

Trichodema reesei 纤维素水解酶的糖苷合成性质

张 玢, 余多慰

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

[摘要] 通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (从 *Trichodema reesei* 天然纤维素水解酶中分离纯化得到了一种相对分子质量约为 65 000 的蛋白组分. 分别以 pNP-Glu, pNP-Gal, oNP-Gal 和 Avicel 作为底物, 均检出该组分的水解活性. 此外该酶对 CMC-Na 有可被测出的弱活性. 以 pNP-Glu 为底物, 45℃ 时, 其水解酶性质的米氏常数 $K_m = 3.04 \text{ mg/ml}$, $V_{max} = 3.77 \mu\text{mol/m in}$. 用 DNS 法和对硝基苯酚法 (仅对含有对硝基酚结构的底物 pNP-Glu, pNP-Gal 和 oNP-Gal) 分别检测了在 180 m in 反应时段内产物还原糖和对硝基苯酚的含量变化, 结果显示在封闭的反应体系中有明显的可逆反应存在, 并出现了周期性振荡的特征, 有糖苷合成活性的表现, 水解产生还原糖和对硝基苯酚的量, 呈现出分别为 $25.43 \pm 8.34 \text{ m in}$ 和 $36.25 \pm 2.50 \text{ m in}$ 的含量增减振荡周期. 与此同时, 为了证实该酶糖苷合成活性的存在, 以葡萄糖作为底物与酶反应, 得到了 $7.00 \pm 4.83 \text{ m in}$ 的葡萄糖含量周期性波状振荡结果. 对底物为 pNP-Glu 反应 15 m in 后的产物作乙酰化处理 GC/MS 分析, 结果产物中有含二糖结构的产类型, 揭示了 this 水解酶的糖苷合成的特点. 这是首次从 *Trichodema reesei* 纤维素水解酶中分离得到了具有糖苷合成活性的酶.

[关键词] *Trichodema reesei*, 纤维素酶, 酶活, 糖苷合成, 可逆反应

[中图分类号] O657.3; Q55 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2007)02-0069-08

Glycoside Synthesis Ability of a Cellulase From *Trichodema reesei*

Zhang Bin Yu Duowei

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract By PAGE, an enzyme was purified from commercial Cellulase which was extracted by *Trichodema reesei*. The molecular mass of the purified enzyme was 65 000 estimated by SDS-PAGE. The purified enzyme had hydrolytic activities correlating with some substrates containing p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranoside (pNP-Glu), p-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside (pNP-Gal), o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside (oNP-Gal) and Avicel. The enzyme had weak activity which can be detected using CMC-Na as substrate. Its K_m was 3.04 mg/ml and V_{max} was $3.77 \mu\text{mol/m in}$, using pNP-Glu as substrate, at 45°C. DNS method and p-nitrophenol method (only for pNP-Glu, pNP-Gal and oNP-Gal as substrate) were used to analyze changes of quantity of reducing sugar and p-nitrophenol in 180 m in. The results confirmed that the reversible reactions characteristic of period oscillation have displayed in the close reaction system. The quantity change period time of reducing sugar and p-nitrophenol were $25.429 \pm 8.343 \text{ m in}$ and $36.25 \pm 2.5 \text{ m in}$, respectively. Using glucose as substrate, period undulate oscillation was detected also and the period time of which was $7.00 \pm 4.83 \text{ m in}$. The acetylated products were detected by GC/MS, using pNP-Glu as substrate with reaction time 15 m in. The result confirmed that the component existed containing disaccharide structure in the all reaction productions. It confirmed that the enzyme had characteristic of glycoside synthesis. It was firstly discovered that the enzyme possessed glycoside synthesis activity of Cellulase hydrolyase from *Trichodema reesei*.

Key words *Trichodema reesei*; Cellulase; enzyme activity; glycoside synthesis; reversible reaction

收稿日期: 2006-10-20 修回日期: 2006-11-22

基金项目: 江苏省高校自然科学基金 (03KJB180064) 资助项目.

作者简介: 张 玢 (1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事分子生物学的学习与研究. E-mail: iespring@hotmail.com

通讯联系人: 余多慰 (1954-), 教授, 主要从事分子生物学的教学与研究. E-mail: yuduowei@njnu.edu.cn

0 引言

Trichoderma reesei (瑞氏木霉) 能产生降解纤维素与半纤维素的完全酶系, 共 8 种不同的纤维素酶, 分别属于 7 种不同的族群 (CBH I, CBH II, EGI, EGII, EGIII, EGV, BGLI, BGLII)^[1], 由于成分比较复杂, 分离纯化甚为困难, 目前主要是利用基因工程的方法对纤维素酶的基因进行克隆, 通过蛋白质工程的方法对纤维素酶分子的结构和功能进行研究^[2].

虽然可以通过大肠杆菌或酵母菌的表达得到单一的纤维素酶蛋白, 但是并未有文献报道能保证所得到的酶蛋白依然维持与天然酶完全等同的构象. 为了得到具有天然构象并保持活性的酶蛋白, 将来源于 *T. reesei* 的纤维素酶制品经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离纯化, 图谱上呈现 5 个能明显分开的天然蛋白质区带, 对其中一个相对分子质量约为 65 000 的蛋白进行回收并做了研究和分析, 发现这个蛋白可归属为 CBHI, 并且该蛋白除有水解酶的活性, 同时还具有糖苷合成活性. 目前, 对 *T. reesei* 纤维素酶的基础研究和应用研究已经相当的广泛, 但缺乏其糖苷合成活性研究的报道, 本文的研究为将此酶改造, 以用于糖苷合成提供了新的思路, 也为酶法制备批量糖苷化合物提供前期研究基础.

1 材料与方法

1.1 材料

T. reesei 纤维素酶 (Cellulase of *Trichoderma reesei* > 30 U/mg), 购自 Sanland 公司和 Sunshine 公司; 对硝基酚-β-葡萄糖苷 (pNP-Glu), 对硝基酚-β-半乳糖苷 (pNP-Gal), 均购自 Sigma 公司; 对硝基酚-β-半乳糖苷 (oNP-Gal), 购自 Amresco 公司; 中分子量蛋白质标准购自 Promega 公司; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na), 微晶纤维素 (Avicel), 购自南京试剂厂; 葡萄糖, 对硝基苯酚 (pNP), 冰醋酸, 醋酸钠, 吡啶, 盐酸羟胺, 乙酸酐均为国产分析纯.

1.2 制备电泳

采用 BIO-RED 公司 Mini PROTEAN 3 垂直电泳仪, 分离胶浓度 18%, 电泳 90 min, 仅得到 3 条可区分的蛋白质条带. 为了证实样品纯度, 改用 BD-RED 公司大型垂直电泳仪 PROTEAN II (样品迁移距离可达 18.3 cm), 分离胶浓度为 18%, 非变性 PAGE, 为获得高分离度的组分, 低压 (相当于 10 V/cm) 电泳 24 h, 切胶染色, 得到蛋白条带的准确位置信息后, 在未染色的胶上切下对应部分并碾碎, 加入蒸馏水将胶内的蛋白溶出, 离心, 得到蛋白溶液. 蛋白质标准品组成如下: 溶菌酶 (14 400)、碳酸酐酶 (31 000)、卵清蛋白 (42 700)、牛血清白蛋白 (66 200)、磷酸化酶 b (97 400).

1.3 酶活测定方法

(1) 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 比色法^[4]. 目前报道, 较灵敏的比色波长在 482~484 nm、520 nm 和 540 nm 等比色波长^[4], 通过从 480~540 nm 的连续波长扫描, 当吸收波长为 530 nm 时, 相同水平下所测吸光度 *A* 最大, 故本文采用 530 nm 为测定波长.

(2) 对硝基苯酚法^[5]. 配制不同浓度的 pNP 溶液 (分别为 0.005 0.01 0.02 0.04 0.06 0.08 0.1 0.12 mg/mL), 各取 100 μL, 加入 100 μL 1 mol/L Na₂CO₃ 溶液, 410 nm 波长下测定, 作 pNP-光密度标准曲线. 用 pNP-Gal, oNP-Gal 为底物测酶活力鲜有报道, 为获得可比性的数据, 实验条件与底物为 pNP-Glu, Avicel 和 CMC-Na 的实验条件相同^[4,5]. 蛋白浓度测定采用 Bradford 法^[6]. 本文中酶活定义为: 1 μg 酶 1 min 水解产生的还原糖量 (或 pNP 量) 为一个活力单位^[5].

1.4 pH 和时间对酶活的影响

(1) 配制不同 pH 浓度梯度的 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 (4.0 4.5 5.0 5.2 5.4 5.5 5.6 5.8 6.0 6.2), 底物分别为 pNP-Glu, pNP-Gal, oNP-Gal, Avicel 和 CMC-Na, 45°C, 反应 10 min, 用 DNS 法测酶活. (2) 在最适 pH 条件下, 以 pNP-Glu 为底物, 测定反应 2 4 6 8 10 12 14 16 20 25 min 的还原糖的生成量, 并由此确定测定 *A* 酶米氏常数实验时所采用的合适反应时间.

1.5 水解酶性质的动力学测定 (米氏常数的测定)

以 pNPG 作为酶反应底物, 配成浓度 $[S]$ 为 0.5 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 mg/mL, 在线性反应阶段时间内, 测定反应速度, 用 Lineweaver-Bulk 作图法求得 K_m , V_{max} .

1.6 GC分析中糖的衍生化

45℃下, 酶和底物反应 15 min后, 加入 Na_2CO_3 终止反应, 并立即加入盐酸羟胺 10 mg 吡啶 20 mL 振荡, 90℃水浴反应 30 min 取出冷却后加 2.0 mL 乙酸酐于 90℃水浴中酰化 30 min 得到的产物减压蒸干, 残渣加入 2 mL 氯仿溶解, 直接注入 GC 分析^[7].

1.7 GC/MS分析条件

色谱柱: Varian 公司 VF-5ms(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); 柱温/柱室初始温度 60℃, 以 15℃/min 升至 260℃, 保持 15 min. 进样器温度均为 250℃, 载气为氦气, 流速为 1.0 mL/min

MS 条件: EI 源, 检测器温度为 200℃, 离子化电势 70 eV, 测试时间 30 min^[8].

1.8 数据统计分析

用 EXCEL XP 做数据处理得到平均值、标准差, 以及一元线性回归方程. 按平均值 ± 标准差表示. 用 Mathematica 软件确定了周期中的最高点和最低点. 本文中各实验的重复次数都在 6 次以上, 每次实验都设 3 组平行样品.

2 结果与讨论

2.1 组分的分离纯化

从电泳图(图 1)上可以看到, 出现了 5 条能明显分开的蛋白质区带, 表明改用大型的垂直电泳槽, 保持较低电压, 通过延长电泳时间, 分离效果明显, 能够得到更高纯度的产品. 按电泳迁移率由大到小分别命名为 1~5 组分, 由于区带 4 的表达高, 为纤维素酶制剂中的主要成分, 本文中分析的目标为区带 4 经 SDS-PAGE 鉴定, 相对分子质量约为 65 000 以下简称为 A 酶. 通过对变性和非变性的 PAGE 图的比较(图 1), SDS-PAGE 获得的电泳区带谱型与非变性胶分离所得谱型一致, 表明所有蛋白组分均为单亚基构成. 泳道 1 和 2 中的纤维素酶制剂分别购于 Sanland 公司和 Sunshine 公司, 通过比较, 发现购得的酶制剂均为天然 *T. reesei* 纤维素酶制品, 因此由稳定的多酶体系成份组成.

2.2 pH 对酶活的影响

结果(图 2)可见, 底物分别为 pNP-Glu, pNP-Gal, oNP-Gal 和 Avicel 时, 最大酶活依次为 87.25、91.47、158.72 和 39.57 个活力单位, 另外底物为 CMC-Na 在 pH 5.5 时达到最大酶活 5.50 个活力单位. 这 5 种底物在 pH 为 5.5 时所测酶活力能达到最高, 故 pH 5.5 是此酶的最适 pH.

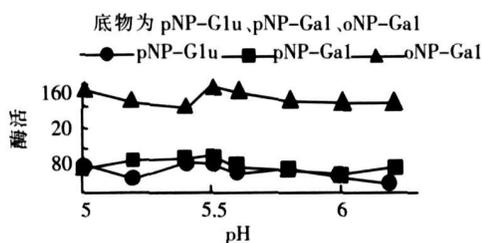
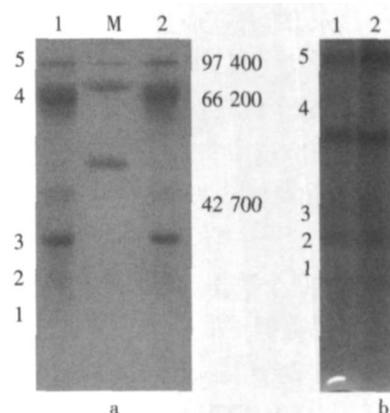


图 2 底物分别为 pNP-Glu、pNP-Gal、oNP-Gal 和 Avicel, pH 对酶活的影响

Fig.2 pH effect and substrate effect by pNP-Glu, pNP-Gal, oNP-Gal and Avicel

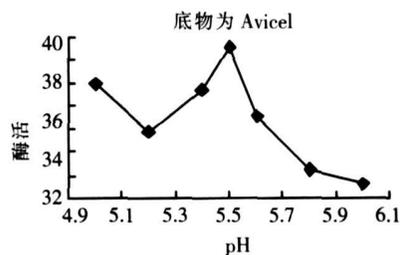
2.3 A 酶属性的分析

A 酶能作用底物 Avicel 排除了属于 EG 的可能性. A 酶又能对 pNP-Glu 等系列底物作用, 排除了属 CBH II 的可能, 属于 CBH I 或者 BGLI 的可能性较大^[9]. 因为 A 酶既能作用于 Avicel 又能与 pNP-Glu 反应, 以及测得此酶相对分子质量大小约为 65 000 根据文献^[9, 10]可以排除属于 BGLI 的可能性. 此外, 在整



实验条件: 大型垂直电泳仪样品迁移距离可达 18.3 cm, 低压(相当于 10 V/cm)电泳 24 h; 1: Sanland 公司样品; 2: Sunshine 公司样品; M: 蛋白 Marker

图 1 *T. reesei* 纤维素酶 SDS-PAGE (a) 和 PAGE (b)
Fig.1 PAGE analysis of both SDS(a) and nature(b) of the cellulase from *T.reesei*



个 *T. reesei* 诱导发酵过程中, 所产生的纤维素酶存在以 CBH 产量为主, 同时 β -葡萄糖苷酶活性偏低的现象^[11], 而 A 酶的 pNP-Glc pNP-Gal oNP-Gal 活力都比较高; 且相对分子质量低于 β -葡萄糖苷酶(相对分子质量一般大于 70 000^[9, 12]), 这也排除了其为 BGLI 的可能, 因此基本可以判断 A 酶属于 CBH I. 通常, 酶如果有 p-NPC 活性就可以鉴定此酶属于 CBH I^[13], 但是文献表明, 当 CBH I 的 p-NPC 活力为 $0.0368 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 时, CBH II 的 p-NPC 活力居然能够达到 $0.0457 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ^[14]. 而且, 指出纤维素水解酶作用于底物 p-NPC 时, 纤维二糖是主要的水解产物, 这会强烈抑制纤维素酶的水解作用^[15]. 所以本文没有将 p-NPC 作为 A 酶鉴定外切酶属性的反应底物.

大量文献报道, CMC 活力是用来表征内切酶活力的, 认为 CBH 对 CMC-Na 无酶活性^[9, 16]. 但是, 阎伯旭^[17]等指出, CMC 活力可以视为内切酶活力, 是因为 EG 的 CMC 比活力比 p-NPC 活力高几十倍, CBH 对 CMC-Na 的比活力在数值上比 p-NPC 的比活力低几倍. 这就表明对于外切酶来说能够检测出 CMC 活力. 对 CBH I 的全酶和活性中心的研究表明, CBH I 的 CMC 活力甚至能够达到 Avica 活力的 5~9 倍, 而 p-NPC 活力与 CMC 活力相比仅是其 1.38 倍^[18]. 另一方面, 有研究结果却显示, CBH I 的 p-NPC 活力只有 CMC 活力的 0.71^[14]. 由此可见, A 酶出现了 CMC 活性, 不能排除它属于 CBH 的范畴, 相反, 增加了 A 酶属于 CBH I 的可能性.

2.4 时间对酶活的影响

图 3 显示, 随着反应进行, 在初始 8 min 内, 还原糖生成量与时间呈直线关系, 因此, 确定 A 酶米氏常数实验为 8 min. 8 min 后还原糖生成量在明显的下降后又出现上升的现象. 为了更准确的研究反应与时间之间的关系, 通过加长反应时间, 用 DNS 方法和对硝基苯酚方法分别测定还原糖和 pNP 的生成量.

图 4 中, 10 个数据点仅 1 个数据点 (115 min) 的标准差覆盖区域与相邻数据点的标准差覆盖有少部分重叠; 图 5 中, 15 个数据点中有 2 个数据点 (115 min 和 150 min) 的标准差覆盖区域与相邻数据点有部分重叠. 两图各自仅有 1/10 和 2/15 的数据点与相邻数据点有部分标准差重叠, 86.7% 及以上的数据点都是相邻不相重叠的, 表明这种周期性振荡结果不属于实验测试误差, 是酶性质的真实反映. 图 4 中, 随着反应时间的加长, pNP 的生成量呈现在高点和低点之间规律振荡, 当升至高点(对各周期内的高点进行回归分析, 得到回归方程 $y = 0.0018x + 0.1043$) 时 pNP 的生成量会出现短暂的回落, 并降至低点(对每个周期内的低点进行回归分析, 即每个周期的起点, 回归方程 $y = 0.0018x + 0.0772$), 到达此点后又以接近线性的方式上升至下一个最高点.

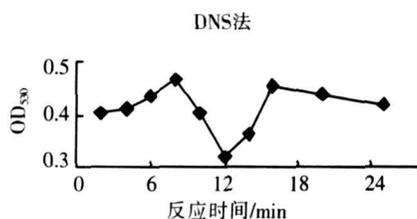


图 3 25 min 内还原糖生成量进程曲线
Fig.3 The quantity process curve of reducing sugar

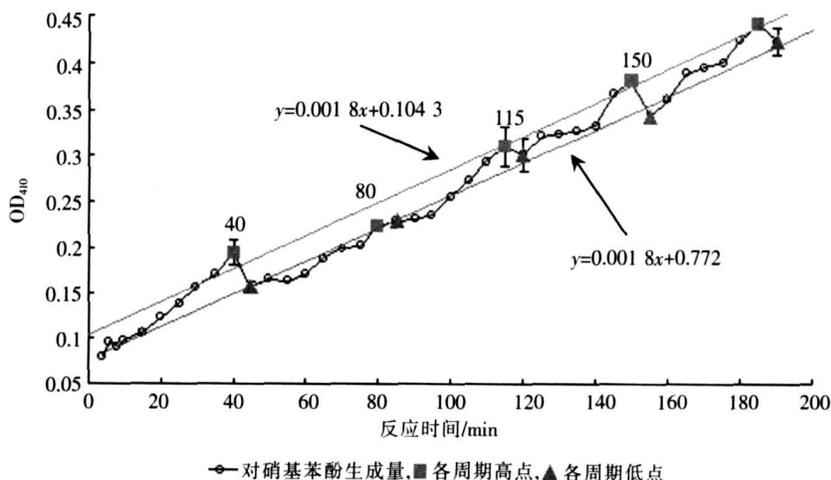


图 4 pNP 生成量进程曲线(对硝基苯酚法)
Fig.4 The quantity process curve of pNP (p-nitrophenol method)

由振荡现象考虑对其周期性的判定, 周期定义: 从第一次出现水解反应的产物生成量最高点到下一次出现水解反应的产物生成量最高点之间的时间为一个周期时间, 此周期为一个水解周期 (关于合成周期另有讨论). 通过 pNP 生成量的测定, 在 40 min 时 pNP 的含量为 0.343 mmol/L, 这是首次出现高点, 第一个低点出现在 45 min, 此时 pNP 含量为 0.283 mmol/L; 图 3 上最后一个周期中出现高点时间为 185 min, pNP 含量为 0.745 mmol/L, 190 min 时低点的 pNP 含量是 0.715 mmol/L. 经过统计分析, 在反应中 pNP 含量变化的一个周期时间为 36.25 ± 2.50 min.

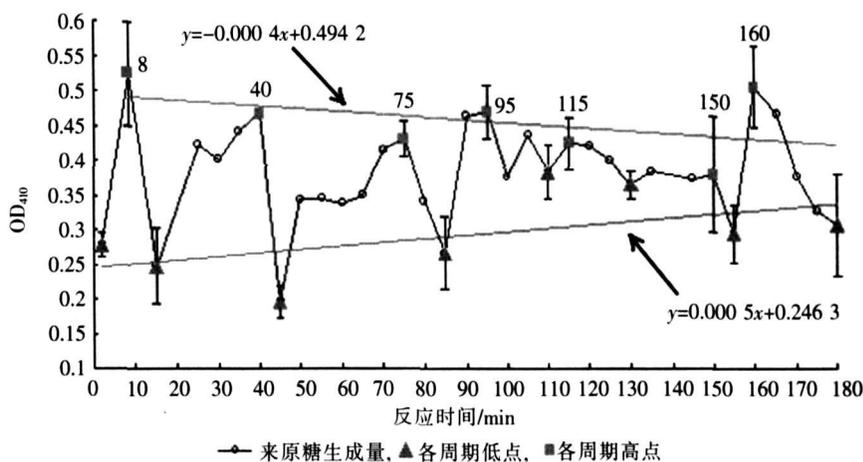


图 5 pNP-Glu 作为底物, 还原糖生成量进程曲线 (DNS 法)

Fig.5 The quantity process curve of reducing sugar, pNP-Glu as substrate (DNS method)

图 5 表示 180 min 内用 DNS 法测还原糖生成量与时间的关系, 与 pNP 生成量变化相类似的是, 还原糖生成量也是随着时间的延长有规律的在最大值和最小值之间上下波动, 但是又有明显的不同, 那就是还原糖的生成量基本维持在一定的水平上, 而不增加. 对于这两种曲线变化上的差异已经作了进一步的研究, 将在另文报道.

高培基等^[19]认为, 当还原糖量达到 2 mg/mL 时, 多数纤维素酶稀释率与还原糖生成的关系曲线已偏离线性范围. 在本实验中还原糖的生成量最大值只能到达 0.13 mg/mL 左右. 这是由于高培基等测定的是复杂酶系的反应产物, 有多种酶协同反应, 能更好的利用底物, 但本实验中只有一种酶对底物作用, 没有协同效应, 故产量不能达到文献报道的水平.

管斌等^[20]认为, 反应初期酶解速率较高; 随着反应进行, 酶促反应速率逐渐降低. 认为这是过渡区域的纤维素很快被酶解, 而结晶区域的纤维素难以被酶解, 因而造成后来的酶解速率大大降低. 由于文献 [20] 是将天然纤维素作为底物, 本实验中使用的是单一成分的小分子底物. 图 5 显示随着时间的延长, 不是酶活力有所下降, 而是酶的水解反应活性受到可逆反应的抑制, 还原糖的产量趋于稳定的波动反应中.

图 5 中, 还原糖的生成量也是在高点 and 低点之间振动 (各周期高点回归方程 $y = -0.0004x + 0.4942$, 各周期低点回归方程 $y = 0.0005x + 0.2463$). 不过从第一个周期的最高点 8 min 来看, 此时的还原糖量达到了 0.689 mmol/L, 最后一个高点 160 min 的还原糖量也达到了 0.674 mmol/L, 在 2 min 为出现最早的低点, 其还原糖量为 0.488 mmol/L, 最后一个周期的低点 180 min, 还原糖量为 0.511 mmol/L, 这两个周期中还原糖量的增加和减少大致相同.

在 8, 40, 75, 95, 115, 150, 160 min 出现了还原糖生成量的高点, 经计算得到周期时间为 25.43 ± 8.34 min. 图 4 中 pNP 含量高点出现在 40, 80, 115, 150 和 185 min, 可见在两图中几乎同时出现了产物的高点; 对硝基苯酚法测得的反应周期时间为 36.25 ± 2.50 min, DNS 法测得的反应周期为 25.43 ± 8.34 min, 也是相关联的. 因为还原糖和 pNP 是一个反应同时产生的两个产物, 相关联的周期说明了反应体系和 A 酶活性的相对稳定性.

水解反应的两个产物 pNP 和还原糖的浓度, 都出现了阶段性的相对高值, 这表明有水解产物抑制了水解反应继续的可能 (也有可能是水解反应速率低于合成反应速率).

2.5 酶的浓度效应

不同的 A 酶溶液浓度 (分别为 40.96 113.52 和 227.04 mg/mL), 100 min 内还原糖生成量变化趋势基本一致, 所得周期时间为 28.10 ± 4.84 min (由于实验中采取每 5 min 一个数据点, 所以标准差数值相对较大), 由此可以排除本实验结果是由于实验误差导致的可能性。

2.6 水解酶性质的动力学测定 (米氏常数的测定)

根据时间对酶活影响的实验, 确定反应时间 8 min 来测定 A 酶的水解酶性质的米氏常数. 由图 6 可知, A 酶的 $K_m = 3.04$ mg/mL, $V_{max} = 3.77 \mu\text{mol}/\text{min}$

2.7 A 酶糖苷合成性质的研究

糖苷酶的水解活性可将碳水化合物转化为单糖, 也可将非多糖糖苷化合物转化为苷元; 其水解的逆反应可合成各种寡糖、糖基化合物和糖蛋白^[21, 22]. 关于 *T. reesei* 纤维素水解酶 CBH I 的糖苷合成作用极少有报道。

2.7.1 葡萄糖作为底物

图 7 中, 24 个数据点有 6 个数据点 (低点为 10 25 45 95 160 和 170 min 若按高点分析则为 6 20 35 90 155 和 165 min) 的标准差覆盖区域与相邻数据点的标准差覆盖有部分重叠. 图中 75% 的数据点的标准差都是相邻不相重叠的, 表明这种周期性振荡结果不属于实验测试的误差, 是酶的性质真实反映。

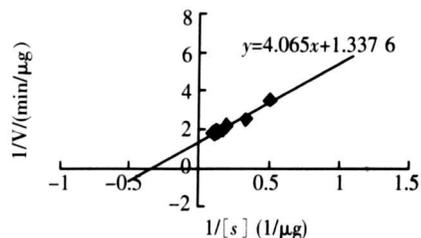


图 6 A 酶水解反应的米氏常数

Fig.6 Lineweaver-Burk plot of the enzyme A

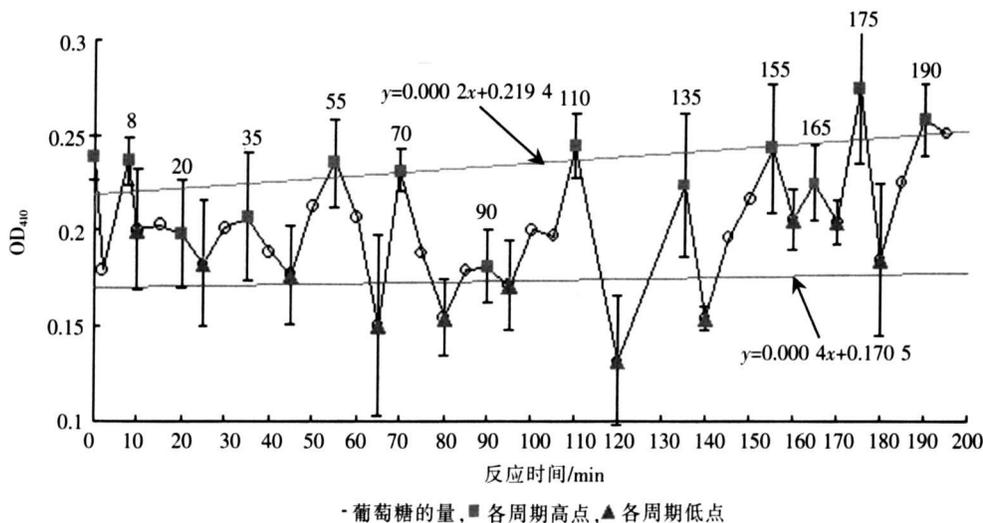


图 7 葡萄糖作为底物 (DNS 法), 在 195 min 内, 溶液中葡萄糖含量的变化情况

Fig.7 Change of Glucose quantity, glucose as substrate, in 190 min (DNS method)

用糖苷水解终产物葡萄糖作为底物进行反应, 检测葡萄糖含量变化, 出现了类似的反应现象, 葡萄糖的含量也表现为振荡波动的反应状态 (图 7). 说明酶能够将葡萄糖作为反应底物加以利用, 具有合成酶的活性, 使得葡萄糖的含量随着时间的延长减少和增多。

根据图 7 得到的周期时间为 17.00 ± 4.83 min 与 pNP-Glu 为底物时的周期时间有所不同, 这是由于底物的改变, 酶的结合能力有差异, 因而周期产生了变化. 第一个高点 0 min 葡萄糖量为 0.314 mmol/L, 这时反应还没有开始, 此时含量是作为底物的葡萄糖总量. 随着反应进行, 葡萄糖含量 (以还原糖的浓度为标志) 迅速下降, 表明在葡萄糖量绝对多时, A 酶首先是利用葡萄糖进行反应. 最后一个高点为 190 min, 此时的葡萄糖含量为 0.335 mmol/L, 此时葡萄糖的量明显有增加, 且高点的回归方程 $y = 0.000 2x + 0.219 4$ 表现出了上升趋势. 对于只有 A 酶与底物葡萄糖的反应体系, 葡萄糖量会随着时间而有增多, 可能是由于在所有的葡萄糖制剂中均有极少量的糊精和淀粉杂质, 从而葡萄糖还原性总量表现出了增多. 葡萄糖含量的低点的回归方程为 $y = 0.000 4x + 0.170 5$ 第一个低点和最后一个低点, 即 2 min 和 180 min 葡萄糖量分别为 0.261 mmol/L 和 0.276 mmol/L, 就是说葡萄糖量只要降低到这个水平时就会使糖苷的合成反应受到抑制, 转变为水解反应. 由此可见, A 酶的确同时拥有水解和合成两种活性。

2.7.2 GC/MS分析

对 45°C, 反应 15 min (图 5 第一个反应低点, 此时还原糖量较低, 合成产物相对较多) 时以 pNP-Glu 为底物的反应产物进行乙酰化衍生, 经 GC/MS 检测。

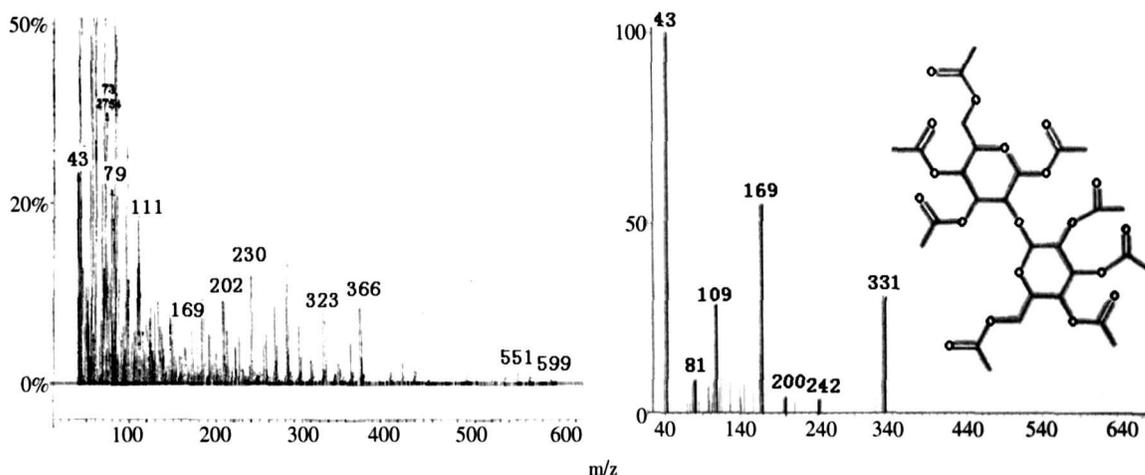


图 8 保留时间 17.665 min 色谱峰的质谱图(左)和二糖标准质谱图(右)

Fig.8 MSs of both the product at 17.665 min retention time (left) and disaccharide standard (right)

分子离子图上出现了多个色谱峰, 经质谱分析, 保留时间为 12.8 min 确认为六乙酰化葡萄糖的色谱峰, 保留时间为 24.870 min 是未参与反应的 pNP-Glu 乙酰化产物的色谱峰。在这两个峰之间的保留时间为 17.665 min 处 (图 8 附二糖标准质谱图, 来自于 NIST 谱库), 出现了含有乙酰化二糖结构的物质。通过对气相色谱图中各峰的峰高比较分析和质谱图的比对, 排除了这是杂质的乙酰化产物。

但是由于仪器只能检测到最大的碎片峰为 600 m/z, 所以不能准确判断该物质的相对分子质量大小。但该物质的出现表明在 A 酶的作用下, 还原糖之间确实发生了合成反应。这与以葡萄糖为底物的反应中, 葡萄糖还原性总量出现下降现象, 因而认为有新的糖苷键的生成的推论是相吻合的。

糖苷水解酶用于糖苷合成, 有两种反应模式: 一种是逆水解反应; 一种是转糖苷反应^[21]。对本实验中反应体系的产物进行 MS 分析, 没有发现含以 pNP-Glu 作为其组成部分的大分子量产物, 因此排除了 A 酶的转糖苷作用, A 酶的糖苷合成极有可能是逆水解反应。

Vic 小组^[23]利用逆水解反应合成的一系列糖苷, 其中葡萄糖浓度为 0.19 mol/L, 各种醇浓度为 0.80 mol/L。本文以葡萄糖为底物的反应中, 其浓度仅为 0.314 mmol/L 时, 反应就往合成方向进行了, 可见 A 酶的糖苷合成能力较强。

3 结论

3.1 A 酶的活性与归属鉴定

A 酶的蛋白相对分子量约为 65 ku, 最适 pH 为 5.5 对底物 pNP-Glu, PNP-Gal, oNP-Gal, Avicel 和 CMC-Na 均表现出了酶活, 对底物 CMC-Na 活性相对较弱。能够作用于底物 Avicel, 排除了属于 EG 的可能性。能对 pNP-Glu 等系列底物作用, 排除了属 CBH II 的可能。又因为能作用于 Avicel 和 pNP-Glu 以及测得此酶的相对分子质量大小约为 65 000 而 β -葡萄糖苷酶相对分子质量一般大于 70 000 由此可以排除属于 BGLI 的可能。另一方面, 文献报道, CBH 有 CMC 的活性, CBHI 的 CMC 活力甚至能高于 Avicel 活力 5~9 倍, 因此检测出 A 酶的 CMC 活力是合理的。综上所述, 判断 A 酶可能属于 CBHI。

3.2 A 酶水解活性的米氏常数

测定在 45°C 下, 8 min 内酶反应动力学常数, 符合酶反应米氏方程。45°C 时, A 酶的水解活性的米氏常数 $K_m = 3.04 \text{ mg/mL}$, $V_{max} = 3.77 \mu\text{mol/min}$

3.3 以 pNP-Glu 为底物时 A 酶水解反应周期的研究

通过重复试验, 对各周期中出现的高点和低点进行统计分析, 以及酶的浓度效应研究, 排除了由实验测试误差导致数据振荡的可能, 可以确定本实验结果是 A 酶自身性质的反映。对硝基苯酚方法测得在

190 min 内, pNP 的水解反应周期为 36.25 ± 2.50 min, 在 高点回归方程 $y = 0.0018x + 0.1043$ 和 低点回归方程 $y = 0.0018x + 0.0772$ 之间以近线性的方式振荡上升. DNS 法在 180 min 内测得还原糖的水解反应周期为 25.43 ± 8.34 min, 在 $y = -0.0004x + 0.4942$ 和 $y = 0.0005x + 0.2463$ 两条回归曲线之间波状振荡. pNP 水解反应的高点与还原糖水解反应的高点基本相互吻合, 且反应周期也相关联.

3.4 以葡萄糖为底物时 A 酶合成反应周期的研究

以葡萄糖作为底物与 A 酶反应, 用 DNS 法跟踪葡萄糖含量的变化, 也得到了一个周期时间为 17.00 ± 4.83 min 的波状振荡结果. 由于底物的改变, 所以周期有所不同. 对 GC/MS 的结果分析, 证实了 A 酶能利用葡萄糖发生合成反应, 具有糖苷合成活性. 国际上已报道的糖苷合成酶有 13 种, 来源于 12 种不同的微生物及植物^[24], 但没有 *T. reesei* 纤维素水解酶糖苷合成活性的报道, 本文的发现为构建新型糖苷合成酶, 促进酶法生产糖苷技术的实际应用, 增强寡糖分子在医药领域的应用, 提供了更多的选择.

[参考文献]

- [1] 王巧兰, 郭刚, 林范学. 纤维素酶研究综述 [J]. 湖北农业科学, 2004(3): 14-19.
- [2] Coughlan M. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application [J]. Biotechnol Genet Eng Rev 1985(3): 39-109.
- [3] 阎伯旭, 齐飞, 张颖舒, 等. 纤维素酶分子结构和功能研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(3): 233-237.
- [4] 齐香君, 苟金霞, 韩戎珺, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定溶液中还原糖的研究 [J]. 纤维素科学与技术, 2004 12(3): 17-30.
- [5] 车建美, 刘波, 朱育菁, 等. 尖孢镰刀菌中 β -D-葡萄糖苷酶活性测定条件的研究 [J]. 江西农业大学学报, 2006 28(1): 126-128.
- [6] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 387.
- [7] 程明冬, 王忠民, 石秀花, 等. 葡萄糖多糖的分离及其单糖组成分析 [J]. 食品与药品, 2006 8(5): 52-54.
- [8] 刘叶民, 徐桂芸. 羟乙基淀粉的羟乙基取代位置的研究 [J]. 分析化学, 2003, 21(3): 271-276.
- [9] Shou T, Hiroshi I, Akira N, et al. Overproduction of recombinant *Trichoderma reesei* cellulases by *Aspergillus oryzae* and their enzymatic properties [J]. Journal of Biotechnology, 1998(65): 163-171.
- [10] Kobe J, Kubicek C P. Quantification of the main components of the *Trichoderma* cellulose complex with monoclonal antibodies using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Applied Microbiol Biotechnol 1990 34: 26-30.
- [11] 邬敏辰, 李江华. 里氏木霉固体发酵生产纤维素酶的研究 [J]. 江苏食品与发酵, 1998(2): 2-6.
- [12] 余晓斌, 具润谟. 里氏木霉 RuC-30 液态法生产纤维素酶 [J]. 无锡轻工业大学学报, 1998 17(2): 6-10.
- [13] Wu Bin, Zhao Yue, Gao Peiji. Estimation of Cellobiohydrolase I Activity by Numerical Differentiation of Dynamic Ultraviolet Spectroscopy [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 2006 38(6): 372-378.
- [14] 阎伯旭, 高培基. 外切葡聚糖纤维二糖水解酶的分离纯化和部分性质研究 [J]. 生物化学杂志, 1997, 13(3): 362-364.
- [15] 赵越, 武彬, 阎伯旭, 等. 纤维二糖抑制外切纤维素酶水解作用机理的分析 [J]. 中国科学, 2003, 33(5): 454-460.
- [16] Miettinen-Oinonen Arja. *Trichoderma reesei* Strains for Production of Cellulases for the Textile Industry (VTT Publications 550) [M]. Espoo: VTT Publications, 2004: 22.
- [17] 阎伯旭, 高培基. 十二烷基磺酸钠所致外切葡聚糖纤维二糖水解酶底物专一性的变化 [J]. 纤维素科学与技术, 1998 6(3): 10-15.
- [18] 阎伯旭, 孙迎庆, 高培基. 有限酶切拟康氏木霉纤维素酶分子研究其结构域的结构与功能 [J]. 纤维素科学与技术, 1998 6(3): 1-8.
- [19] 高培基, 刘垂. 研究纤维素酶活时测定还原糖方法的选择 [J]. 植物生理学通讯, 1986(2): 46-48.
- [20] 管斌, 谢来苏, 丁友昉, 等. 纤维素酶活力测定方法的校正 [J]. 无锡轻工业大学学报, 1999, 18(4): 20-26.
- [21] 胡莹, 杨凌, 杨胜利. 糖苷酶序列分类法和作用机理的研究进展 [J]. 药物生物技术, 2006 13(1): 66-70.
- [22] 郁惠蕾, 许建和, 林国强. 糖苷水解酶在糖苷合成中的应用概况 [J]. 有机化学, 2006 26(8): 1052-1058.
- [23] Scigelova M, Singh S, Crout DHG, et al. Glycosylases—a great synthetic tool [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 1999, 6(5): 483.
- [24] 卢丽丽, 肖敏, 赵晗. 糖苷合成酶——一类新型的寡糖高效合成工具 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2006 33(4): 310-320.

[责任编辑: 孙德泉]