

β -N-乙酰氨基己糖苷酶产生菌的筛选与产酶条件*

严自正 陶 勇 程秀兰 孙晋武 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

筛选了真菌、细菌和放线菌共 1121 株, 其中有 β -HexNAcase 活力的有 237 株, 在所筛选菌中只要有 β -GlcNAcase 活力, 也就有 β -GalNAcase 活力, 但两酶比值 (β -GlcNAcase/ β -GalNAcase) 不同。

所筛选出的溜曲霉 (*Asp. tamarisii*) S215 为由土壤中分离的, 其产酶最适条件为 5% 麸皮液体培养基, 28—30°C 振荡培养 5—6 天, 补充碳源如纤维二糖、葡萄糖胺、半乳糖胺或者补充氮源 (NH_4)₂SO₄ 及 NH_4NO_3 , 可以稍稍提高酶活。在溜曲霉的培养液中除 β -GlcNAcase 及 β -GalNAcase 外, 还有 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、 β -岩藻糖苷酶及 α -甘露糖苷酶。

关键词 β -N-乙酰氨基己糖苷酶; β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶; β -N-乙酰氨基半乳糖苷酶; 糖苷酶; 溜曲霉

β -N-乙酰氨基己糖苷酶 (EC3.2.1.52), 兼有 β -GlcNAcase (EC 3.2.1.30) 和 β -GalNAcase (EC3.2.1.53) 活力, 它从几丁寡糖链的非还原末端切断 β -D-乙酰氨基己糖苷键而释放乙酰葡萄糖胺。己糖胺酶的应用前景很广, 高纯度的己糖胺酶是研究糖链结构的有用工具; 它可以分解某些大分子的糖缀合物; 有治疗某些代谢遗传病——神经节苷脂沉积症潜在的功能; 和其他酶协同分解透明质酸及几丁质, 有利于生物资源开发, 并对环境保护有一定意义。

早在 1933 年 Helferich 和 Iloff^[1] 在苦杏仁酶中首次发现 β -GlcNAcase 活力, 以后陆续报道了它广泛存在于动物组织^[2-3]、植物种子^[4-5] 及各种微生物中^[6-7]。对微生物己糖胺酶研究较多的是真菌来源的, 如黑曲霉^[8-9]、米曲霉^[10]、草酸青霉^[7]、易脆毛霉^[11] 及朱红密孔菌 (*Pycnoporus Cinnabarinus*)^[12], 对细菌也曾有过报道, 如脆弱拟杆菌 (*Bacteriaceae fragilis*)^[13]、枯

草杆菌^[14] 及大肠杆菌^[15]。孙册等^[16] 从猪肝中部分纯化了己糖胺酶, 并对其性质作了初步研究, 以后李士元等^[17] 在植物中、戈苏国等^[18] 在真菌中均检测到己糖胺酶活性。本文报道己糖胺酶在不同微生物中分布情况、菌种筛选及溜曲霉己糖胺酶的产酶条件。

材料和方法

(一) 菌种

本文于 1988 年 9 月 8 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目, 中国科学院资助项目。

浙江水产学院岑利权同志进修期间参加部分工作。溜曲霉由微生物研究所齐祖同、孙增美同志鉴定, 一并致谢。

本文采用缩写符号:

β -N-GalNAcase β -N-乙酰氨基半乳糖苷酶, β -N-GlcNAcase β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, β -N-HexNAcase β -N-乙酰氨基己糖苷酶, 又简称己糖胺酶,

PAGE 聚丙烯酰胺盘状凝胶电泳,

pNPGalNAc 对硝基酚- β -N-乙酰氨基半乳糖,

pNPGlcNAc 对硝基酚- β -N-乙酰氨基葡萄糖。

细菌由微生物所保藏室及周慧玲、蔡妙英提供;放线菌由张国伟提供,真菌由齐祖同提供,还有部分菌种是由土壤中分离的。

(二) 培养基及培养方法

细菌和放线菌用液体合成培养基,真菌用液体察氏培养基及 5% 麸皮液体培养基。

将菌种接入筛选用 8ml 培养液 ($2 \times 20\text{cm}$ 大试管) 或 30ml 发酵用培养液 (250ml 三角瓶) 中,在 $28-30^\circ\text{C}$ 振荡培养 4—6 天,过滤,滤液即为粗酶液,测定 β -GlcNAcase 或 β -GalNAcase 活力。

(三) 酶活力测定^[4]

1. 定性测定: 2mmol/L pNPGlcNAc 或 pNPGalNAc $25\mu\text{l}$, 加粗酶液 $25\mu\text{l}$, 50°C 保温 15min, 加 1mol/L Na_2CO_3 $50\mu\text{l}$, 呈黄色,为阳性菌株。

2. 定量测定: 底物同上, $100\mu\text{l}$, 加 $\text{pH}5.0$ 的 0.2mol/L 醋酸缓冲液 $50\mu\text{l}$, 加入合适浓度的粗酶液 $50\mu\text{l}$, 50°C 保温 7.5—15 min, 加 0.2mol/L Na_2CO_3 3ml 以终止反应, 测定波长 400nm 处的吸光度值。硝基苯酚的摩尔吸收系数为 $1.74 \times 10^4 \text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$

3. 酶活力单位定义: 在以上反应条件下每分钟释放 $1\mu\text{mol}$ 对硝基酚所需酶量为一个活力单位。

(四) 聚丙烯酰胺盘状凝胶电泳

按 Davis 方法^[19]进行,凝胶浓度 7%, 考马斯亮蓝 R250 染色,酶活力显色用 1mmol/L 上述底物(溶于 $\text{pH}3.5$, 0.1mol/L 醋酸缓冲液中)浸泡凝胶条, 50°C 保温,凝胶上出现黄色,即为酶活力带。

结 果

1. 用定性方法测定了 1211 株菌的粗酶液中 β -GlcNAcase 及 β -GalNAcase 活

力,其中包括细菌 112 株,放线菌 380 株及真菌 252 株,其它为由土壤中分离的真菌。测定结果表明(表 1),在本实验所用的培养方法及测定酶活力的条件下,真菌中有酶活力的比例较大,其次是放线菌,最少为细菌。在所筛选的菌株中,有 β -GlcNAcase 活力,必有 β -GalNAcase 活力,但两酶活力比不同。

2. 为了解不同微生物产 β -GlcNAcase 和 β -GalNAcase 活力情况,用定量方法测定了 35 株菌,其中细菌 5 株,放线菌 8 株和真菌 22 株的酶活力,求出 β -GlcNAcase/ β -GalNAcase 活力比,今将部分测定菌的结果列于表 2。

3. 对活力较高的 7 株真菌,包括草酸青霉,拟青霉以及由土壤中分离到的 S215 进行了粗酶液的 PAGE 分析,发现大部分粗酶液均有二十条以上的蛋白带(图 1),用酶活显色法,测出黄色酶带 Rm 值均在

表 1 己糖胺酶在不同微生物中的分布

Table 1 Distribution of β -N-acetylhexosaminidase in various microorganisms

微生物 Microorganism	测定株数 Strains tested	产己糖胺酶菌株 β -HexNAase producing strain	
		菌株数 Number of strain	(%)
细菌 Bacteria	112	11	9.8
放线菌 Actinomyces	380	63	16.5
真菌 Fungi			
曲霉 <i>Aspergillus</i>	124	91	73.3
青霉 <i>Penicillium</i>	95	65	68.4
镰刀菌 <i>Fusarium</i>	9	5	55.0
拟青霉 <i>Paecilomyces</i>	24	2	8.3

表 2 不同微生物中 β -GlcNAcase/ β -GalNAcase 活力比Table 2 Ratio of β -GlcNAcase/ β -GalNAcase for different strains

菌株和编号 Strains and No.	β -GlcNAcase (A) (u/ml)	β -GalNAcase (B) (u/ml)	A/B
<i>Bacillus subtilis</i> 1.210	0.136	N.D.	—
<i>Serratia mercescens</i> 1.589	0.252	0.121	2.08
<i>Streptomyces coelicolor</i> group 86—243	0.206	0.170	1.21
<i>Streptomyces glaucus</i> group 86—201	0.360	0.126	2.85
<i>Streptomyces cinereus</i> group 86—377	1.65	0.204	8.09
<i>Streptomyces globisporus</i> group 86—614	0.850	0.01	85.0
<i>Streptomyces aureus</i> group 84—561	0.57	0.092	6.16
<i>Aspergillus niger</i> 8474	4.30	3.33	1.29
<i>Fusarium moniliforme</i> 3.2879	5.50	2.55	2.15
<i>Paccilomyces</i> sp.	0.189	0.160	1.18
<i>Penicillium oxalicum</i> 8433	6.09	4.59	1.33
<i>Penicillium vermiculatum</i> 5954	0.181	0.124	1.45
<i>Aspergillus tamarii</i> S215	7.30	2.90	2.52

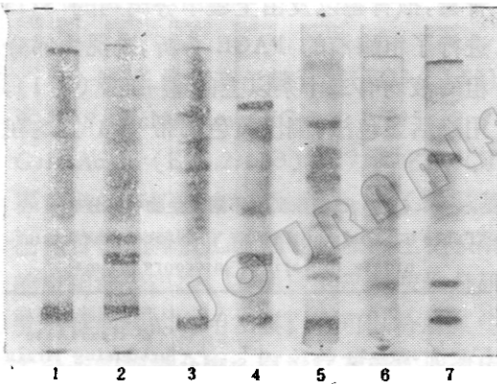


图 1 七株真菌培养液的 PAGE 图

Fig. 1 PAGE Patterns of culture filtrate

1. *Pen. oxalicum*; 6620 2. *Pen. sp*; 607
 3. *Pen. oxalicum*; 8433 4. *Asp. usarii*;
 3.2923 5. *Pen. oxalicum*; 5973 6. *Pen.*
oxalicum; 4025 7. *Asp. tamarii* S215

0.4, (图 1 箭头), 说明这些菌株产生的已糖胺酶的电泳行为相似。

4. 根据以上筛选结果, S215 酶活力较高(见表 2), 两个酶活力比为 2.5 左右, 酶活力显色, 区带清楚, 菌株在察氏斜面培养基上生长快, 孢子多。经鉴定为拟曲霉 (*Aspergillus tamarii*), 而拟曲霉作为已糖胺酶的来源未见报道, 故选择它作进一

表 3 合成培养基与天然培养基的比较

Table 3 Comparison of synthetic and natural media forenzyme production

培养基 media	酶活力 (u/ml) Enzyme activity
察氏培养基 Czapek's media	碳源 C
半乳糖 Galactose	0.94
糊精 Dextrin	0.75
木糖 Xylose	0.70
葡萄糖 Glucose	0.47
蔗糖 Sucrose	0.47
马铃薯淀粉 Potato starch	0.23
右旋糖酐 Dextran	0.21
天然培养基 Natural media	
麸皮液体培养基 Wheat Bran suspension	4.80
米糠液体培养基 Rice bran suspension	0.71

步试验。

5. 产酶条件试验:

(1) 比较合成培养基和天然培养基对 S215 产酶的影响: 合成培养基以察氏培养基为基础, 改变其中碳源, 天然培养基用 5% 麸皮液体培养基或米糠液体培养基。结果(表 3)表明, 麸皮培养酶活力最高, 以下试验均用 5% 麸皮液体培养基进行。

(2) 溜曲霉产酶过程: 在察氏斜面培养基上生长 4—7 天的溜曲霉, 用无菌水洗下孢子, 接入 5% 麸皮液体培养基中, 培养 1.5 天开始测定酶活力, 以后每隔 1 天测定一次, 直到 9.5 天。从 1.5 天开始产酶, 5—6 天产酶最高, 以后酶活力稍有下降(图 2)。

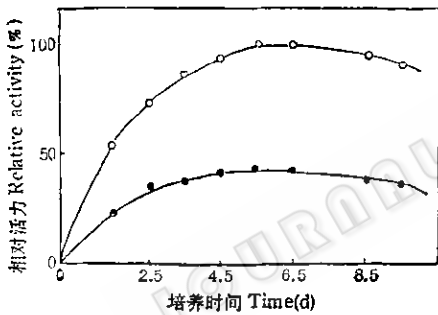


图 2 溜曲霉产酶时间过程

Fig. 2 Time-course of enzyme production by *Asp. tamarii*

○: β -GlcNAcase ●: β -GalNAcase

(3) 补充碳源对产酶影响: 麸皮液体培养基中分别补加葡萄糖、半乳糖、蔗糖、葡萄糖胺、半乳糖胺、N-乙酰葡萄糖胺及 N-乙酰半乳糖胺来试验对产酶影响, 结果表明, 0.1% 的己糖胺和 0.5% 纤维二糖微有诱导作用, 而 0.5% 葡萄糖或半乳糖等对产酶有轻微抑制作用(表 4)。

(4) 补充氮源对产酶的影响: 在麸皮培养基中分别补加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4AC 、 NaNO_3 、 NH_4NO_3 、尿素、酵母膏及蛋白胨。结果 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及 NH_4NO_3 对产酶

微有促进作用, NH_4AC 、 NaNO_3 及尿素等不利于产酶(表 5)。

表 4 补充碳源对产酶的影响

Table 4 Effects of additional carbon sources on β -N-acetylhexosaminidase production

碳源 carbon sources added	浓度 Conc. (%)	酶活力 Enzyme activity (u/ml)	
		β -GlcNA- case	β -GalNA- case
对照 Control	0.0	7.17	3.25
纤维二糖 Cellobiose	0.5	7.94	3.88
葡萄糖胺 Glucosamine	0.1	7.90	3.57
半乳糖胺 Galactosamine	0.1	7.87	3.40
蔗糖 Sucrose	0.5	7.32	3.25
甘露糖 Mannose	0.15	7.27	3.18
几丁质 Chitin	0.3	7.17	3.52
乙酰半乳糖胺 GalNAc	0.1	6.86	3.30
乙酰葡萄糖胺 GlcNAc	0.1	6.12	2.58
半乳糖 Galactose	0.5	6.02	2.43
葡萄糖 Glucose	0.5	5.75	2.82

6. 溜曲霉产其他糖苷酶: 用 14 种对硝基酚糖苷底物测定溜曲霉粗酶液中各种糖苷酶(表 6), 除占优势的 β -GlcNAcase 和 β -GalNAcase 外, 还有 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、 β -岩藻糖苷酶和 α -甘露糖苷酶(表 6)。没有检测到 α -葡萄糖苷酶、 β -甘露糖苷酶、 β -木糖苷酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶、 α -岩藻糖苷酶和 α -木糖苷酶活力。

表 5 补充氮源对产酶的影响

Table 5 Effects of additional nitrogen sources on β -N-acetylhexosaminidase production

氮源 Nitrogen sources	浓度 Conc. (%)	酶活力 Enzyme activity (u/ml)	
		β -GlcNAcase	β -GalNAcase
对照 Control	0.0	6.99	3.30
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.3	8.34	4.27
NH_4NO_3	0.3	7.76	3.88
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.3	7.18	3.49
牛肉膏 Beef extract	0.1	6.59	3.20
蛋白胨 Peptone	0.1	4.85	2.13
酵母膏 Yeast extract	0.1	4.66	2.01
NaNO_3	0.3	4.07	1.74
NH_4AC	0.3	3.20	1.26
尿素 Urea	0.3	1.47	0.66

表 6 漏曲霉培养液中的糖苷酶活性

Table 6 Glycosidase activities in the culture filtrate of *Asp. samarii*

酶 Enzyme	编号 EC no.	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 β -N-acetylglucosaminidase	3.2.1.30	6.79
β -N-乙酰氨基半乳糖苷酶 β -N-acetylgalactosaminidase	3.2.1.53	2.57
α -半乳糖苷酶 α -Galactosidase	3.2.1.22	1.40
β -半乳糖苷酶 β -Galactosidase	3.2.1.23	0.46
β -葡萄糖苷酶 β -Glucosidase	3.2.1.21	0.42
β -岩藻糖苷酶 β -Fucosidase	3.2.1.38	0.30
α -甘露糖苷酶 α -Mannosidase	3.2.1.24	0.04

讨 论

1. 己糖胺酶在不同微生物中的分布情况未见报道。我们筛选了细菌、放线菌和真菌共 1121 株, 结果发现真菌 252 株中有 163 株有己糖胺酶活力, 放线菌 380 株有 63 株有活力, 而 112 株细菌仅 11 株有活力, 其原因有待进一步查明。

2. Woollen 等^[6]比较了一些细菌和真菌的 β -GlcNAcase/ β -GalNAcase 活力比, 米曲霉活力比为 1.2, 大型真菌马勃菌为 1.43 或小于 1; 细菌有梭菌、变形杆菌、肺炎球菌和肠球菌其活力比均在 6.6 以上。Yamamoto^[7]报道了曲霉、青霉、链孢霉、木霉、根霉和毛霉其活力比均在 1—2, 有一株草酸青霉比值小于 1。我们比较了 35 株菌, 其中 5 株细菌, 8 株放线菌和 22 株真菌, 从表 2 的细菌和真菌结果来看, 部分和 Woollen、Yamamoto 的结果相似, 而不同处是他们结果中有比值小于 1 的菌株, 我们未找到小于 1 的菌株, 而我们发现了 1 株放线菌其两酶活力比值达到 85。

3. 筛选了大批由土壤中分离的真菌, 其中 S215 酶活力较高, 经鉴定为溜曲霉, 人们在研究各种糖苷酶时, 对真菌大都集中在黑曲霉、米曲霉、草酸青霉及瑞氏木霉等^[8-10, 20], 而溜曲霉己糖胺酶尚未见过报道, 这可能由于溜曲霉虽是比较常见真菌之一, 但未见到工业上明显的用途, 因而未能引起人们的兴趣。这启示我们在寻找新酶时, 应广泛利用微生物资源, 而不能局限

于某些工业用菌。

参 考 文 献

- [1] Helferich, B. et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **221**: 252—258, 1933.
- [2] Conchie, J. et al.: *Biochem. J.*, **71**: 318—325, 1959.
- [3] Robinson, D. et al.: *Biochem. J.*, **107**: 321—327, 1968.
- [4] Li, Yu-Teh et al.: *Methods in Enzymol.*, **28B**: 702—713, 1972.
- [5] Agrawal, K. M. L. et al.: *Ibid.*, **728**—734, 1972.
- [6] Woollen, J. W. et al.: *Biochem. J.*, **79**: 294, 1961.
- [7] Yamamoto, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **49** (3): 611—619, 1985.
- [8] Bahl, O. P. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**(11): 2970—2978, 1969.
- [9] Jones, C. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**(24): 11861—11869, 1980.
- [10] Mega, T. et al.: *J. Biochem.*, **85**: 335—341, 1979.
- [11] Yamamoto, K. et al.: *App. Environ. Microb.*, **51**(5): 1019—1023, 1986.
- [12] Ohtakara, A. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **45**(1): 239—247, 1981.
- [13] Berg, Jan-Olof et al.: *App. Environ. Microb.*, **40**: 40—47, 1980.
- [14] Ortiz, J. M. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **289**: 174—186, 1972.
- [15] Yem, D. W. et al.: *J. Bacteriol.*, **125**: 324—331, 1976.
- [16] 孙 册等: 第五次全国生物化学学术会议摘要汇编, p.293, 1984.
- [17] 李士元等: 生物化学与生物物理学报, **15**: 495—497, 1983.
- [18] 戈苏国等: 微生物学通报, **12**: 157—159, 1985.
- [19] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404, 1964.
- [20] Woodward, J. et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, **4**: 73—79, 1982.

SCREENING OF β -N-ACETYLHEXOSAMINIDASE FORMING STRAINS AND CONDITIONS FOR ENZYME PRODUCTION*

Yan Zizheng Tao Yong Cheng Xiulan Sun Jinwu Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

About 1200 strains of microorganisms were screened including fungi, actinomycetes, and bacteria, in which 237 strains producing the enzyme desired. The results showed that the β -GlcNAcase and β -GalNAcase always co-existed in one strain, though may be in different ratio.

From strains mentioned above the authors screened out a potent β -N-acetylhexosaminidase producing strain, *Aspergillus tamarii* S215, from the soil sample. The optimal conditions for enzyme production were as follows: The microorganisms was inoculated in a 5% wheat bran suspension, cultured at 28—30°C on shaker for 5—6 days. The productivity can be moderately enhanced by the addition of cellobiose or glucosamine or ga-

lactosamine or by the extra supplement of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and NH_4NO_3 as N sources. In the culture filtrate of *Asp. tamarii*, the α , (β)-galactosidase, β -glucosidase, α -mannosidase and β -fucosidase were also found.

Key words

β -N-acetylhexosaminidase; β -N-acetylglucosaminidase; β -N-acetylgalactosaminidase; glycosidase; *Aspergillus tamarii*

* The project supported by National Natural Science Foundation of China and Chinese Academy of Sciences.