

水不溶酶的 研 究

II. 对氨基苯磺酰乙基纤维素-葡萄糖淀粉酶的制备*

黎青翔 张绍愷 孙万儒 寇秀芬 杨廉婉 黎淑芳 杨开宇

(中国科学院微生物研究所, 北京)

1. 用甘蔗渣纤维素及对- β -硫酸酯乙砒基苯胺为原料, 研究了 ABSE-纤维素的制备条件, 探讨了黑曲霉 (*Asp. niger*) 粗制糖化酶共价键合到重氮化的 ABSE-纤维素上的影响因子。获得 ABSE-纤维素糖化酶合适的制备方法。

2. ABSE-纤维素糖化酶含 3.7—6.4% 蛋白量, 酶活力约为 10000 单位/克, 以淀粉为底物, 与自然酶比较, 相对活力为 20—30%, 偶联时加入适量的硫酸铵能提高相对活力至 43.9%。该水不溶酶最高活力是在 pH 4.5 和 65—70°C (对淀粉)。在 55°C 淀粉化液液中稳定性良好。

3. 将 ABSE-纤维素糖化酶 (33912 单位) 装柱, 在 55°C, 以 25.4 毫升/小时的流速通过 pH 4.5 的 31—34% 的淀粉液化液进行连续糖化, 218 小时内得到 DE 值为 93.9 的葡萄糖液, 326 小时后不溶酶柱仍保持原活力的 74.9%。而搅拌糖化在 140 小时后只保持 64.8% 原活力。

近十多年来, 对各种水不溶酶的制备已有不少评述^[1-4]。关于水不溶葡萄糖淀粉酶(以下简称不溶糖化酶)的研究, 威尔逊和利利 (Wilson & Lilly)^[5] 用烷化法制备了不溶糖化酶, 前田英胜和铃木英雄^[6,7] 用叠氮法制备了羧甲基纤维素-糖化酶, 最近, 他们^[8] 又制备了卤乙酰基纤维素-糖化酶。但这些研究仍未能很好解决大规模工业应用问题。

上海生物化学研究所曾用对氨基苯磺酰乙基葡聚糖凝胶 G 200 制备 5'-磷酸二酯酶的水不溶酶。广州市固相酶协作组用甘蔗渣人纤浆粕制备不溶糖化酶。前文^[9] 报道了用 DEAE-葡聚糖凝胶制备不溶性糖化酶。本文报道用对氨基苯磺酰乙基纤维素制备水不溶糖化酶的初步研究结果。

材料和方法

一、酶及试剂: 北京果脯厂生产的黑曲霉

(*Asp. niger* M-85) 716-2 发酵液, 经酸性白土处理后, 加入 75% 饱和度的硫酸铵, 沉淀制成浓酶制剂, 经透析后使用。对 β -硫酸酯乙砒基苯胺 [4-(α -Sulfatoethylsulfonyl)-aniline 简称 SESA] 为天津染料厂产品, 其氨基值和酯化值分别为 90—92% 和 80—85%。甘蔗渣纤维素 (含 15% 木纤维素) 为北京造纸二厂纸浆, 打浆度为 50 左右, 水煮半小时, 干燥后称一定重量, 悬浮于蒸馏水中经 8000—10000 转/分钟组织匀浆器搅拌 3 分钟。其它试剂均系分析纯或保证试剂。

二、酶活力的测定: 自然酶反应测定同前文^[9]。水不溶酶反应在 55°C, pH 4.5, 1% 可溶性淀粉液电动搅拌下进行, 用带砂芯漏斗的吸管吸滤取出反应液, 用威尔斯塔特-叔德尔 (Wills-tätter-Schudel)^[10] 次亚碘酸盐法及斐林氏液还原糖快速滴定法^[11]。测定还原糖量。空白用淀粉

* 在工作中, 承广州市固相酶协作组介绍许多宝贵经验, 北京果脯厂提供糖化酶发酵液, 对我们启发帮助很大, 特此致谢。

本文 1973 年 2 月 8 日收到。

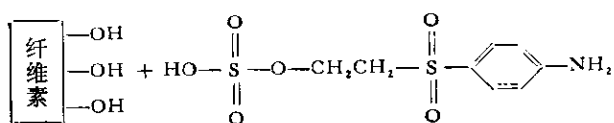
液。在上述酶反应条件下,以每小时催化生成 1 毫克葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活力单位。

三、葡萄糖值的测定: 淀粉液化液及糖化液的葡萄糖值,即葡萄糖占干物质总重量的百分数,以 DE 值表示。干物质量用比重法测定^[12]。葡萄糖测定用次亚磷酸盐法。

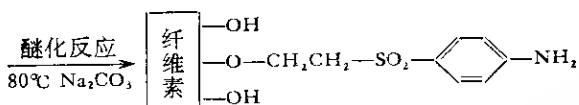
四、氮含量的测定: 用凯氏定氮法^[13]。

五、蛋白质含量的测定: 按劳里(Lowry)^[14]法,以结晶牛血清清蛋白为标准,用 72 型分光光度计,在 680 毫微米波长比色。

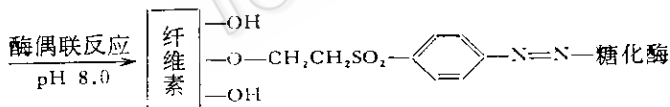
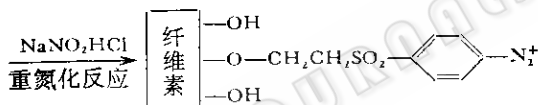
六、不溶糖化酶的制备: 过程如下:



甘蔗渣纤维素 对-β-硫酸酯乙酰胺基苯胺 (简称 SESA)



对氨基苯磺酰乙基纤维素
(简称 ABSE-纤维素)



具体操作如下:称 1.25 克 SESA,加水 3.8 毫升,2% Na_2CO_3 (溶于 0.1N NaOH 中) 11.2 毫升, pH 6.4—6.7, 过滤,弃去滤渣。将上述的甘蔗渣纤维素湿浆抽干,以相当于干重 1 克的纤维素加入上述 SESA 液中,搅匀,于 78℃ 水浴中保温 10 分钟,加入 0.75 克 NaCl, 13 分钟后加入 0.6 克 Na_2CO_3 , 升温至 83℃, 搅拌, 30 分钟后, 冷却, 抽干, 用蒸馏水洗 5 次 (每次约 60 毫升), 抽干, 即得 ABSE-纤维素。在 0—5℃ 下, 加水 2.4 毫升, 1N HCl 5.6 毫升, 搅匀, 慢慢滴加 4 毫升 5% NaNO_2 , 搅匀, 20 分钟后抽干, 用冷 0.05N HCl 洗 3 次 (每次约 60 毫升) 最后用冷水洗 1—2 次, 最终 pH 在 4.5 左右, 抽干, 立刻在 0—5℃ 下, 滴加用 0.5M Na_2CO_3 调节 pH 至 8.0 的糖化酶液 8

毫升 (约 1 万单位/毫升), 搅拌均匀 (此时 pH 下降至 5.8 左右), 再用 0.5M Na_2CO_3 滴加调 pH 至 8.0, 0.5—3 小时后用冷水洗四次 (每次约 50 毫升), 即得不溶糖化酶。

实验结果

一、水不溶糖化酶的制备

(一) 纤维素的选择: 用不同来源的纸浆纤维素在相同条件下制备水不溶糖化酶, 以甘蔗渣纤维素的偶联酶量和不溶酶活力较高, 其中又以打浆的较好 (表 1)。因而选用打浆的甘蔗渣纤维素制备不溶糖化酶。

表 1 不同品种纤维素制备不溶酶比较

品 种*	偶联酶量** (单位/克载体)	不溶酶活力 (单位/克)	
甘蔗纸浆	已	50154	11880
稻麦纸浆	打	25092	8040
竹 纸 浆	浆	18330	5712
甘蔗浆粕	未 打 浆	19126	8640
针叶树浆粕		12364	5560
芦苇浆粕		16342	4080
棉短绒浆粕		6504	1848

* 甘蔗纸浆为北京第二造纸厂产品; 稻麦纸浆 (2:1 W/W) 为保定造纸厂产品; 竹纸浆为上海前卫造纸厂提供; 甘蔗浆粕为广东江门甘蔗化工厂产品; 针叶树浆粕为瑞典产品; 芦苇浆粕为镇江浆粕厂产品; 棉短绒浆粕为保定化纤厂产品。

** 偶联酶量: 为结合到载体上的酶量。给酶量为 96696 单位 (8 毫升)/克载体。

(二) 醚化反应条件

1. 浴比: 以二种浴比制得的 ABSE-纤维素用于偶联糖化酶, 不溶酶活力无显著差异 (表 2) 为减低 SESA 用量, 以后实验均采用 1:15 浴比。

2. SESA 用量: 每克纤维素 SESA 用量由 0.25 增至 1.0 克, 制得的 ABSE-纤维素含氮量亦增加, 相应偶联酶量及蛋白量、不

表2 不同溶比醚化反应比较

反应溶比*	反应物用量(克/克纤维素)			偶联酶量 (单位/克载体)	偶联蛋白量 (毫克/克载体)	不溶酶活力 (单位/克)	相对活力 (%)
	SFSA	Na ₂ CO ₃	NaCl				
1:30	2.5	1.2	1.5	59040	52.1	12288	20.8
1:15	1.25	0.6	0.75	72292	64.6	12648	17.5

* 反应溶比为纤维素: 反应液 (W/V)。
给酶量为 109420 单位 (8 毫升)/克载体。

表3 不同 SESA 用量醚化反应比较

SESA 用量 (克/克载体)	ABSE-纤维素含氮量 (%)	偶联酶量 (单位/克载体)	偶联蛋白量 (毫克/克载体)	不溶酶活力 (单位/克)	相对活力 (%)
0.25	0.121	9144	12.8	4730	51.7
0.50	0.157	27870	35.8	8618	30.9
0.75	0.159	33378	39.8	9698	29.0
1.00	0.198	49902	56.8	11037	22.1
1.25	0.246	48250	64.8	10994	22.7

给酶量 73586 单位 (8 毫升)/克载体。

溶酶活力亦增加。但 SESA 用量由 0.75 增至 1.25 克时不溶酶活力增加不显著, 因而每克纤维素用 0.75 克 SESA 较适宜(表 3)。

3. Na₂CO₃ 用量: 醚化反应是在碱性条件下进行, 每克纤维素 Na₂CO₃ 用量由 0.3 至 0.6 克所制备的不溶酶活力迅速增加。Na₂CO₃ 用量由 0.6 克增至 1.2 克时,

偶联酶量增加, 不溶酶活力增加不多, 因而相对活力下降(图 1)。每克纤维素 Na₂CO₃ 用量以 0.6—0.8 克较适宜。

4. 氯化钠用量: 不同量氯化钠对载体偶联酶量及不溶酶活力影响不大(表 4)。

表4 氯化钠对醚化反应的影响

氯化钠量 (克/克纤维素)	偶联酶量 (单位/克载体)	不溶酶活力 (单位/克)	相对活力 (%)
0	45342	6690	12.1
0.375	45342	6690	12.1
0.750	45342	7340	13.3
1.500	41022	7560	18.4

给酶量 45342 单位 (4 毫升)/克载体。

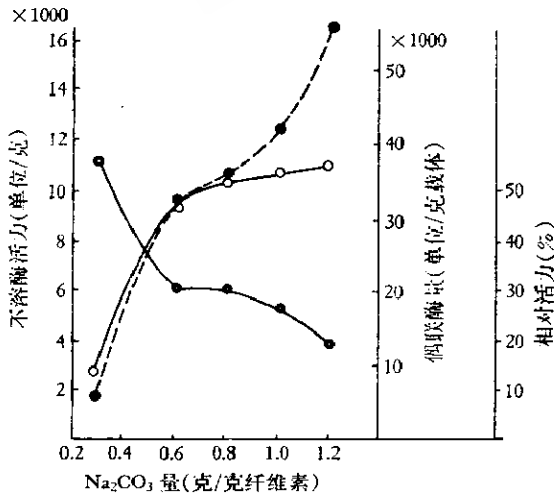


图1 Na₂CO₃ 用量与不溶酶活力的关系
●---● 偶联酶量 ●——● 相对活力
○——○ 不溶酶活力

(三) 重氮化反应及偶联反应的条件:

1. 温度的影响: 由于重氮盐中间物不稳定, 分别在 5、15 和 20℃ 进行重氮化反应及偶联酶反应, 试验证明可在 15℃ 以下进行(表 5)。

2. 酶量及酶浓度与偶联的关系: 用不同酶浓度的相同酶量进行比较, 酶浓度越低, 偶联酶量及蛋白量越少, 不溶酶活力亦下降(表 6)。因而需要较高的酶浓度偶联

表 5 不同温度下重氮化及偶联酶比较

温度 (°C)	偶联酶量 (单位/克载体)	偶联蛋白量 (毫克/克载体)	不溶酶活力 (单位/克)	相对活力 (%)
5	32056	34	8532	26
15	32608	34	9180	28
20	29854	42	7236	24

给酶量 72264 单位 (8 毫升)/克载体。

表 6 不同浓度酶液的偶联反应

每克载体加入量		偶联酶量	偶联蛋白量	不溶酶活力	相对活力
酶量 (单位/毫升)	蛋白浓度 (毫克/毫升)	(单位/克载体)	(毫克/克载体)	(单位/克)	(%)
90576/8	13.8	42840	42.8	10400	24.2
90576/40	2.64	26140	26.1	6480	24.7
90576/80	1.32	20196	20.2	3600	17.8
90576/120	0.88	20932	14.9	2880	19.2

才能获得较高的不溶酶活力。如再增大酶浓度一倍左右(表 7 第 2, 3 项), 偶联酶量及不溶酶活力略有增加。如再增大酶量一倍, 偶联酶量增加, 但不溶酶活力增加不显著(表 7 第 1, 2 项), 由此可见过高的酶浓度及过大的酶量并不能显著提高不溶酶活力。

表 7 不同酶量及浓度的偶联反应

处理号	给酶量及浓度 (单位/毫升/克载体)	偶联酶量 (单位/克载体)	不溶酶活力 (单位/克)	相对活力 (%)
1	106272 (4 毫升)	27552	10368	37.6
2	212544 (8 毫升)	43050	11280	26.2
3	102336 (8 毫升)	36778	9120	24.7

3. pH 对偶联反应的影响: pH 对酶偶

联基团有较大影响, 故在不同 pH 下进行偶联试验, 结果以 pH6 较好(表 8), 但有时在 pH6 制备的不溶酶分散度较差。

表 8 不同 pH 对酶偶联的影响

pH	偶联酶量 (单位/克载体)	不溶酶活力 (单位/克)	相对活力 (%)
3.5	39601	4000	10.1
5	50252	4615	9.2
6	56409	10433	18.4
8	56409	9843	17.4

给酶量为 56409 单位 (4 毫升)/克载体。

4. 硫酸铵对偶联酶的影响: 加入一定量硫酸铵虽降低偶联酶量, 但能提高不溶酶活力、相对活力及回收率(表 9)。

二、水不溶糖化酶的一些性质

(一) 最适 pH: 试验证明, 水不溶糖化酶活力在 pH4.5 最高(图 2)。

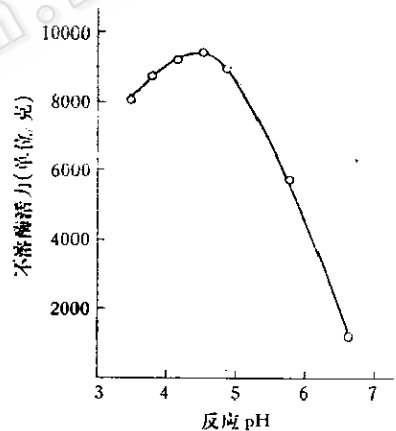


图 2 不溶性糖化酶 pH 活力曲线

(二) 最适温度: 酶促反应在 10 分钟时, 温度在 65—70℃ 之间不溶酶活力最

表 9 硫酸铵对酶偶联的影响

处 理	铵盐量 (μ moles/克载体)	载体偶联硫酸铵量 (μ moles/克载体)	偶联酶量 (单位/克载体)	偶联蛋白量 (毫克/克载体)	不溶酶活力 (单位/克)	活力提高 (%)	相对活力 (%)	回收率*
对 照	0	0	49310	51.2	10800	0	21.9	21.9
硫 酸 铵	1260	52.1	35810	36.8	15750	45.8	43.9	31.9

* 回收率 = $\frac{\text{表现活力}}{\text{给酶量}} \times 100\%$ 。

给酶量为 49310 单位 (4 毫升)/克载体。

表 10 ABSE-纤维素-糖化酶的搅拌糖化

加入酶单位/克干淀粉	糖化次数 (每次 14 小时)										糖化十次后(共140小时) 剩余活力 (%)
	DE 值										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
340	97.6	96.5	97.6	94.9	96.0	95.3	93.8	95.2	95.1	91.7	64.8
170	91.2	86.0	86.1	80.1	82.9	84.4	78.7	88.7	84.8	77.7	68.1

分别在 400 毫升 32% 左右经过滤的淀粉液化液中, 加入 4 克及 2 克水不溶糖化酶(分别相当 340 及 170 活力单位/克干淀粉), 在 55℃ pH 4.5 下电动搅拌糖化, 每次 14 小时。

高(图 3)。

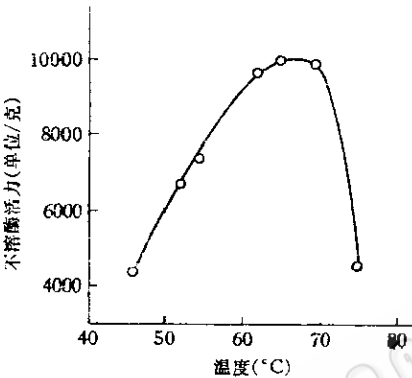


图 3 不溶性糖化酶最适温度

(三) 稳定性: 在无底物存在下, 将水不溶糖化酶在不同温度下保温 4 小时, 活力下降较快, 55℃ 下降 35%, 60℃ 下降 65% (图 4)。如在 31—34% 淀粉液化液

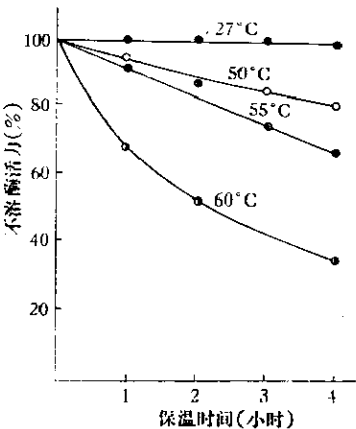


图 4 无底物保温对不溶酶活力的影响

中 55℃ 保温 326 小时, 活力才下降 25% (表 11)。可见底物的存在能提高不溶酶对热的稳定性。在 55℃ pH 4.5 下进行 10 次不溶酶活力的连续测定, 酶活力仅损失约 7%。在冰箱保存三个月仍保持原有活力。

表 11 ABSE-纤维素-糖化酶柱型糖化

糖化时间 (小时)	DE 值	淀粉液化液浓度 (%)	流出液体体积 (毫升)	糖化淀粉克数	剩余活力 (%)
26	96.86	34.38	2245	771.83	
38	95.66				
62	95.02				
86	94.7				
98	95.10	31.27	2344	732.96	
110	94.70				
146	94.10				
182	93.90				
218	93.9				
总计			5379	1773.24	
230	91.7	33.81			74.9
266	89.7				
326	86.2				

用 4 克不溶糖化酶 (8478 单位/克), 装在 3×30 柱内, 在 55℃, 以平均流速 25.4 毫升/小时, 通过经过滤的 pH 4.5 的 31.27—34.38% 淀粉液化液。

三、糖化试验

用同批制备的相同活力单位的不溶糖化酶分别进行搅拌及柱型糖化试验。

(一) 搅拌糖化: 用 4 克不溶酶(相当

于 340 单位/克干淀粉)连续糖化 9 次, DE 值仍达 95.1, 第 10 次糖化 DE 值即有下降。如用 2 克不溶酶(相当于 170 单位/克干淀粉)进行糖化, DE 值不高(表 10)。

(二) 柱型糖化: 将与搅拌糖化相同活力单位的不溶糖化酶 4 克装柱进行糖化试验, 最初流出液 DE 值达 96.8, 至 218 小时为 93.9, 在相同流速下以后 DE 值逐渐下降(表 11)。

试验证明, 用不溶糖化酶进行搅拌糖化, 140 小时后剩余酶活力为 64.8% (表 10), 而柱型糖化 326 小时后仍保持 74.9% 的原酶活力(表 11), 可见柱型糖化较搅拌糖化对不溶糖化酶的稳定性有利。

讨 论

通过共价键偶联制备水不溶酶, 已有很多报道, 苏里诺夫和马诺依洛夫(Суринов и Манойлов)^[15] 用类似于 ABSE-纤维素的 1-甲氧基氨基苯磺酰乙基纤维素偶联胰蛋白酶等。但用 ABSE-纤维素作为不溶酶载体, 国外尚未见报道。SESA 是乙烯砷型活性染料的活性基, 是一种来源方便, 成本也较低的化合物。甘蔗渣纤维素价格低廉, 经打浆后具有良好的反应性能及较好的过滤性能。二者均具有应用前途。通常共价键偶联酶比较牢固, 但操作不当容

易使酶失活, ABSE-纤维素糖化酶的相对活力对麦芽糖为 94%, 对淀粉为 20—30%, 加入适量硫酸铵可达 43.9%, 说明用此法制备不溶糖化酶效果较好。

前田英胜等报道 CMC-糖化酶的相对活力对麦芽糖为 90%, 对淀粉为 15—17%^[6]。其每克活力为 57 国际单位(对麦芽糖), 蛋白质含量为 29 毫克^[7]。每克卤乙酰基纤维素-糖化酶活力为 194 国际单位(对麦芽糖), 蛋白质含量为 26—43 毫克^[8]。我们制备的 ABSE-纤维素糖化酶, 每克活力为 335 国际单位(对麦芽糖), 蛋白质含量为 37—64 毫克。

不同含氮量的 ABSE-纤维素制备的不溶糖化酶活力与相对活力成反比关系(表 3), 可能是有空间障碍时构型改变所致。

CMC-糖化酶柱型糖化淀粉液化液^[7], 在 40℃ pH 4.5 条件下经过 28 天保持 78% 原酶活力, 在 50℃ 条件下只保持 33% 原酶活力。ABSE-纤维素糖化酶在 55℃ pH 4.5 柱型糖化 13 天, 保持原酶活力 74.9%, 因而其稳定性的提高有待进一步研究。

ABSE-纤维素糖化酶柱型连续水解淀粉至 216 小时的克数与发酵液的自然酶比较, 如按偶联酶量计算, 提高 4.21 倍。如按不溶酶活力计算则提高 15.69 倍(表 12)。

表 12 不溶酶与自然酶糖化效率比较

糖化方法		酶量 (单位)	糖化时间 (小时)	水解干淀粉量 (克)	糖化效率比	水解淀粉速度 (克/小时)	剩余酶活力 (%)
以偶联酶量比较	不溶酶柱糖化	125668	218	1773.2	4.21	—	326 小时后仍有 74.9
	自然酶糖化*	125668	24	418.9	1.00	—	流失
以不溶酶活力比较	不溶酶柱糖化	33912	218	1773.2	15.69	8.13	326 小时后仍有 74.9
	自然酶糖化*	33912	24	113.0	1.00	4.7	流失

* 自然酶糖化是用发酵液糖化 30% 淀粉液化液, 加酶量为 300 单位/克干淀粉。

参 考 资 料

- [1] Silman, I. H. and Katchalski, E.: *Ann. Rev. Biochem.*, **35**: 873—908, 1966.
- [2] 土佐哲也、千畑一郎：发酵协会志，**25**: 49—57, 1967.
- [3] Goldman, R. Goldstein, L. and Katchalski, E.: Biochemical aspects of reactions on solid supports. Stark, G. R. (Eds.), Academic Press, p. 1—78, 1971.
- [4] Melrose, G. J. H.: *Rev. Pure Appl. Chem.*, **21**: 83—119, 1971.
- [5] Wilson, R. J. H. and Lilly, M. D.: *Bio-technol. Bioeng.*, **11**: 349—362, 1969.
- [6] 前田英胜、铃木英雄：日本农芸化学会志，**44**: 547—555, 1970.
- [7] 前田英胜、宫道慎二、铃木英雄：发酵协会志，**28**: 391—397, 1970.

- [8] Maeda, H. and Suzuki, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 1581—1593, 1972.
- [9] 中国科学院微生物研究所不溶酶组：微生物学报，**13**(1): 24—29, 1973.
- [10] Willstätter, R. and Schudel, G.: *Ber.*, **51**: 780, 1918.
- [11] 沈汎猷译：化学世界，第7期 344—346, 1955.
- [12] Horwitz, W. Ed.: In official methods of analysis of the association of official agricultural chemists, 9th Ed. Plato table, p. 704—709, 1960.
- [13] Kieldahl, J.: *Z. Anal. Chim.*, **22**: 366, 1883.
- [14] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Ranadall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275, 1951.
- [15] Суринов, Б. П. и Манойлов, С. Е.: *Биохимия*, **31**: 387—397, 1966.

STUDIES ON IMMOBILIZED ENZYME

II. PREPARATION OF P-AMINO BENZENESULFONYLETHYL
CELLULOSE-GLUCOAMYLASE COMPLEX

LI KAO-HSIANG, CHANG SHAO-KAI, SUN WAN-RHU, KU SHU-FEN,
YANG LIEN-WAN, LI SHU-FANG AND YANG KAI-YU
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking)

1. The preparative conditions for ABSE-cellulose have been investigated by using bagasse cellulose and 4-(2-sulfatoethylsulfonyl)-aniline as the basic materials. ABSE-cellulose glucoamylase was prepared by covalent bonding the native glucoamylase to the diazotized ABSE-cellulose. The effect of some factors on the coupling of crude glucoamylase from *Asp. niger* to ABSE-cellulose has also been investigated, and the optimum procedure for the preparation of ABSE-cellulose glucoamylase has been established.

2. The immobilized glucoamylase contained 3.7—6.4% of protein, and its activity was about 10000 units/g. Generally, the relative activity to starch was about 20—30% of that of the native one, but in the presence of appropriate amount of ammonium sulfate during coupling the relative

activity could be raised to 43.9%. The optimum pH and optimum temperature for ABSE-cellulose glucoamylase action on starch were determined, and the highest activity was at pH 4.5 and 65—70°C. It showed good heat stability in starch solution at 55°C.

3. ABSE-cellulose-glucoamylase of 33912 units of activity was packed in a column and then continuous saccharification of 31—34% liquefied starch at pH 4.5 was performed by passing the solution through the column at a flow rate of 25.4 ml/hr. at 55°C. Glucose solution above 93.9% purity was obtained in 218 hrs. The column maintained 74.9% of the initial activity after 326 hrs, while the saccharification under stirring condition retained only 64.8% of the initial activity after 140 hrs.