

文章编号 :1009 - 038X(2001)03 - 0270 - 05

麦芽根中核酸酶的分离纯化及性质研究

陈洁, 王璋

(无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘要 :采用硫酸铵沉淀及色谱分离技术对麦芽根中核酸酶进行了分离纯化,通过 Sephacryl S-200, DEAE Sephadex A-50 and Sephacryl S-200 3 步色谱分离,得到了部分纯化的两种核酸酶(I 和 II)。核酸酶 I 的纯化倍数为 94, 核酸酶 II 的纯化倍数为 1790。高效液相色谱显示两种酶作用于酵母 RNA 的产物均为 5'-核苷酸。核酸酶 I 的热稳定性比核酸酶 II 好,在 55 ℃ 下保温 2 h 后,核酸酶 I 的活力损失仅 13%, 而核酸酶 II 则高达 64%。两种酶的最适温度分别为 55 ℃ 和 65 ℃。两种酶的 pH 稳定性相似,在 pH 2.5 ~ 9.0 范围内很稳定。核酸酶 I 的最适 pH 值为 5.0 和 8.0 ~ 8.5, 核酸酶 II 的最适 pH 范围为 4.0 ~ 5.5。

关键词 :核酸酶; 纯化; 性质

中图分类号 :Q814.1

文献标识码 :A

Separation, Purification and Properties of RNase in Malted Barley Roots

CHEN Jie, WANG Zhang

(School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract : Two RNases (I and II) were isolated from extracts of malted barley roots by ammonium sulfate precipitation and purified by chromatography on Sephacryl S-200, DEAE Sephadex A-50 and Sephacryl S-200 consecutively. The RNase I was purified by 94 fold and RNase II 1790 fold. Reaction products of these two RNases with yeast RNA were all 5'- nucleotides determined by HPLC. The heat stability of RNase I was better than that of RNase II. Activity loss was 64% for RNase II and less than 13% for RNase I after 2 h at 55 ℃. The optimum temperatures of RNase I and RNase II were 65 ℃ and 55 ℃ respectively. The pH stability of these two enzymes was similar and they were stable in the pH 2.5 ~ 9.0. The optimum pHs were 5.0 and 8.0 ~ 8.5 for RNase I, and pH 4.0 ~ 5.5 for RNase II.

Key words : RNase; purification; properties

麦芽根中含有丰富的核酸酶类,主要包括脱氧核糖核酸酶(DNase),核糖核酸酶(RNase),腺苷-5'-磷酸单酯酶(5'-adenosine monophosphatase),尿苷-3'-磷酸单酯酶(3'-uridine monophosphatase)

等^[1,2]。麦芽根中的核酸酶(nuclease)类水解 RNA 的产物主要是 5'-核苷酸^[3],而 5'-核苷酸具有强烈的增鲜作用,是一类很有价值的食品增鲜剂。因此,从 20 世纪 60 年代至今关于麦芽根的核酸酶的性质

收稿日期 2000 - 10 - 19, 修订日期 2001 - 03 - 05.

作者简介:陈洁(1969 -)女,江苏太仓人,工学博士,副教授。

万方数据

及应用不断有所报道。

Louis Laufer 和 Sidney Gutcho^[4]研究发现,麦芽根中的核酸酶能完全地降解酵母 RNA,其水解产物包括 3'-核苷酸、5'-核苷酸、磷酸及碱基等等,其中产生 5'-核苷酸的核酸酶的最佳作用 pH 范围偏碱性,约 pH 9 左右,而此时产生 3'-核苷酸的核酸酶基本受抑制。同时,产生 5'-核苷酸的核酸酶在 Zn²⁺离子存在条件下较耐热,在 75℃保温 20 min 后仍能保持酶活力,而其它核酸及核苷酸水解酶类在经过同样条件保温后,基本失活。该作者认为,采用合适的前处理工艺后,麦芽根可以直接用于水解 RNA 生产 5'-核苷酸。

Prentice^[2]研究认为,麦芽根中主要的核酸降解酶最适 pH 范围约为 6.0~6.5,其温度稳定性较差,40℃下保温 1 h 后,酶活即损失了 30%。

文献中报导的麦芽根中核酸酶性质相差较大,这可能是由于麦芽品种不同或者是分离纯化程度不同引起的。事实上,核酸酶的性质对于麦芽根的应用有直接的影响。作者对麦芽根中的核酸酶进行分离纯化并详细研究了部分纯化后核酸酶的性质。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

麦芽根 无锡市东亭麦芽厂提供;核糖核酸 sigma 公司产品;夏盛纤维素酶 宁夏夏盛酶工程有限公司生产;沉淀剂 0.25% 钼酸铵溶于 25% 高氯酸中;超滤器和超滤膜 截留相对分子质量 1 万,天津纺院提供;高压液相色谱仪 HP1050 HPLC 仪, BDS-C18 柱, Sephacryl S-200 和 DEAE-Sephadex A-50, Pharmacia 公司产品。

1.2 核酸酶的提取

参考文献^[5]的方法,主要工艺流程如下:

300g 麦芽根 + 0.4 mol/L NaCl + 0.5% 夏盛纤维素酶 + 3 000 mL 水 $\xrightarrow{40\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}, 3\text{h}}$ 反应 \rightarrow 纱布过滤 \rightarrow 离心分离 \rightarrow 抽滤液 \rightarrow 用截留相对分子质量为 1 万膜超滤浓缩 \rightarrow 45% (NH₄)₂SO₄ 饱和溶液沉淀(4℃, 2 h) \rightarrow 离心分离 \rightarrow 上清液用截留相对分子质量为 1 万的膜超滤脱盐 \rightarrow 透过液冷冻干燥

1.3 核酸酶的纯化

1) Sephacryl S-200 分离 将冷冻干燥后的粗酶提取物溶解在去离子水中,浓度为 10%,上样量:5 mL,流速:19.5 mL/h,缓冲液:0.01 mol/L 磷酸盐,柱:D 1.6 cm × 150 cm。

2) DEAE-Sephadex A-50 分离 粗酶粉经 Sephacryl S-200 分离后得到 A、B、C、D 四个组分;采用离子交换色谱 DEAE-Sephadex A-50 对 B 组分进一步分离,其分离条件如下,流速:26 mL/h,15 min/管,起始缓冲液:0.01 mol/L pH 6.5 磷酸盐缓冲液,以含有 NaCl 的磷酸缓冲液梯度洗脱,NaCl 的浓度梯度为 0~1.0 mol/L;柱:D 2.6 cm × 50 cm。

3) Sephacryl S-200 再次分离 组分 B 经 DEAE-Sephadex A-50 分离后得到两个组分 B-1 和 B-2,再次采用 Sephacryl S-200 分别对 B-1 和 B-2 进行分离,两组分的分离条件均为:流速:10.15 mL/h,20 min/管,缓冲液:0.01 mol/L pH 6.5 磷酸盐缓冲液,柱:D 1.6 cm × 150 cm。

1.4 测定方法

1.4.1 核酸酶活力测定方法

采用 N. prentice^[2]的方法测定核酸酶活力。用 0.1 mol/L pH 6.5 磷酸盐缓冲液溶解底物 RNA,使底物质量浓度为 1 g/dL。取 1 mL 底物溶液放置于 30℃的水浴中保温,待温度达到平衡后,加入已恒温(30℃)好的酶液 1 mL,立刻混匀并同时计时,反应 10 min 后取出试管,置于冰浴中震荡,然后在反应体系中加入 1 mL 沉淀剂,并在冰浴中保持 15 min 后过滤,取滤液稀释至合适倍数后于 260 nm 比色,空白试验先加沉淀剂。

核酸酶活力单位定义:在规定条件下,1 min 内降解酵母 RNA 产生的酸溶性产物使 260 nm 吸光度变化 0.1 所需的酶量。1 活力单位表示为 1 RU。

1.4.2 蛋白质测定 采用福林酚法^[6]。

1.5 核酸酶性质研究^[7]

1.5.1 pH 对酶稳定性的影响 在 pH 2.5~10.0 条件下分别测定核酸酶 B-1 和 B-2 的酶活,在不同的试管中加入相同体积、pH 分别为 2.5~10.0,离子强度均为 0.01 mol/L 的缓冲液(pH 2.5~8.0 为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,pH 9.0 和 10.0 为甘氨酸-氢氧化钠缓冲液),将试管置于 30℃恒温水浴中保温,然后在不同试管中分别加入相同体积的经超滤脱盐并浓缩的核酸酶 B-1,在不同的时间间隔(0~120 min)分别从各试管中取出一定量的酶液,置于 0℃,0.1 mol/L pH 6.5 的磷酸盐缓冲液中保存,然后在 30℃条件下测定酶的残余活力。核酸酶 B-2 的 pH 稳定性测定同核酸酶 B-1。

1.5.2 温度对酶稳定性的影响 在 10℃~70℃条件下分别测定核酸酶 B-1 和 B-2 的酶活。将核酸酶 B-1 和 B-2 的酶液分别在 30℃~70℃条件下保温,在不同的时间间隔(0~120 min),依次取出一定

量的酶液,置于冰浴中保存,在 30 °C, pH 6.5 条件下测定酶的残余活力^[7]。

1.6 产物鉴定

利用高效液相色谱检测核酸酶 B-1 和 B-2 催化酵母 RNA 降解的产物,以判定酶作用产物类型。

样品:将 2 mL 纯化后的酶液加入 10 mL 的 1% 酵母 RNA 溶液中,在 40 °C 下反应 2 h,反应液在 100 °C 下加热 10 min 以灭酶,然后采用截留相对分子质量为 3 000 的膜对反应液进行超滤以除去大分子。所得透过液进行高效液相检测。标样采用 SIGMA 公司的 3'-AMP 和 5'-AMP 及味之素公司的 5'-GMP^[8]。

高压液相色谱条件:HP 1050 HPLC 仪, BDS-C18 柱,流速:1 mL/h,室温,洗脱液 0.05% 磷酸。

2 结果与讨论

2.1 酶的纯化

麦芽根中核酸酶的分离纯化步骤、各步酶的回收率及纯化倍数见表 1。第一次凝胶过滤色谱 Sephacryl S-200 的分离结果见图 1,图中样品为 10% 粗酶粉溶液,上样量:5 mL,流速:19.5 mL/h,缓冲液 0.01 mol/L 磷酸盐,色谱柱:D 1.6 cm × 150 cm,相对分子质量标准蛋白:a,二磷酸果糖酶(Aldolase) 158 000;b,牛血清蛋白(Albumin) 68 000;c,鸡蛋白蛋白(Albumin) 45 000;d,胰凝乳蛋白酶原(Chymotrypsinogen A) 25 000;e,细胞色素(Cytochrome),12 500。与标准相对分子质量蛋白的相对分子质量对照,麦芽根中的核酸酶似乎在宽广的相对分子质量范围内均有分布(其中各相对分子质量段的酶量见表 2 所示)。事实上,核酸酶粗酶粉中相对分子质量低于 1 万的蛋白应该很少或几乎没有,因为在提取过程中,原酶液用相对分子质量 1 万的膜超滤浓缩并反复脱盐。

表 1 分离纯化结果*

Tab.1 The result of the purification of RNase in malted barley roots

分离方法	总酶活/u	总蛋白质量/mg	比活力/(u/mg)	酶回收率/%	纯化倍数
粗提取液	5 222	6 072	0.86	100	1
45% 硫酸铵沉淀 + 超滤脱盐	2 820(冻干后 1 984)	305.9	4.61	54	5.4
Sephacryl S-200					
A	76			1.5	
B	1 112	40.4	27.5	21.3	32
C	476	11.0	43.2	9.1	50.2
D	204			3.9	
DEAE-Sephadex A-50					
B-1	301	3.7	81.0	5.8	94.2
B-2	394	0.6	657	7.5	764
Sephacryl S-200					
B-1	113	3.4	31.9	2.1	37.1*
B-2	154	0.1	1 540	2.9	1 790.6

注:由于分离纯化时间较长,酶在存放过程中失活,活力下降严重,故纯化倍数采用第二步结果即 94.2 倍。

另外,据 Prentice^[2]的研究报道,麦芽根中的核酸酶的相对分子质量主要在 30 000 ~ 35 000 之内。因此,可以推测,麦芽根抽提物中可能存在与 Sephacryl S-200 有吸附作用的蛋白质,致使洗脱体积增加。另外,将洗脱液的离子强度从 0.01 mol/L 提高到 0.1 mol/L,洗脱曲线几乎没有明显变化,说明改变离子强度不能有效减轻这种吸附作用,见图 2。图中样品为 10% 粗酶粉溶液,上样量:5 mL,流速:19.5 mL/h,色谱柱:D 1.6 cm × 150 cm,缓冲液分别为 pH 6.5、0.01 mol/L 和 pH 6.5、0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液。

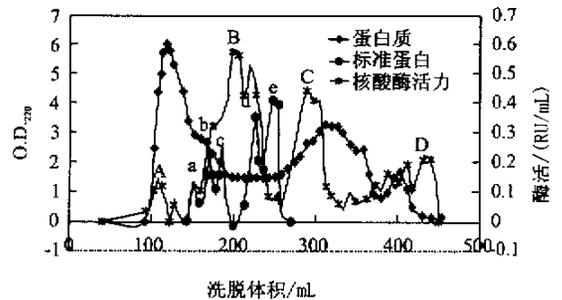


图 1 核酸酶第一次 Sephacryl S-200 分离结果

Fig.1 First separation of RNase by Sephacryl S-200

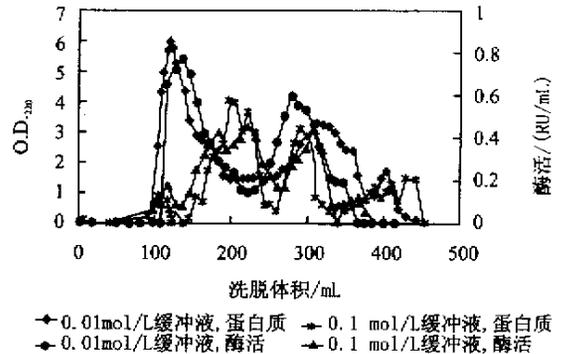


图 2 利用 Sephacryl S-200 分离核酸酶时不同离子强度缓冲液洗脱的结果

Fig.2 The effect of ion strength on the RNase purification by Sephacryl S-200

表 2 Sephacryl S-200 分离结果

Tab.2 Purification results from Sephacryl S-200

组分	总酶活/u	比例	与相对分子质量标准蛋白对照的相对分子质量范围
A	76	4	> 15 800
B	1112	56	25 000 ~ 68 000
C	476	24	< 10 000
D	204	10	< 10 000

B 组分经 DEAE-Sephadex A-50 分离,又得到 B-1, B-2 两个组分(见图 3)。图 3 中分离条件:流速 26 mL/h,15 min/管;起始缓冲液 0.01 mol/L, pH 6.5 磷酸盐缓冲液;以含有 NaCl 的磷酸缓冲液梯度洗脱,NaCl 的浓度梯度为 0~1.0 mol/L;柱 D 2.6 cm × 50 cm。B-1 和 B-2 的 Sephacryl S-200 的进一步分离结果分别见图 4 和图 5 所示,图 4 中分离条件:流速 10.15 mL/h,20 min/管;洗脱缓冲液 0.01 mol/L, pH 6.5 磷酸盐缓冲液;色谱柱:D 1.6 cm × 150 cm。图 5 中分离条件:流速 10.15 mL/h,20 min/管;洗脱缓冲液 0.01 mol/L, pH 6.5 磷酸盐缓冲液;色谱柱:D 1.6 cm × 150 cm。经过 3 步纯化后, B-1, B-2 分别纯化了 90 倍和 1 790 倍。

将这两种酶分别与 1% 的酵母 RNA 底物溶液反应,产物由高效液相色谱证明均为 5'-核苷酸。

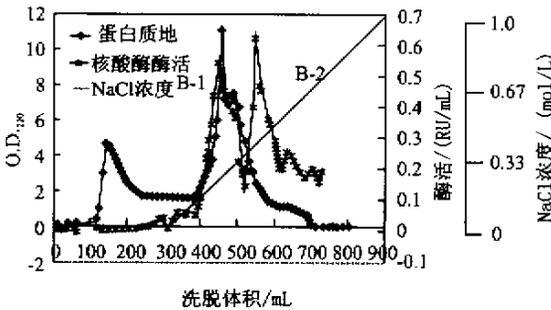


图 3 B 组分的 DEAE-Sephadex A-50 分离结果

Fig.3 Purification of part B by DEAE-Sephadex A-50

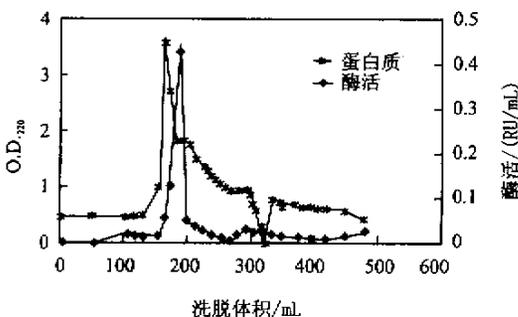


图 4 B-1 的 Sephacryl S-200 进一步分离结果

Fig.4 Purification of part B-1 by Sephacryl S-200

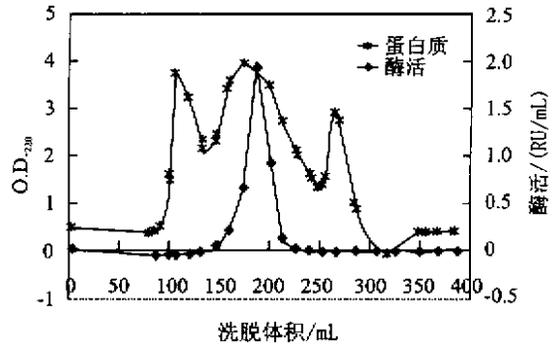


图 5 B-2 的 Sephacryl S-200 进一步分离结果

Fig.5 Purification of part B-2 by Sephacryl S-200

2.2 核酸酶 B-1 和 B-2 性质

2.2.1 最适 pH 及 pH 稳定性 核酸酶 B-1 有两个最适 pH 范围,分别为 pH 5 左右和 pH 8.0~8.5, B-2 的最适 pH 范围为 pH 4.0~5.5。这两种酶的 pH 稳定性相似,在 pH 2.5~9.0 的范围内均十分稳定,在 pH 10 的条件下,30 °C 保温 2 h 后,酶活损失近 30%。这两种核酸酶的最适 pH 及 pH 稳定性与 Prentice 的报道有很大差别。Prentice 报道的核酸酶最适 pH 范围在 6.0~6.5,而且酶在 pH 6.0 以下、6.5 以上皆不稳定。

2.2.2 最适温度及温度稳定性

核酸酶 B-1 和 B-2 的最适温度分别为 65 °C 和 55 °C (图 6)。核酸酶 B-1 有较好的温度稳定性(图 7)45 °C 以下保温 2 h 很稳定,酶活几乎没有损失,而在 50、55、60、70 °C 下保温 2 h,该酶分别有 10%、13%、29% 和 60% 的活力损失。核酸酶 B-2 的温度稳定性相对差一些(图 8)在 30 °C 以上保温均会对酶活造成损失,40 °C 时保温 2 h 后酶活力损失 6%,在 45、50、55、60 °C 下保温 2 h 后,该酶分别有 15%、50%、64% 和 80% 的活力损失,而在 70 °C 下保温 10 min,活力就损失了 80%。

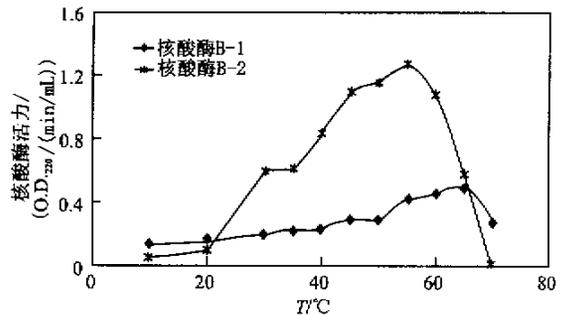


图 6 核酸酶 B-1 和 B-2 的最适温度

Fig.6 Optimum temperatures of part B-1 and B-2

核酸酶 B-1 的热稳定性与 Louis^[3]报道的类似, Louis 认为麦芽根中产生 5'-核苷酸的核酸酶在 Zn 离子存在的条件下较耐热,能承受 75 °C,20 min 左

右的热处理,而核酸酶 B-2 的热稳定性则与 Prentice 的报道接近,Prentice^[2]研究认为,麦芽根中的主要核酸降解酶其温度稳定性较差,在 40 °C 下保温 1 h 酶活即损失了 30%.

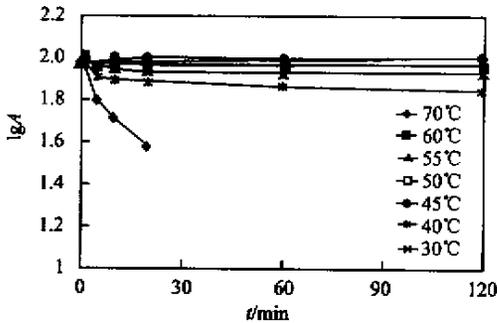


图7 核酸酶 B-1 温度稳定性

Fig.7 The effect of temperature on the stability of part B-1

3 结论

采用 45% 硫酸铵沉淀结合超滤及色谱技术对麦芽根中核酸酶进行了分离纯化,通过 Sephacryl S-200, DEAE Sephadex A-50 and Sephacryl S-200 3 步色谱分离,得到了部分纯化的两种核酸酶(B-1 和

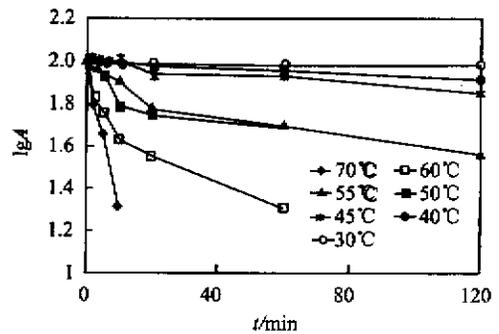


图8 核酸酶 B-2 温度稳定性

Fig.8 The effect of temperature on the stability of part B-2

B-2) 核酸酶 B-1 的纯化倍数为 94, 核酸酶 B-2 的纯化倍数为 1790. 高压液相色谱显示两种酶作用于酵母 RNA 的产物均为 5'-核苷酸. 两种酶的性质研究结果显示, 核酸酶 B-1 的热稳定性比核酸酶 B-2 好, 在 55 °C 下保温 2 h 后, 核酸酶 B-1 的活力损失仅 13%, 而核酸酶 B-2 则高达 64%. 两种酶的最适温度分别为 55 °C 和 65 °C. 两种酶的 pH 稳定性相似, 在 pH 2.5 ~ 9.0 范围内很稳定. 核酸酶 B-1 存在两个最适 pH, 分别为 5.0 和 8.0 ~ 8.5, 核酸酶 B-2 的最适 pH 范围为 4.0 ~ 5.5.

参考文献:

- [1] PRENTICE N. Comparison of malts for nuclease and nucleobase potentials[J]. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1983, 41(4): 133 ~ 144.
- [2] PRENTICE N. Characterization of a nuclease from malted barley roots[J]. *Journal of Cereal Science*, 1987, (5): 175 ~ 187.
- [3] FIERS W, VANDENDRIESEHE L. The ribonuclease-activity of barley[J]. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 1961, 69(3): 339 ~ 363.
- [4] LAUFER L, GUTCHO S. Hydrolysis of RNA to 5'-nucleotide by seed sprouts, particularly malt sprout[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1968, 10: 257 ~ 275.
- [5] 陈洁, 王璋. 麦芽根中核酸酶的提取及制备[J]. *食品工业科技*, 2000, (1): 19 ~ 21.
- [6] 张龙翔. 生化实验方法及技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1981.
- [7] 王璋. 食品酶学[M]. 北京: 轻工业出版社, 1990.
- [8] NGUYEN T T, PALCIC M M, HADZIYEV D. Enzymatic formation of nucleotides and the flavor enhancer 5'-GMP during vegetable processing[J]. *Journal of Chromatography*, 1987, 388: 189 ~ 199.

(责任编辑 朱明)