

# 黑曲霉胞内 $\beta$ -葡萄糖苷酶 分离提纯及其性质的研究

赵林果, 夏文静, 游丽金, 王 平, 余世袁

(南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:** 采用丙酮沉淀、DEAE-Sephrose 阴离子交换层析、Sephacryl S-200 凝胶过滤、Phenyl Sepharose CL-4B 疏水层析等步骤, 从黑曲霉菌丝体中获得了一种凝胶电泳均一的胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 其单亚基相对分子质量为 122.7 k, 纯化倍数和得率分别为 7.2 和 19.3%。以纤维二糖为底物时, 该酶葡萄糖的抑制常数  $K_i$  为 0.19 mmol/L,  $K_m$  值和  $V_{max}$  分别为 2.99 mmol/L、1.49  $\mu$ mol/min。该酶最适反应温度 60 $^{\circ}$ C, 最适反应 pH 为 5.0; 在 60 $^{\circ}$ C 以下及 pH 3~6 范围内均能保持稳定。甲醇、乙醇、正丁醇、丙酮和乙酸乙酯等有机溶剂对胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶有很好的激活作用。

**关键词:**  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 胞内酶; 提纯; 黑曲霉

中图分类号: O629.8; TQ426.97

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2008)10-0038-03

## Study on purification and some properties of intracellular $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger*

ZHAO Lin-guo, XIA Wen-jing, YOU Li-jin, WANG Ping, YU Shi-yuan

(College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** A kind of intracellular  $\beta$ -glucosidases is purified to homogeneous  $\beta$ -glucosidase from an *Aspergillus niger* mycelia by the acetone precipitation, DEAE-Sephrose ion exchange chromatography, Sephacryl S-200 HR gel layer chromatography and Phenyl Sepharose CL-4B hydrophobic interaction chromatography. The final purification factor of 7.2 and yield of 19.3% are obtained. The enzyme single subunit molecular weight is about 122.7 kDa which is identified by SDS-PAGE. The  $K_i$ ,  $K_m$  and  $V_{max}$  values of the enzyme are 0.19 mmol/L, 2.99 mM/L and 1.49  $\mu$ mol/min, respectively, using cellobiose as a substrate. The optimum reaction temperature and pH for  $\beta$ -glucosidase are 60 $^{\circ}$ C and 5.0, respectively. The enzyme is stable in the pH value range of 3.0-6.0 and at the temperature up to 60 $^{\circ}$ C. Organic solvent such as methanol, ethanol, 1-butanol, acetone and acetoacetate have great effects on the activity of  $\beta$ -glucosidase.

**Key words:**  $\beta$ -glucosidase; intracellular enzyme; purification; *Aspergillus niger*

$\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -glucosidase), 又称为纤维二糖酶、龙胆二糖酶和苦杏仁苷酶。它是纤维素酶系中重要组分之一, 在纤维素的酶解过程中,  $\beta$ -葡萄糖苷酶作用于纤维素二糖生成葡萄糖<sup>[1]</sup>。此外  $\beta$ -葡萄糖苷酶可应用于催化葡萄糖发生转移反应和缩合反应合成功能性低聚糖<sup>[2-3]</sup>; 可应用于乳品工业中分解乳糖<sup>[4]</sup>; 可以作为风味酶应用于(果)酒、茶叶、果汁中起到增香作用<sup>[5]</sup>。另一方面, 黑曲霉是  $\beta$ -葡萄糖苷酶的高产安全菌株, 其分泌的  $\beta$ -葡萄糖苷酶种类不止一种<sup>[6]</sup>。笔者从一株黑曲霉菌丝体中分离纯化了一种能被有机溶剂激活、具有耐有机溶剂功能的  $\beta$ -葡萄糖苷酶。本文报道了该酶的分离纯化过程及其主要酶学特性。

## 1 实验部分

### 1.1 酶的制备

以黑曲霉 (*Aspergillus sp.* NL-1) 菌种 (南京林业大学微生物技术实验室保藏), 在适宜的条件下液态发酵制备发酵  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[7]</sup>。发酵液抽滤后收集菌丝体, 用蒸馏水洗涤 3~4 次后置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中 6 h 左右。解冻, 加入适量 50 mmol/L、pH=4.8 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液进行匀浆, 并在 40 $^{\circ}$ C 下提酶 1 h。抽滤后的液体经适当浓缩后即为本实验所用的胞内酶样品。

### 1.2 酶的分离纯化

在每升粗酶液中, 一边搅拌一边缓慢加入 1.5 L 的 -20 $^{\circ}$ C 丙酮, 4 $^{\circ}$ C 静置 4 h, 离心。沉淀于 30 $^{\circ}$ C 下真

空干燥除去大部分残留的丙酮后,溶于 pH 5.3、0.05 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲溶液溶解中。样品上样至 DEAE-Sephacryl 阴离子交换层析柱(2.5 cm × 60 cm)。经 50 mmol/L、pH 5.3 醋酸-醋酸钠缓冲溶液平衡至  $A_{280}$  恒定后,用 0~0.8 mol/L NaCl 进行梯度洗脱,流速为 2.0 mL/min。收集具有  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的组分,脱盐并浓缩至 1~2 mL,上样至已平衡好的 Sephacryl S-200 凝胶柱。用 50 mmol/L、pH 4.8 醋酸-醋酸钠缓冲溶液洗脱,洗脱速度为 0.5 mL/min。收集有活性的酶液。在酶液中加入 30% (固液比, g/mL) 的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 上样至含 30%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的 pH 7.0 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠平衡的 Phenyl Sepharose CL-4B 疏水层析柱(1.0 cm × 20 cm)。酶蛋白经 5 倍柱床体积、含 30%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的相同缓冲溶液洗脱至  $A_{280}$  恒定后,用 30%~0%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  进行梯度洗脱。流速为 1.2 mL/min。收集有活性的酶液,脱盐,浓缩。

### 1.3 测定方法

$\beta$ -葡萄糖苷酶活力的测定<sup>[8]</sup>:以对硝基苯酚- $\beta$ -D-葡萄糖苷(pNPG)为底物,测定波长为 400 nm。定义每分钟水解生成 1  $\mu\text{mol}$  对硝基苯酚所需要的酶量为一个酶活力单位。

可溶性蛋白质的测定采用 Bio-Rad 法<sup>[9]</sup>。

蛋白质纯度及亚基分子质量测定采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法<sup>[10]</sup>。聚丙烯酰胺凝胶含量为 12% (g/mL),标准蛋白为宝生物工程(大连)有限公司生产,其相对分子质量范围为 44.3 k~200 k。在凝胶成像仪上扫描并确定未知样品相对分子质量。

温度对酶活力的影响:分别在 20、30、40、50、60、70℃ 条件下测定酶活力,根据其酶活力的大小确定其酶的最适水解温度。

酶的热稳定性:将酶液分别置于 20、30、40、50、60、70℃ 下保温 30 min,然后迅速置于冰浴中,在

50℃ 下测定各样品的酶活力。

pH 对酶活力的影响:分别使用不同 pH 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液作为酶活测定中的缓冲溶液(终浓度均为 50 mmol/L),测定各样品的酶活力。根据其酶活力的大小确定酶的最适水解 pH。

酶在不同 pH 下的稳定性:将酶液置于不同 pH 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中,在 4℃ 冰箱中保存 24 h,然后将各酶液的 pH 调整到 4.8。在相同的条件下测定各样品的酶活力。

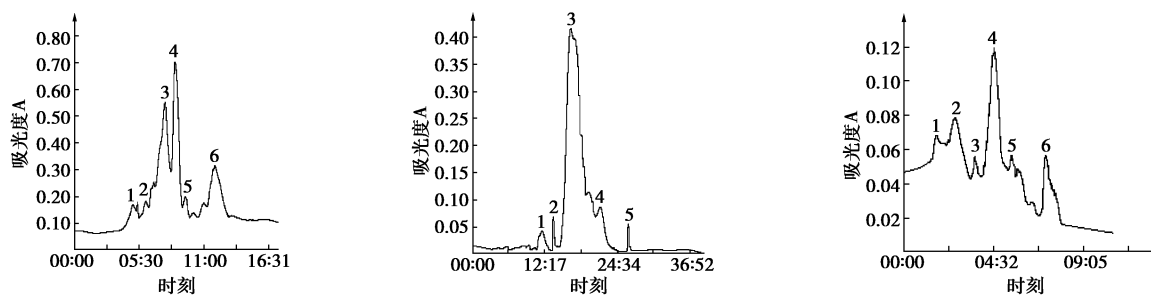
有机溶剂对酶活力的影响:在酶用量和底物(pNPG)浓度均相同的反应体系中,分别添加所实验的有机溶剂,使其最终体积分数分别达到 10%、20%、30%、40%,测定各样品的酶活力。以未加有机溶剂的酶活力为 100%。

酶的动力学<sup>[11]</sup>:以 3、4.5、6、7.5、9、10.5 mmol/L 纤维二糖为底物,取适量稀释后的酶液和 pH 4.8 的 50 mmol/L 柠檬酸缓冲溶液混合(反应体系总体积为 2 mL),置于 50℃ 下保温 30 min。终止反应后,采用葡萄糖氧化酶法测定产生的葡萄糖量。根据 Lineweaver-Burk 作图法计算  $K_m$  和  $V_{max}$ 。以 3.0、9.0 mmol/L 纤维二糖为底物,分别添加不同浓度的葡萄糖到酶反应体系中,测定各样品的酶活力。以反应速率的倒数为纵坐标,抑制剂葡萄糖的浓度为横坐标作图,两线交点的横坐标即为抑制常数  $K_i$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶的纯化

粗酶液经过丙酮沉淀后,上样至 DEAE-Sephacryl 阴离子交换层析柱。用 50 mmol/L、pH 5.3 醋酸-醋酸钠缓冲溶液平衡并用 0~0.8 mol/L NaCl 进行梯度洗脱。结果如图 1(a)所示,该步骤共分离得到 6 个蛋白峰,但仅有峰 3 含有  $\beta$ -葡萄糖苷酶,其他为杂蛋白峰。



(a) DEAE-Sephacryl 阴离子交换层析

(b) Sephacryl S-200 凝胶过滤层析

(c) Phenyl Sepharose CL-4B 疏水柱层析图谱

图 1 阴离子交换柱层析、凝胶过滤层析和疏水柱层析图谱

合并上一步分离得到的峰 3 各收集液,脱盐并浓缩后上样至已平衡好的 Sephacryl S-200 凝胶柱。洗脱后得到如图 1(b)所示的图谱。图中共有 5 个蛋白峰,经检测,峰 3 含有  $\beta$ -葡萄糖苷酶。

合并凝胶过滤层析后含有  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的峰 3 收集液,加入 30%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,上样至已经平衡好的 Phenyl Sepharose CL-4B 疏水层析柱。再次平衡后进行梯度洗脱,结果如图 1(c)所示。该步骤共分离得到 6 个蛋白峰,经检测峰 4 含有  $\beta$ -葡萄糖苷酶,且酶活力峰的峰形对称,并与蛋白峰完全吻合,而其他峰均不含  $\beta$ -葡萄糖苷酶。峰 4 的洗脱液用 SDS-PAGE 分析检测显示一条蛋白带,表明实验用的黑曲霉菌株产生的胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶通过上述步骤的纯化已达到电泳纯。纯化后的胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶相对于粗酶液纯化了 7.2 倍,酶的比活力由 2.6 U/mg 提高到 18.8 U/mg,酶活力回收率为 19.3%。

## 2.2 胞内 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶学性质

按照 Lineweaver-Burk 法,以纤维二糖为底物时,胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶  $K_m$  值和  $V_{max}$  分别为 2.99 mmol/L、1.49  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ;以 3.0、9.0 mmol/L 纤维二糖为底物,分别添加 5.00、2.50、1.25 mmol/L 的葡萄糖到混合反应体系中,结果显示葡萄糖的抑制常数  $K_i$  为 0.19 mmol/L。

许多酶在非水相中不会失活,可以用于有机合成或生物转化<sup>[12]</sup>,但不同反应介质,对酶的活性及酶选择性影响很大。“溶剂工程”就是通过改变反应介质来实现酶催化特性的改变。从表 1 可知,30% (体积分数) 以内的乙醇对酶活性有一定的促进作用,但添加量增大到 40% 就表现出对胞内  $\beta$ -葡萄糖苷有较弱的抑制作用。而添加 40% 以内的甲醇、乙酸乙酯、正丁醇、丙酮对酶的活性都有明显的激活作用。添加 30% 甲醇、乙酸乙酯时,它们的相对酶活力均达到最高,分别为 153% 和 162%。在添加

表 1 有机溶剂对胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的影响

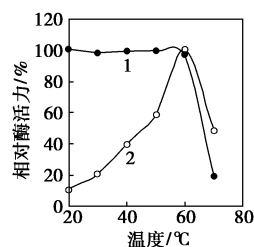
有机溶剂	有机溶剂体积分数/%			
	10	20	30	40
乙醇	103	120	110	78
甲醇	135	148	153	132
正丁醇	123	138	162	184
乙酸乙酯	108	129	148	120
丙酮	149	145	140	146

注:无有机溶剂时相对酶活设定为 100%。

浓度范围内,正丁醇、丙酮对胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶的激活作用随着添加浓度的增加而加强,在添加高达 40% 的正丁醇、丙酮时,相对酶活力分别达到 184% 和 146%。已有的研究表明,能被有机溶剂激活或具有耐有机溶剂的  $\beta$ -葡萄糖苷酶具有转糖基的功能<sup>[13]</sup>,所以纯化得到的该类  $\beta$ -葡萄糖苷酶在非水相的有机合成工业中也将具有较好应用前景。

### 2.2.1 胞内 $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适反应温度和温度稳定性

从图 2 可知,该酶最适反应温度为 60℃;在低于 60℃ 的条件下具有较好的热稳定性,当温度超过 60℃ 时,其活力迅速下降。

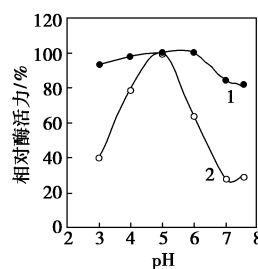


1—酶的热稳定性;2—酶反应的适宜温度

图 2 温度对胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性及稳定性的影响

### 2.2.2 胞内 $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性

从图 3 中可知该酶最适水解 pH 为 5.0;在 pH = 3~6 范围内均很稳定,当 pH > 6.0 时,酶的稳定性下降。



1—酶在不同 pH 时的稳定性;2—酶反应的适宜 pH

图 3 pH 对胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性及稳定性的影响

## 3 结语

采用有机溶剂沉淀、阴离子交换层析、凝胶过滤、疏水层析等,从黑曲霉菌丝体中获得了一种凝胶电泳均一的胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶,其单亚基相对分子质量为 122.7 k,并探讨了其酶学性质。该酶最适

(下转第 40 页)

## 1.2 试剂与仪器

二氯甲烷(DCM),经氯化钙回流干燥脱水,常压蒸出;胆固醇,生化试剂,天津市英博生化试剂公司;其他试剂为化学纯或分析纯,未经处理直接使用。

Bruker Tensor 307 型红外光谱仪;Bruker 300 MHz 核磁共振仪;Perkin-Elmer DSC-7 差示扫描量热仪;Olympus BX51 偏光显微镜;Linkam THMS 600 热台。

## 1.3 反应步骤

1,4-二(4-乙酰氨基苯-1-氧)丁烷(1)的合成参照文献[11]。1,4-二(4-氨基苯-1-氧)丁烷(2)的合成参照文献[11]。丁二酸胆固醇单酯(3)的合成按文献[12]进行。

### 1.3.1 丁二酸胆固醇单酯对醛基苯酯(4)的合成

1.948 g(4 mmol)丁二酸胆固醇单酯与 0.488 g(4 mmol)对羟基苯甲醛溶于 40 mL 新干燥的 DCM 中,搅拌下加入 0.824 g(4 mmol)二环己基碳二亚胺(DCC)和催化剂量的 4-二甲基氨基吡啶(DMAP),室温下反应 24 h,抽滤析出固体,滤液在减压下蒸干溶剂,用无水乙醇重结晶,室温下真空干燥,得到产物 1.733 g,产率 75%。红外光谱(FT-IR), $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 2 940,1 766,1 736,1 707,1 599,1 310,1 126,979,857,839。核磁共振氢谱( $^1\text{H-NMR}$ ), $\delta$ :9.99(1H, s),7.90(2H, t),7.26(2H, t),5.37(1H, s),4.65(1H, d),2.90(2H, t),2.73(2H, t),2.35~0.68(43H, broad)。

### 1.3.2 四液晶化合物(LC tetramer)的合成

0.591 g(1 mmol)丁二酸胆固醇单酯对醛基苯酯

(4)与 0.136 g(0.5 mmol)1,4-二(4-氨基苯-1-氧)丁烷(2)溶于 40 mL 无水乙醇中,加入约 10 mg 对甲苯磺酸催化剂,回流下反应 4 h,冷却后将沉淀过滤,再用无水乙醇洗涤数次,得白色固体粉末 0.58 g,产率为 82%。FT-IR, $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3 037,2 945,1 760,1 731,1 576,1 506,1 311,1 133,1 014,978,949,834。 $^1\text{H-NMR}$ , $\delta$ :8.46(2H, s),7.90(4H, d),7.22(8H, d),6.93(4H, d),5.39(2H, s),4.66(2H, d),4.08(4H, t),2.90(4H, t),2.73(4H, t),2.34(4H, d),2.04~0.68(86H, broad)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 目标化合物的合成

参照文献[11]对乙酰氨基苯酚和二溴丁烷反应得到 1,4-二(4-乙酰氨基苯-1-氧)丁烷(1),然后在碱性条件下水解得 1,4-二(4-氨基苯-1-氧)丁烷(2)。化合物 1、2 的熔点和红外光谱谱图与文献报道完全一致。丁二酸胆固醇单酯对醛基苯酯(4)由丁二酸胆固醇单酯(3)和对羟基苯甲醛缩合酯化反应得到。两个分子的丁二酸胆固醇单酯对醛基苯酯(4)和一个分子的 1,4-二(4-氨基苯-1-氧)丁烷(2)在酸性条件下缩合就得到由 2 个胆固醇基和 2 个席夫碱基团通过柔性间隔段连接而成的四液晶基元化合物,化合物 4 和四液晶基元化合物的化学结构经红外光谱和核磁共振氢谱分子证明是正确的。

(上接第 42 页)

反应温度 60℃,最适反应 pH 为 5.0;在 60℃ 以下及 pH=3~6 均能保持稳定。甲醇、乙醇、正丁醇、丙酮和乙酸乙酯等有机溶剂对胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶有很好的激活作用。该类  $\beta$ -葡萄糖苷酶在合成工业中将有很好的前景。

## 参考文献

- [1] Chaudhuri B K, Sahai V. Production of cellulase using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on lactose in batch culture[J]. Appl Microbiol Technol, 1993, 39: 194-196.
- [2] Yan T R, Liao J C. Synthesis of alkyl  $\beta$ -glucosides from cellobiose with *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase II [J]. Biotechnology Letters, 1998, 20(7): 653-657.
- [3] 邹辉,黎锡流,罗明姬.低聚龙胆糖的酶法生产技术[J].中国食品添加剂,2004(3):97-101.
- [4] Shin H J, Yang J W. Galactooligosaccharide synthesis from lactose by *Penicillium-Funiculosum* cellulase[J]. Biotechnology Letters, 1996, 18(2): 143-144.
- [5] Gueguen Y, Chemardin P, Janbon G, et al. A very efficient  $\beta$ -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44: 2336-2340.
- [6] Decker C H, Visser J, Schreier P.  $\beta$ -Glucosidases from five black *Aspergillus* species: Study of their physico-chemical and biocatalytic properties[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(10): 4929-4936.
- [7] 赵林果,周潭澈,孟鹏.  $\beta$ -葡萄糖苷酶产生菌的筛选及其所产纤维素酶系组成分析[J].工业微生物,2007,37(5):47-50.
- [8] 陈向东,藤尾雄策.日本根霉 IFO5318 胞外  $\beta$ -葡萄糖苷酶的纯化及部分特性[J].微生物学报,1997,37(5):368-373.
- [9] Bardford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [10] 汪家政.蛋白质技术手册[M].北京:科学技术出版社,2002:77-110.
- [11] 周晓云.酶学原理与酶工程[M].北京:中国轻工业出版社,2005:57-82.
- [12] Zaks A, Klibanov A M. Enzymatic catalysis in organic media at 100℃ [J]. Science, 1984, 224(4654): 1249-1251.
- [13] Takashi W, Toshie S, et al. Purification and properties of *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase[J]. Eue J Biochem, 1992, 209: 651-659. ■