

热稳定酸性 β - 葡萄糖苷酶的分离纯化及其酶学性质

陈今朝¹, 王剑锋^{2,*}, 王慧超¹, 谭永忠¹

(1. 长江师范学院生命科学与技术学院, 重庆 408100; 2 东华理工大学生物系, 江西 抚州 344000)

摘要: 耐酸性黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* L. 的菌丝体破碎液依次经过乙醇沉淀、离子交换层析和凝胶过滤等步骤处理, 获得电泳纯的 β - 葡萄糖苷酶, SDS-PAGE 显示其分子质量为 125.7kD。 β - 葡萄糖苷酶水解对硝基苯 - β - D-吡喃葡萄糖苷的最适 pH 值为 3.0~4.0, 最适温度为 70℃, 表观米氏常数(K_m)值为 2.35mmol/L, 表观 k_{cat}/K_m 值为 $2.99 \times 10^4 \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$; 水解京尼平苷、水杨苷的表观 k_{cat}/K_m 值分别是 1.26×10^4 、 $1.37 \times 10^4 \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$; 水解活性受 Mn^{2+} 的显著激活和 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等离子的微弱抑制。该酶活性在 pH2.0~8.3 保持稳定; 酶在 65℃ 时保温 60min, 残余酶活达到了 85%, 是一种热稳定酸性 β - 葡萄糖苷酶。

关键词: 胞内酶; 乙醇沉淀; 对硝基苯 - β - D-吡喃葡萄糖苷; 京尼平苷; β - 葡萄糖苷酶

Purification and Characterization of Thermostable Acidic β -Glucosidase from *Aspergillus niger* L.

CHEN Jin-zhao¹, WANG Jian-feng^{2,*}, WANG Hui-chao¹, TAN Yong-zhong¹

(1. Life Science and Technology Institute, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China;

2. Department of Biology, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000, China)

Abstract: In this study, an acidic β -glucosidase (BGL) was purified from acid-tolerant *Aspergillus niger* L. mycelia by ethanol precipitation, DEAE-Sepharose column chromatography and Sephadex G-100 column chromatography. SDS-PAGE showed that the molecular weight of the enzyme was 125.7 kD. Further characterization revealed that it had maximal hydrolytic activity on *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) at pH 3.0 — 4.0 and 70 °C with a K_m of 2.35 mmol/L and a k_{cat}/K_m of $2.99 \times 10^4 \text{mol/L} \cdot \text{s}$. The k_{cat}/K_m values for hydrolyzing geniposide and salicin were $1.26 \times 10^4 \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ and $1.37 \times 10^4 \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, respectively. The hydrolytic activity was activated obviously by Mn^{2+} but inhibited faintly by Fe^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} . The BGL was highly stable at pH 2.0 — 8.5, and 85% of its original activity could be maintained after 60 min of heat treatment at 65 °C. Thus, the enzyme was highly stable to heat.

Key words: intracellular enzyme; ethanol precipitation; *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside; genipin; β -glucosidase

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0205-05

β - 葡萄糖苷酶(β -glucosidase, BGL, EC 3.2.1.21)是纤维素完全酶解糖化的限速酶种^[1]; 具有水解和糖基转移活性, 底物专一性较差, 对多种糖苷类物质均有较强的催化活性^[2]。因而, BGL 在纤维素生物炼制和药食资源开发利用等领域具有广泛的应用价值, 如用于低聚龙胆糖的生产^[3]、红景天苷等糖苷类活性物质的酶法合成^[4-5]和转化天然产物中的糖苷类物质^[6], 从而改善和

提高果蔬茶的风味及中草药的药理活性。黑曲霉是常见的 BGL 产酶菌种, 也是食药生产领域公认的安全菌株。本实验室从霉烂的椴子果上分离到一株能水解京尼平苷的黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* L., 该菌株具有较强的耐酸性, 在培养基初始 pH1.5 时, 仍能正常产酶; 该菌株可以产生两种胞外酸性 BGL, 它们的最适反应 pH 值均为 2.5, 其他酶学性质也显著区别于他种菌株来源

收稿日期: 2011-06-03

基金项目: 重庆市科技攻关计划项目(CSTC, 2011AC1004)

作者简介: 陈今朝(1964 —), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为微生物工程。E-mail: chenjinzhao@126.com

* 通信作者: 王剑锋(1968 —), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为微生物工程。E-mail: wangjianfeng68@126.com

的 BGL^[7]。本实验对 *Aspergillus niger* L. 菌丝进行了破碎抽提, 从中制备了一种电泳纯的 BGL, 并对其酶学性质进行了实验分析, 为进一步开发利用 *Aspergillus niger* L. 源 BGL 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

黑曲霉 *Aspergillus niger* L. 为实验室分离自霉变栀子果。

DEAE-Sephadex FF、Sephadex G-100 美国 Pharmacia 公司; 蛋白质分子量标准 上海生工生物工程技术服务有限公司; 考马斯亮蓝 R-250、聚乙二醇 20000(PEG-20000)、对硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)、3,5-二硝基水杨酸(DNS) 国药集团化学试剂有限公司; 其余化学试剂均为分析纯。

UV-1600 紫外-可见分光光度计 北京瑞利分析仪器有限公司; QT-2H 自动液相色谱分离层析仪(配有 N2000 色谱数据工作站) 上海琪特分析仪器有限公司; DYCZ-3 型电泳槽、DYY-4C 型电泳仪 北京六一仪器厂; GL-21MC 立式冷冻离心机 湘仪离心机仪器有限公司; JYD-900 超声波细胞破碎机 上海之信仪器有限公司。

1.2 BGL 的制备与分离

1.2.1 BGL 的制备

Aspergillus niger L. 孢子接种在豆渣培养基中 28℃、180r/min 培养 5d; 发酵醪液经丝网过滤收集菌丝体, 菌丝体用蒸馏水洗涤多次并压干水分, 然后将菌丝体分散在适量 pH8.0、100mmol/L Tris-HCl 缓冲液中进行超声破碎, 超声功率 800W、时间 20min、破碎 3s、暂停 3s, 后将菌丝破碎液于 12000r/min 离心 15min, 上清液即为粗酶液。

1.2.2 BGL 的分离

取一定体积冷藏粗酶液, 加入 1.25 倍体积 -20℃ 乙醇混匀, 冷冻离心得沉淀; 沉淀以少量 pH7.5、20mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液溶解, 上柱 DEAE-Sephadex FF、洗柱至基线平直, 用同样缓冲液配制的 0~0.4mol/L NaCl 溶液 400mL 线性梯度洗脱, 洗脱流速 90mL/h, 每 5.0mL 收集一管, 检测与 280nm 波长处光吸收峰相对应各管的酶活力和纯度。收集各管酶液于透析袋中并用 PEG-20000 包埋浓缩; 浓缩酶液进行凝胶过滤 Sephadex G-100, pH7.5、20mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液洗脱, 流速 10mL/h, 每 3.0mL 收集一管, 检测蛋白峰各管酶活力。

1.3 指标的测定

1.3.1 蛋白质浓度的测定

依据 Bradford 法^[8]测定蛋白质浓度。

1.3.2 SDS-PAGE^[9]

SDS-PAGE 条件: 浓缩胶 4%、分离胶 10%, 染色剂: 考马斯亮蓝 R-250。

1.3.3 BGL 活性的测定^[7]

采用 pNPG 法和 DNS 法分别测定 BGL 的活性。

1.3.4 酶的最适反应温度及热稳定性的测定

在不同温度下 pNPG 法测定酶活力, 以酶活力最高时的反应温度为最适反应温度; 酶液在不同温度下分别水浴保温 20、40、60min 后测定酶活力, 以未保温酶液的酶活力为 100%, 比较不同温度条件下的相对酶活力。

1.3.5 酶的最适反应 pH 值及 pH 值稳定性的测定

在不同 pH 值的缓冲液中按照 pNPG 法测定酶活力, 以酶活最高时的反应 pH 值为最适反应 pH 值; 将酶液用不同 pH 值的缓冲液同等倍数稀释, 25℃ 水浴保温 12h, 测定相对酶活力。

1.3.6 无机离子对酶活力的影响

在含待考察离子 10mmol/L 的酶促反应体系中以 pNPG 为底物测定酶活力, 以去离子水透析的酶液的酶活力为 100%。

1.3.7 酶促动力学参数测定

在 65℃、pH4.0、100mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液中酶液与不同浓度底物反应, 用 Lineweaver-Burk 作图法求出酶水解底物的米氏常数(K_m)、最大反应速率(V_{max}), 测定酶蛋白量计算酶的底物转换数(k_{cat})。

1.4 数据分析

采用统计软件 DPS v3.01 专业版, SSR 检验显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 *Aspergillus niger* L. 胞内 β -葡萄糖苷酶的分离与纯化

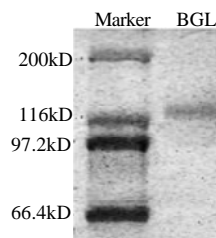


图1 β -葡萄糖苷酶的 SDS-PAGE 图谱
Fig.1 SDS-PAGE of BGL from *Aspergillus niger* L.

菌丝体经超声破碎抽提获得 BGL75.2U/g(以菌丝干质量计)。粗酶液分别用 PEG-6000(20mg/100mL)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

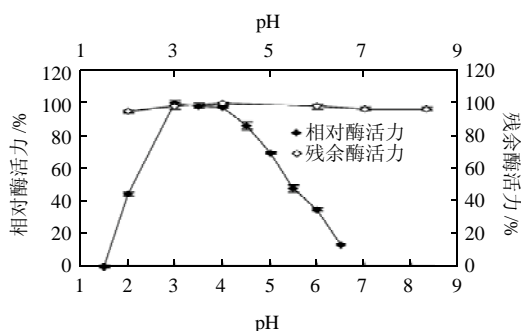
90% 饱和度沉淀浓缩, 酶活回收率分别为 14% 和 81%, 显示胞内 BGL 与胞外 BGL 在溶解性上存在显著差异。粗酶液依次经过乙醇沉淀、DEAE-Sephadex FF、Sephadex G-100 柱层析(表 1), 获得了电泳纯的 BGL, SDS-PAGE 图谱(图 1)显示 BGL 的分子质量为 125.7kD。

表 1 β -葡萄糖苷酶的分离纯化
Table 1 Purification of BGL from *Aspergillus niger* L.

纯化步骤	酶总活 力/U	蛋白质 量/mg	酶比活力/ (U/mg)	纯化 倍数	酶活回收 率/%
粗酶液	11.24	3.21	3.5	1.00	100
55% 乙醇沉淀	9.16	0.91	10.0	2.86	82
离子交换层析	4.04	0.32	12.9	3.69	36
DEAE-Sephadex FF					
凝胶过滤 Sephadex G-100	1.82	0.06	29.5	8.42	16

2.2 *Aspergillus niger* L.胞内 BGL 的酶学性质

2.2.1 pH 值对 BGL 活性及稳定性的影响



上方横坐标考察相对酶活力; 下方横坐标考察酶稳定性。

图 2 pH 值对 β -葡萄糖苷酶活性及稳定性的影响
Fig.2 Effect of pH on BGL activity

由图 2 可知, 在 pH 值 2.0~6.5 的范围内, BGL 对 pNPG 均有明显的水解活性, 其中 pH 值为 3.0~4.0 时, 酶的水解活性最高; 此外, 酶的水解活性随 pH 值变化而下降, pH 值由 3.0 下降至 2.0 时, 酶活下降了 66%, 而 pH 值由 4.0 上升至 5.0 时, 酶活下降了 30%, 说明在较低的 pH 值范围内, 酶活力对酸度的变化更明显。25℃ 保温 12h 后, BGL 残余酶活力在 pH2.0~8.3 的范围内稳定, 说明胞内 BGL 具有很好的 pH 值稳定性。

2.2.2 温度对 BGL 活性及稳定性的影响

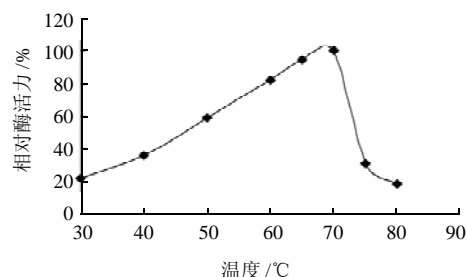


图 3 温度对 β -葡萄糖苷酶活性的影响
Fig.3 Effect of temperature on BGL activity

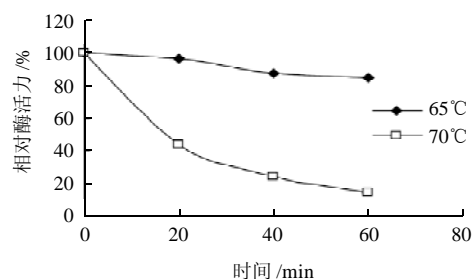


图 4 β -葡萄糖苷酶的热稳定性
Fig.4 Combined effects of temperature and incubation time on BGL stability

由图 3 可知, BGL 在 30~80℃ 均有水解活性, 最适作用温度为 70℃, 但反应温度高于 70℃ 时, 相对酶活力急剧下降, 80℃ 时的反应活性与 30℃ 时的活性相当。由图 4 可知, 在 65℃ 保温 60min, 相对酶活力为 85%, 而在 70℃ 保温 60min, 相对酶活力仅为 14%, 因此, 胞内 BGL 有较好的热稳定性。

2.2.3 金属离子对 BGL 活性的影响

由表 2 可知, BGL 水解 pNPG 的活性受不同金属离子(10mmol/L)的影响。Mn²⁺、Fe³⁺、Ba²⁺、Mg²⁺、Na⁺、Hg⁺ 等离子激活 BGL 水解活性, 其中以 Mn²⁺ 的作用最为显著; Cu²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺ 等抑制酶活性, Fe²⁺ 的抑制作用较明显; K⁺ 和 Ca²⁺ 对酶活性则无明显影响。

2.2.4 BGL 的底物特异性及催化效率

在 pH4.0、65℃ 的反应条件下, 依据 Lineweaver-Burk 作图法分别以 pNPG、京尼平苷、水杨苷为底物测定 BGL 的 K_m 、 k_{cat} (表 3)。依专一性常数 k_{cat}/K_m 可知, 胞

表 2 金属离子对 β -葡萄糖苷酶活性的影响
Table 2 Effects of inorganic ions on BGL activity as tested using pNPG as substrate

金属离子(10mmol/L)	H ₂ O	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Ba ²⁺	Cu ²⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Zn ²⁺	Mn ²⁺	Hg ⁺
相对酶活力/%	100 ^d	105 ^c	100 ^d	101 ^d	104 ^c	104 ^c	97 ^e	91 ^e	120 ^b	93 ^f	212 ^a	103 ^e

注: 肩标字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

内 BGL 水解 pNPG 的催化效率是京尼平苷、水杨苷的两倍多,而水解后两者的催化效率相当,因此, pNPG 是胞内 BGL 的最适底物;同时也说明 BGL 对 β -葡萄糖苷的苷元物质具有选择性。

表 3 β -葡萄糖苷酶的动力学参数Table 3 K_m and k_{cat} values of BGL for three specific substrates

底物	$K_m/(\text{mol} \cdot \text{L})$	k_{cat}/s^{-1}	$k_{cat}/K_m/(\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s}))$
京尼平苷	5.0×10^{-2}	630	1.26×10^4
水杨苷	3.1×10^{-2}	426	1.37×10^4
pNPG	2.35×10^{-3}	70	2.99×10^4

3 讨 论

微生物源 BGL 的分子质量、酶学性质因菌种、菌株不同而有较大差异,其适用范围也随之不同。BGL 的分子质量一般介于 40~250kD,多数在 70~138kD;最适反应 pH 值为 3.5~7.0,以 pH4.0~6.0 常见; pH 值稳定范围多在 pH4.0~8.0;最适反应温度常为 55℃,部分为 65~70℃;热稳定范围常小于 60℃^[1, 10-22]。*Aspergillus niger* L. 菌株内 BGL 的分子质量为 125.7kD,最适反应温度、pH 值分别为 70℃、3.0~4.0, pH 值稳定范围为 pH2.0~8.3, 65℃保温 60min, 相对酶活力保留 85%,除分子质量与 *Aspergillus niger* NL-1 胞内 BGL(122.7kD)^[14]接近外,最适反应温度、pH 值、pH 值稳定范围和热稳定温度均明显不同于后者(60℃、5.0、3.0~6.0、60℃),也区别于实验菌株产生的胞外 BGL(55℃、2.5、2.0~7.0, 55~60℃)^[7];因此,该酶是一种耐酸耐热的 BGL,它的分子质量和最适反应 pH 值与 *Penicillium pinophilum*^[11] *Penicillium purpurogenum*^[16]等来源的 BGL 相近,最适反应温度与 *Penicillium decumbens*^[1]、*Penicillium citrinum*^[19]、*Periconia* sp.^[20]、*Fomitopsis palustris*^[22]等来源的 BGL 相同,热稳定性优于 *Termitomyces clypeatus* 来源的 BGL(60℃保温 1h, 残余酶活 80%)^[13],而不及 *Periconia* sp. 来源的 BGL(70℃保温 1.5h, 残余酶活 60%)^[20]。

BGL 的水解专一性较差,能作用于所有的葡萄糖 β -二聚物;作用于 β -1,4、 β -1,1、 β -1,2、 β -1,3 和 β -1,6 连键;裂解 C—O 糖苷键、C—S 键、C—N 键和 C—F 键等;有些能水解 β -葡萄糖苷、 β -半乳糖苷,甚至木糖苷^[2]。实验菌株胞内 BGL 对邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷、对硝基苯- α -D-吡喃半乳糖苷无水解活性,区别于其胞外 BGL,说明该酶底物专一性高于胞外 BGL,对底物的糖苷键构型和糖基种类均具有选择性。底物专一性常数 k_{cat}/K_m 显示,该 BGL 对 pNPG、

水杨苷和京尼平苷等 β -D-吡喃葡萄糖苷均有催化活性, pNPG 是其天然底物,水解京尼平苷和水杨苷的催化效率相当且远低于 pNPG,表明胞内 BGL 的催化效率受底物分子中苷元结构的影响,而胞外两种 BGL 的天然底物是京尼平苷,其对京尼平苷的催化效率(k_{cat}/K_m 分别为 $4.28 \times 10^4 \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 和 $1.04 \times 10^5 \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$)^[7]也远高于胞内 BGL;并且胞内 BGL 对 pNPG 的催化效率高于未培养源 BGL1T^[12]和源于 *Penicillium citrinum* 的嗜酸热 BGL^[19]。胞内 BGL 的催化活性也受金属离子的明显影响,受 Mn^{2+} 的显著激活,受 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等的抑制,但受抑制强度显著弱于胞外 BGL1。

Aspergillus niger L. 菌株胞内 BGL 具有耐酸耐热、专一性较强、催化活性高且受金属离子影响小等特点,其酶学性质显著优于他种来源的 β -葡萄糖苷酶,适用于橙汁脱苦、中草药活性成分转化、纤维素酶解糖化等酸性高温的工业应用环境。

参考文献:

- [1] CHEN Mei, QIN Yuqi, LIU Ziyong, et al. Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 46(6): 444-449.
- [2] 孟宪文, 宋小红, 陈历俊, 等. β -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. *中国乳业*, 2009(10): 42-44.
- [3] 刘玲玲, 朱松, 朱婷, 等. 重组 β -葡萄糖苷酶生产龙胆低聚糖的工艺条件优化[J]. *微生物学报*, 2009, 49(5): 597-602.
- [4] 刘璘, 梅乐和, 柳行, 等. 酶催化制备 p -羟基苯乙基- β -D-葡萄糖苷过程强化[J]. *高校化学工程学报*, 2009, 23(1): 87-91.
- [5] 王梦亮, 李万丽. 固定化 β -葡萄糖苷酶催化合成红景天甙的研究[J]. *生物技术*, 2009, 19(1): 68-70.
- [6] 金凤燮, 庄子瑜, 鱼红冈, 等. 特异的中草药配糖体苷酶微生物及其发酵与酶学特性[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 1863-1870.
- [7] 王剑锋, 陈今朝, 梁华正, 等. 黑曲霉水解京尼平苷 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及其酶学性质[J]. *菌物学报*, 2010, 29(5): 683-690.
- [8] 李建武, 袁明秀. *生物化学实验原理和方法*[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 89-130.
- [9] 郭尧君. *蛋白质电泳实验技术*[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 161-191.
- [10] GAO Juan, ZHAO Xuesong, LIU Haibo, et al. A highly selective ginsenoside Rb₁-hydrolyzing β -D-glucosidase from *Cladosporium fulvum*[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(6): 897-903.
- [11] JOO A R, JEY A M, LEE K M, et al. Production and characterization of β -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(6): 851-858.
- [12] JIANG Chengjian, HAO Zhenyu, JIN Ke, et al. Identification of a metagenome-derived β -glucosidase from bioreactor contents[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 63(1/2): 11-16.
- [13] PAL S, BANIK S P, GHORAI S, et al. Purification and characterization of a thermostable intra-cellular β -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*[J]. *Bioresource*

- Technology, 2009, 101(7): 2412-2420.
- [14] 赵林果, 夏文静, 游丽金, 等. 黑曲霉胞内 β -葡萄糖苷酶分离提纯及其性质的研究[J]. 现代化工, 2008, 28(10): 38-42.
- [15] NAZ S, IKRAM N, RAJOKA M, et al. Enhanced production and characterization of a β -glucosidase from *Bacillus halodurans* expressed in *Escherichia coli*[J]. Biochemistry, 2010, 75(4): 513-518.
- [16] JEYA M, JOO A R, LEE K M, et al. Characterization of β -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(5): 1473-1484.
- [17] NASCIMENTO C V, SOUZA F H, MASUI D C, et al. Purification and biochemical properties of a glucose-stimulated β -D-glucosidase produced by *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse [J]. Journal of Microbiology, 2010, 48(1): 53-62.
- [18] SOUZA F H M, NASCIMENTO C V, ROSA J C, et al. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens* [J]. Process Biochemistry, 2010, 45(2): 272-278.
- [19] NG I S, LI Chenwei, CHAN Shuangpi, et al. High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(4): 1310-1317.
- [20] HARNPICHARNCHAI P, CHAMPREDA V, SORNLAKE W, et al. A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars[J]. Protein Expression and Purification, 2009, 67(2): 61-69.
- [21] KOROTKOVA O, SEMENOVA M, MOROZOVA V, et al. Isolation and properties of fungal β -glucosidases[J]. Biochemistry, 2009, 74(5): 569-577.
- [22] YOON J J, KIM K Y, CHA C J. Purification and characterization of thermostable β -glucosidase from the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on microcrystalline cellulose[J]. Journal of Microbiology, 2008, 46(1): 51-55.