

诺卡氏菌属 GS-17 耐热茁霉多糖酶的提纯和性质*

鲍东辉 王政一 杨寿钧 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 诺卡氏菌属 GS-17 (*Nocardia* sp. GS-17) 的耐热茁霉多糖酶 (Pullulanase EC. 3. 2. 1. 41) 的粗酶液经中空纤维柱超滤浓缩、羟基磷灰石柱层析和 Pullulan-Sepharose 6B 亲和层析, 得到凝胶电泳均一的纯酶, 比活提高 264 倍。酶作用最适温度为 55℃, 最适 pH 6. 2, 分子量 140000, 等电点 pI 为 6. 0。该酶水解茁霉多糖、支链淀粉和可溶性淀粉, 但不水解糖原。酶在 50℃ 作用于茁霉多糖的米氏常数 K_m 为 0. 90mg/ml, 最大反应速度 V_{max} 为 $57\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。Zn²⁺、Fe³⁺、Hg²⁺、Cu²⁺、Pb²⁺ 和环状糊精对酶有抑制作用, Ca²⁺ 对酶有激活作用。经蛋白质侧链化学修饰研究表明, 色氨酸残基位于酶的活性位区。该酶是由 1129 个氨基酸残基组成的单肽链, 酶的 N 末端序列经测定为, Ala-Gly-His-Gly-Pro-Asp-Val-Gln-Asp-Gly-
关键词 诺卡氏菌属 GS-17, 茁霉多糖酶, 提纯和性质

茁霉多糖酶 (Pullulanase EC. 3. 2. 1. 41) 专一性水解茁霉多糖、淀粉和支链淀粉分子中的 α -1, 6-糖苷键, 它与其它淀粉酶联合作用时能提高淀粉的水解率, 也可作为工具酶用于碳水化合物结构研究。耐热茁霉多糖酶在高温下有良好的热稳定性和较高活力, 在淀粉工业中有重要的应用价值。近年来已从不同的嗜热微生物中分离了耐热茁霉多糖酶^[1-6], 对其性质进行了研究。

我们实验室从土壤中分离到一株产胞外茁霉多糖酶的菌种 GS-17, 经本所鉴定为诺卡氏菌属 (*Nocardia* sp.), 并进行了酶的提纯及性质的研究。

1 材料和方法

1. 1 培养基和细胞培养

培养基成份 (g/L) 为: 马铃薯淀粉 10, 大豆蛋白胨 10, NH₄Cl 5, NaCl 5, MgSO₄ · 7H₂O 1, K₂HPO₄ 1, FeSO₄ · 7H₂O 0. 01, pH 7. 0—7. 2。

将菌种接种于上述培养基中, 于 50℃ 200r/min 的高温摇床中培养 24 小时, 4℃ 4000r/min 离心除去菌体, 清液作为粗酶液存放于 4℃ 的冰箱中。

- * 本课题得到国家自然科学基金资助。

本文引用缩写名词,

DEPC: Diethylpyrocarbonate

NEM: N-Ethylmaleimide

NAI: N-Acetylimidazole

EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride

NBS: N-bromosuccinimide

本文于 1992 年 12 月 14 日收到。

1.2 酶活力的测定

酶活测定用 3,5-二硝基水杨酸法^[7]。0.5ml 2%的苗霉多糖溶液,0.1ml 醋酸缓冲液(0.1mol/L, pH5.8)0.3ml 蒸馏水混合均匀,在 50℃水浴中预热 5 分钟,加 0.1ml 经适当稀释的酶液,50℃反应 30 分钟,沸水中煮 10 分钟终止反应。再加入 3ml 3,5-二硝基水杨酸试剂,100℃沸水中显色 15 分钟,冷却至室温并加 20ml 蒸馏水,在 550nm 测定光吸收度。在上述条件下每分钟产生 1 μ mol 的还原糖(以葡萄糖为标准)所需的酶量为一个酶活力单位。

1.3 其它分析方法

蛋白质测定用 Lowry 法^[8],以牛血清白蛋白为标准。聚丙烯酰胺凝胶电泳参考 Davis 法^[9]。分子量测定用 SDS 凝胶电泳法^[10]。等电点测定用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦法^[11]。糖的分离及鉴定用薄层层析法,用苯胺-二苯胺显色剂显色^[12]。

1.4 化学试剂

苗霉多糖、 α -、 β -及 γ -环状糊精为日本林原公司产品,标准分子量试剂盒、等电聚焦标准蛋白质、载体两性电解质(Pharmalyte pH3-10)、Sephacrose 6B 均为 Pharmacia 公司产品,1,4-丁二醇二缩水甘油醚(1,4-butanediol diglycidyl ether)、直链淀粉、支链淀粉、DEPC 为 Sigma 公司产品,NEM、NAI、EDC 为 E. Merck 公司产品,NBS 为北京化工厂产品,羟基磷灰石为中国科学院上海生化所产品,其余化学试剂均为分析纯。

2 结果和讨论

2.1 酶的提纯

粗酶液经中空纤维超滤器浓缩至原体积的 1/10,于 4℃ 10000r/min 离心 10 分钟除去沉淀,清液对磷酸缓冲液(5mmol/L, pH7.0)透析。

透析后的酶液上样于经相同缓冲液充分平衡过的羟基磷灰石柱(1.6 \times 20cm),起始缓冲液洗去未吸附的蛋白,400ml 起始缓冲液和 0.2mol/L 相同 pH 磷酸缓冲液梯度洗脱,流速 20ml/h,每 30 分钟收集一管,活力部分超滤浓缩后对 20mmol/L 醋酸缓冲液(pH5.8)透析。结果见图 1。

Pullulan-Sepharose 6B 由环氧化 Sepharose 6B 和苗霉多糖连接得到。环氧化 Sepharose 6B 参照 Lars Sundberg 的方法制备。将 10g Sepharose 6B 蒸馏水洗涤抽干,加 10ml 1,4-丁二醇二缩水甘油醚和 10ml 0.6mol/L NaOH(含 20mg 硼氢化钠),于 25℃ 100r/min 摇床反应 8 小时,蒸馏水洗涤终止反应。环氧化的 Sepharose 6B 浸泡于 60ml 碳酸钠缓冲液(0.1mol/L pH11.0),加 60ml 4%苗霉多糖溶液(于 pH11.0 的碳酸钠缓冲液),40℃摇床中反应 16 小时,pH11.0 碳酸钠缓冲液、蒸馏水充分洗涤,抽干后加 50ml 氨基乙酸溶液(1mol/L pH10.0),30℃保温过夜除去未反应的环氧基,蒸馏水充分洗涤后装柱(2.5 \times 10cm),用醋酸缓冲液(20mmol/L, pH5.8)平衡。

羟基磷灰石柱层析后的酶液上样于 Pullulan-Sepharose 6B 亲和层析柱,流速 5ml/h。起始缓冲液、1mol/L NaCl 溶液洗柱后,用 1%的苗霉多糖溶液(溶于起始缓冲液)洗脱,收集有活力的部分,结果见图 2。

提纯后的酶加 1mol/L 的 CaCl₂ 至终浓度为 5mmol/L,45℃保温过夜、超滤浓缩并对

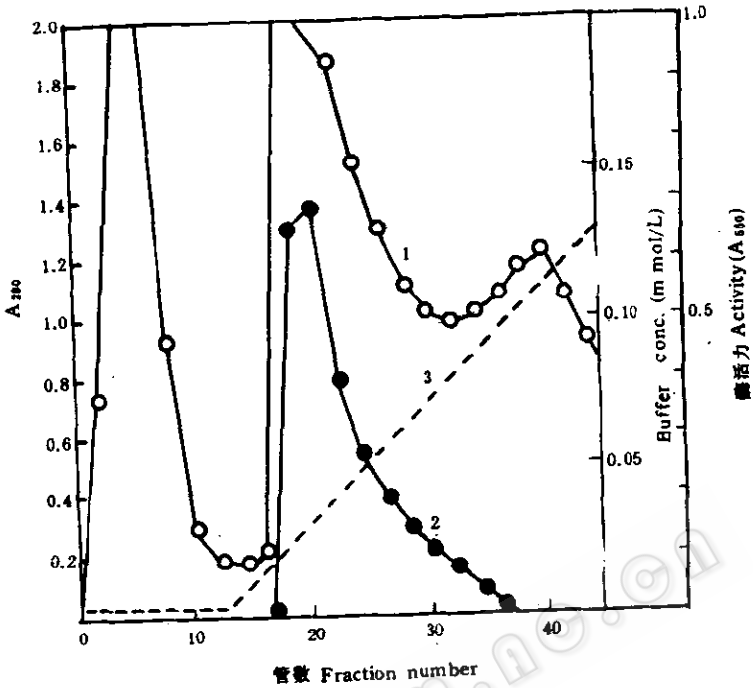


图 1 茁霉多糖酶的羟基磷灰石柱层析

Fig.1 Chromatography of pullulanase on hydroxyapatite

- 1. 280nm 吸光度 A_{280} ;
- 2. 茁霉多糖酶活力 Activity;
- 3. 磷酸缓冲液浓度 Concentration of phosphate buffer.

蒸馏水充分透析得纯酶液。各步提纯结果见表 1。粗酶液经过提纯,比活提高 264 倍,酶活回收率为 33%,经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为均一蛋白质。

表 1 耐热茁霉多糖酶的提纯

Table 1 Purification of thermostable pullulanase

提纯步骤 Step	体积 Volume (ml)	总酶活 Total activity (unit)	总蛋白 Total protein (mg)	比活 Specific activity (u/mg)	酶活回收率 Activity recovery (%)	提纯 Purification fold
粗酶液 Crude enzyme	384	284	1422	0.20	100	1.0
超滤浓缩液 Ultrafiltration	46.7	233	273	0.85	82	4.25
羟基磷灰石柱层析 Hydroxyapatite chromatography	213.3	201	87.3	2.30	70.8	11.5
亲和层析 Affinity chromatography	37.5	93	1.76	52.8	33	264

2.2 酶的性质

2.2.1 酶作用的最适温度和最适 pH:在不同温度或 pH 条件下测定酶活力,酶作用的最适温度为 55℃,最适 pH 值为 6.2。

2.2.2 酶的热稳定性:酶液在 10mmol/L pH5.8 醋酸缓冲液(含 5mmol/L CaCl₂)中,不同温度下保温 30 分钟后测定剩余酶活力,以不经保温时的活力为 100%,测得 50℃的剩余活力为 96%,55℃时为 85%,60℃时仅存 9%。

2.2.3 酶的 pH 稳定性:酶液和不同 pH 值缓冲液在 30℃保温 30 分钟后,用 0.2mol/L pH5.8 的醋酸缓冲液调回 pH,测定酶活力。该酶在 pH5.5—7.6 范围内稳定。

2.2.4 酶的底物专一性及水解产物鉴定:以不同的碳水化合物为底物,测定酶的相对活力,以茁霉多糖为底物时为 100%(表 2)。酶水解不同底物(1%底物、10mmol/L pH5.8 醋酸缓冲液、0.1μ 的纯酶),50℃反应 12 小时,产物在硅胶板上用正丁醇、乙酸、水(2:1:1)展开,苯胺-二苯胺显色剂显色(图 3)。

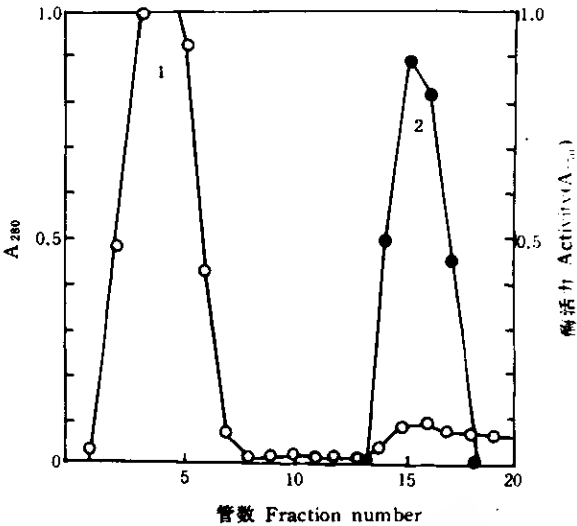


图 2 茁霉多糖酶的亲和层析
Fig. 2 Affinity chromatography of pullulanase on pullulan-Sepharose 6B
1. 吸光度 A₂₈₀; 2. 茁霉多糖酶活力 Activity.

表 2 茁霉多糖酶的底物特异性
Table 2 Substrate specificity of pullulanase

底物		相对活力
Substrate		Relative activity(%)
茁霉多糖	Pullulan	100
支链淀粉	Amylopectin	40.5
可溶性淀粉	Soluble starch	35.0
直链淀粉	Amylose	8.0
糖原	Glycogen	4.2

诺卡氏菌 GS-17 茁霉多糖酶水解茁霉多糖、支链淀粉和可溶性淀粉而不水解糖原和直链淀粉。水解茁霉多糖的产物为麦芽三糖及少量麦芽六糖。Plant^[14]曾报道嗜热厌氧菌(*Thermoanaerobium* Tok6-B1)的茁霉多糖酶可水解茁霉多糖分子中的 α-1,6 糖苷键,还可

以水解直链淀粉和支链淀粉分子中的 α -1,4 糖苷键得到寡聚麦芽糖(DP2—DP4)。而诺卡氏菌 GS-17 茁霉多糖酶不水解直链淀粉,水解支链淀粉产物中没有低分子量多糖,表明该酶只作用于底物中的 α -1,6 糖苷键,而不作用于 α -1,4 键。

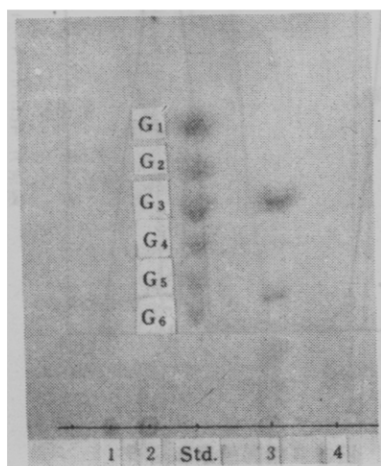


图3 茁霉多糖水解不同底物的硅胶薄层色谱
1. 直链淀粉;2. 支链淀粉;3. 茁霉多糖;4. 可溶性淀粉;std. 为标准寡糖混合物(G_1-G_6)。 $G_1, G_2, G_3, G_4, G_5, G_6$ 分别为葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖和麦芽六糖。

Fig. 3 Thin-layer chromatography of hydrolysis products produced from different substrates by purified pullulanase

Lane 1, amylose; lane 2, amylopectin; lane 3, pullulan; lane 4, soluble starch. Abbreviations: std., standard mixture of oligosaccharides (G_1-G_6). $G_1, G_2, G_3, G_4, G_5, G_6$ are glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose and maltohexaose respectively.

2.2.5 酶作用于茁霉多糖的米氏常数和最大反应速度:以茁霉多糖为底物,在不同浓度下测定酶活力,以活力表示反应速度,按 Woolf-Hofstee 法作图。该酶作用于茁霉多糖的米氏常数 K_m 为 0.90mg/ml 。最大反应速度 V_{max} 为 $57\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

2.2.6 酶的分子量:酶的分子量用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定,由标准蛋白对照得到茁霉多糖酶的分子量为 $140\,000$ (图4)。

2.2.7 酶的等电点 pI:用聚丙烯酰胺薄层凝胶等电聚焦法测定,两性载体 pH3-10。酶的等电点 pI 为 6.0 。

2.2.8 不同金属离子及碳水化合物对酶活力的影响:在有金属离子及其它试剂存在下测定酶活力,以纯酶活力为 100% 计算相对活力。 1.0mmol/L 的 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 对酶有强烈抑制作用,酶的剩余活力不足 10% , 1.0mmol/L 的 Ca^{2+} 对酶有最大激活作用,酶的剩余活力为 105% 。 α -、 β -、 γ -环状糊精对酶活力有一定抑制作用,其中 γ -环状糊精作用较大,在浓度为 10mmol/L 时酶的剩余活力约为 50% 。

2.2.9 不同蛋白质侧链化学修饰剂对酶活力的影响:酶液和不同的蛋白质侧链化学修饰剂于 30°C 保温 30 分钟,以不加修饰剂的酶活力为 100% ,在标准条件下测定剩余活力(表3)。经不同浓度的 NBS 修饰的酶液测定其荧光发射光谱,激发光波长为 280nm (图5)。结果表明巯基修饰剂 NEM,酪氨酸修饰剂 NAI,组氨酸修饰剂 DEPC 在浓度为 10mmol/L 时对酶活无明显抑制作用,羧基修饰剂 EDC 对酶有一定抑制作用。色氨酸修饰剂 NBS 对酶活有强烈抑制作用,随着 NBS 浓度增加,酶的剩余活力降低,位于 335nm 的色氨酸残基荧光发射峰也相应降低,当 NBS 为 $10\mu\text{mol/L}$ 时仅有 6.4% 的原始酶活力, 335nm 处的荧光发射峰也消失。由于受酶 pH 稳定范围限制, NBS 修饰的反应条件选为 pH5.0,此时副反应增加,通过测定色氨酸残基的荧光发射光谱证实色氨酸残基为酶活所必需的基团。

表 3 蛋白质侧链化学修饰剂对酶活力的影响
Table 3 Effect of modification reagents on the activity of pullulanase

试剂 Reagent	浓度 Concentration	反应条件 Condition	相对活力 Relative activity (%)
None	—	—	100
NEM	10mmol/L	50mmol/L phosphate buffer pH8.0	90
NAI	10mmol/L	50mmol/L phosphate buffer pH8.0	95
DEPC	10mmol/L	50mmol/L phosphate buffer pH6.0	79
EDC	10mmol/L	20mmol/L TEMED-HCl+10mmol/L glycine ethyl ester pH5.0	69
NBS	1.0μmol/L	50mmol/L acetate buffer pH5.0	97
	2.5μmol/L	50mmol/L acetate buffer pH5.0	84
	5.0μmol/L	50mmol/L acetate buffer pH5.0	61
	10μmol/L	50mmol/L acetate buffer pH5.0	6.4

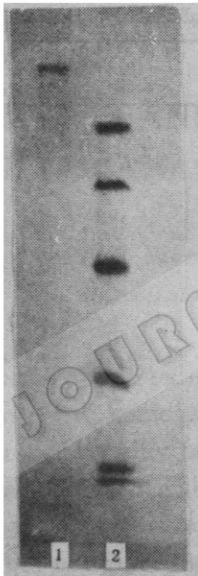


图 4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定酶分子量

1. 苗霉多糖酶;2. 标准蛋白质

Fig. 4 Molecular weight determination of pullulanase by SDS-PAGE

1. Pullulanase; 2. Standard marker proteins; phosphorylase b (94000), albumin (67000), ovalbumin (43000), trypsin inhibitor (20000), α -lactalbumin (14000).

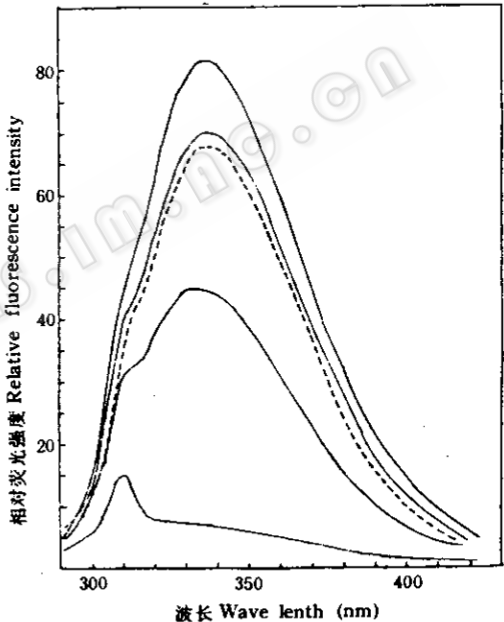


图 5 苗霉多糖酶经 NBS 修饰后的荧光光谱

Fig. 5 Fluorescence spectra of pullulanase after NBS modification

——酶加不同量的 NBS 保温 30 分钟后的荧光光谱, NBS 浓度由上至下依次为 0, 1.0, 5.0, 10.0 μmol/L.

Fluorescence spectra of pullulanase after reacted with NBS for 30min. NBS concentration; 0, 1.0, 5.0 and 10.0 μmol/L, down ward;

---有 0.5% 的苗霉多糖保护时的荧光光谱, NBS 浓度为 5 μmol/L

Fluorescence spectra of pullulanase protected by 0.5% pullulan (NBS concentration was 5 μmol/L).

为进一步确定色氨酸残基与酶活性的关系,我们进行了底物保护试验。在有不同底物保护下测定 $10\mu\text{mol/L}$ 的 NBS 对酶活力的影响,以不加修饰剂的酶液为对照,酶的剩余活力随底物浓度增加而增加,当底物浓度为 0.5% 时,剩余酶活力为 76%。这些结果表明色氨酸残基位于酶的活性位区。许多文献^[15-17]也报道色氨酸残基对霉菌多糖酶的活性是必需的。在我们的实验条件下羧基修饰剂 EDC 对酶活抑制作用不强烈,这可能与反应时 pH 偏高有关。

2.2.10 酶的氨基酸组成:酶样品约 $100\mu\text{g}$, 110°C 盐酸水解 24 小时,用 Beckman 121MB 型氨基酸分析仪测定其氨基酸组成。Gln 与 Glu 合计为 Glu, Asp 与 Asn 合计为 Asp。Trp 未测定。结果见表 4。Suzuki 等人^[5]分析了几种不同来源的霉菌多糖酶的氨基酸组成与热稳定性的关系,认为酶分子内脯氨酸含量与酶的热稳定性有线性关系。诺卡氏菌 GS-17 的霉菌多糖酶的脯氨酸及疏水氨基酸含量少,这可能是该酶热稳定性不高的原因之一。

表 4 霉菌多糖酶的氨基酸组成

Table 4 Amino acid composition of pure pullulanase

氨基酸 Amino acid	摩尔百分含量 mol%	残基数 Residues
Asp	9.51	110
Thr	5.32	61
Ser	14.98	173
Glu	12.81	148
Pro	3.59	41
Gly	13.55	156
Ala	7.32	83
Val	3.36	39
Met	3.06	35
Ile	6.87	79
Leu	5.76	66
Tyr	2.37	27
Phe	2.34	28
Lys	4.46	51
His	2.80	32
Arg	1.91	22

2.2.11 酶的 N 末端序列分析:纯酶样品约 $30\mu\text{g}$, 用 Edman 降解法, Applied Biosystem 477A 蛋白质序列分析仪测得酶的 N 末端序列为 Ala-Gly-His-Gly-Pro-Asp-Val-Gln-Asp-Gly-。

致谢 本所细菌室刘志恒同志帮助鉴定菌种,技术室徐军同志帮助测定荧光光谱,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Hyun H H *et al*, *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49:1174-1181.

- [2] Kock R *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, **27**:192—198.
- [3] Madi E *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**:1161—1167.
- [4] Odibo F J C *et al.* *J Ind Microbiol*, 1988, **3**:343—350.
- [5] Suzuki Y *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, **34**:707—714.
- [6] Plant A R *et al.* *Enzyme Microbiol Technol*, 1986, **8**:668—672.
- [7] Reese E T *et al.* *Methods in carbohydrate chemistry*. Whistler R L ed. Academic Press. 1963. 139.
- [8] Lowry O *et al.* *J Biol Chem*, 1951, **193**:265—275.
- [9] Davis B J. *Ann N Y Acad Sci*, 1969, **121**:404.
- [10] Weber K *et al.* *J Biol Chem*, 1969, **244**:4406.
- [11] 杨寿钧. 聚丙烯酰胺凝胶薄层等电聚焦. 见:张树政等主编. 酶学研究技术. 北京:科学出版社, 1987. 307.
- [12] 戈苏国, 等. 糖的纸色谱. 见:张惟杰主编. 复合多糖生化研究技术. 上海:上海科学技术出版社, 1987. 12.
- [13] Sundberg L *et al.* *J Chromatogr*, 1974, **90**:87—98.
- [14] Plant A R *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, **26**:427—433.
- [15] 杨寿钧, 戈苏国, 张树政. 微生物学报, 1981, **21**(1):68—72.
- [16] Saha B C *et al.* *Biochem J*, 1988, **252**:343—348.
- [17] Saha B C *et al.* *Appl Environ Microbiol* 1990, **56**(4):881—886.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF THERMOSTABLE PULLULANASE FROM *NOCARDIA* SP. GS-17

Bao Donghui Wang Zhengyi Yang Shoujun Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract A thermostable pullulanase (EC. 3. 2. 1. 41) from a thermophile, *Nocardia* sp. GS-17, was purified to homogeneous by ultrafiltration, hydroxyapatite chromatography and affinity chromatography on pullulan-Sepharose 6B. The enzyme was purified 264-fold. The enzyme had a molecular weight of 140 000 by SDS-PAGE. The isoelectric point was pH6.0. The enzyme hydrolized α -1, 6 glucosidic linkages of pullulan, amylopectin, soluble starch, but not glycogen. The K_m and V_{max} values for enzyme activity on pullulan at 50°C were 0.90mg/ml and $57\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively. The optimum temperature and pH for activity were 55°C and 6.2, respectively. The enzyme was activated by Ca^{2+} and strongly inhibited by Zn^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} and γ -cyclodextrin. Modification of the enzyme with $10\mu\text{mol/L}$ NBS led to loss of the activity and substrate could protect the enzyme from NBS inactivation. These suggested that tryptophan residue may be located at the binding site of the enzyme. The amino acid composition and N-terminal sequence of the enzyme was determined. The N-terminal sequence was Ala-Gly-His-Gly-Pro-Asp-Val-Gln-Asp-Gly-.

Key words *Nocardia* sp. GS-17, Pullulanase, Purification and properties