

红曲霉葡萄糖淀粉酶形成过程的研究

孙晋武 王杨声 徐桃献 严自正 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

红曲霉 (*Monascus* sp.) 的葡萄糖淀粉酶具有多型性。比较了原始菌株 AS3.978 及其变异株 AS3.2199 及 AS3.3491 所产生的葡萄糖淀粉酶的凝胶电泳图谱。证实了三者所产生的主要区带 E₃ 和 E₄ 是互相对应的。

研究了 AS3.3491 在不同的培养条件下, 一些酶的生成与变化情况。发现在葡萄糖淀粉酶形成的同时, 有酸性蛋白酶、 α -淀粉酶和 α -半乳糖苷酶的生成, 没有发现有中性蛋白酶、碱性蛋白酶、 β -半乳糖苷酶、甘露糖苷酶和甘露聚糖酶。培养时加入酸性蛋白酶抑制剂并不影响葡萄糖淀粉酶多型性的模式。

红曲霉葡萄糖淀粉酶具有多型性, 用凝胶电泳可分为 3—5 个区带, 距正极最近的为 E₁, 依次为 E₂ 到 E₅。我们曾对其中两型 E₃ 和 E₄ 进行了提纯, 并作了较为详细的比较研究^[1-4]。

具有两个或两个以上分子型的葡萄糖淀粉酶, 在其它菌种也有不少报道^[5-9], 大多数工作都停留于对这些不同分子型的酶的物理化学性质及其化学组成方面的研究。S. Hayashida 报道了泡盛酒曲霉具有三种不同分子类型的葡萄糖淀粉酶, 它们可以在不同培养条件下有选择性地产生^[10], 并且提出了蛋白酶和糖苷酶可以促进一种类型转化成另一类型^[11]。对于红曲霉葡萄糖淀粉酶的多型性问题, 我们在前文^[3]中曾提到有两个 N-末端存在是否是由于蛋白酶的作用引起的。鉴于该酶属于糖蛋白, 分子型 E₃ 和 E₄ 在氨基酸组成及在糖含量上具有某些差异, 因此我们考虑采用不同的培养条件, 从蛋白酶和糖苷酶对酶多型性的影响这个角度来进行探索, 得出一些初步的结果, 报道如下。

材料与 方法

(一) 菌种与酶制剂

1. 菌种: 为 *Monascus* sp. 菌号为 AS3.2199 和 AS3.3491, 均系 AS3.978 的变异株, 由我所菌种保藏室提供。

2. 酶制剂: 无锡酶制剂厂生产的红曲糖化酶, 生产菌种为 *Monascus* sp. 共三种酶制剂: 酶制剂 A, 生产菌为 AS3.2199, 酶的活力每克 2 万单位; 酶制剂 B, 生产菌为 AS3.2199, 酶的活力每克 8 万单位; 酶制剂 C, 生产菌为 AS3.3491, 酶的活力每克 2 万单位。

(二) 化学试剂

酪蛋白、密二糖、棉子糖和乳糖皆为分析纯试剂。酸性蛋白酶抑制剂 Pepstatin A 为美国唐建南教授赠送。可溶性淀粉为浙江菱湖淀粉厂产品。田菁胶由中国科学院植物研究所黄启华同志提供。

(三) 菌种培养

1. 斜面种子培养: 麦芽汁斜面培养基, 35℃ 培养 10 天左右。

2. 液体培养: 玉米粉培养基成分 (%): 玉米粉 3, 豆饼粉 1.5, KH₂PO₄ 0.03, MgSO₄·7H₂O 0.05, 用水配制, 煮沸 10 分钟, 冷却后用 HCl 调 pH 到 4.5。

于 200ml 三角瓶中加液体培养基 40ml, 在 15 磅蒸汽压下灭菌 30 分钟, 接种后在旋转摇床 (220 转/分) 上 35℃ 培养。不同时间取样, 离心, 取上清液进行测定。

本文于 1981 年 2 月 24 日收到。

(四) 分析方法

1. 葡萄糖淀粉酶活力及蛋白质含量的测定同前^[1]。

2. α -淀粉酶活力的测定按改进后的 Fuwa 方法进行测定^[12]。以 1 分钟水解 0.1mg 可溶性淀粉定义为一个酶活单位。

3. 酸性蛋白酶活力的测定: 用 0.05M pH3.0 乳酸缓冲液配制的 0.5% 酪蛋白溶液 1ml, 加入 1ml 适当稀释的酶液, 40℃ 反应 10 分钟, 加入 2ml 10% 三氯乙酸溶液中中止反应, 沉淀 10 分钟后过滤, 取滤液 1ml, 加入 5ml 0.4M 碳酸钠溶液及 1ml 稀释 3 倍后的 Folin 试剂, 40℃ 水浴保温 20 分钟后在 680nm 比色。以热失活的酶作为对照。以每分钟水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸的酶量定义为一个酶活力单位。

4. 中性和碱性蛋白酶活力测定: 分别用 0.02M pH7.2 磷酸缓冲液和 0.05 M pH10.0 硼砂-氢氧化钠缓冲液配制 0.5% 酪蛋白溶液, 37℃ 反应 10 分钟, 其它操作与酸性蛋白酶活力测定方法相同。

5. 糖苷酶的测定: 用 0.04M pH5.0 醋酸缓冲液分别配制成 2% 的密二糖, 乳糖, 以及 1% 的田菁胶溶液。将 72 小时的培养液, 对蒸馏水充分

透析, 吸取 0.5ml 加入到 2ml 上述各种底物溶液中, 在 37℃ 水浴中保温 48 小时, 在沸水浴中煮沸 10 分钟, 然后点样进行纸层析。层析方法同前报^[4]。

结果和讨论

(一) 几种酶制剂凝胶电泳区带的比较

按报道过的方法^[1], 将酶制剂 A, B 和 C 分别浸出, 浸液用硫酸铵沉淀, 凝胶过滤脱盐, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。用 AS 3.2199 菌株生产的酶制剂 A, B 具有五条区带, 与过去报道^[1]是一致的。而用 AS 3.3491 生产的酶制剂 C 仅有三条区带。进一步将三种样品分别用 DEAE-纤维素柱层析, 均可得到洗脱液部分 I (以 E_4 为主) 及洗脱液部分 II (以 E_5 为主)^[2], 然后将酶制剂 B, C 得到的洗脱液部分 II 合并进行凝胶电泳, 两者非常吻合, 并没有增加新的区带, 结果见图 1。洗脱液酶的比活见表 1。由图 1 的凝胶电泳图谱可见酶制剂 C

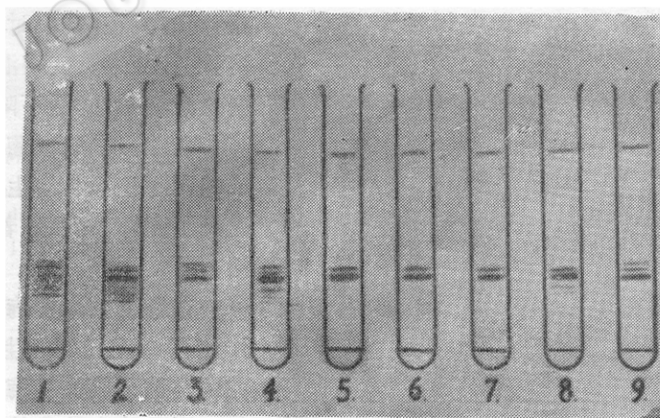


图 1 不同酶制剂及相应的柱层析洗脱液的凝胶电泳图谱

Fig.1 PAGE patterns of crude and purified glucoamylase from different strains

1. 酶制剂 A 2. 酶制剂 B 3. 酶制剂 C 4. (1 + 2 + 3) 5. 酶制剂 B 洗脱液部分 II 6. 酶制剂 C 洗脱液部分 II 7. (5 + 6) 8. (2 + 5) 9. (3 + 6)
- 1: enzyme A 2: enzyme B 3: enzyme C 4: (1 + 2 + 3) 5: fraction II from DEAE-cellulose column of enzyme B 6: fraction II from DEAE-cellulose column of enzyme C 7: (5 + 6) 8: (2 + 5) 9: (3 + 6)

的三条区带相应于酶制剂 A 的 E_3 、 E_4 和 E_5 。由表 1 可见,不同菌株所得的柱层析纯化的酶的比活也非常接近。

表 1 不同酶制剂柱层析洗脱液的比活

Table 1 Specific activity of eluant fractions from different enzyme preparations

| 部分 Fraction | 酶制剂 A (由 AS 3.2199) enzyme A (from AS 3.2199) | 酶制剂 B (由 AS 3.2199) enzyme B (from AS 3.2199) | 酶制剂 C (由 AS 3.3491) enzyme C (from AS 3.3491) |
|----------------------|--|--|--|
| 部分 I Fraction I | 1008 | 978 | 1112 |
| 部分 II Fraction II | 994 | 921 | 1112 |

(二) 几株红曲霉菌株培养液凝胶电泳区带的比较

无锡酶制剂厂红曲糖化酶的生产菌先后为 AS3.2199 和 AS3.3491, 均系 AS3.978 的变异株。为了搞清它们所产生的酶在凝胶电泳图谱方面的异同, 我们在实验室中对此三株菌株分别进行培养, 72 小时后取样。硫酸铵沉淀取 40—65% 部分。透析

后进行凝胶电泳, 结果见图 2。

由图可见, 由酶制剂得到的凝胶电泳图谱与由相应菌株在实验室培养后得到的凝胶电泳图谱是一致的。另外, AS3.978 的凝胶电泳图谱与 AS3.3491 的基本一致, 主要也是三条区带, 但边缘比较模糊。由此图也可看出这三株菌株的培养液都具有 E_3 、 E_4 和 E_5 成分。

由于我们后来所采用的酶制剂皆是由 AS3.3491 菌株发酵所得, 因此下面报道的是以此菌株培养所得的一些结果。

(三) 在不同培养条件下, 几种酶活力的变化和凝胶电泳图谱

1. 正常条件培养:

按照工厂生产条件培养(培养基 pH 为 4.5), 不同时间取样, 离心取上清液, 测定蛋白质含量, 葡萄糖淀粉酶、 α -淀粉酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶和酸性蛋白酶的活力, 结果见图 3。样品经对水透析后进行凝胶电泳检查见图 4。

由图 3 可见, 葡萄糖淀粉酶的生成在 72 小时后虽然仍有增加, 但经显微镜观察, 可看到在 72 小时后菌体开始自溶, 培养液逐渐变得混浊, 测得的蛋白量激增, 故比活下降。

酸性蛋白酶在葡萄糖淀粉酶生成的同时也不断地生成, 在 72 小时达到了高峰, 之后随着菌体的自溶, 活力急剧下降。

在葡萄糖淀粉酶生成的同时, 伴随有 α -淀粉酶的生成, 它的产酶曲线与葡萄糖淀粉酶的曲线并不平行, 说明有独立的 α -淀粉酶存在。

在此培养条件下, 测不出中性蛋白酶和碱性蛋白酶的活性。

由凝胶电泳图谱(图 4) 可见在培养 48 小时时已有明显的酶的区

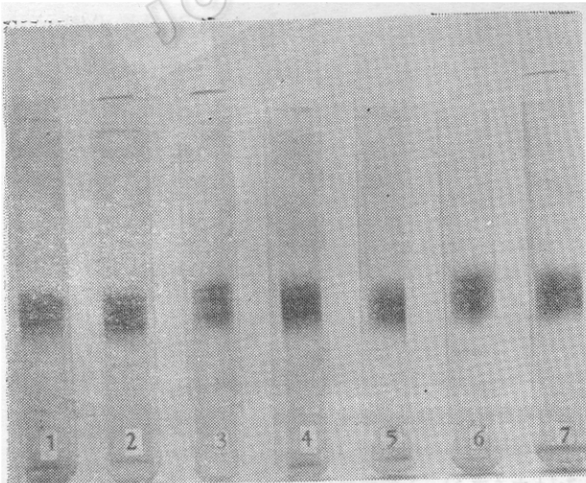


图 2 几株红曲霉菌株培养液凝胶电泳图谱

Fig.2 PAGE patterns of glucoamylase from different strains

1. AS3.978 2. AS3.2199 3. AS3.3491 4. (1+2)
5. (1+3) 6. (2+3) 7. (1+2+3)

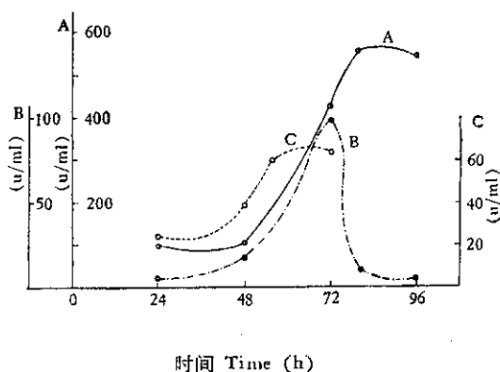


图 3 培养过程中一些酶的形成过程

Fig. 3 Formation of some enzyme during incubation

A: 葡萄糖淀粉酶 Glucosylase
B: 酸性蛋白酶 Acidic proteinase
C: α -淀粉酶 α -amylase

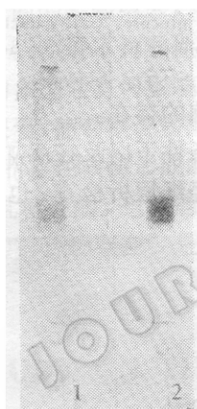


图 4 不同培养时间培养液的凝胶电泳图谱

Fig. 4 PAGE patterns of culture filtrates at different time

1: 48h 2: 72h

带,而且与培养 72 小时的区带完全一致,即有 E_3 、 E_4 和 E_5 区带。在培养 36 小时,也有模糊的相应区带,这说明这种酶的多型性,在酶生成的早期已经存在。

2. 在中性条件下培养

在中性条件下培养,葡萄糖淀粉酶的生成极其缓慢,培养 96 小时才达到高峰,生成的葡萄糖淀粉酶很少。显微镜观察,菌体生长很不健康,菌体细,短而且很少,

说明在此条件下不利于菌体的生长及葡萄糖淀粉酶的形成。在这一条件下,生成的酸性蛋白酶的量确实是减少了,但与葡萄糖淀粉酶生成的量相比,其相对量并不低于在正常条件下培养所得到的数值。72 小时后取样,进行凝胶电泳,其图谱与图 4 完全一样。

3. 在培养基中添加酸性蛋白酶抑制剂

为了检查酸性蛋白酶的存在与否对葡萄糖淀粉酶多型性形成的影响,在培养基中添加酸性蛋白酶抑制剂。根据文献报道^[13] $2.9 \times 10^{-8} M$ 浓度的 Pepstatin 即能对 *Asp. niger* 的酸性蛋白酶有抑制作用。我们在培养基中添加 Pepstatin A 使其浓度达 $0.02 \mu g/ml$,其它条件均与正常条件一致,不同时间取样,测定葡萄糖淀粉酶和酸性蛋白酶活力,以不加 Pepstatin A 的作为对照。

结果发现添加酸性蛋白酶抑制剂后,基本上没有测出酸性蛋白酶的活力,葡萄糖淀粉酶和 α -淀粉酶的活力变化不大。

72 小时后取样作凝胶电泳,与正常条件培养的结果相同。图 5 说明酸性蛋白酶的存在与否并不影响葡萄糖淀粉酶多型性的产生。

4. 在培养基中加入锌离子

如前所述,在正常条件下培养,检查不出中性和碱性蛋白酶的存在。S. Hayashida 报道^[10]在培养泡盛酒曲霉的过程中锌离子的存在可促使生成这两种蛋白酶。我们也在培养基中添加了 0.1% 的醋酸锌,其他条件不变,不同时间取样测定酶活力,由结果可知添加锌离子后仍未测出中性和碱性蛋白酶活力。而菌体生长以及其他酶(葡萄糖淀粉酶,酸性蛋白酶和 α -淀粉酶)的生成情况皆与正常条件培养相似。

72 小时后取样进行凝胶电泳,与正常条件培养的结果相同,(图 5)说明锌离子

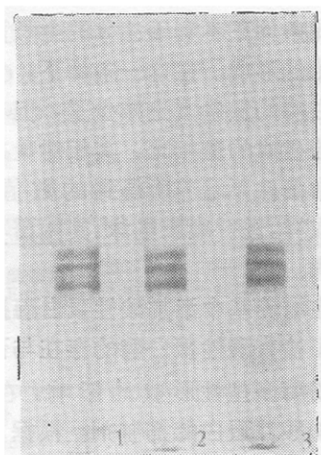


图5 不同培养条件糖化酶的凝胶电泳图谱
Fig. 5 PAGE of glucoamylase under different culture conditions

1. 正常条件 2. 加 pepstatin A 3. 加锌离子
1. normal condition 2. with pepstatin A 3. with zinc ion

的加入,对酶多型性的形成没有影响。

还试验了加入不同剂量的锌离子进行培养,结果发现,当锌离子浓度高于 0.2% 时,对菌体生长有抑制作用。

(四) 其它一些糖苷酶的生成情况

红曲霉葡萄糖淀粉酶是一种糖蛋白,由于糖苷酶的切割,使酶分子带有不同的糖侧链,这也可能是造成酶多型性的原因。已知红曲霉葡萄糖淀粉酶的 E_3 和 E_4 的含糖量确有不同,分别为 7% 和 9%,所含糖主要是甘露糖和半乳糖,还有痕量木糖和葡萄糖^[3]。为此目的,我们用纸层析方法检查了在培养过程中是否有这类糖苷酶的生成。

1. 以密二糖为底物

密二糖是以 α -半乳糖和葡萄糖以 1,6 键连结起来的贰糖,由纸层析图谱(图 6)可见,此培养液能使密二糖分解成半乳糖和葡萄糖,说明有 α -半乳糖苷酶存在。另外的实验也表明,该培养液能作用于棉子糖,生成半乳糖和蔗糖,从而进一步证明

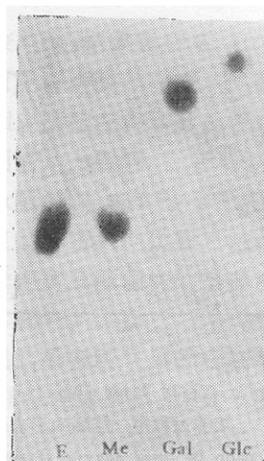


图6 培养液作用于密二糖产物的纸层析图谱
Fig. 6 Paper chromatogram of melibiose hydrolysate

Glc: 标准葡萄糖 Gal: 标准半乳糖
Me: 标准密二糖 E: 密二糖为底物的酶解产物
Glc: glucose Gal: galactose
Me: melibiose E: melibiose as substrate

α -半乳糖苷酶的存在。

在中性条件下以及在添加锌离子的条件下培养,经纸层析检查,也有 α -半乳糖

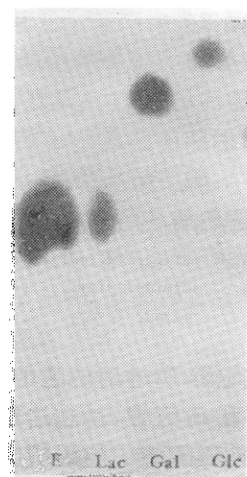


图7 以乳糖为底物的反应情况
Fig. 7 Paper chromatogram of reaction mixture with lactose as substrate

Glc: 标准葡萄糖 Gal: 标准半乳糖 Lac: 标准乳糖 E: 以乳糖为底物的作用情况
Glc: glucose Gal: galactose Lac: lactose
E: lactose as substrate

苷酶的形成。

2. 以乳糖为底物

乳糖是 β -半乳糖与葡萄糖以 1, 4 键连结起来的二糖。由图 7 可见, 此培养液没有分解乳糖, 说明没有 β -半乳糖苷酶的存在。

3. 以甘露半乳聚糖田菁胶为底物

田菁胶的主要成分是甘露半乳聚糖, 纸层析结果表明, 没有单糖和寡糖的生成, 看来没有甘露糖苷酶。为检查是否有甘露聚糖酶的存在, 除纸层析外, 我们还测定了水解液的粘度, 经酶作用 48 小时的水解液, 其粘度并没有下降, 可知甘露聚糖酶是不存在的。

根据上面的实验结果, 从蛋白酶的角度来考虑, 我们看不到酸性蛋白酶对葡萄糖淀粉酶的多型性有何影响。但是从糖苷酶的角度来看, 葡萄糖淀粉酶的 E_3 和 E_4 含糖量不同, 而且在该酶形成的同时, 确实存在有 α -半乳糖苷酶, 也可能还有其它我们没有测定的糖苷酶存在。是否是由于它们

的作用, 引起葡萄糖淀粉酶多型性的产生, 还需进行深入的研究。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能组: 微生物学报 **16**(3): 200—205, 1976。
- [2] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能组: 微生物学报 **17**(2): 101—107, 1977。
- [3] 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。
- [4] 三杨声等: 微生物学报 **20**(4): 398—406, 1980。
- [5] Lineback, D. R. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**: 539, 1969.
- [6] Pazur, J. H. et al.: *Carbohydr. Res.*, **20**: 83—96, 1971.
- [7] Tsuboi, A. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **38**: 543, 1974.
- [8] Miah, M. N. N. and S. Ueda.: *Die Stärke*, **29**: 235—239, 1977.
- [9] Lizuka, H. and S. Mineki.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **24**: 185—192, 1978.
- [10] Hayashida, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**(11): 2039—2099, 1975.
- [11] Yoshino, E. and S. Hayashida.: *J. Ferment. Technol.*, **56**(4): 289—295, 1978.
- [12] Yamaguchi, K. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **15**: 97—107, 1967.
- [13] Umezawa, H. et al.: *J. Antibiotics*, **23**: 259—262, 1970.

STUDY ON THE FORMATION OF GLUCOAMYLASE IN *MONASCUS* SP.

Sun Jinwu Wang Yangsheng Xu Taoxian Yan Zizheng Zhang Shuzheng
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The glucoamylase from *Monascus* sp. exists in multiple molecular forms. The comparison of the patterns of disc gel electrophoresis of the original strain AS 3.978 and the mutant strains AS 3.2199 and AS 3.3491 indicated that the main two bands E_3 and E_4 produced by them were corresponding to each other.

Investigation of the formation and chan-

ges of some enzymes under different cultural conditions showed that accompanying to the glucoamylase formation acidic proteinase, α -amylase and α -galactosidase were produced, while neutral proteinase, basic proteinase, β -galactosidase, mannosidase and mannanase were not found. The existence of acidic proteinase did not affect the pattern of the multiple molecular forms of glucoamylase.