

# 水不溶酶的研究

## I. 用 DEAE-葡聚糖凝胶作载体制备水不溶葡萄糖淀粉酶

中国科学院微生物研究所不溶酶组

在我们试验的几种离子交换剂中, DEAE-葡聚糖凝胶是制备不溶性糖化酶的较好载体。其吸附的最适 pH 为 4.5—6.0, 每克载体吸附 50000 单位酶量为宜。DEAE-葡聚糖凝胶糖化酶与自然酶比较最适 pH 与最适温度基本相同, 而米氏常数明显增加, 前者为 0.023(%), 后者为 0.0057(%). 采用搅拌糖化方式, 以 30% 淀粉为原料, 葡萄糖值能达到 95 以上, 连续使用 10 次原活力仍能保持 63%。

不溶酶是近十几年来酶学领域中的一项新生事物, 它的研究在理论和实践上具有重要意义。在生物体内, 许多酶是与细胞器相结合, 实际上是一种天然的不溶酶。因此, 不溶酶的研究有助于阐明酶在细胞上的催化特性。不溶酶是一种人工改变了的酶, 在结构上与天然酶差别较大, 因此可以认为不溶酶是一种研究酶特性的较好的模型。就实践意义来说, 不溶酶比天然酶具有许多优越的特点, 例如可以反复使用、便于连续化操作、能随时从反应体系中分离出来、产品质量比较纯净等。因此在工业生产, 实验室研究和临床化验上都有广泛应用的前途。

用离子交换吸附法制备不溶酶具有许多优点: ①操作简便, ②条件温和, ③对稀酶液能起浓缩作用, ④载体可以回收。因此在制备不溶性糖化酶时, 首先进行了这方面的研究。本文介绍用 DEAE-葡聚糖凝胶作载体制备不溶性葡萄糖淀粉酶的初步结果。

## 材料和方法

### 一、酶的来源和离子交换剂

1. 葡萄糖淀粉酶(简称糖化酶): 黑曲霉(*Asp. niger* M-85) 发酵液, 由北京果脯厂提供; 红曲霉(*Monascus* sp. A S 3.6911) 发酵液。在实验中, 除注明外, 均采用黑曲糖化酶。

2. 离子交换剂: DEAE-葡聚糖凝胶 A50 (瑞典 Pharmacia 及本组合成); 110 离子交换树脂(华北制药厂产品); CM-纤维素(Whatman CM70); DEAE-纤维素(Whatman DE11)。

### 二、DEAE-葡聚糖凝胶-糖化酶的制备方法

1. 柱式: 取一定量的 DEAE-葡聚糖凝胶 A50 用 0.1M pH 6.0 磷酸盐缓冲液(或 pH 4.5 醋酸缓冲液)平衡装柱, 通过一定量的酶液, 再用同样缓冲液或水淋洗。

2. 摇床振荡方式: 取一定量按上述方法经缓冲液平衡好的 DEAE-葡聚糖凝胶和酶液, 置三角瓶内, 在 28—30℃ 下摇床振荡 2.5—5.0 小时, 抽干, 用缓冲液或水洗涤。

### 三、酶活力的测定

1. 自然酶的活力测定: 10 毫升底物(1% 可

本文 1973 年 2 月 8 日收到。

溶性淀粉液, 含 0.05M pH4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液)加入 0.25 毫升酶液, 于 55°C 反应 10 分钟再移入沸水浴以停止反应。所生成的葡萄糖用次亚碘酸法<sup>[1]</sup>测定。在上述条件下每小时催化生成 1 毫克葡萄糖的酶量为一个活力单位。

2. 不溶酶的活力测定: 取 0.5 克(按干重计)不溶酶, 在搅拌的条件下倾入 55°C 400 毫升底物(同自然酶)。待不溶酶分散后立即吸滤 5 毫升作为空白对照, 按测定自然酶活力的方法记录消耗硫代硫酸钠的毫升数(A), 10 分钟再吸滤取样 5 毫升, 同样记录消耗硫代硫酸钠毫升数(B)。

不溶酶活力(单位/克) =

$$= (B - A) \times N \times 90.05 \times \frac{60}{10} \times \frac{400}{5}$$

N = 硫代硫酸钠的当量浓度, 每毫克当量硫代硫酸钠相当于 90.05 毫克葡萄糖。

3. 游离酶\*的测定方法: 测定不溶酶活力时, 反应 5 分钟吸滤出 10 毫升上清液, 其中 5 毫升用次亚碘酸法测定, 记录消耗 0.05N 硫代硫酸钠毫升数(B), 另外 5 毫升样品继续在 55°C 水浴中保温 30 分钟后再用次亚碘酸法测定, 记录消耗 0.05N 硫代硫酸钠毫升数(A)。(B - A) 即为游离酶之活力。

## 实验结果

### 一、离子交换剂的选择

几种离子交换剂的比较试验指出, 除 DEAE-葡聚糖凝胶能吸附糖化酶, 且游离酶很少外其余数种离子交换剂或因不能吸附, 或因牢度差, 均不宜作载体(表 1)。故确定 DEAE-葡聚糖凝胶为制备不溶性糖化酶的载体。

表 1 不同离子交换剂吸附糖化酶的情况

离子交换剂		110 树脂	DEAE-纤维素	CM-纤维素	DEAE-Sephadex
吸附情况	红曲	吸附	吸附	不吸附	吸附
	黑曲	不吸附	吸附	—	吸附
游离酶情况	红曲	大量	大量	—	偶尔有
	黑曲	—	大量	—	偶尔有

## 二、DEAE-葡聚糖凝胶-糖化酶的制备条件

1. pH 选择: 在离子交换吸附中, pH 条件是重要的因素。分别于 pH 5、6、7 条件下制备不溶性糖化酶的结果(表 2)表明, 在 pH 6 时吸附酶量最多, 每克不溶酶表现活力也较高。

表 2 不同 pH 对制备 DEAE-葡聚糖凝胶-糖化酶的影响

pH	给酶量 (单位/克)	吸附酶量 (单位/克)	表现活力 (单位/克)	相对活力 (%)	回收率 (%)
5	125520	49270	9936	20.1	7.3
6	143510	135272	14688	10.8	10.2
7	133544	123616	12744	10.3	9.5

- 注: 1. 给酶量: 制备不溶酶时给予的总酶量。  
2. 吸附酶量: 被载体吸附的酶量(即给酶量减去未被吸附的酶量)。  
3. 表现活力: 不溶酶的活力。  
4. 相对活力 =  $\frac{\text{表现活力}}{\text{吸附酶量}} \times 100\%$ 。  
5. 回收率 =  $\frac{\text{表现活力}}{\text{给酶量}} \times 100\%$ 。

2. 不同给酶量试验: 由表 2 还可看出, 表现活力与每克载体吸附酶量并不成比例增加, 相对活力反有下降, 这可能与吸附酶量过多, 空间障碍影响有关, 因此在吸附酶量最多的 pH 6 的条件下进行了不同给酶量试验, 结果(表 3)表明, 当每克载体给酶量较低时, 吸附完全, 不溶酶的表现活力较低, 随着给酶量增加不溶酶的表现活

表 3 不同给酶量对不溶酶表现活力及回收率的影响

处理	给酶量 (单位/克)	吸附酶量 (单位/克)	表现活力 (单位/克)	相对活力 (%)	回收率 (%)
1	12960	12960	3888	30.0	30.0
2	25920	25920	5292	20.4	20.4
3	51840	51840	7344	14.2	14.2
4	77676	71604	8640	12.1	11.1
5	103680	97200	10044	10.3	9.6

\* 游离酶即从不溶酶中解吸下来的酶。

力增高。但当给酶量高至 77676 单位/克时,不能全被吸附,结果回收率低于相对活力。所以,给酶量一般应控制在酶能完全被吸附且不溶酶表现活力也较高,即每克载体给酶 5 万单位左右为宜。

3. DEAE-葡聚糖凝胶-糖化酶制备条件的确定:考虑到 DEAE-葡聚糖凝胶是弱碱性阴离子交换剂,按一般离子交换原理,pH 高时吸附,pH 低时洗脱,同时不溶酶糖化时的 pH 为 4.5,如果制备时也采用 pH 4.5,对增加不溶酶的牢度是有好处的。由上述结果得出给酶量一般控制在 5 万左右为宜,从表 2 看出,在 pH 5 时,吸附量可达 49270 单位,因此又进行了 pH 4.5 与 pH 6.0 的比较。试验结果表明,无论 pH 6.0 还是 pH 4.5,在给酶量为 5 万左右单位/克时,都能被载体全部吸附,且不溶酶的表现活力,相对活力及回收率都相当一致(表 4)。所以在制备 DEAE-葡聚糖凝胶-糖化酶时,选择每克载体给酶量 5 万左右,在 pH 4.5 时进行吸附。

表 4 pH 4.5 与 pH 6.0 制备 DEAE-葡聚糖凝胶-糖化酶的比较

pH	给酶量 (单位/克)	吸附酶量 (单位/克)	表现活力 (单位/克)	相对活力 (%)	回收率 (%)
4.5	46494	46494	11750	25.27	25.27
6.0	44004	44004	11535	26.21	26.21

### 三、不溶性糖化酶的若干性质

1. 最适 pH: 由图 1 可以看出,该不溶酶在 pH 4.0 与 pH 4.5 之间表现活力均高于 pH 5.0。如再降低 pH,则又有大量游离酶解吸下来,所以其最适 pH 为 4.0—4.5。

2. 最适温度: 图 2 表明,在 55℃ 时不溶酶的表现活力最高。

3. 不同底物对不溶性糖化酶活力的影响: 通常测定糖化酶活力,是以可溶性淀粉为底物,而实际糖化过程是将淀粉经

$\alpha$ -淀粉酶作用后转变成糊精为底物的。因此分别测定了以可溶性淀粉和糊精为底物时不溶性糖化酶活力。由表 5 看出,用可溶性淀粉为底物所测定的活力略高。这与一般报道<sup>[2]</sup>的淀粉链长短(分子量大小)和不溶酶活力的关系不大一致。可能因为制备不溶酶时所用的发酵液中含有  $\alpha$ -淀粉酶的原因。

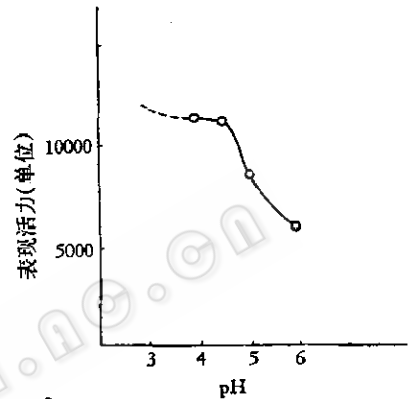


图 1 DEAE-葡聚糖凝胶-糖化酶 pH 活力曲线 (----表示有游离酶)

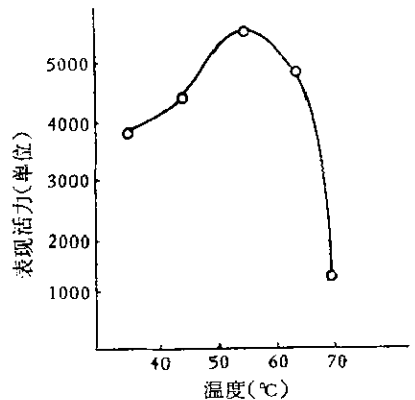


图 2 DEAE-葡聚糖凝胶-糖化酶的最适温度

表 5 不同底物对不溶性糖化酶活力的影响

表现活力 (单位) 浓度 (%)	底物	
	可溶性 淀粉	糊精
1	6804	5508
2	9504	8424

表 6 不溶酶的米氏常数

酶	底物浓度 (% w/v)	速度 (毫克葡萄糖/分)	米氏常数 (Km百分浓度)
不溶酶	1.00	16.20	0.023
	2.00	23.40	
	4.00	35.10	
自然酶	0.375	10.44	0.0057
	0.50	12.47	
	0.75	15.48	
	1.00	16.79	

4. 不溶酶的米氏常数: 用赖因韦尔 (Lineweaver) 和贝克 (Burk) 作图法求得其米氏常数  $K_m$ , 为了便于比较, 同时也测定了原发酵液自然酶的米氏常数。结果见表 6 及图 3。

四、不溶性糖化酶糖化试验

1. 糖化试验: 用每克(干重)为9504单位的不溶酶 3 克, 每次加入 pH 4.5 淀粉液化液 300 毫升 (干物质浓度约为 30%) 于 55°C 进行重复糖化试验, 结果(表 7)表明,

重复糖化 10 次, 累计糖化时间 106 小时, 前九次每次糖化时间不超过 12 小时, 葡萄糖值可达 95 以上, 第 10 次葡萄糖值略有下降。此不溶酶经重复使用后, 充分用水淋洗以除去糖液, 再测其表现活力, 每克(干重)不溶酶尚存活力为 5940 单位, 为原不溶酶活力的 63%。

2. 不溶酶用量的选择: 从不溶酶重复糖化试验可以看出, 不溶酶按自然酶常用

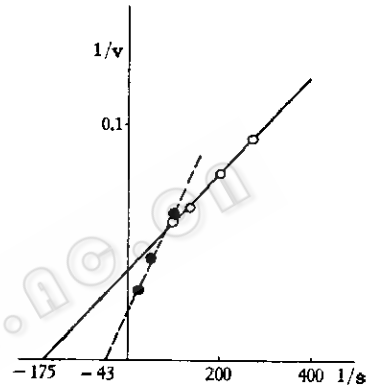


图 3 不溶酶及自然酶以 1/V 对 1/S 作图  
●——●不溶酶 ○——○自然酶

表 7 不溶性糖化酶连续糖化试验

糖化次数		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
葡萄糖值(%)	6小时	93.4	97.15	95.75	96.75	95.46	—	93.92	91.30	85.27	78.24
	12小时	96.97	99.15	98.75	—	—	95.98*	96.64	95.44	97.10	92.48
累计糖化时间		12	24	36	42	48	58	70	82	94	106

\* 糖化 10 小时。

表 8 糖化酶用量与糖化时间的关系

酶类	酶用量 (单位/克淀粉)	葡萄糖值 (%)									
		0小时	2小时	4.5小时	6小时	8小时	10小时	14小时	24小时	38小时	
不溶酶	500	23.1	87.2	92.5	93.2	97.3					
	250	23.1	84.4	94.0	—	99.0					
	160	25.4	61.8	—	90.3	—	—	97.1			
	150	21.5	78.5	—	92.8	—	—	98.4			
	100	18.5	38.7	—	65.3	—	—	—	82.8		
自然酶	150	21.5	—	—	—	—	—	83.5	89.4	98.2	
	300	21.5	—	—	—	—	—	92.9	98.3		
	450	19.4	64.3	—	85.5	—	95.8	98.8			

单位(即每克绝干淀粉用 300 单位左右)进行糖化,糖化时间大大缩短,故需进一步探讨不溶酶用量与糖化时间的关系,并与自然酶相比较。

从试验结果(表 8)看出,不溶酶和自然酶的糖化趋势是一致的,用酶量高时糖化时间缩短,用酶量低时糖化时间延长;两者不同的是,糖化效率差别很大,每克淀粉用 160 单位不溶酶与用 450 单位自然酶的糖化效果几乎完全一样,而用酶量相同达到同一糖化度,不溶酶所用时间远比自然酶为短。总之,用不溶酶进行糖化,时间在 14 小时左右,每克淀粉用酶量以 150—200 单位为宜。

## 讨 论

从多次糖化试验中发现,用不溶性糖化酶水解淀粉,酶的用量比自然酶为低。以 14 小时水解淀粉使葡萄糖值达 95 以上为标准,水解每克绝干淀粉,自然酶的用量为 450 单位,而不溶酶则为 150—200 单位。其原因何在,有必要在这里加以讨论。

通常认为底物分子量大小对于测定计算不溶酶的活力影响较大,淀粉分子量越小,不溶性糖化酶水解能力越强<sup>[2]</sup>。但是在我们的试验条件下(表 5),因混有  $\alpha$ -淀粉酶,由于两种酶的协同作用,不论是用可溶性淀粉或糊精为底物,实际的底物仍为糊精,所以看不出分子量的影响。

比较合理的解释是底物浓度的影响。前面已经提到,当用 1% 淀粉为底物测定自然酶活力时,所得到的结果接近于最大反应速度,而用 1% 淀粉测定不溶酶活力时,此时的反应速度远比最大反应速度为小,如表 6 所示,当用 4% 淀粉为底物时,所求得反应速度比前者超出一倍以上。反映在米氏常数上,自然酶的  $K_m$  为 0.0057 (%),不溶酶的  $K_m$  为 0.023 (%). 换言之,

在 1% 的底物浓度下测定的不溶酶活力为 150—200 单位,如改用 4% 底物时,则应大于 300—400 单位,按此计算,糖化一克淀粉所需的不溶酶与自然酶的单位差别不大。

与此相联系的一个问题,是如何计算不溶酶的相对活力与收率。自然酶制成不溶酶后,通常在性质上会发生一系列变化,如果沿用测定自然酶活力的条件来测定不溶酶活力,由于某些条件未必是不溶酶的最适条件,所测得的活力就可能偏低,例如 DEAE-葡萄糖凝胶-糖化酶按 1% 淀粉所测得的活力计算相对活力与回收率为 15% 左右,如按糖化淀粉液化液的能力来推算,则相对活力与回收率可达 35—45%。为了方便起见,在充分考虑到这些影响因素的情况下,采用与自然酶活力测定基本相同的条件来测定不溶酶活力,最后以实际应用时的催化能力相比较也是完全可以的。

利用离子交换剂制备不溶酶有不少优点,其缺点是牢度差,受条件影响大。我们发现不同批号发酵液所制备的不溶酶牢度、相对活力及回收率均有所不同。巴赫勒(Bachler)<sup>[3]</sup>及斯麦勒(Smiley)<sup>[4]</sup>用 DEAE-纤维素制备不溶性糖化酶取得了较好的结果,而我们用 DEAE-纤维素虽能吸附糖化酶,但很易解吸,牢度极差。官本<sup>[5]</sup>等也发现类似现象。这可能是由于酶源不同,其中含有某些干扰物质所致。

另一有趣的现象是 DEAE-纤维素与 DEAE-葡聚糖都具 DEAE 功能团,在制备不溶性氨基乙酰化酶时,无论是利用 DEAE-纤维素或 DEAE-葡聚糖凝胶作载体,结果都相当一致<sup>[6]</sup>,但我们利用这两种载体制备不溶性糖化酶时,即使使用同一样来源的酶液,制备出来的不溶酶牢度相差很大。这很可能是因为 DEAE-葡聚糖具

有网状结构, DEAE 基团从各方向与酶相结合, 从而增加了吸附牢度。倘若如此, 可考虑用离子交换吸附后再用适当交联剂交联, 以克服牢度不好这一缺点。这是一个值得进一步研究的问题。

### 参 考 资 料

[1] Browne, C. A. and Zerban F. W.: *Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis*, Third Edition p. S95—896, 1948.

- [2] 前田英胜、铃木英雄: 日本农芸化学会志, **44**: 547—555, 1970.
- [3] Bachler, M. J., Strandberg, G. W., Smiley, K. L.: *Biotechnology and Bioengineering*, **12**: 85—92, 1970.
- [4] Smiley, K. L.: *Biotechnology and Bioengineering*, **13**: 309—317, 1971.
- [5] Kazuhisa Miyamoto, Tomoko Fujū and Yoshiharu Miura: *J. Ferment. technol.*, **49**: 565—573, 1971.
- [6] Tosa, T., T. Mori, N. Fuse and I. Chibata: *Agr. Biol. Chem.*, **33**: 1047—1052, 1969.

## STUDIES ON IMMOBILIZED ENZYME

### I. THE PREPARATION OF IMMOBILIZED GLUCOAMYLASE BY ADSORPTION ON DEAE-SEPHADEX

#### RESEARCH GROUP OF IMMOBILIZED ENZYME

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

The immobilized glucoamylase has been prepared by using DEAE-Sephadex-A 50 as a solid support. The optimum pH of adsorption was 4.5—6.0 in 0.1 M sodium acetate buffer. In order to prepare an immobilized enzyme with higher relative activity to the free enzyme, about 50,000 activity units of enzyme adsorbed per gram of dry carrier was found to be suitable. The general properties such as optimum pH and temperature of bound glucoamylase were almost identical with those of the native one. However,

the Michaelis constant (Km) of DEAE-Sephadex-glucoamylase complex (0.023%) for soluble starch differed from that of the native enzyme (0.0057%). The bound enzyme was used to convert 30% starch solution (pre-liquefied with  $\alpha$ -amylase) to glucose in a stirred reactor and the DE of the product was higher than 95. After repeated operation for 10 times, the immobilized enzyme still retained 63% of its original activity.