

诺卡氏菌形放线菌 β -甘露聚糖酶的纯化和性质*

吴 襟 何秉旺

(中国科学院微生物资源前期开发国家重点实验室 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:产 β -1, 4-D-甘露聚糖酶的诺卡氏菌形放线菌 (*Nocardioform actinomycetes*) 菌株 NA3-540, 发酵培养 72h, 发酵液离心去菌体, 上清经硫酸铵沉淀, 95% 乙醇沉淀, CM-Sephadex A50 柱层析、羟基磷灰石柱层析、DEAE-纤维素离子交换及 Sephadex G-100 分子凝胶过滤柱等步骤, β -甘露聚糖酶的比活提高了 137 倍, 获得凝胶电泳均一的蛋白样品。经 SDS-PAGE 和凝胶过滤法分别测定 β -甘露聚糖酶分子量为 41kD 和 40kD, 证明该酶为单聚体; 用等电聚焦电泳测得其等电点为 4.8; 经氨基酸组成分析, 发现蛋白中有较高含量的 Gly、Asp、Ala 及 Glu 残基。该酶的最适反应温度为 75 $^{\circ}$ C, 在不超过 60 $^{\circ}$ C 时酶活较稳定; 酶反应的最适 pH 为 8.0, pH 稳定范围为 6.5~11.0。重金属离子 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 能强烈抑制该酶活性, 而 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ag^{+} 对该酶有部分的抑制作用, 低浓度的 Na^{+} 、 K^{+} 、 Li^{+} 对该酶基本没有影响。

关键词: β -甘露聚糖酶, 纯化和性质, 诺卡氏菌形放线菌

中图分类号: Q559 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2000) 01-0069-74

β -1, 4, -D-甘露聚糖酶 (β -1, 4-D-mannan mannanohydrolase, EC. 3. 2. 1. 78), 又简称为 β -甘露聚糖酶 (β -mannanase), 是一类能够水解含有 β -1, 4-D-甘露糖苷键的甘露寡糖、甘露多糖 (包括甘露聚糖、半乳甘露聚糖、葡甘聚糖等) 的内切水解酶^[1], 它属于半纤维素酶类。 β -甘露聚糖酶来源广泛, 在动物、植物、微生物中都发现有该酶的存在。已报道的产 β -甘露聚糖酶的微生物类群包括: 细菌中的芽孢杆菌^[2~4]、假单胞菌^[5]、弧菌^[6], 真菌里的曲霉^[7]、木霉^[8]、酵母^[9]、青霉^[10]、梭孢菌^[11]、多孔菌^[12] 和放线菌中的链霉菌^[13] 等。

随着近来对自然界半纤维素资源的开发和甘露寡糖药用价值的发现, β -甘露聚糖酶的研究和开发进入一个新高潮, 它已在食品、医药、造纸、纺织印染、石油开采及生物技术等多方面得到了广泛运用。如本实验室筛选的诺卡氏菌形放线菌产生的 β -甘露聚糖酶用于低温 (30 $^{\circ}$ C ~ 60 $^{\circ}$ C) 油井石油压裂液的生物破胶剂, 具有效率高, 成本低, 对地层伤害小, 配胶工艺简便等优势, 很好地解决了我国低温油井压裂液破胶的难题, 在实际生产中取得了巨大的综合效益。诺卡氏菌形放线菌产 β -甘露聚糖酶国际上目前尚无报道。

1 材料和方法

1.1 菌种与培养

从油井附近采集泥土样品, 经分离、筛选、亚硝基胍和紫外线复合诱导处理, 获得产 β -

* 国家“八五”科技攻关项目部分内容 (85-722-14-02)

作者简介: 吴 襟 (1972-), 男, 江苏扬州人, 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室助理研究员, 硕士, 主要从事酶学研究

收稿日期: 1998-07-10, **修回日期:** 1999-01-26

甘露聚糖酶的高活力菌株 NA3-540, 经初步鉴定为诺卡氏菌形放线菌 (*Nocardioform actinomycetes*)。摇瓶发酵培养基组成为: 田菁粉 0.2g, 蛋白胨 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03g, 定容至 1L, pH8.0, 250mL 摇瓶装 50mL 上述培养基, 灭菌后接种, 于 30℃, 200r/min 振荡培养 3d, 收集发酵液。

1.2 主要试剂

槐豆胶 (Sigma); Sephadex G-100, CM-Sephadex A50 (Pharmacia); DEAE-纤维素 DE32 (Whatman); 羟基磷灰石、标准分子量蛋白 (中国科学院上海生物化学研究所); 两性电解质载体 (Ampholine 40%) (军事医学科学院); 其他试剂均为分析纯。

1.3 酶活力测定

按 Akino 的方法^[4]作适当变化进行测定, 以 0.9mL 缓冲液 A (0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH8.0) 配制的 0.5% (W/V) 槐豆胶作底物, 加入 0.1mL 酶液, 60℃ 保温 10min, 用 DNS 法测产生的还原糖量。酶活定义为在上述反应条件下, 每分钟产生相当于 1 μmol 甘露糖的还原糖所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.4 蛋白质测定

按 Bradford 方法^[14]和 A_{280} 比色法, 以牛血清白蛋白绘制标准曲线。

1.5 蛋白中糖含量的测定

按地衣酚-硫酸法^[15]测定。

1.6 电泳分析

分子量的测定参照 Laemmli^[16] 的 SDS-凝胶电泳方法; 用等电聚焦电泳方法测定等电点^[17]。

1.7 酶的氨基酸组成分析

5.7mol/L 盐酸 110℃ 水解 24h, 用氨基酸自动分析仪 (Beckman AAA6300) 进行分析; 色氨酸的残基测定采用 Spanda 等的 NBS 滴定法^[18]。

1.8 酶的分离和纯化

全部操作均在 4℃ 进行。发酶液 6000r/min 离心 10min 去菌体, 所得上清液为粗酶液, 向其中缓慢加入硫酸铵至 35% 饱和度, 静置 8h 后, 10000r/min 离心 20min 去沉淀, 上清液中继续加入硫酸铵至 60% 饱和度, 静置 8h 后, 10000r/min 离心 20min 收集沉淀, 用少量缓冲液 A 溶解并用相同缓冲液透析过夜。透析液用 95% 乙醇分级沉淀 (分别加入 0.4~1.4 体积的乙醇, $[\text{Mg}^{2+}] = 10\text{mmol/L}$, 10000r/min 离心 10min), 所得沉淀溶于少量缓冲液 B 中 (0.02mol/L 磷酸缓冲液, pH8.0) 并透析过夜。将透析液上 CM-Sephadex A50 柱 (1.8cm × 45cm), 缓冲液 B 洗脱, 流速 18 mL/h, 收集有酶活力的部分, 上羟基磷灰石柱 (1.2cm × 15cm), 先用 0.05mol/L 磷酸缓冲液 (pH8.0) 充分淋洗, 再用 0.06mol/L (pH8.0) ~ 0.35mol/L (pH10) 的磷酸缓冲液梯度洗脱, 流速 8mL/h, 活力部分经浓缩后用缓冲液 A 透析过夜, 上 DEAE-纤维素柱 (1.2cm × 20cm), 用含有 0.2mol/L ~ 1.0mol/L NaCl 的缓冲液 A 进行直线梯度洗脱, 流速 8mL/h, 收集酶活力部分用缓冲液 A 透析过夜, 上 Sephadex G-100 层析柱 (2.6cm × 100cm), 再用相同缓冲液洗脱, 流速 10mL/h, 收集有酶活力的部分, 冷干后置于 4℃ 冰箱中保存。

2 结果

2.1 β -甘露聚糖酶的分离纯化

在酶的纯化过程中,先后采用了硫酸铵盐析沉淀、有机溶剂沉淀、羟基磷灰石柱层析、DEAE-纤维素离子交换柱层析、Sephadex G-100 分子凝胶过滤柱层析等方法,最终酶的比活提高了 137 倍,酶活回收率为 25.8%。酶蛋白样品进行凝胶电泳为一条带。以上各步提纯结果列于表 1。

表 1 诺卡氏菌形放线菌 NA3-540 β -甘露聚糖酶的纯化

Table 1 Purification of β -mannanases from Nocardioform actinomycetes NA3-540

Purification step	Total Volume/mL	Total activity/U	Total protein/mg	Specific activity/(U/mg)	Purification /fold	Recovery/%
Crude enzyme	440	21292	1474	14.9	/	/
(NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitation	33	20229	306	66.2	4.4	95.0
95% alcohol precipitation	12	15779	58.4	270	18.0	74.1
CM-Sephadex A50	52	15620	49	318.6	21.2	73.4
Hydroxyapatite	120	11560	14.8	780.7	51.9	54.3
DEAE-Cellulose	180	6774	4.27	1585	105.4	31.8
Sephadex G-100	60	5488	2.67	2053.3	137.0	25.8

2.2 酶的基本性质

2.2.1 分子量、等电点及糖含量的测定:用 SDS-PAGE 和葡聚糖凝胶柱层析法^[16]测出 β -甘露聚糖酶的分子量分别为 41kD 和 40kD (图 1);用 PAGEIEF 法测定酶的等电点为 4.8;用地衣酚-硫酸法测定酶蛋白中糖含量为 3.5%。

2.2.2 氨基酸组成:如表 2 所示,含量最高的氨基酸残基依次为 Gly > Asp > Ala > Glu, 它们的百分含量之和为 40%。

2.2.3 金属离子对酶活的影响:100mmol/L 的金属离子溶液与酶液在 30℃ 保温 1h 后,按标准条件测定酶活力,以未加金属离子的酶液的酶活力为 100%。结果表明(见表 3):在正常条件下,重金属离子 Hg²⁺、Pb²⁺、Cu²⁺ 等对 β -甘露聚糖酶有强烈的抑制作用,而 Na⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Ba²⁺ 等离子对酶活基本没有影响。

2.2.4 pH 和温度对酶活力和稳定性的影响:pH 8.0 时,在不同温度条件下测定 β -甘露聚糖酶活力,获得温度—活力曲线(图 2-A);将酶液在不同温度中分别保温 30~180min 后,测定残余酶活力,以未保温的酶液活力为 100%,获得温度—稳定性曲线(图 2-B)。

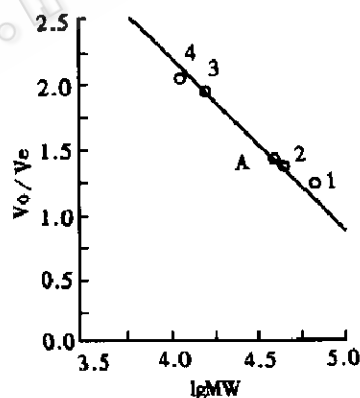


图 1 Sephadex G-100 柱层析测定 β -甘露聚糖酶分子量

Fig. 1 Determination of molecular weight of β -mannanases by Sephadex G-100 column chromatography

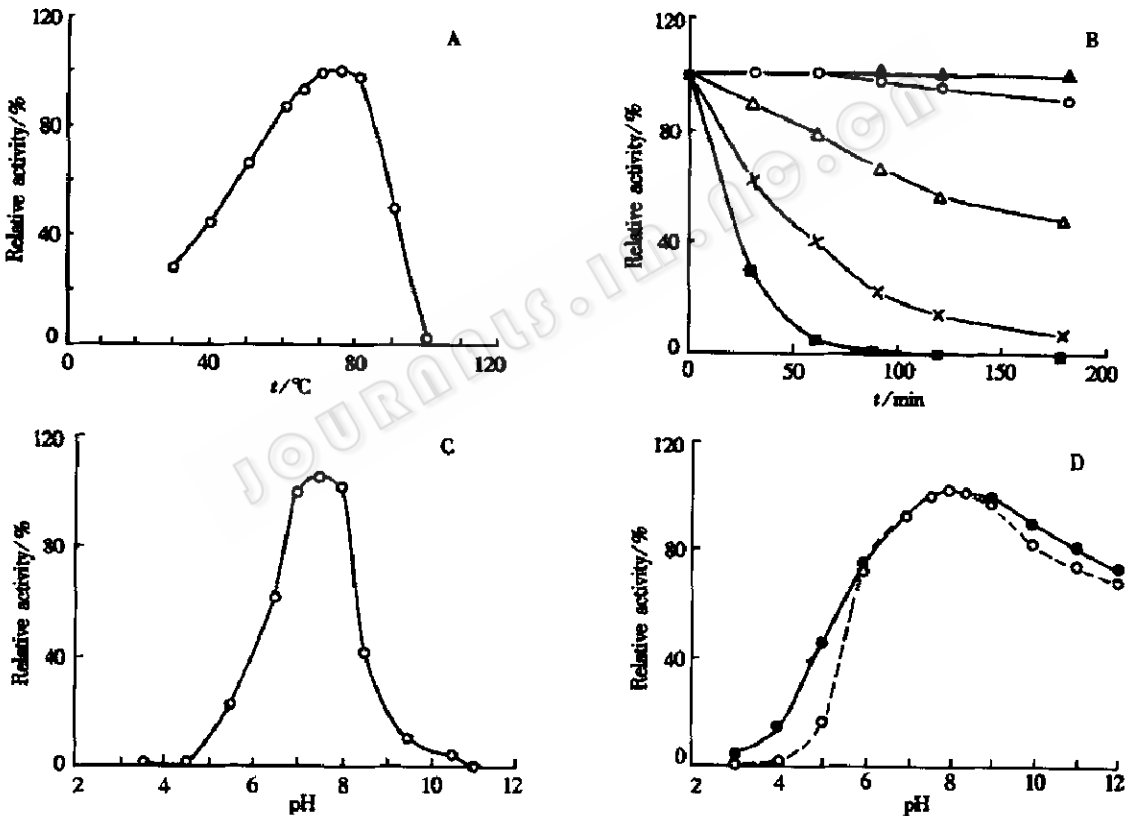
1. Bovine serum Albumin(66.2kD);
2. Chicken Ovalbumin(44kD);
3. Equine myoglobin(17kD);
4. Cytochrome C(13kD);
- A. β -mannanase.

表2 β -甘露聚糖酶的氨基酸组成Table 2 Amino acid composition of β -mannanase

Amino acid	Residues/mol	Amino acid	Residues/mol
Asp	41	Met	7
Thr	24	Ile	20
Ser	26	Leu	27
Pro	22	Tyr	15
Glu	32	Phe	12
Gly	46	Lys	24
Ala	36	His	11
Val	26	Arg	21
Cys	NT	Trp	12

表3 金属离子对 β -甘露聚糖酶活力的影响Table 3 Effect of various metal ions on β -mannanases activity

Metal ion	Relative activity/%	Metal ion	Relative activity/%
1.0 mmol/L		1.0 mmol/L	
-	100	Mn ²⁺	36.5
Na ⁺	106	Ag ⁺	38.8
Li ⁺	100.3	Hg ⁺	9.6
Mg ²⁺	99	Co ²⁺	11.5
Ca ²⁺	106	Pb ²⁺	1.3
Ba ²⁺	97	Zn ²⁺	2.7
K ⁺	90.5	Fe ³⁺	9.5
Fe ²⁺	40.9	Cu ²⁺	2.9

图2 pH和温度对 β -甘露聚糖酶活力和稳定性的影响Fig. 2 Effects of pH and temperature on activities and stabilities of β -mannanases

A. Enzyme activities at various temperatures; B. Enzyme stabilities at various temperatures;

C. Enzyme activities at various pH; D. Enzyme stabilities at various pH.

—◆— 50°C; —○— 60°C; —△— 65°C; —×— 70°C; —■— 80°C.

60°C时,在不同pH条件下测定 β -甘露聚糖酶活力,获得pH—活力曲线(图2-C);将酶液在不同pH条件下分别在50°C、60°C保温30min,测定残余酶活力,以未处理的原酶液活力为100%,获得pH—稳定性曲线(图2-D)。

3 讨论

诺卡氏菌形放线菌菌株 NA3-540 产生的 β -1, 4-D-甘露聚糖酶的分子量在 40kD~41kD 左右, 为单聚体; 等电点 pI 为 4.8, 偏酸性; 槐豆胶半乳甘露聚糖是该酶比较理想的水解底物; 重金属离子 Hg^{+} 、 Ag^{2+} 等的强烈抑制作用表明了 β -甘露聚糖酶中巯基基团在催化反应中的重要性; 该酶的最适反应温度为 75 $^{\circ}C$, 最适反应 pH 为 8.0; 温度稳定范围为 60 $^{\circ}C$ 以下, pH 稳定范围为 6.5~11.0; 该酶有很好的耐热、耐碱性, 在高温、强碱条件下长时间保存, 活力降低很少。例如其在 60 $^{\circ}C$ 时, pH11 的条件下保存 1h, 残余酶活力仍有 80%, 这预示该酶有着稳定的蛋白高级结构, 是研究蛋白耐热机制的良好材料。

通过研究还发现该酶为糖蛋白, 是目前放线菌类 β -甘露聚糖酶中的首例报道; 这个特点与细菌、植物来源的 β -甘露聚糖酶不同而与真菌来源的相似, 也表明了该酶较为特殊的一面。此外经对比研究发现, 几种不同来源的 β -甘露聚糖酶中 Gly、Ala、Asp、Glu 残基数量都很高, 而且百分含量之和也比较接近: 如来自厌气性真菌 *Piromyces*^[19] 的 β -甘露聚糖酶中四种氨基酸残基百分含量之和为 38.5%, 来自芽孢杆菌 AM-001⁴ 的含量之和为 38%, 来自链霉菌¹³ 的含量之和为 42.5%, 而来自我们诺卡氏菌形放线菌的含量之和则为 40%。据推测, 这几种残基可能属于 β -甘露聚糖酶氨基酸组成中比较保守的成分, 对蛋白质二级结构的形成有重要影响, 这将在我们下一步的工作中深入研究。

参 考 文 献

- [1] Schomburg D, Salmann M. *Enzyme handbook* (4). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1991, 1~5.
- [2] 田新玉, 徐毅, 马延和, 等. 微生物学报, 1993, 32(2): 115~121.
- [3] Hossain M Z, Abe J, Hizukuri S. *Enzyme-Microb Technol*, 1996, 18(2): 95~98.
- [4] Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. *Appl Microbio Biotechnol*, 1987, 26(4): 323~327.
- [5] Yamaura I, Matsumoto T, Funatsu M, et al. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(9): 2425~2427.
- [6] Araki T, Tamaru Y, Morishita T. *J Gen Appl Microbiol*, 1993, 38(4): 343~351.
- [7] Araujo A, Ward O P. *J Ind Microbiol*, 1990, 6(3): 171~178.
- [8] Macarron R, Acebal C, Castillon M P, et al. *Biotechnol Lett*, 1996, 18(5): 599~602.
- [9] Oda Y, tonomura K. *Lett Appl Microbiol*, 1996, 22(2): 173~178.
- [10] Kusakabe I, Zama M, Park G G, et al. *Agric Biol Chem*, 1987, 51(10): 2825~2826.
- [11] Araujo A, Ward O P. *J Ind Microbiol*, 1990, 6(4): 269~274.
- [12] Johnson K G, Ross N W, Schneider H. *World-J Microbiol Biotechnol*, 1990, 6(3): 245~254.
- [13] Arcand N, Kluepfel D, Paradis F W, et al. *Biochem J*, 1993, 290(3): 857~863.
- [14] Marion M B. *Analytical biochem*, 1976, 72: 248~254.
- [15] 戈苏国. 糖蛋白中糖的组成与连接方式的研究方法. 见: 张树政等主编. 酶学研究技术(上册), 北京: 科学出版社, 1987, 277~280.
- [16] 陈曾燮, 刘 兢, 罗 丹编. 生物化学实验. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1994, 32~36.
- [17] Laemmli V K. *Nature*, 1970, 227: 680.
- [18] Spande T F, Withkop B. *Methods in Enzymol*, 1967, 11: 498~506.
- [19] Cristina F, Tamas P, Gary W B, et al. *J Biol Chem*, 1995, 270(49): 29314~29322.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF β -D-MANNANASE FROM *NOCARDIOFORM ACTINOMYCETES**

Wu Jin He Bingwang

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Chinese Academy of Science,
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080)

Abstract: After cultivating in liquid medium for 3 days, an extracellular endo-1,4- β -D-mannanase (EC-3.2.1.78) from a *Nocardioform actinomycetes* strain NA3-540 was purified 137-fold to electrophoretic homogeneity by ammonium sulfate precipitation, 95% alcohol precipitation, CM-sephadex A-50, hydroxyapatite column chromatography, DEAE-cellulose anion-exchange column chromatography and Sephadex G-100 column chromatography. The enzyme had a molecular mass of 41 kDa (by SDS-PAGE) and 40 kD (by gel filtration), a pI of 4.8 (PAGEIEF) and carbohydrates content of 3.5%. The enzyme was optimally active at pH 8 and 75°C and showed stability at pH range of 6.5 to 12 at the temperature below 60°C. The amino acid composition analysis of the enzyme proved that there were large amount of Gly, Asp, Ala and Glu. The enzyme was strongly inhibited by Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Zn^{2+} and partly inhibited by Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ag^+ and slightly inhibited by Na^+ , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} .

Key words: β -D-Mannanase, Purification and properties, *Nocardioform actinomycetes*

* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development(85-722-14-02)