

真菌糖苷酶的筛选

戈苏国 杨寿钧 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

糖苷酶具有高度的底物专一性, 能广泛用于测定糖脂, 糖蛋白中的糖苷键结构, 以及探索糖在大分子中的生物学功能。又由于不同来源的糖苷酶性质有差异, 即使都来源于真菌, 但由于种属不同, 它们对底物的亲和力也表现出明显差异。因此筛选不同来源的糖苷酶具有重要的意义。

糖苷酶能专一地水解特定的糖苷键, 对于人工合成的底物对位或邻位硝基苯基糖苷, 有

极高的水解速度。本文报道用对硝基苯基糖苷 (简称 PNPG) 法筛选真菌糖苷酶的实验结果。

材料和方法

(一) 菌种

供筛选用的 43 株真菌都由我所菌种保藏组提供。

(二) 培养基

1. 斜面培养基: 除部分菌用马铃薯琼脂斜面外, 其余均用察氏培养基斜面。

2. 固体培养基: 在 250ml 三角瓶中放入 5g 麦麸和 7.5ml 1.0% 乳酸溶液, 拌匀, 1 公斤/厘米² 蒸汽灭菌 30 分钟。

3. 液体培养基(%): 玉米粉 6, 玉米浆 2, 豆饼粉 2, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.003。250ml 三角瓶内装 50ml, 1 公斤/厘米² 蒸汽灭菌 30 分钟。

(三) 粗酶液的提取

1. 固体培养: 将 42 株真菌分别接种于培养基斜面上, 28℃ 培养 6 天, 转接于固体培养基中, 28℃ 培养 5—6 天 (2—3 天后翻动一次), 加 50ml 蒸馏水浸泡 2 小时, 用滤纸过滤, 测定滤液中糖苷酶的活力。

2. 液体培养: 将斜面菌株转接于液体培养基 (250 ml 三角瓶中加入 50ml 液体培养基), 30℃ 振荡培养 5 天, 摇床转速为 200 rpm。过滤, 测定滤液中糖苷酶的活力。

(四) 测定方法

1. 酶活力测定方法—PNPG 法: 对(或邻)位硝基苯基糖苷可以被相应的糖苷酶水解, 释放出对(邻)位硝基苯酚和单糖。在碱性溶液中, 硝基酚呈黄色。根据黄色的深浅, 可目测糖苷酶的活力大小, 或在 400nm 波长测定吸光度值 A, 来表示酶活力的大小。

将 100 μl 底物溶液 (3.0 mg 不同的底物分别溶于 2.5 ml 蒸馏水中), 100 μl 0.5 M 醋酸缓冲液 (pH 4.5), 与 20 μl 酶提取液相混合, 在 37℃ 保温反应一小时, 然后加入 0.5ml 0.2 M 的硼酸钠终止反应。目测反应液黄颜色的深浅或将反应液适当稀释后, 在 721 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂出品) 400 nm 波长处测定吸光度 A。

2. 凝胶电泳: 按王扬声^[1]方法进行酶提取液的凝胶电泳, 凝胶浓度 7%, 电泳结束后, 取出胶条用蒸馏水漂洗一次, 然后与底物在 37℃ 保温 5—10 分钟, 取出胶条放在 0.2 M 硼酸钠溶液中, 立刻出现黄色区带。也可以将电泳后的凝胶条用考马斯亮蓝 R-250 染色。

3. 聚丙烯酰胺薄层凝胶等电聚焦: 聚丙烯酰胺薄层凝胶等电聚焦按杨寿钧方法^[2]进行。使用 Pharmacia 公司平板等电聚焦仪, 薄层为 22×10×0.1(cm), 电泳在水冷却下进行, 恒功率 10W, 两性载体电介质 (Ampholine), pH3—10, 聚焦 3 小时。以下操作同凝胶电泳。

结果与讨论

用 12 种合成底物对 43 株真菌的固体培养提取液和液体培养过滤液中的糖苷酶活力进行测定, 结果见表 1。固体培养和液体培养相比较, 液体培养滤液中糖苷酶活力比固体培养提取液酶的活力普遍较低, 但凝胶电泳图谱比较单一。

由表 1 可以看出, 在被筛选的 36 株曲霉中, 黑曲霉, 泡盛曲霉烟色变种和肉桂色曲霉的产酶情况基本相同, 它们都产生丰富的 α -及 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、 β -甘露糖苷酶、 β -木糖苷酶和 N-乙酰基- β -D-葡萄糖胺酶; 产生少量的 β -岩藻糖苷酶和 α -葡萄糖苷酶, 几乎都不产生 α -甘露糖苷酶、N-乙酰基 α -D-半乳糖胺酶和 N-乙酰基- α -D-葡萄糖胺酶。米曲霉与上述几株曲霉的产酶情况相似, 但产量都比较少。无花果曲霉和宇佐美曲霉除产生上述几种糖苷酶外, 还产生 α -岩藻糖苷酶; β -岩藻糖苷酶和 α -葡萄糖苷酶也比上述几株曲霉的产酶量多。其中, 宇佐美曲霉 3.2783 是曲霉中唯一产 α -甘露糖苷酶和 N-乙酰基- α -D-半乳糖胺酶的菌种。

与曲霉属相比较, 7 株根霉产生糖苷酶的量均比曲霉少, 而且都不产生 α -及 β -岩藻糖苷酶和 α -甘露糖苷酶。在被筛选的 42 株真菌中, 只有米根霉 3.866 及日本根霉 3.868 产生 N-乙酰基- α -D-葡萄糖胺酶。

在初筛的基础上, 对部分菌株的粗酶提取液进行了凝胶电泳 (图 1) 和等电聚焦。从中选出产酶量高、杂蛋白少、酶易于纯化的优良菌株。宇佐美曲霉 3.2783 是产岩藻糖苷酶、 α -甘露糖苷酶和 N-乙酰基- α -D-半乳糖胺酶的菌株; 黑曲霉 3.316 是作为产 β -葡萄糖苷酶的研

表1 真菌固体培养的酶提取液活力测定

菌 种	株数	底 物*											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	8	-	+	+++	+++	+	+++	-	++	+++	-	-	+++
泡盛曲霉烟色变种 (<i>Asp. awamori</i> var. <i>fumus</i>)	7	-	+	+++	+++	+	+++	-	++	+++	-	-	+++
肉桂色曲霉 (<i>Asp. cinnamomeus</i>)	7	-	+	+++	+++	++	+++	-	++	+	-	-	+++
米曲霉 (<i>Asp. oryzae</i>)	3	-	+	++	+++	-	+++	-	+	+	-	-	++
焦曲霉 (<i>Asp. ustus</i>)	1	-	-	+++	-	-	+++	-	+	+++	-	-	+++
无花果曲霉 (<i>Asp. ficuum</i>)	7	+	++	+++	+++	+++	+++	-	++	+++	-	-	++
宇佐美曲霉 (<i>Asp. usamii</i>)	3	++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	-	+++
米根霉 (<i>Rhizopus oryzae</i>)	3	-	-	+++	+	+	+++	-	+	+	+	+	++
日本根霉 (<i>Rh. japonicus</i>)	1	-	-	++	-	+	+++	-	+	+	+	+	++
科恩根霉 (<i>Rh. cohni</i>)	1	-	-	-	++	+	+++	-	-	-	-	-	++
少根根霉 (<i>Rh. arrhizus</i>)	2	-	-	+	-	+	+++	-	-	-	-	-	+++

* 目测结果: +: 浅黄色, 比色测定吸光度A在0.05—0.10之间。++: 中等黄色, 吸光度A在0.1—0.5之间。+++ : 强烈黄色, 吸光度 A>0.50。

使用的12种底物如下(均为Sigma公司产品):

1. PNP- α -L-Fucopyranoside; 2. PNP- β -D-Fucopyranoside; 3. PNP- α -D-Galactopyranoside; 4. PNP- β -D-Galactopyranoside; 5. PNP- α -D-Glucopyranoside; 6. PNP- β -D-Glucopyranoside; 7. PNP- α -D-Mannopyranoside; 8. PNP- β -D-Mannopyranoside; 9. PNP- β -D-Xylopyranoside; 10. PNP-N-Acetyl- α -D-Galactosaminide; 11. PNP-N-Acetyl- α -D-Glucosaminide; 12. PNP-N-Acetyl- β -D-Glucosaminide.

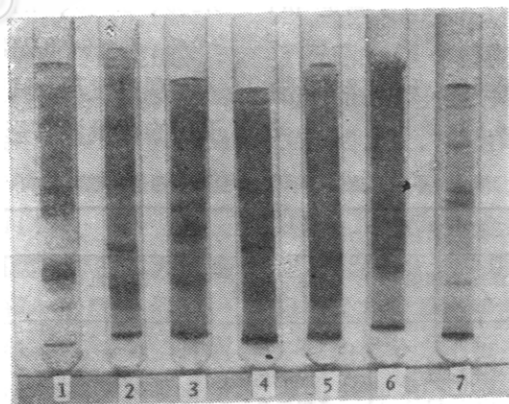


图1 不同菌株固体培养粗酶提取液凝胶电泳图谱

1. 黑曲霉 3.316; 2. 黑曲霉 3.3143; 3. 无花果曲霉 3.860; 4. 泡盛曲霉烟色变种 3.907; 5. 米根霉 3.866; 6. 宇佐美曲霉 3.2783; 7. 焦曲霉 3.3534

究菌种; 无花果曲霉 3.860 作为产 β -半乳糖苷酶的菌种。有关酶的进一步纯化及其性质的研究正在进行中。

参 考 文 献

- [1] 王扬声: 微生物学通报, 5(6): 33, 1978,
- [2] 杨寿钧: 微生物学通报, 9(4): 186, 1982.