

芦荟叶皮 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质^①

李蕊伽, 廖海君, 白亚娟, 陶敏, 唐菁, 唐云明

西南大学 生命科学学院/重庆市甘薯工程研究中心/三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715

摘要: 库拉索芦荟叶皮经匀浆、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液抽提, 硫酸铵分级沉淀, DEAE-Sepharose fast flow 层析和 Superdex-200 prep grade 层析, 获得电泳纯的 β -葡萄糖苷酶(β -Glucosidase, BGL). 纯化结果是 β -葡萄糖苷酶比活力为 98.48 U/mg, 纯化倍数为 328.27 倍, 酶活性回收率为 9.87%, 全酶分子质量约为 69.3 kD, 亚基分子质量约为 69.7 kD. 酶学性质研究表明: β -葡萄糖苷酶的最适反应温度和最适反应 pH 值分别为 40 °C 和 5.0; 在 20~30 °C 及 pH 4.0~8.0 范围内稳定性较好; 最适条件下, 以 pNPG 为底物的 K_m 值为 2.21 mmol/L, V_{max} 为 1.381 μ mol/(min · L). 乙醇, 抗坏血酸, Mn^{2+} , K^+ 对该酶活性具有激活作用; SDS, Cu^{2+} 对该酶活性具有强烈抑制作用; 异丙醇, EDTA, 尿素, Mg^{2+} , Li^+ 对该酶活性影响较小; 甲醇对该酶有双重作用.

关键词: 芦荟叶皮; β -葡萄糖苷酶; 分离纯化; 酶学性质

中图分类号: Q946.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2017)04-0053-08

β -葡萄糖苷酶(β -Glucosidase, BGL; EC 3.2.1.21)属于一种水解酶, 又称 β -D-葡萄糖苷水解酶, 能够催化 β -葡萄糖苷、二糖及低聚糖中糖苷键的水解, 释放出非还原性末端葡萄糖残基^[1], 广泛存在于植物、动物以及微生物体中. 在人类的糖原降解和动物、植物、微生物的糖类代谢方面具有重要的生理功能, 特别是对于植物来源的 BGL 具有更广泛的生理功能, 包括参与植物细胞壁降解、木质化作用、香味前体水解等^[2]. 近年来, 随着对该酶性质的研究, 植物来源的 BGL 主要应用在纤维素材料和食品风味方面^[3]. 因此获得来源更广泛、成本更低廉的 BGL 并对其性质进行研究具有重要的理论和经济意义.

芦荟(*Aloe vera*)是一种多年生肉质草本植物, 富含多糖、蒽醌类化合物、氨基酸等营养成分, 在医药、美容、保健及食品上有良好的功效^[4]. BGL 作为一种关键风味酶, 在果酒、茶叶以及果汁中具有增香作用^[5]. 芦荟叶皮 BGL 的分离纯化及酶学性质的研究未见报道, 因此, 本文对芦荟叶皮 BGL 进行分离纯化, 并对其部分酶学性质进行研究, 为其进一步研究和开发利用提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

库拉索芦荟品种, 采自西南大学植物园.

4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside, pNPG), 聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVPP), 甲叉-双丙烯酰胺, 丙烯酰胺, 瑞士 Fluka 公司; DEAE-Sepharose, 蛋白质十

① 收稿日期: 2016-08-30

基金项目: 中央高校基本业务费专项资金资助(XDJK2016C110).

作者简介: 李蕊伽(1990-), 女, 四川泸州人, 硕士研究生, 主要从事蛋白质与酶工程的研究.

通信作者: 唐云明, 教授, 博士.

二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)标准品及 Superdex-200 凝胶层析分子质量标准品, 美国 GE Healthcare 公司; 考马斯亮蓝 R-250, 美国 Bio-Rad 公司; 牛血清蛋白, 美国 Sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机, 德国 Thermo Electron LED GMBH; Milli-Q plus 纯水仪, 美国 Millipore 公司; 精密电子天平, 瑞士 Mettler-Toledo 公司; UV-2550 型分光光度计, 蛋白核酸定量仪, 日本岛津公司; MC4L 冷冻干燥机, 德国 Uni Equip 公司; 垂直板电泳槽和电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; AKTA prime plus 蛋白纯化系统, 美国 GE 公司。

1.3 方 法

1.3.1 粗酶液的制备

将库拉索芦荟去除叶肉组织取皮, 洗净后晾干, 称量 30 g 并切成小块, 按照 1:8(m/V)加入 4℃预冷的 50 mmol/L pH 值为 5.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和 1.2 g 的聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVPP), 充分匀浆后于 4℃条件下抽提 1 h。经 2 层纱布过滤, 将滤液在 4℃, 4 000 r/min 离心 1 h, 收集上清液即为 BGL 粗酶液。

1.3.2 硫酸铵分级沉淀

在粗酶液中缓慢加入硫酸铵至 30%饱和度, 4℃静置 2 h 后, 4℃, 4 000 r/min 离心 1 h 收集上清液; 上清液加入硫酸铵至 80%饱和度, 4℃静置 2 h 后, 4℃, 4 000 r/min 离心 1 h 收集沉淀。沉淀溶解于 50 mmol/L pH 值为 5.8 的磷酸盐缓冲液中; 以 50 mmol/L pH 值为 5.8 的磷酸盐缓冲液作透析外液, 4℃透析 3 次, 每次间隔 4 h。透析后 4 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液即为 BGL 初酶液。

1.3.3 DEAE-Sepharose fast flow 层析

用 3 倍柱床体积的 0.05 mol/L pH 值为 5.8 的磷酸盐缓冲液平衡经再生处理的 DEAE-Sepharose fast flow 层析柱(26 mm×15 cm); 取 10 mL BGL 初酶液上柱, 0~0.5 mol/L NaCl(用 0.05 mol/L pH 值为 5.8 的磷酸盐缓冲液)溶液进行线性洗脱。流速 0.5 mL/min, 每管收集 5 mL 体积, 共收集 60 管。测定各管收集液的酶活性和蛋白质质量分数。收集活性较高的酶液, 透析后, 冷冻干燥备用。

1.3.4 Superdex-200 prep grade 层析

用 0.05 mol/L pH 值为 5.8 的磷酸盐缓冲液平衡 Superdex-200 prep grade 层析柱(16 mm×60 cm)后, 用 3 mL 0.05 mol/L pH 值为 5.8 的磷酸盐缓冲液溶解 1.3.3 中冻干样品并上样, 以 0.05 mol/L pH 值为 5.8 的磷酸盐缓冲液洗脱, 流速 0.3 mL/min, 每管收集 3 mL, 共收集 60 管。测定各管收集液的酶活性和蛋白质质量分数, 收集活性较高的酶液, 用去离子水透析, 冷冻干燥后-20℃保存备用。

1.3.5 酶活力的测定

参照文献^[6], BGL 在一定条件下能够水解对硝基苯-β-D-葡萄糖苷(pNPG)中的糖苷键, 产生对硝基苯酚。对硝基苯酚在碱性条件下显黄色, 通过比色法测定该黄色物质质量分数, 从而计算出 BGL 的活力。酶活力单位的定义: 以 pNPG 为底物, 一定条件下, 每分钟释放出 1 μmol 对硝基苯酚所需要的酶量为一个酶活力单位(U)。

酶活测定方法参照文献[5]略有修改: 反应体系为 4.3 mL, 包括 0.2 mL 10 mmol/L 的 pNPG, 2 mL 0.05 mol/L pH 值为 5.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和 0.1 mL 酶液, 37℃水浴反应 30 min, 加入 2 mL 1 mol/L Na₂CO₃ 终止反应, 400 nm 波长下测定吸光值。将反应前加入 Na₂CO₃ 用作失活处理的酶液, 为空白对照。BGL 活力计算公式为

$$U = \frac{Y \times V_2 \times V \times N}{K \times V_1 \times M \times T}$$

式中, Y 为酶促反应吸光值; V 为酶液提取总体积(mL); V₁ 为反应体系中酶液体积(mL); V₂ 为总反

应液体积(mL); K 为对硝基苯酚标准曲线斜率; M 为样品质量(g); N 为稀释倍数; T 为反应时间(min).

1.3.6 蛋白质量分数的测定

通过考马斯亮蓝染料法(Bradford)^[7]以及紫外分光光度法^[8]测定蛋白质质量分数.

1.3.7 BGL 纯度鉴定及分子质量测定

1.3.4 所得的 BGL 经 SDS-PAGE, 进行纯度鉴定. 制备 12% 分离胶和 5% 浓缩胶, 上样量 15 μ L, 通过 SDS-PAGE 和凝胶过滤层析法分别测定 BGL 的亚基分子质量和全分子质量^[7].

1.3.8 BGL 最适温度与热稳定性

在 20~65 $^{\circ}\text{C}$ (梯度间隔 5 $^{\circ}\text{C}$), pH 值为 5.0 条件下测定 BGL 酶活力, 分别以最适温度测得的酶活力为 100%, 其余各温度下的酶活力与之相比得相对酶活力. 并将一定量的酶液分别置于 20~60 $^{\circ}\text{C}$ (梯度间隔 10 $^{\circ}\text{C}$), 每间隔 30 min 测定酶活力, 测定 3 h, 将未保温的酶液酶活力记为 100%, 计算不同温度、不同时间段的相对酶活力, 从而研究其热稳定性.

1.3.9 BGL 最适 pH 值与 pH 值稳定性

在 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 值为 3.0~9.0 测定 BGL 的酶活力, 酶活力最高值为 100%, 计算不同 pH 值的相对酶活力, 确定 BGL 的最适反应 pH 值. 将酶液分别与等体积的 pH 值为 4.0~8.0 缓冲体系混合于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 每间隔 30 min 分别测定酶活力, 在同等条件将酶液与等体积去离子水混合所测的酶活力记为 100%, 计算各 pH 值的相对酶活力, 从而研究其 pH 值稳定性.

1.3.10 不同有机溶剂对 BGL 活性的影响

将酶液分别与不同浓度的异丙醇、乙醇、甲醇(体积分数为 10%~50%)等体积混合于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 分别测定酶活力, 在同等条件将酶液与等体积去离子水混合所测的酶活力记为 100%, 计算不同浓度、不同有机溶剂的相对酶活力.

1.3.11 不同化合物对 BGL 活性的影响

将酶液分别与不同浓度的草酸, SDS, 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA), 抗坏血酸和尿素(5~25 mmol/L)等体积混合于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 分别测定酶活力, 在同等条件下将酶液与等体积去离子水混合所测的酶活力记为 100%, 计算不同浓度、不同化合物的相对酶活力.

1.3.12 BGL 米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})的测定

在 40 $^{\circ}\text{C}$, pH 值为 5.0 最适条件下, 以不同浓度的 pNPG(0.1~1 mmol/L)为底物测定 BGL 酶活力, 经双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法)^[8], 计算 BGL 的 K_m 和 V_{max} 值.

1.3.13 不同金属离子对 BGL 活性的影响

将酶液分别与不同浓度(10~50 mmol/L)的金属离子(Mg^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} , Li^{+})等体积混合于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 分别测定酶活力, 在同等条件下将酶液与等体积去离子水混合所测的酶活力记为 100%, 计算不同浓度、不同金属离子的相对酶活力.

2 结果与分析

2.1 芦荟叶皮 BGL 的分离纯化结果

初酶液经 DEAE-Sepharose fast flow 层析柱后的结果如图 1 所示, 酶活性峰集中在 26~35 管, 最高酶活力管为第 28 管. 经离子交换层析后所得的 BGL, 进行 Superdex-200 prep grade 层析, 洗脱结果如图 2 所示, 酶活性峰集中在 29~36 管, 最高酶活力管为第 30 管, 收集活性较高的酶液, 经对去离子水透析、冷冻干燥后, 进行 SDS-PAGE, 结果显示单一条带(图 3), 说明 BGL 分离纯化后达到电泳纯. 该酶整个分离纯化结果见表 1, 最终得到芦荟叶皮 BGL 的回收率为 9.87%, 纯化倍数为 328.27, 酶比活力为 98.48 U/mg.

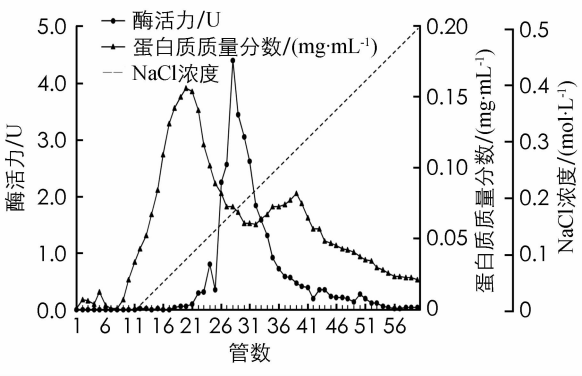


图 1 芦荟叶皮 BGL 的
DEAE-Sepharose fast flow 层析

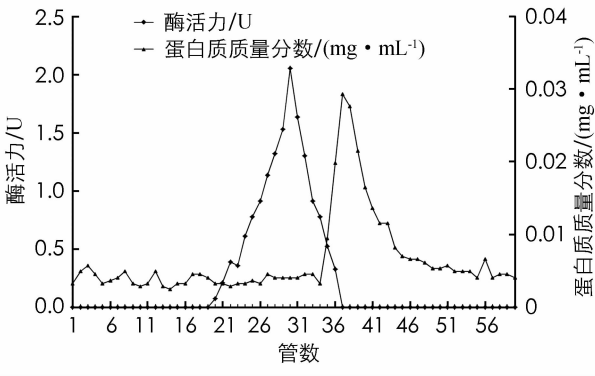


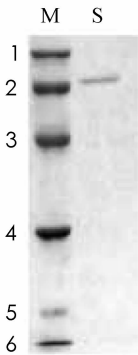
图 2 芦荟叶皮 BGL 的
Superdex-200 prep grade 层析

表 1 芦荟叶皮 BGL 分离纯化结果

纯化步骤	总蛋白 /mg	总酶活 /U	比活力 /(U · mg ⁻¹)	回收率 /%	纯化 倍数
粗酶液	826.60	249.43	0.30	100.00	1
硫酸铵分级沉淀透析	86.05	131.50	1.53	52.72	5.10
DEAE-sepharose fast flow	3.83	89.67	23.41	35.95	78.03
Superdex-200 prep grade	0.25	24.62	98.48	9.87	328.27

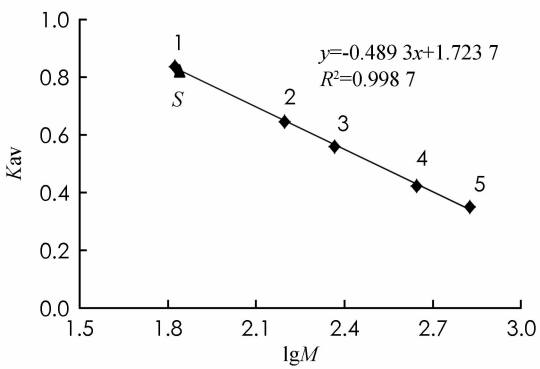
2.2 芦荟叶皮 BGL 的纯度鉴定及分子质量测定

纯化后的 BGL 经 SDS-PAGE, 测得其亚基分子质量约为 69.7 kD, Superdex-200 prep grade 层析后测得其全酶分子质量约为 69.3 kD(图 4), 由此推测出芦荟叶皮 BGL 由单亚基构成。



M 分子质量标准品; 1. 兔磷酸化酶 B 97.0 kD;
2. 牛血清白蛋白 66.0 kD; 3. 鸡卵清蛋白 45.0 kD;
4. 牛碳酸酐酶 30.0 kD; 5. 大豆胰蛋白酶抑制剂 20.1 kD;
6. α-牛乳白蛋白 14.4 kD; S: 芦荟外皮 BGL 69.7 kD

图 3 芦荟叶皮 β-葡萄糖苷酶
的 SDS-PAGE 图谱



1. 牛血清白蛋白 66.0 kD; 2. 醛缩酶 158.0 kD;
3. 过氧化氢酶 232.0 kD; 4. 铁蛋白 440.0 kD;
5. 甲状腺球蛋白 669 kD; S: 芦荟外皮 BGL 69.3 kD

图 4 Superdex-200 prep grade 层析测得
芦荟叶皮 BGL 的分子量

2.3 芦荟叶皮 BGL 的酶学性质

2.3.1 BGL 最适温度与热稳定性

芦荟叶皮 BGL 的最适反应温度为 40 ℃(图 5). BGL 的热稳定性如图 6 所示, 4 ℃下孵育 3 h 后相对酶活力均保持在 85%以上; 20~30 ℃之间, 保温 3 h 后均保持在 70%以上的相对酶活力, 而且该酶在 30 ℃的稳定性高于 20 ℃; 40~50 ℃之间, 保温 1 h 后均保持 50%以上的相对酶活力; 60 ℃保温 1 h 后酶活力基本完全消失。

2.3.2 BGL 的最适 pH 值与 pH 值稳定性

芦荟叶皮 BGL 的最适 pH 值为 5.0(图 7). 该酶的 pH 值稳定性结果如图 8 所示, 总体而言, 该酶在

pH 值为 4.0~8.0 缓冲体系均保持较好的稳定性, 除 pH 值为 4.0 的缓冲体系中孵育 2h 后相对酶活力有明显降低之外, 其他缓冲体系的相对酶活力均保持在 90% 以上。

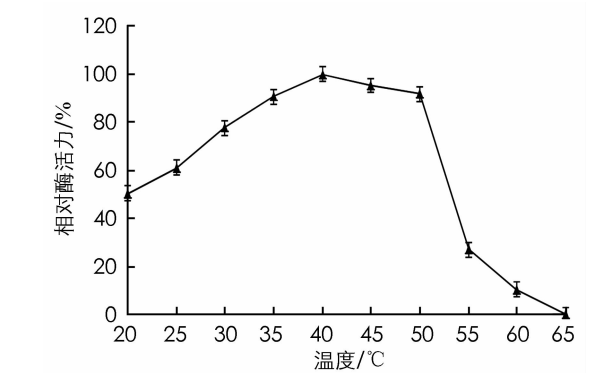


图 5 温度对芦荟叶皮 BGL 的酶活力影响

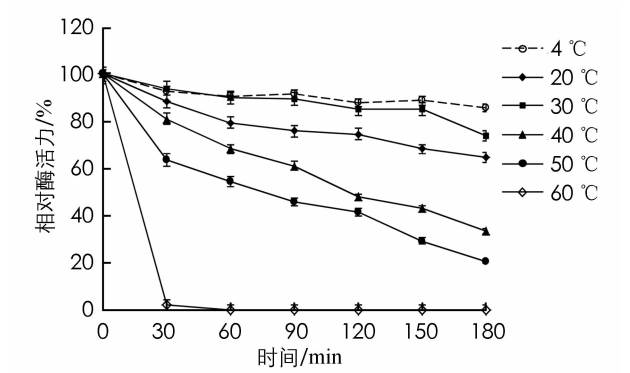


图 6 芦荟叶皮 BGL 的热稳定性

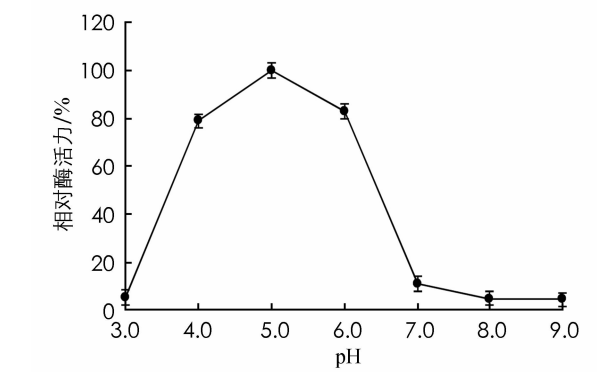


图 7 pH 对芦荟叶皮 BGL 的酶活力影响

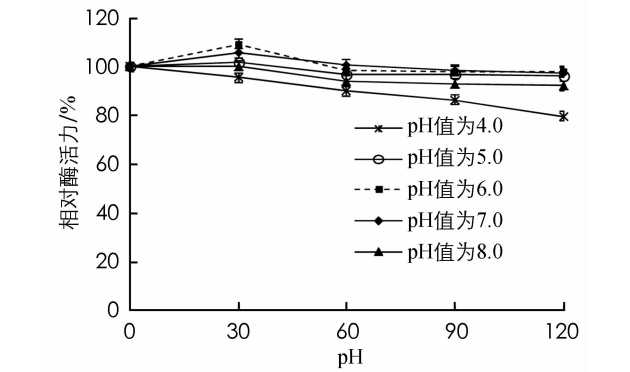


图 8 芦荟叶皮 BGL 的 pH 值稳定性

2.3.3 不同有机溶剂对 BGL 活性的影响

在 3 种有机溶剂的作用下, 乙醇的激活作用较为显著, 相对酶活力均保持在 110% 以上, 当体积分数大于 30% 时, 激活作用开始降低, 甲醇的体积分数小于 10% 时对 BGL 有较弱的激活作用, 当超过其体积分数, 其呈现出较大的抑制作用, 异丙醇对该酶无明显作用(图 9)。

2.3.4 不同化合物对 BGL 活性的影响

抗坏血酸对芦荟叶皮 BGL 的激活作用强烈, 并随着浓度的增大激活作用越强, 而 SDS 对该酶有较强的抑制作用, 当浓度大于 15 mmol/L 时几乎完全抑制, 草酸对该酶呈现较弱的抑制作用, EDTA 和尿素对该酶作用不明显(图 10)。

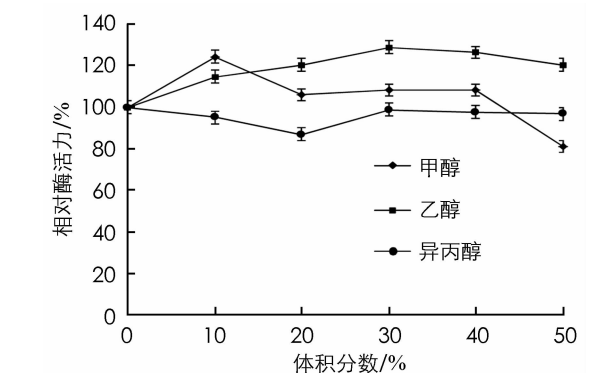


图 9 不同有机溶剂醇类物质对芦荟叶皮 BGL 的活性影响

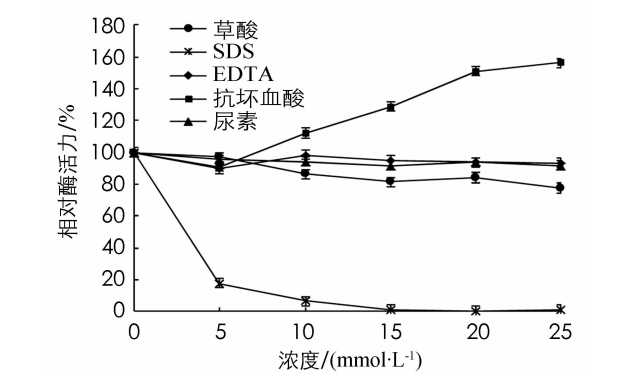


图 10 不同化合物对芦荟叶皮 BGL 活性的影响

2.3.5 BGL 米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})的测定

在 40 ℃, pH 值为 5.0 最适条件下, 将不同浓度 pNPG 为 BGL 反应底物, 经 Lineweaver-Burk 法得出 $1/[S]$ 与 $1/V$ 呈线性关系(图 11), 计算出芦荟叶皮 BGL 对 pNPG 的 K_m 值为 2.21 mmol/L, V_{max} 为 1.381 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$.

2.3.6 不同金属离子对 BGL 活性的影响

实验结果如表 2 所示, 随着金属离子浓度的增加, Mn^{2+} , K^+ 对该酶活性有一定的激活作用, Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} 对该酶有不同程度的抑制作用, 其中 Cu^{2+} 的抑制作用最为强烈, Zn^{2+} 在低浓度(10 mmol/L)具有较弱激活作用, 随着浓度增加, 其抑制作用逐渐增强. Mg^{2+} , Li^+ 对该酶活性无较大的影响.

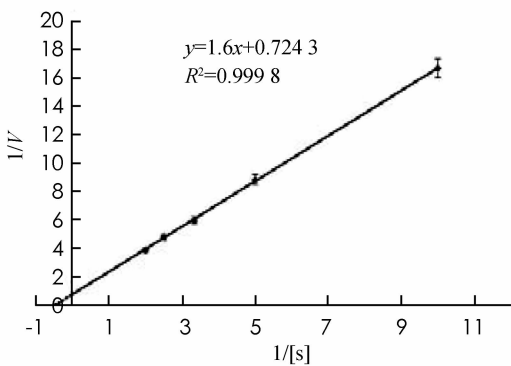


图 11 双倒数法测定芦荟叶皮 BGL 的米氏常数图

表 2 不同金属离子对芦荟叶皮 BGL 活性的影响

金属离子	不同浓度下的相对酶活力/%				
	10/(mmol · L ⁻¹)	20/(mmol · L ⁻¹)	30/(mmol · L ⁻¹)	40/(mmol · L ⁻¹)	50/(mmol · L ⁻¹)
对照	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Mg ²⁺	92.22	100.00	95.56	93.33	92.96
Cd ²⁺	82.22	82.78	82.22	76.67	75.93
Mn ²⁺	102.91	118.12	118.12	122.82	122.82
Co ²⁺	89.04	84.49	74.72	75.17	73.83
Cu ²⁺	92.72	90.29	64.40	42.72	23.62
Zn ²⁺	110.68	105.50	103.88	95.47	88.03
Ba ²⁺	95.15	93.20	97.09	96.12	81.55
Ca ²⁺	90.29	89.97	87.38	86.73	86.41
K ⁺	106.35	114.29	114.29	115.87	112.70
Li ⁺	93.44	93.85	93.72	92.90	91.26

3 讨 论

本实验所选取的材料来自库拉索芦荟叶皮, 经缓冲液抽提、硫酸铵沉淀、DEAE-Sepharose fast flow 层析和 Superdex-200 prep grade 层析, 分离纯化得到电泳纯的 BGL. 所体现的优势在于进行材料处理时操作简便, 而来自其他植物材料的 BGL(如栀子花、樱桃、西梅籽^[9-11])由于受外部环境因素的影响, 需要在特定时期进行采样处理, 因此减少了实验时间. 本文以 DEAE-Sepharose fast flow 层析和 Superdex-200 prep grade 层析代替在荞麦材料仅有一步的葡聚糖凝胶 SephadexG-150 层析, 从而更大地减少杂蛋白, 提高比活力和纯化倍数^[3]. 该酶比活力为 98.48 U/mg, 远远高于莲子(0.287 U/mg), Penidiella sp. HEY-1 (3.30 U/mg), 腊梅花(0.244 U/mg)^[5, 12, 13]; 该酶纯化倍数为 328.27 倍, 高于荞麦(4.71 倍), 樱桃(6.8 倍), 肠球菌(9.79 倍)^[3, 12, 14]中 BGL 的纯化倍数.

芦荟叶皮 BGL 的最适温度为 40 ℃, 低于碧桃(60 ℃)^[15]的最适温度, 与福寿螺(43 ℃)^[16]和橄榄果(42 ℃)^[17]接近, 与乳酸菌^[18]一致, 4 ℃下的稳定性较好, 并且在 20~30 ℃之间, 保温 3 h 后均保持 70% 以上的相对酶活力. 该酶的最适 pH 值为 5.0, 比 Penidiella sp. HEY-1(pH 3.0)^[12]高, 较乳酸菌(pH 6.0)^[18]低, 与荞麦^[3]的 BGL 一致. 由此可见不同来源的 BGL 的最适 pH 值具有一定差异. pH 值为 4.0~8.0 范围内, 在 4 ℃条件下静置 2 h, 其稳定性均较好, 表明该酶在酸性和碱性环境条件下都有较强的适应性.

该酶为单一亚基, 分子质量约为 69.7 kD, 高于肠球菌(61 kD)^[14]和碧桃(64.5 kD)^[15]的 BGL 亚基分

子质量,与樱桃(68 kD)^[10]接近,部分植物如莲子^[5]、荞麦^[3]等含有两个亚基。全酶分子质量约为69.3 kD, BGL 的相对分子量一般在 40~250 kD 之间,表明不同来源的 BGL 相对分子量由于其结构和组成不同因而差异很大。

在不同有机溶剂的作用下,乙醇的激活作用较为显著,当处于高浓度时,激活作用开始降低,甲醇在低浓度时对 BGL 有较弱的激活作用,高浓度则呈现出较大的抑制作用,异丙醇对该酶无明显作用。

Mn^{2+} , K^{+} 对该酶活性有一定的激活作用,与福寿螺^[16]和绿色木霉^[19]的报道类似, Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} 对该酶有不同程度的抑制作用,其中 Cu^{2+} 的抑制作用最为强烈,并随着浓度的增大抑制作用增强,而多数文献也报道出 Cu^{2+} 能明显抑制 BGL 的活性^[11-13]。 Mg^{2+} , Li^{+} 对该酶活性无较大的影响,这与绿色木霉^[19]所报道的 Mg^{2+} 的激活作用存在差异,这说明同一种金属离子对不同来源的同种酶活性会产生不同效应。抗坏血酸对该酶有较强的激活作用,并且随着浓度的增大使酶活性增强,反之 SDS 对其有较强的抑制作用,在浓度为 15 mmol/L 时,该酶活性几乎完全丧失。

BGL 是植物醇系香气产生的一种关键酶,目前已有文献报道从莲子提取的 BGL 能够增加荷叶饮料香气^[5],从香梨中提取的 BGL 能够影响香气成分的释放等^[20],从而在今后的发展中一定程度上以增香酶替代部分增香剂。尽管已有多种植物来源的 BGL 进行分离纯化,但不同来源的 BGL 其针对性也有差异,本文采用芦荟叶皮进行提取,相对于其他植物而言,种植范围较广,取材方便,价格低廉,操作简易。虽然现阶段芦荟的用途较多样化,但其叶皮的利用相对较少,因此本实验不仅加强了对芦荟的再次利用,还能在食品、香精香料以及化妆品行业方面提供进一步的实践意义。

参考文献:

- [1] KETUDAT CAIMS J R, ESEN A. β -Glucosidases [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(20): 3389—3405.
- [2] 彭喜春,彭志英. β -葡萄糖苷酶的研究现状及应用前景 [J]. 江苏食品与发酵, 2001(4): 22—25.
- [3] 张 卓. 荞麦中 β -葡萄糖苷酶的分离提取及其酶促动力学研究 [D]. 长春:吉林农业大学, 2011.
- [4] 陶海腾,王文亮,程安玮,等. 芦荟皮的营养价值及开发应用 [J]. 农产品加工·学刊, 2011(8): 116—117.
- [5] 张 亮. 莲子 β -葡萄糖苷酶特性及其对荷叶饮料增香作用的研究 [D]. 武汉:华中农业大学, 2008.
- [6] MAHADEVAN P R, BRUEE E. Glucosidase and Exo-Glucanases [J]. Archives of chemistry, 1964(8): 22—29.
- [7] 李建武,余瑞元. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京:北京大学出版社, 1994: 171—223.
- [8] 陈钧辉,陶 力,朱婉华,等. 生物化学实验 [M]. 5 版. 北京:科学出版社, 2004: 204—205.
- [9] 董尚胜,童启庆. 梔子花中糖苷酶的分离及其与醇系香气形成的关系 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(1): 89—92. .
- [10] GERARDI C, BLANDO F, SANTINO A, et al. Purification and Characterisation of a Beta-Glucosidase Abundantly Expressed in Ripe Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Fruit. [J]. Plant Science An International Journal of Experimental Plant Biology, 2001, 160(5): 795—805.
- [11] 陈 磊. 西梅籽 β -葡萄糖苷酶的分离纯化、性质及固定化研究 [D]. 广州:华南理工大学, 2011.
- [12] 何友文,李 江,王剑锋,等. *Penidiella* sp. HEY-1 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及其酶学性质 [J]. 林产化学与工业, 2011, 31(3): 110—114.
- [13] 宋晓青. 蜡梅花 β -葡萄糖苷酶的活性分析、分离纯化与性质的初步研究 [D]. 武汉:华中农业大学, 2005.
- [14] 张浩忠. 肠球菌中 β -D-葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质研究 [D]. 济南:山东轻工业学院, 2010.
- [15] 李志强,廖祥儒,陆 芳. 碧桃(*Prunus persica* L.)叶中 β -葡萄糖苷酶的分离纯化和某些特性分析 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 359—362.
- [16] 张 喆,赵 红,周兴旺,等. 福寿螺 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及性质的初步研究 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38(2): 287—291.
- [17] KARA H E, SINAN S, TURAN Y. Purification of Beta-Glucosidase from Olive (*Olea europaea* L.) Fruit tissue with Specifically Designed Hydrophobic Interaction Chromatography and Characterization of the Purified Enzyme [J]. Journal

of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences, 2011, 879(19): 1507–1512.

- [18] 孟宪文, 李长彪, 刘长江, 等. 乳酸菌 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及特性研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(11): 116–119.
- [19] 刘 颖, 韩春然, 张 帅, 等. 绿色木霉 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质 [J]. 食品科学, 2014, 35(5): 150–155.
- [20] 詹 萍, 田洪磊, 杜 娟. 库尔勒香梨中 β -葡萄糖苷酶活的测定及不同贮藏条件下活性变化的研究 [J]. 现代食品科技, 2008, 24(11): 1104–1107.

On Isolation, Purification and Characterization of β -Glucosidase from Leaf Skin of *Aloe Vera*

LI Rui-jia, LIAO Hai-jun, BAI Ya-juan,
TAO Min, TANG Jing, TANG Yun-ming

Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education,

Chongqing Sweet Potato Engineering Research Center, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Electrophoresis-purity β -Glucosidase from leaf skin of *Aloe vera* has been obtained through homogenization, citrate buffer extraction, ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sepharose fast flow chromatography and Superdex-200 prep grade chromatography. After purification, the result shows that the specific activity of β -Glucosidase is 98.48 U/mg, with a 328.27-fold purification and a 9.87% activity recovery. The relative molecular weight of the β -Glucosidase is approximately 69.3 kD, in which the subunit molecular mass is roughly 69.7 kD. The enzymatic properties illustrated that the optimum temperature and pH for the β -Glucosidase are 40 °C and 5.0, respectively. This enzyme is stable at 20–30 °C and at pH 4.0–8.0. Its apparent K_m and V_{max} are 2.21 mmol/L and 1.381 μ mol/(min · L) towards pNPG. The enzyme activity of β -Glucosidase could be activated by ethanol, ascorbic acid, Mn^{2+} , K^+ , and strongly inhibited by SDS, Cu^{2+} . Isopropanol, EDTA, urea, Mg^{2+} , Li^+ had little activation for it. Methanol has a dual effect on this enzyme.

Key words: leaf skin of *Aloe vera*; β -Glucosidase; isolation and purification; enzymatic properties

责任编辑 周仁惠