

红曲霉葡萄糖淀粉酶色氨酸残基的修饰与酶活力的关系

杨寿钧 戈苏国 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

试验了几种蛋白质侧链修饰剂对锈色红曲霉 (*Monascus rubiginosus* Sato) 的葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3) 的影响, 发现以 N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS) 选择性氧化能使酶失活, 预先加入酶的底物可溶性淀粉或麦芽糖对酶有保护作用, 表明色氨酸残基对于该酶的活性是重要的, 可能位于酶的结合部位或其附近。

在以 NBS 进行选择性氧化时, 红曲霉葡萄糖淀粉酶的两个分子型 E_3 和 E_4 反应性不同, E_3 随反应介质的 pH 不同 (3.5, 4.0 和 4.5) 和有无 8M 尿素的存在而有不同程度的失活; E_4 则不受影响, 在上述不同 pH 和有无尿素时失活程度相同。 E_3 分子中 1mol 色氨酸残基被氧化约需 4.5mol 的 NBS, E_4 则仅需 3.3mol NBS, 以上三个事实均说明 E_3 中活力必需的色氨酸较 E_4 中的暴露程度为低, 即 E_3 和 E_4 在空间构象上存在一定的差异。这与温度差光谱测出的结果^[1]是一致的。

仅一个色氨酸残基被氧化时, 酶大部分失活, 此色氨酸残基为其表现活力所必需, 而且优先被 NBS 所氧化。

锈色红曲霉 (*Monascus rubiginosus* Sato) 的葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3) 具有多型性; 已将其中主要的两个分子型 E_3 和 E_4 进行了分离纯化及性质的比较^[2], 此外也比较了它们的底物特异性^[3], 差光谱^[1]及某些化学试剂对酶活力的影响^[4]。为了进一步探索它们的差异所在, 又进行了蛋白质侧链修饰剂对酶活力的影响试验, 发现 N-溴代琥珀酰亚胺 (以下简称 NBS) 对酶活力有强烈的抑制作用, 色氨酸为其表现活性所必需的基团, E_3 和 E_4 存在一定的构象差异。本文报道此试验结果。

材料和方法

(一) 酶制剂

酶制剂为无锡酶制剂厂生产的红曲霉糖化酶, 酶活力每克 20,000 单位, 生产菌种为 AS 3.978 的变异株 AS 3.3491。

(二) 主要试剂和仪器

DEAE-纤维素 DE11 为 Whatman 厂产品; QAE-Sephadex, Sephadex G-25 为 Pharmacia 厂

产品, 可溶性淀粉, NBS, PMA 为北京化工厂产品; WSCCD, NEM, DTNB, NAI, PMSF 均为 E. Merck 厂产品, PCMB 为 Light 厂产品。除 NBS 在使用前用水重结晶二次外, 其余试剂均未作进一步提纯。

紫外分光光度计为 Unicam SP 700 C 型, 72 型光电分光光度计为上海分析仪器厂产品。

(三) 酶的提纯

酶的提纯按我们实验室的方法, 在洗脱液浓度上稍加改进。将硫酸铵沉淀并脱盐后的酶液 (含蛋白质 300—500mg) 加到预先用 0.08M pH5.0 醋酸缓冲液平衡的 DEAE-纤维素 DE11 柱 (1.8 × 45cm) 上, 用同样缓冲液 750ml 为下限, 以 0.12M pH5.0 醋酸缓冲液 750ml 为上限, 进行梯度洗脱, 流速每小时 20—25ml, 定时分段收集, 每 10ml 一管。取洗脱峰不同位置的管进行盘状凝胶电泳鉴定, 分别收集 E_3 , E_4 均为一带的洗脱液, 经浓缩和对蒸馏水透析后作为实验用样品。

(四) 酶活力测定方法

反应体系为 2% 可溶性淀粉 0.5ml, 0.5M

本文于 1980 年 8 月 27 日收到。

pH4.5 醋酸缓冲液 0.1ml, 酶液 0.1ml (加入的酶蛋白量控制在 10—20 μ g 范围内, 加水到 1.0ml。在 50 $^{\circ}$ C 水浴中反应 10 分钟, 煮沸 10 分钟终止反应, 取 0.1ml 反应液用 Somogyi-Nelson 法^[9]在 520nm 波长下比色, 测定还原糖, 以每小时生成 1mg 葡萄糖的酶量为 1 活力单位。

(五) 被氧化的色氨酸残基数的测定

被 NBS 氧化的色氨酸残基数按 Spande^[4]等人的方法测定, 2nmol 的酶在 pH3.5, 50mM 的醋酸缓冲液中, 在搅拌下定量加入 NBS 水溶液, 使其浓度达到实验要求, 加水到 1.0ml, 以不加 NBS 的酶液为对照, 在 30 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟, 反应液在 280nm 波长下, 光径 1.0cm 测定吸光度, 按下列公式计算被氧化的色氨酸残基数:

$$n = \frac{\Delta A \times 1.31 \times MW \times V}{W \times 5500}$$

这里 n 为每克分子蛋白中被 NBS 氧化的色氨酸残基数, ΔA 为对照酶液在 280nm 的吸光度与 NBS 氧化后的酶液在相同波长下的吸光度差值, W 为蛋白质重量(克数), 1.31 为 Witkop 因数, 5,500 为色氨酸在 280nm 的克分子吸光系数。酶的分子量为 55,000。

(六) 其它分析方法

蛋白质测定用 Lowry 法^[7]。盘状凝胶电泳按 Davis 法^[8], 凝胶浓度为 7%, 用考马斯亮蓝 R250 染色。SDS 凝胶电泳按 Weber 法^[9], 凝胶浓度 10%。

结果和讨论

(一) 蛋白质侧链修饰剂对酶活力的影响

利用专一性的试剂, 对蛋白质分子内氨基酸侧链基团进行化学修饰已被广泛地用于蛋白质结构和功能的研究。我们试验了不同的蛋白质侧链化学修饰剂对红曲霉葡萄糖淀粉酶活力的影响。取 0.1mg 酶, 除 HNBB 在 0.1M 醋酸中, 其余均在 50mM pH4.5 的醋酸缓冲液中, 30 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟, 取 0.1ml 测定相对活力(以不加修饰剂的酶活力作为 100%), 结果列于表 1 中。从表 1 的结果可以看出: 典型的硫

基试剂 PCMB, NEM, DTNB 以及 PMA 等对活力没有明显的抑制作用, 文献报道巯基对于 Taka α -淀粉酶 A^[10], 酵母 β -葡萄糖苷酶^[11] 和甘薯 β -淀粉酶^[12] 等的活力是十分重要的, 但是对于红曲霉葡萄糖淀粉酶的活力并不是必需的。羧基修饰剂 WSCCD, 酪氨酸残基修饰剂 NAI 和丝氨酸修饰剂 PMSF 在我们的实验条件下对酶活力没有明显的影响。色氨酸残基修饰剂 1mM HNBB 有 50% 的抑制, NBS 在 0.1mM 浓度下引起 E₃ 和 E₄ 全部酶活力的

表 1 不同的化学修饰剂对 E₃ 和 E₄ 酶活力的影响

Table 1 Effect of Protein Modification Reagents on Glucoamylase Activity

修饰剂名称 Reagent*	最终浓度 Concn. (mM)	相对活力 (%) Relative activity (%)	
		E ₃	E ₄
对 照 None	—	100	100
PCMB	0.1	117	102
NEM	1.0	115	125
DTNB	1.0	105	100
PMA	1.0	85	85
WSCCD	1.0	95	101
NAI	1.0	83	84
PMSF	1.0	102	100
HNBB	1.0	50	47
NBS	1.0	0	0
NBS	0.1	0	0
NBS	0.01	8	10

* PCMB: P-Chloromercuribenzoic acid.

NEM: N-Ethylmaleimide.

DTNB: 2, 2'-Dinitro-5, 5'-dithiodibenzoic acid.

PMA: Phenyl mercuric acetate.

WSCCD: Water soluble N-cyclohexyl-N'-[β -(N-methylmorpholinio)-ethyl]-carbodiimide-P-toluo sulfonate.

NAI: N-Acetylimidazole.

PMSF: Phenylmethanesulfonyl fluoride.

HNBB: 2-Hydroxy 5-nitrobenzyl bromide.

NBS: N-Bromosuccinimide.

丧失,当浓度为 0.01mM 时,二者的剩余活力分别为 8% 和 10%。为了试验 NBS 在本实验条件下对酶的氧化作用有无引起肽链的断裂,用 10 倍于酶量(克分子比)的 NBS 在 50mM pH3.5 醋酸缓冲液中,以不加 NBS 的酶液为对照,在 30℃ 保温 30 分钟,按 Weber 的方法进行 SDS 凝胶电泳,结果见图 1。在过量 NBS 存在下没有观察到酶肽链的断裂,酶活力的丧失是由于色氨酸残基被 NBS 氧化的结果,表明色氨酸残基对于红曲霉葡萄糖淀粉酶的活力是十分必需的。

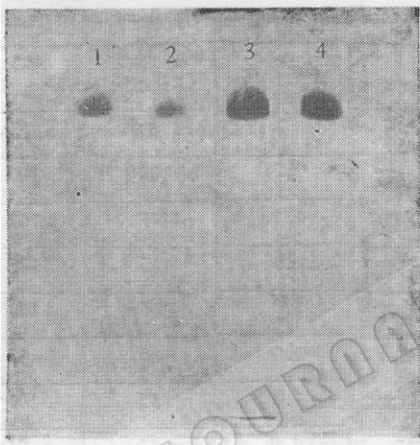


图 1 酶液 NBS 氧化后的 SDS 凝胶电泳

Fig. 1 SDS-PAGE patterns of NBS-oxidized glucoamylase

- 1. E_3 对照 E_3 control
- 2. 被 NBS 氧化后的 E_3 NBS-oxidized E_3
- 3. E_4 对照 E_4 control
- 4. 被 NBS 氧化后的 E_4 NBS-oxidized E_4

(二) 底物对酶被 NBS 钝化的保护作用

为了确定色氨酸是否与酶的活性部位有关,考察了在用 NBS 氧化时底物是否对酶有保护作用。取 0.1mg 酶在 50mM pH4.5 醋酸缓冲液中,加入不同浓度的底物可溶性淀粉或麦芽糖,3 分钟后,加入 NBS 水溶液,使其最终浓度为 0.01mM,用蒸馏水补足到 1.0ml,以不加 NBS 的酶

液加不同浓度底物各作一个对照,然后在 30℃ 保温 30 分钟,取 0.1ml 反应混合液按常法测定酶活力,以各自相应的对照酶液活力为 100%,结果见图 2。底物对酶的保护作用随浓度增加而增加,当可溶性淀粉在反应液中的浓度为 1.0% 时, E_3 和 E_4 的相对活力分别为 70% 和 50%。为了试验可溶性淀粉是否影响 NBS 对色氨酸的氧化,我们用 0.1mM 色氨酸在 50mM pH4.5 醋酸缓冲液中,在有不同浓度淀粉(0.1, 0.5 和 0.7%)存在下,用 0.1mM 的 NBS 在 30℃ 保温 10 分钟,以不加淀粉的色氨酸溶液为对照,测定 280nm 的吸光度,按 Spande 的方法用克分子吸光系数计算被氧化的色氨酸百分数,结果见表 2。由表 2 看出有无淀粉存在,均有 36% 的色氨酸被 NBS 氧化,淀粉并不影响 NBS 对色氨酸的氧化。

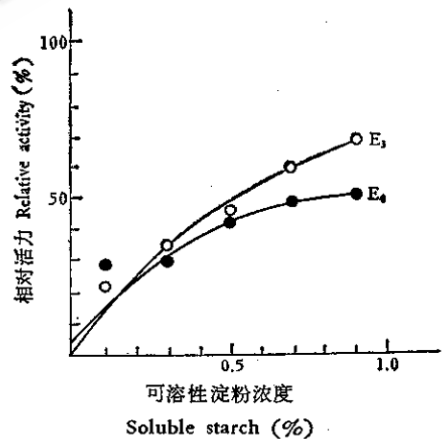


图 2 不同浓度的淀粉对酶活力的保护作用

Fig. 2 Protection of enzyme activity from NBS inactivation by different concentration substrate

麦芽糖对酶活力也表现出同样的保护作用。这些结果表明色氨酸残基可能位于酶的结合部位或其附近,当酶和底物亲合形成中间复合物时,阻止了 NBS 对色氨酸的氧化,从而表现出对酶活力的保护作用。

文献也曾报道, 黑曲霉^[13] 和根霉的葡萄糖淀粉酶^[14] 中的色氨酸残基位于酶的结合部位。

表 2 在不同浓度淀粉存在下 NBS 对色氨酸的氧化

Table 2 Oxidation of L-tryptophan with NBS at Different Concentrations of Soluble Starch

淀粉 (%) Soluble starch (%)	被氧化的色氨酸 (%) Oxidized Trp (%)
0	36
0.1	41
0.5	36
0.7	36

(三) 在不同 pH 条件下酶被 NBS 的氧化

在偏酸性的反应介质中, NBS 能够选择性地氧化蛋白质中的色氨酸残基, 已发现多种蛋白质中的色氨酸残基被 NBS 氧化受 pH 值的影响很大^[15]。我们研究了在不同的 pH 值下酶被 NBS 氧化的情况。取 2nmol 酶在 50mM 醋酸缓冲液中, pH 分别为 3.5, 4.0 和 4.5, 加入不同量的 NBS, 最终体积为 1.0ml, 在 30℃ 保温 30 分钟, 取 0.1ml 按常法测定相对活力。结果见图 3。看来 E₃ 被 NBS 氧化失活的程度在所试 pH 范围内随 pH 值降低而加大; 而 E₄ 则在所试 pH 均有同样程度的失活, 可能的解释是 E₃ 在低 pH 时构象改变而较易被 NBS 氧化, E₄ 则在上述所试 pH 同样地易被 NBS 氧化, 二者的构象存在一定差异。为了进一步证实此观点我们又试验了尿素的影响。

(四) 在有无尿素存在下酶被 NBS 的氧化

浓尿素溶液 (8M) 能够破坏蛋白质的高级结构, 使原来处于分子内部的基团暴露出来, 从而使反应性低的色氨酸较易被 NBS 所氧化^[15]。我们比较了尿素对活力

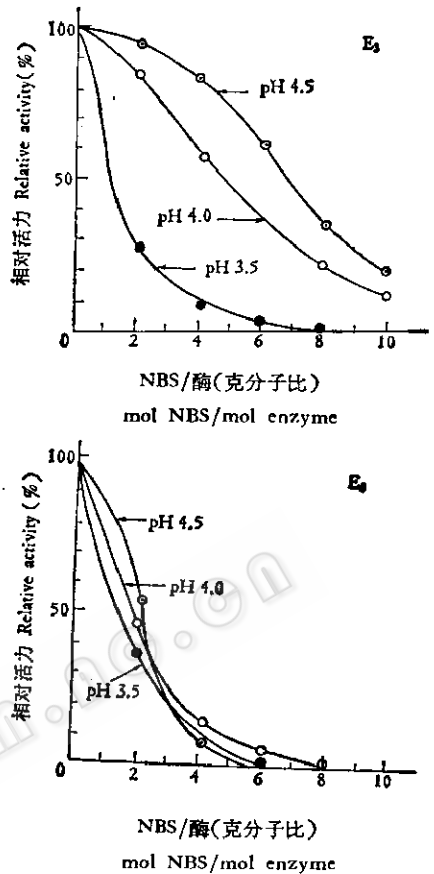


图 3 在不同 pH 值时酶被 NBS 的选择性氧化

Fig. 3 Selective oxidation of glucoamylase with NBS at different pH values

的影响以及有无尿素存在下, E₃ 和 E₄ 被 NBS 氧化的情况。取 2nmol 酶, 放入 pH4.0 醋酸缓冲液配制的浓尿素溶液中, 再加入不同量的 NBS 水溶液, 加蒸馏水到 1.0ml, 使尿素的最终浓度为 8M, 以不加 NBS 的酶液为对照, 30℃ 反应 30 分钟后, 对蒸馏水透析 96 小时, 取 0.1ml 测定相对活力, 结果见图 4。

E₃ 和 E₄ 在 8M 尿素 (pH4.0) 存在下, 酶活力全部丧失。对水透析 96 小时除去尿素后, 活力恢复到原始活力的 80% 左右^[4], 根据这一事实, 进行了在有无尿素存在下酶被 NBS 氧化的试验, 发现 E₃ 在有 8M 尿素存在下, 比无尿素时更易被 NBS

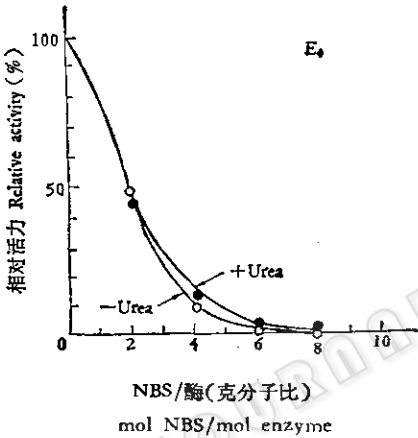
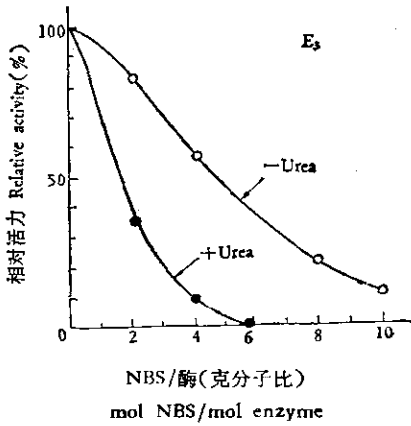


图 4 酶被 NBS 氧化时 8M 尿素的影响
Fig. 4 Effect of 8M urea on the oxidation of glucoamylase by NBS

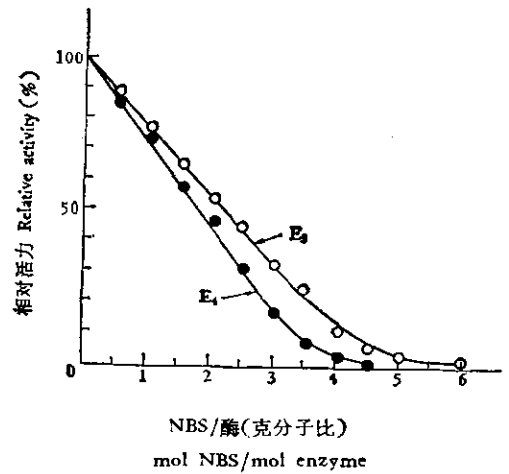


图 5 不同用量的 NBS 对酶的氧化
Fig. 5 Oxidation of enzyme at different molar ratios of NBS to glucoamylase

氧化而失活, E₄ 则不受尿素的影响, 这一结果与上述不同 pH 值对酶被 NBS 选择性氧化的影响是一致的。

(五) 色氨酸的氧化与酶活力的关系

用不同克分子比 (NBS/酶) 的 NBS 对酶进行选择氧化, 然后测定酶活力, 同时测定被氧化的色氨酸残基数。取 2nmol 酶在 50mM pH3.5 醋酸缓冲液中, 加入不同量的 NBS 水溶液, 总体积 1.0ml, 30℃ 保温 30 分钟, 取 0.1ml 按常法测定酶活力, 其余测定 280nm 的吸光度, 按 Spande 方

表 3 酶活力与色氨酸氧化程度的关系

Table 3 Correlation between Enzyme Activity and the Extent of Tryptophan Oxidation

NBS mol 酶 mol mol NBS/mol enzyme	相对活力 (%) Relative activity (%)		氧化的色氨酸 mol 酶 mol mol Trp oxd. mol enzyme		氧化 1mol 色氨酸残基加入 的 NBS 平均 mol 数 mol NBS add. mol Trp oxd.	
	E ₃	E ₄	E ₃	E ₄	E ₃	E ₄
0	100	100	—	—		
2	25	34	0.5	0.8		
4	6	13	0.8	1.1		
6	4	6	1.3	1.4		
8	0	2	1.7	2.4		
10	0	2	2.2	3.1	4.54	3.34

法计算被氧化的色氨酸残基数, 结果见表 3。随 NBS 用量的增加酶急剧失活, 每克分子酶中仅一个色氨酸残基被氧化时, 大约 90% 的酶活力丧失。在每 1mol 酶中氧化一个色氨酸残基需要的 NBS mol 数在 E_3 为 4.5、 E_4 为 3.3。在比较低的 NBS/酶克分子比的情况下, 酶活力的丧失与 NBS 的用量呈直线关系如图 5 所示。将图 5 中的直线延长与横轴的截距相当于酶完全失活时所需的 NBS mol 数, 在 E_3 为 4.5、 E_4 为 3.6, 与表 3 求出的数值接近。由表 3 结果看来只有一个色氨酸为其表现活力所必需, 而且该色氨酸优先被 NBS 所氧化。

为表现酶活力所必需的色氨酸残基优先被 NBS 所氧化的情况已有报道。Hayashi 等^[16]指出卵清溶菌酶中的色氨酸残基被 NBS 氧化时很有选择性, 酶的催化活性与一个色氨酸密切相关。其后他们^[17]又证明了这个优先被氧化的也是必需的色氨酸为 Trp 62, 而不是 Trp 63。这是用化学方法直接证明了色氨酸残基与酶的结合部位(活性部位)有关, 与 X-光衍射分析^[18]所表明溶菌酶的结合部位有 Trp 62, 63 和 108 的结果相符。

Okada 等^[19]报道枯草杆菌的 α -淀粉酶在 pH6, 0℃ 的情况下以 NBS 处理一分钟即完全失活, 每 1mol 酶需要 6mol NBS, 经过分析 15 个色氨酸残基中仅有一个被氧化。

Sugiura 等人^[20]最近报道菜豆壳孢菌 (*Macrophomina phaseoli*) 中的 β -半乳糖苷酶在 pH5.0, 37℃ 以 NBS 处理 10 分钟, 发现 24 个色氨酸残基中仅 1 个被氧化。酶活力仅剩 10%。半乳糖对酶有保护作用。说明此优先受 NBS 氧化的色氨酸与分解乳糖的活力有密切关系。Spande 等^[15]指出, 一般蛋白质在有尿素存在下, 在 pH3—4 通常氧化 1 mol 色氨酸需要

2.5—3.5mol NBS, 在没有尿素时, 有些色氨酸残基不易被氧化, 如所需的 NBS 超过以上正常值, 则表示该蛋白质中的色氨酸埋藏较深。在 E_3 分子中色氨酸的氧化比 E_4 需要较多的 NBS, 说明 E_3 中的必需色氨酸较 E_4 中的暴露程度为低, 这一点与上述 E_3 中色氨酸氧化受 pH 变动和有无尿素存在的影响是一致的, 说明二者空间构象上存在一定差异。前报温度差光谱^[1]的结果是在 pH3.6 时, E_3 和 E_4 的转变温度虽均为 56℃, 但 E_3 的温差光谱曲线变化较大, 说明有较大的构象变化。可能原来埋藏较深的色氨酸残基暴露出来而引起吸光度的增加。与本试验的结果是符合的。

参 考 文 献

- [1] 严自正等: 微生物学报, 22 (1)64, 1982.
- [2] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能组: 微生物学报, 20 (3): 263—270, 1980.
- [3] 王杨声等: 微生物学报, 20 (4): 398—406, 1980.
- [4] 戈苏国等: 微生物学报, 22(2): 126—131, 1982.
- [5] Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, 153: 375, 1944.
- [6] Spande, T. F. and B. Witkop.: in "Methods in Enzymology" Vol. 11 ed. by Hirs, C. H. W.; Academic press, 1967, p. 498.
- [7] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- [8] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404, 1964.
- [9] Weber, K. and M. Osborn.: *J. Biol. Chem.*, 244: 4406, 1969.
- [10] Kato, I.: *J. Biochem. (Tokyo)*, 63: 479, 1968.
- [11] Duerksen, J. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 233: 1113, 1958.
- [12] Spradlin, J. and J. A. Thoma.: *J. Biol. Chem.*, 245: 117, 1970.
- [13] Jolley, M. E. and C. J. Gray.: *Carbohydrate Res.*, 49: 361, 1976.
- [14] Ohnishi, M. and K. Hiromi.: *J. Biochem. (Tokyo)*, 79: 11, 1976.
- [15] Spande, T. F. and B. Witkop.: in "Methods in Enzymology" Vol. 11, ed. by Hirs, C. H. W.; Academic press, 1967, p. 528.
- [16] Hayashi, K. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, 54: 381, 1963.
- [17] Hayashi, K. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, 58: 227, 1965.

- [18] Johnson, L. M. and D. C. Phillips,: *Nature*, 206: 761, 1965.
- [19] Okada, Y. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, 54: 477, 1963.
- [20] Sugiura, M. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 58. 11, 1980.

RELATION BETWEEN MODIFICATION OF TRYPTOPHAN RESIDUES AND THE ACTIVITY OF GLUCOAMYLASE FROM *MONASCUS RUBIGINOSUS* SATO

Yang Shoujun Ge Suguo Zhang Shuzheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

The effects of some protein modification reagents on the activity of glucoamylase from *Monascus rubiginosus* Sato have been studied. The facts that selective oxidation with N-bromosuccinimide (NBS) strongly inactivated the enzyme and the substrates such as soluble starch or maltose could protect the enzyme from NBS inactivation, suggested that tryptophan residue may be located at the binding site of the enzyme.

The reactivity of the two molecular forms E_s and E_a toward NBS were different. Oxidation of E_s at various pH (3.5, 4.0, 4.5), and in the presence or

absence of 8 M urea resulted in different degree of inactivation, while the inactivation of E_a remained the same under the above conditions. Oxidation of 1 mol of Trp in E_s required 4.5 mol of NBS, while in E_a only 3.3 mol. These facts indicated that the essential tryptophan residue in E_s is less exposed than in E_a , and there is conformation difference between E_s and E_a .

About 90% enzyme activity was lost when only one tryptophan residue was oxidized. The tryptophan residue seems to be essential for the activity of glucoamylase.