 100mg 菌丝体加 500 μ L 无菌水清洗,离心取沉淀。沉淀重悬于 500 μ L 提取液(50mmol/L Tris-HCl pH8.0,150mmol/L NaCl,100mmol/L EDTA pH8.0)中,混匀,加入 5.0 μ L 10% SDS,于 60℃ 温育 45~60min,10000r/min

基金项目: 国家“863 计划”(2003AA214030);国际科技合作重点项目(2004DFA060800)

* 通讯作者。Tel: 86-10-68975126;Fax: 86-10-68975127;E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

作者简介: 密士军(1975-),男,山东人,博士研究生,研究方向为酶的分子生物学与基因工程。E-mail: shijun_mi@163.com

其他作者: 史秀云,黄火清,张宇宏,石鹏君

收稿日期: 2006-03-24;接受日期: 2006-04-17;修回日期: 2006-04-24

离心 10min 去沉淀。上清液用等体积酚、酚:氯仿、氯仿依次抽提。取上层溶液加 0.6 ~ 1 倍体积的异丙醇常温沉淀 10min。12000r/min 离心 15min。沉淀用 70% 乙醇清洗,稍离心,将沉淀烘干后用 30 μ L 无菌水溶解,备用。

1.2.2 PCR 引物的设计:从 GenBank 中选取黑曲霉、木霉、青霉、根霉等 18S rDNA 序列,用 Vector NTI 7.1 软件进行序列比对,选取合适的保守序列作为引物,对各菌株的 DNA 进行扩增。引物(正向引物 Pfl:5'-CGGAGARGMGCMGTGAGA-3' 和反向引物 P12:5'-GGGCATMACDGCCTGT-3')由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.2.3 扩增体系和程序:分别以各丝状真菌 DNA 为模板,利用设计好的引物进行 PCR 扩增。扩增反应条件:94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 30s 55 $^{\circ}$ C 30s 72 $^{\circ}$ C 1.5min, 30 个循环 72 $^{\circ}$ C 10min。扩增后产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段进行测序。

1.2.4 序列比对与系统发育树图的构建:测序后的序列与 NCBI 数据库中的核苷酸序列进行比对。系统发育树图的构建利用 Mega 3.1 软件完成^[10]。菌株 F63 的 18S rDNA 序列已存放在 GenBank 核苷酸序列数据库中,存取号是 DQ499658。并将该菌株保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心,菌株保藏号为 CGMCC1669。

1.3 酶活力测定

酶活力测定方法采用 pNPG 法^[11],略有修改。将 pNPG 溶于 pH5.0、0.1mol/L McIlvaine 缓冲液中,使其终浓度为 20mmol/L。将 10 μ L 酶液,90 μ L 的 McIlvaine 缓冲液和 100 μ L 20mmol/L 的 pNPG 混合,摇匀。37 $^{\circ}$ C 温育 5min 后,加入 2.8mL 1mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液终止反应。在 405nm 下测其 OD 值,以对硝基酚的生成量表示酶活力。一个酶活单位(U)定义为每分钟分解 pNPG 释放 1 μ mol 对硝基酚所需的酶量。

1.4 蛋白质浓度和分子量的测定

采用 Lowry 法^[12],以牛血清白蛋白为标准测定蛋白质浓

度。采用 Laemmli 法^[13]进行 SDS-PAGE 测定蛋白质分子量。

1.5 酶分离纯化

1.5.1 离子交换层析:培养物离心取上清,用 20% ~ 95% 的饱和硫酸铵沉淀过夜。然后 5000r/min 离心 10min,用适量的 20mmol/L, pH 8.0 Tris/HCl 缓冲液(buffer A)溶解,透析过夜。将透析后的粗酶液用 30kDa 的膜包浓缩并更换成缓冲液 A。取 2.0mL 浓缩液上预先用缓冲液 A 平衡的 HiTrap Q Sepharose XL 阴离子柱(预装柱),然后用相同缓冲液配置的 1mol/L NaCl 溶液和缓冲液 A 进行梯度洗脱,流速为 2.0mL/min,分部收集,每管 1mL。对收集管中的溶液进行酶活和蛋白浓度测定。

1.5.2 凝胶过滤层析:经离子交换层析后得到的样品浓缩后进行 Sephacryl S-200 分子筛层析(1.0cm \times 120cm),用缓冲液 A 洗脱,流速为 0.5mL/min,分部收集,每管 0.5mL。对收集管中的溶液进行酶活和蛋白浓度测定。

1.6 纯化蛋白的质谱鉴定与内肽序列的测定

将含有纯化蛋白的 SDS-PAGE 胶送中国军事医学科学院国家生物医学分析中心进行胰蛋白酶酶解后的 MALDI-TOF-MS 分析与内肽 N 端序列的 ESI-MS/MS 测定。

1.7 底物特异性的测定

将蜜二糖、棉子糖、水苏糖和角豆胶溶解于 0.1mol/L McIlvaine 缓冲液(pH5.0)中,蜜二糖、棉子糖、水苏糖浓度各 1mg/mL,角豆胶为 3mg/mL。纯化的 2U 的 α -半乳糖苷酶分别与 1mL 这些底物在 40 $^{\circ}$ C 下作用 24h。半乳糖的释放用离子交换色谱仪 CARBOPAC PA10(Dionex Corporation, USA)测定。

2 结果与分析

2.1 产 α -半乳糖苷酶的菌株 F63 的形态观察

将 26 株丝状真菌接种到产酶培养基中,以豆粕作为诱导物诱导 7d 后,离心取其培养基上清液,于 37 $^{\circ}$ C 测定 α -半乳糖苷酶活性。分离出 5 株产 α -半乳糖苷酶的菌株,其中 F63 的 α -半乳糖苷酶活性最高,达到 1.84U/mL。F63 在马铃薯汁

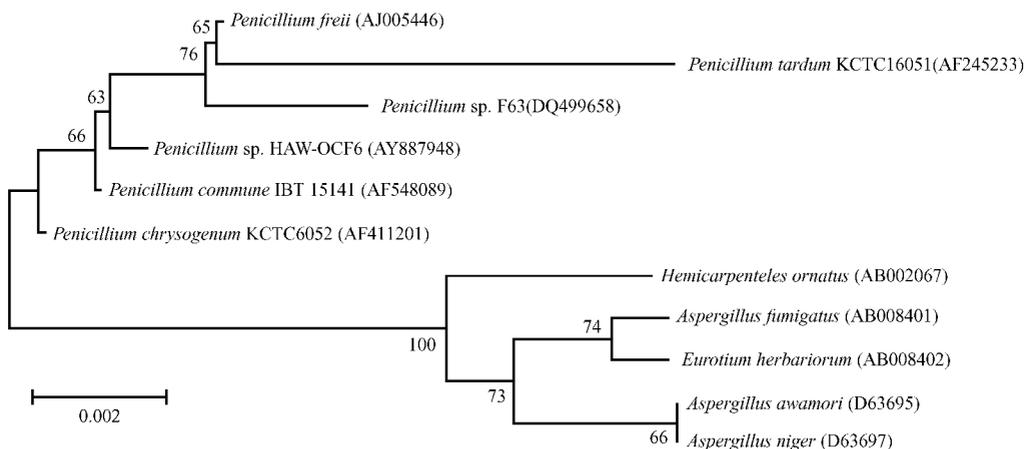


图 1 菌株 F63 的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic relationship between strain F63 with other fungi based on the 18S rDNA sequences. The values at the nodes represent percent of bootstrap confidence levels based on 1000 resamplings. Bar, 0.2% sequence divergence. In the brackets after each fungal name are the 18S rDNA accession numbers in GenBank Databases.

斜面培养基上生长两天后可以看到青绿色的分生孢子。通过镜检观察,该菌株是由菌丝体构成。菌丝是由有隔多核的多细胞构成,顶端生有扫帚状的分生孢子头。

2.2 产 α -半乳糖苷酶的菌株 F63 的分子鉴定

根据丝状真菌 18S 的保守序列设计的引物对该菌株 F63 的 DNA 进行 PCR 扩增,得到 1.0 kb 的单一一条带,与预期大小基本一致。通过与 GenBank 数据库中的核苷酸序列比对,发现 F63-18S 的核苷酸序列与其它青霉的核苷酸序列有 99% 的

同源性。根据 18S rDNA 序列比对的结果做系统发育树图(图 1),菌株 F63 与所有的青霉菌株聚在一起。

2.3 来源于青霉的 α -半乳糖苷酶的纯化

α -半乳糖苷酶的纯化结果见表 1。粗酶液经过 Sephacryl S200 FPLC 柱子后,经变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测为单一一条带,分子量约为 82kDa(图 2)。 α -半乳糖苷酶的纯化倍数为 11,活性回收率为 10.1%,所得的酶比活为 106.4 U/mL。

表 1 α -半乳糖苷酶的纯化

Table 1 Purification of the α -galactosidase from *Penicillium* sp F63

Purification step	Vol /mL	Total activity /U	Total protein /mg	Specific activity (U/mg)	Yield /%	Purification (fold)
Crude filtrate	1200	2208	230	9.6	100.00	1.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	80	1342	104.8	12.8	60.7	1.3
HiTrap Q Sepharose XL	7.5	784	11	71	35.5	7.4
Sephacryl S-200 HR	2	223	2.1	106.4	10.1	11

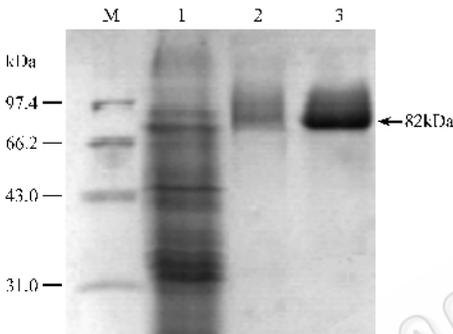


图 2 α -半乳糖苷酶的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the α -galactosidase. M. Standard protein molecular weight; 1. Culture supernatant; 2. α -galactosidase after anion exchange chromatography; 3. α -galactosidase after size chromatography.

2.4 纯化蛋白的内肽序列的测定

中国军事医学科学院国家生物医学分析中心对该蛋白进行了胰蛋白酶的酶解反应,通过 MALDI-TOF-MS 分析,得到的肽指纹图谱利用 Mascot 软件查询 NCBI 数据库,该蛋白没有匹配上任何已知的 α -半乳糖苷酶,与一个未命名的蛋白具有较高的匹配值。利用 ESI-MS/MS 技术测得了 4 段内肽的 N 端氨基酸序列,序列分别为:QSEGYTVSEFQYK,

表 2 测定肽段与其它真菌 α -半乳糖苷酶序列的同源性

Table 2 The sequence homology between the sequenced inner peptides and the corresponding peptides of other fungal α -galactosidases

The sequenced inner peptides	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
QSEGYTVSEFQYK	66%	66%	76%
VNPLVLTGDMWR	58%	75%	75%
LEGLDENALYK	0	0	0
PEVQDFLLK	0	0	0

The accession numbers of the amino acid sequences of the α -galactosidases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* and *Trichoderma reesei* are CAB63901, EAA58775 and CAA93245, respectively.

VNPLVLTGDMWR, LEGLDENALYK, PEVQDFLLK。测定肽段与其它真菌相应 α -半乳糖苷酶的序列同源性见表 2,其中 2 个肽段与已知的 α -半乳糖苷酶具有同源性,最高为木霉来源的 α -半乳糖苷酶,但也不超过 76%,而另 2 个肽段与已知的 α -半乳糖苷酶无任何同源性。4 个肽段与已知青霉的 α -半乳糖苷酶序列没有同源性。这些结果说明分离到的 α -半乳糖苷酶是一新酶。

2.5 α -半乳糖苷酶的酶学性质

2.5.1 α -半乳糖苷酶的最适作用温度及热稳定性 在上述标准反应系统中,于 10~60℃ 分别测定其酶活力。结果表明,该 α -半乳糖苷酶的最适作用温度为 45℃。将该酶在不同的温度(40℃、50℃和 60℃)下作用 60min,然后测定剩余酶活力。结果显示,该酶在 40℃ 下作用 1h 后可以保持 60% 以上的活性,该酶在 50℃ 下作用 5min,酶活性即完全丧失。因此该酶在 40℃ 以下时稳定的,对高温较敏感。

2.5.2 α -半乳糖苷酶的最适作用 pH 及 pH 稳定性 将酶液分别加入用 pH3.0~7.5 的 0.1mol/L 的 McIlvaine 缓冲液和 pH8.0~9.0 的 0.1mol/L 的 Tris/HCl 缓冲液配制的底物 pNPG 中,按上述方法测酶活力,结果表明该 α -半乳糖苷酶的最适作用 pH 为 5.0。该酶在 pH4.5~6.5 保持 85% 以上的相对酶活性。将酶在不同的缓冲液中常温作用 12h 后测其酶活,结果显示,该酶最稳定的 pH 范围为 5.0~6.0,室温下作用 12h,酶活力保持在 93% 以上。

2.5.3 α -半乳糖苷酶的反应动力学 以适量的 α -半乳糖苷酶和底物 pNPG,测定该酶的反应速度。利用双倒数(Lineweaver-Burk)作图法,以 S^{-1} 为横坐标,以 V^{-1} 为纵坐标,测得 $K_m = 1.4\text{mmol/L}$, $V_{\max} = 1.556\text{mmol/L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

2.5.4 金属离子及其它化学试剂对 α -半乳糖苷酶活性的影响 在酶反应体系中分别加入不同的金属离子和别的化学试剂,使其终浓度为 1.0mmol/L。表 3 显示,大多数的金属离子对 α -半乳糖苷酶的活性几乎没有影响, Cu^{2+} 和 SDS 对其酶活性抑制较严重,相对酶活分别为 19% 和 26.5%。 Hg^{2+} 完全

抑制 α -半乳糖苷酶的活性,可以推断带有巯基的氨基酸(如半胱氨酸)可能在其活性中心部位^[15]。值得注意的是,与已报道的 α -半乳糖苷酶的活性都受到 Ag^+ 的强烈抑制不同的是^[14, 15] 该 α -半乳糖苷酶受 Ag^+ 的抑制作用不显著(保持

88.7%的相对酶活力),说明该酶中具有羧基的氨基酸或组氨酸可能不在此酶的活性中心部位^[15]。该酶活性中心部位的氨基酸构成与其它 α -半乳糖苷酶是不同的。

表 3 各种金属离子和化学试剂对 α -半乳糖苷酶活性的影响

Table 3 Effect of various metal ions and chemicals on the α -galactosidase activity

Metal ions and other chemical reagents	CK	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Li ⁺	Co ⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Mg ²⁺	Fe ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Ag ⁺	Hg ²⁺	EDTA	SDS
Relative activity/%	100	104	94.9	93.1	98.4	94.4	86.2	97.9	19	97.1	66.1	61.3	92.6	88.7	0	104	26.5

2.5.5 α -半乳糖苷酶的底物特异性:该 α -半乳糖苷酶可以降解蜜二糖、棉子糖和水苏糖,而不能将降解多糖类的角豆胶。降解 α -半乳糖苷类的寡糖的顺序为:蜜二糖 > 棉子糖 > 水苏糖(表 4)。

表 4 α -半乳糖苷酶水解寡糖后半乳糖的释放量

Table 4 The release of galactose from galactose-containing oligosaccharides by the α -galactosidase

Substrate	The amount of the substrates /mg	The amount of galactose released /mg	D-Galactose released /%
Melibiose	1	0.425	80.7
Raffinose	1	0.204	67.5
Stachyose	1	0.420	64.8
Guar gum	3	0	0

3 讨论

在本实验中,用大豆粕作为诱导物,从 26 株丝状真菌中筛选出 5 株 α -半乳糖苷酶的菌株,其中以菌株 F63 的酶活力最高。为了确定 F63 的种属来源,我们对该菌株进行了形态观察与 18S rDNA 序列鉴定。初步鉴定该菌株属于青霉属。一般而言,两个菌株的同源性为 100% 时,可以确定该两个菌株为同一个种;当同源性小于 99% 时,可以初步确定为新种,如果试验菌株与亲缘关系最近的菌株的同源性在 99% 至 100% 之间时,它们之间的关系要视不同的情况而定^[16]。因此菌株 F63 的种名还不能仅仅根据形态学与分子生物学的方法来确定,详细的菌种鉴定还需要生理生化 and 化学分类等方法。

根据 α -半乳糖苷酶的分子量,可以把它们分成两类。一类 α -半乳糖苷酶的分子量大于 80kDa,另一类的分子量是在 53 ~ 67kDa 之间^[15]。一般情况下,细菌来源的 α -半乳糖苷酶属于第一类,而真菌来源的 α -半乳糖苷酶则属于第二类。但本实验分离纯化的真菌的 α -半乳糖苷酶的分子量大于 82kDa 属于第一类类型的 α -半乳糖苷酶。该 α -半乳糖苷酶的电泳谱带有“拖尾”现象,该现象很可能是由蛋白的糖基化造成的;“拖尾”的长度与该蛋白结合不同大小的碳水化合物有关。

单胃动物胃肠道的温度为 37 ~ 40℃,其 pH 为酸性。该

酶的最适作用温度为 45℃,在 37 ~ 40℃ 时保持 80% 左右的酶活性,该酶的最适作用 pH 为 5.0,在 pH4.2 ~ 5.0 之间保持 75% 以上的酶活性。此 α -半乳糖苷酶的最适作用条件与单胃动物肠道的生理条件基本一致,且该酶可以有效降解棉子糖和水苏糖,因此该 α -半乳糖苷酶可以用于降解豆类饲料中的 α -半乳糖苷类的寡糖,从而消除或降低这类寡糖的抗营养作用,提高豆类饲料的利用率,促进畜禽对营养物质的消化和吸收。另外,豆奶中含有的棉子糖类寡糖能够引起一部分人食用后,产生胀气等疾病,添加 α -半乳糖苷酶可以消除豆奶中的棉子糖类寡糖,从而增加豆奶的可食用人群。豆奶的自然 pH 为 5.0,与该 α -半乳糖苷酶的最适作用 pH 相同,因此该酶可用于豆奶加工。

该酶的最适温度低于已报道的青霉的 α -半乳糖苷酶,但其最适作用 pH 略高于其它青霉的 α -半乳糖苷酶^[17, 18]。 Ag^+ 对该酶的影响研究结果表明其酶活性中心部位的氨基酸构成与其它报道的 α -半乳糖苷酶可能是不同的^[14, 15], 这为进一步研究 α -半乳糖苷酶结构与功能的关系提供优良的材料。

利用肽指纹图谱鉴定纯化的 α -半乳糖苷酶,该蛋白没有匹配上任何已知的 α -半乳糖苷酶,说明该蛋白是一个新的 α -半乳糖苷酶。我们又通过质谱测其内肽的 N 端序列,得到的 4 段内肽序列,其中两段内肽序列与黑曲霉、构巢曲霉和木霉有 58% ~ 76% 的同源性,与已知青霉的 α -半乳糖苷酶序列没有同源性。并且没有找到与另外两段内肽同源的 α -半乳糖苷酶序列,这进一步证实了纯化的该蛋白为新的 α -半乳糖苷酶。根据内肽序列的信息,获得了此 α -半乳糖苷酶的基因组序列与 cDNA 序列,测序结果通过 BLAST 比较表明,该基因与已知的 α -半乳糖苷酶序列同源性最高仅为 66.7%,氨基酸序列同源性最高仅为 69.6%,该 α -半乳糖苷酶属于糖基水解酶的 36 家族(以上结果另文发表)。目前,从青霉中分离的 α -半乳糖苷酶都为糖基水解酶的 27 家族^[8, 17],这是首次报道从青霉中分离纯化出 36 家族的 α -半乳糖苷酶。以上这些结果表明,纯化的该蛋白是一个新的 α -半乳糖苷酶。

参 考 文 献

- [1] Ghazi S, Rooke JA, Galbraith H. Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease and α -galactosidase treatment in broiler cockerles and broiler chicks. *British Poultry Science*, 2003, **44**(3):
- © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [2] Igbasan FA, Guenter W, Slominski BA. The effect of pectinase and α -galactosidase supplementation on the nutritive value of peas for broiler chickens. *Can J Anim Sci*, 1997, **77**: 537 – 539.
- [3] Ganter C, Böck A, Buckel P, *et al.* Production of thermostable recombinant α -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. *J Biotechnol*, 1988, **8**: 301 – 310.
- [4] Prashanth SJ, Mulimani VH. Soy milk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* α -galactosidase immobilized in calcium alginate. *Process Biochemistry*, 2005, **40**: 1199 – 1205.
- [5] Lenny LL, Hurst R, Goldstein J, *et al.* Transfusions to group O subjects of 2 units of red cells enzymatically converted from group B to group O. *Transfusion*, 1994, **34**: 209 – 214.
- [6] Ademark P, Larsson M, Tjerneld F, *et al.* Multiple α -galactosidase from *Aspergillus niger*: Purification, characterization and substrate specificities. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, **29**: 441 – 448.
- [7] Zeilinger S, Kristufek D, Arisan-Atac I, *et al.* Conditions of formation, purification, and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 1347 – 1353.
- [8] Luonteri E, Alatalo E, Siika-aho M, *et al.* α -Galactosidase of *Penicillium simplicissimum*: production, purification and characterization of the gene encoding AGLI. *Biotechnol Appl Biochem*, 1998, **28**: 179 – 188.
- [9] Shibuya H, Kobayashi H, Sato T, *et al.* Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, **61**(4): 592 – 598.
- [10] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, **5**: 150 – 163.
- [11] Den Herder IF, Rosell AMM, Van Zuilten CM, *et al.* Cloning and expression of a member of *Aspergillus niger* gene family encoding α -galactosidase. *Mol Gen Genet*, 1992, **233**: 404 – 410.
- [12] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265 – 275.
- [13] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680 – 685.
- [14] Fridjonsson O, Watzlawick H, Gehweiler A, *et al.* Cloning of the gene encoding a novel thermostable α -galactosidase from *Thermus brockianus* ITI360. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 3955 – 3963.
- [15] Zapater IG, Ullah AH, Wodzinski RJ. Extracellular α -galactosidase (E. C. 3.2.1.22) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 purification and characterization. *Prep Biochem*, 1990, **20**: 263 – 296.
- [16] 邵铁娟, 孙 谧, 郑家声, 等. Bohaise-9145 海洋低温碱性脂肪酶研究. *微生物学报*, 2004, **44**(6): 789 – 793.
- [17] Shibuya H, Kobayashi H, Park GG, *et al.* Purification and some properties of α -galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**(12): 2333 – 2335.
- [18] 李孝辉, 竺莉红, 吴吉安, 等. 青霉 α -半乳糖苷酶的纯化及酶学性质的研究. *浙江农业学报*, 2003, **15**(2): 99 – 102.

Purification and characterization of a novel α -galactosidase from *Penicillium* sp. F63 CGMCC1669

MI Shi-jun, BAI Ying-guo, MENG Kun, WANG Ya-ru, YAO Bin*

(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: An α -galactosidase-producing fungus was screened out of 26 filamentous fungi isolated from soil by us. Phylogenetic analysis based on the alignment of 18S rDNA sequences, combined with the morphological identification, indicated that the strain F63 was a member of the genus *Penicillium*. The α -galactosidase from *Penicillium* sp. F63 was purified to apparent homogeneity by ammonium sulfate precipitation, ion-exchange and gel filtration chromatography. The molecular size of the purified enzyme is approximately 82kDa estimated by SDS-PAGE. The α -galactosidase has an optimum pH of 5.0 and an optimum temperature of 45°C. The enzyme is stable between pH5.0 and 6.0 below 40°C. The α -galactosidase activity is slightly inhibited by Ag^+ , which is dissimilar to other α -galactosidases. Kinetic studies of the α -galactosidase showed that the K_m and the V_{max} for pNPG are 1.4mmol/L and 1.556mmol/L. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively. The enzyme is able to degrade natural substrates such as melibiose, raffinose and stachyose but not galactose-containing polysaccharides. The α -galactosidase was identified by MALDI-TOF-MS and its inner peptides were sequenced by ESI-MS/MS. The results show that the α -galactosidase is a novel one.

Keywords: Filamentous fungi; *Penicillium* sp.; α -galactosidase; Purification; Enzymatic properties

Foundation items: National High Technology Research and Development Program of China(2003AA214030); Key International S&T Cooperation Projects of China(2004DFA060800).

* Corresponding author. Tel: 86-10-68975126; Fax: 86-10-68975127; E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

Other authors: SHI Xiu-yun, HUANG Huo-qing, ZHANG Yu-hong, SHI Peng-jun

Received: 24 March 2006/Accepted: 17 April 2006/Revised: 24 April 2006 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>