

## 研究报告

# 红曲霉葡萄糖淀粉酶的研究

## I. 提纯和结晶

中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组\*

(北京)

红曲霉的葡萄糖淀粉酶具有多形性。经聚丙烯酰胺盘状凝胶电泳可分离为几个距离很近的带, 暂定为带 1、2、3、4 和 5。酶制剂浸出液经硫酸铵盐析, 凝胶过滤脱盐和 DEAE-纤维素柱层析, 初步得到两个洗脱部分。部分 I 以带 4 为主, 部分 II 以带 3 为主。两部分均提纯约 2.5 倍, 收率合计 27%。将部分 I 或 II 用硫酸铵沉淀出酶蛋白, 再用逐步降低浓度的硫酸铵溶液在 0°C 抽提, 然后在 7°C 放置数周, 在盐饱和度为 56、54、52% 的抽提液中均出现结晶, 结晶为针状, 并聚成麦捆状、放射状或球状晶簇。长径可达 50—100 微米。

葡萄糖淀粉酶 (Glucoamylase EC 3·2·1·3) 能将淀粉几乎百分之百地水解为葡萄糖。近年来已广泛用于葡萄糖的工业生产, 代替了酸水解法。应用于生产的菌种有根霉、黑曲霉、拟内孢霉等。关于这些菌产生的酶的提纯及性质已有不少报道<sup>[1-8]</sup>。已经由其中得到结晶酶的有德氏根霉 (*Rhizopus delemar*)<sup>[5,6]</sup>、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)<sup>[6]</sup>、内孢霉 (*Endomyces sp.*)<sup>[7]</sup> 及鲁氏毛霉 (*Mucor rouxianus*)<sup>[8]</sup> 等。我们曾进行过红曲霉葡萄糖淀粉酶的研究并已应用于生产<sup>[9]</sup>。为了解决生产中存在的一些问题, 并对酶本身的物理化学性质作进一步了解, 我们进行了一些基础工作。本文报道酶提纯及结晶的研究结果。

## 材料和方法

一、酶制剂 生产菌种为红曲霉 (*Monascus sp.*) AS 3.978 的变异株 AS 3.2199 和 AS 3.3491。由无锡酶制剂厂生产, 简称糖化酶。活力为每克

2 万单位或 8 万单位。

二、主要化学药品及仪器 DEAE-纤维素 DE 11 为 Whatman 厂产品。QAE-Sephadex A50、Sephadex G 25 为 Pharmacia 产品, 紫外分光光度计为 Unicam SP700c 型。72 型光电分光光度计为上海分析仪器厂产品, PHS-2 型 pH 计及 DDS-11A 型电导率仪为上海第二分析仪器厂产品。流动紫外光吸收计 Uricord II 为 LKB 产品。偏光显微镜为 Zeiss NF 型。

三、酶活力测定方法 反应系统为 2% 可溶性淀粉溶液 5 毫升 (0.1 M pH 4.5 醋酸缓冲液), 视酶液浓度不同加入不同毫升数的酶液, 酶蛋白含量一般控制在 50—70 微克左右。以水补足到总体积为 10 毫升。在 50°C 保温 10 分钟。立即在沸水浴中煮沸 10 分钟停止反应。取反应液 0.5 毫升。用 3,5-二硝基水杨酸比色测定还原糖<sup>[10]</sup>。在所用条件下, 每小时生成 1 毫克葡萄糖定为 1 酶活力单位。

四、一般分析法 蛋白质测定用 Lowry

本文于 1976 年 5 月 8 日收到。

\* 中国科技大学生物物理专业参加部分工作。

法<sup>[11]</sup>,或在 280 毫微米测光吸收,按下式计算<sup>[12]</sup>:

$$\text{蛋白质(毫克/毫升)} = 1.45 E_{280} - 0.74 E_{260}$$

铵盐浓度用奈氏(Nessler)试剂比色测定。

五、聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳(简称凝胶电泳)按 Davis<sup>[13]</sup>方法进行。凝胶浓度为 7%。用考马斯亮蓝 R 250 染色。

## 实验结果

### 一、硫酸铵分划

用饱和硫酸铵将蛋白质沉淀下来,再用逐步降低饱和度的硫酸铵分次抽提,分别测定抽提物的酶活及蛋白质,结果见图 1。蛋白质及酶活主要分布在硫酸铵饱和度为 35—60% 之间。在 47.5% 饱和度时比活最高。因为硫酸铵浓度是逐步由高到低,实际上的浓度要比此数值高一些。

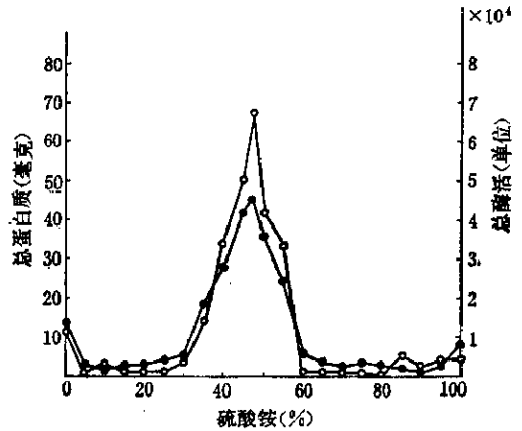


图 1 抽提液硫酸铵的饱和度和酶分布

### 二、葡萄糖淀粉酶的多形性

用 3.2199 菌株生产的每克 2 万活力单位的酶制剂,经过硫酸铵沉淀并脱盐之后,进行凝胶电泳,用氨基黑 10 B 染色,

表 1 凝胶电泳各带的酶活力

| 酶带  | $R_m$ | 蛋白质含量*<br>毫克/毫升 | 酶活<br>单位/毫升 | 比活*<br>单位/毫克 | 凝胶电泳检查 |    |     |    |    |
|-----|-------|-----------------|-------------|--------------|--------|----|-----|----|----|
|     |       |                 |             |              | 1      | 2  | 3   | 4  | 5  |
| 1   | 0.79  | 0.28            | 78          | 278          | ++     | +  |     |    |    |
| 2   | 0.73  | 0.33            | 156         | 473          |        | ++ |     |    |    |
| 3   | 0.68  | 0.41            | 240         | 585          |        |    | ++  |    |    |
| 4   | 0.63  | 0.41            | 222         | 542          |        |    |     | ++ |    |
| 5   | 0.58  | 0.40            | 102         | 256          |        |    | +   | +  | ++ |
| 原酶液 |       | 25.40           | 20,400      | 805          | +      | +  | +++ | ++ | ++ |

\* 凝胶对蛋白测定有干扰,测定值偏高,故比活较低。

其凝胶电泳图谱表现为单一的蛋白质带,但带相当宽。改用考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue) R-250 染色,则可看出是距离很近的 5 条带。各带的比移值 [ $R_m$ (蛋白质带泳动距离/溴酚兰(前沿)泳动距离)] 经过多次测量,比较恒定。因此同时作 8—15 管凝胶电泳,根据  $R_m$  值将各带切下来,分别汇集在一起。切碎后用蒸馏水抽提,测定蛋白质及酶活。为了鉴定切割是否准确,再进行一次凝胶电泳检查,结果见表 1。

表中酶带数字是以距正极最近的为 1。由表 1 结果可以看出,5 条带基本上都有酶活力,但带 1 和带 5 比活较低,而且混有少量其它带,其活力尚不能完全肯定。

### 三、酶的提纯

1. 浸出: 称取 100 克酶制剂,加到 500 毫升预热至 37℃ 的蒸馏水中,继续在 37℃ 保温 1 小时。不时搅拌,用折叠滤纸过滤,除去残渣,即为酶浸出液。

**2. 硫酸铵沉淀:** 酶制剂为硫酸铵沉淀剂,浸出液中含有硫酸铵,用奈氏试剂测定浓度,计算出硫酸铵饱和度(一般在10—15%)。再加计算量的硫酸铵至70%饱和度\*,放冰箱中过夜,于0℃左右,13,000转/分离心分离沉淀,溶于蒸馏水。

**3. 凝胶过滤脱盐:** 上述溶液加到Sephadex G25柱(3×25厘米),加样18—20毫升。用蒸馏水洗脱,用30%三氯乙酸检查,出现蛋白时开始收集,至出现铵离子(奈氏试剂检查)止。一般收集35—40毫升。

**4. DEAE-纤维素柱层析:** DE 11纤维素预先用0.5N NaOH—0.5N HCl—0.5N NaOH交替浸泡半小时,酸硷更换之间及最终均用蒸馏水洗至中性。再浸于起始缓冲液(pH 5.80, 0.08M或0.1M醋酸),用0.2M醋酸调pH至5.80,自然沉

降装柱(1.8×45.5厘米),用起始缓冲液平衡,至流出液与起始缓冲液的pH及电导率相同。将上步脱盐酶液调整至与起始缓冲液相同的pH及电导率后上柱,再用起始缓冲液平衡。然后用直线浓度梯度洗脱。下限为起始缓冲液750毫升。上限为pH 5.80, 0.25M醋酸缓冲液750毫升。流速每小时25—30毫升。自洗脱开始时收集,每管10毫升。用紫外分光光度计测定每管280毫微米的吸光度(或透光率)。每隔10管测定酶活、pH及电导率。选择分布在洗脱峰不同位置的管进行凝胶电泳,并根据此结果合并洗脱液。柱层析结果见图2, pH一直稳定在5.80,故图中未画出。图右上角是各管凝胶电泳示意图。将25—35管合并为洗脱液部分I, 36—48管合

\* 根据硫酸铵逐步由低到高浓度分级沉淀结果决定。

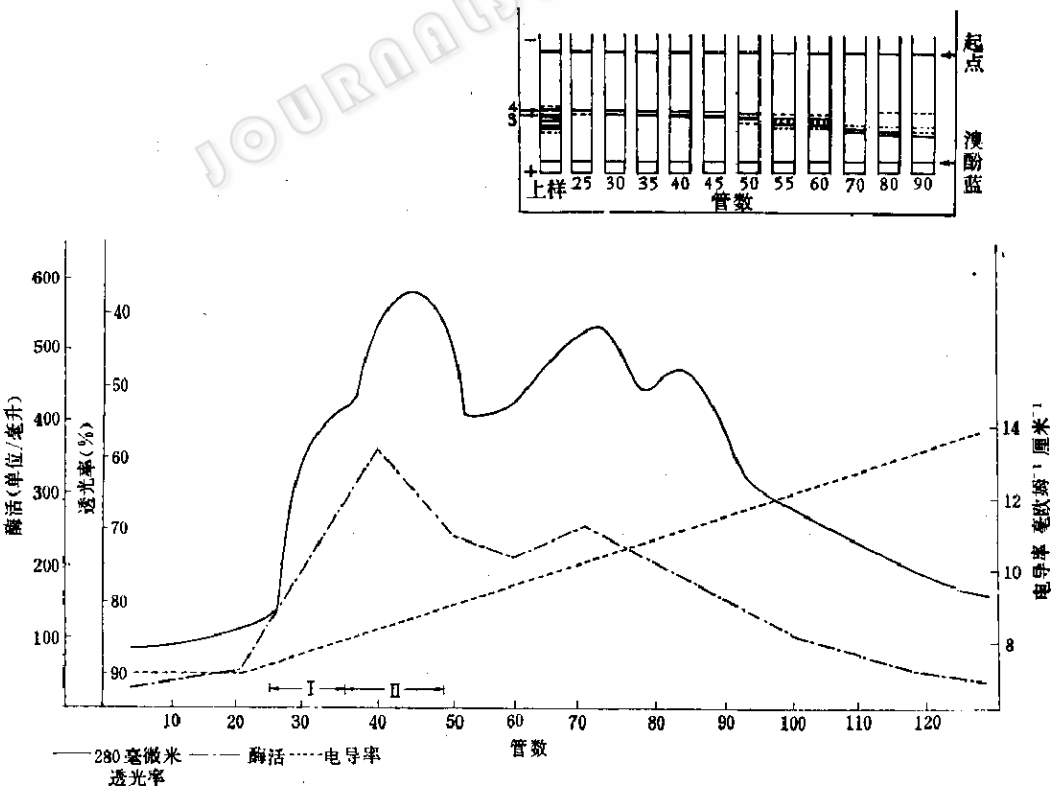


图2 DEAE-纤维素柱层析洗脱图谱

并,为洗脱液部分 II。部分 I 以带 4 为主,部分 II 以带 3 为主。50 管以后的各管凝胶电泳带比较复杂,主要是带 1、2 及 5 等(图版 I-1 为提纯各步的凝胶电泳照片)。从酶活曲线看,这些带均有酶活。与前面凝胶切段的试验相符。将部分 I 及 II 分别在同样条件下进行再层析,未能得到凝胶电泳均一的样品。

各步提纯结果列于表 2。提纯 2.5 倍左右。两部分合计酶活收率 27% 左右。

**5. 浓缩:** 因为由柱上下来的洗脱液部分蛋白质浓度太低,所以通常将几批柱

层析样品合并。用 QAE-Sephadex A50 柱 (2.8×18 厘米) 进行浓缩。QAE-Sephadex A50 预先用 0.1N NaOH—0.1N HCl—0.1N NaOH 预处理,水洗至中性。用起始 pH5.80, 0.05M 醋酸缓冲液平衡。将柱层析合并样品用蒸馏水稀释一倍。连续通过柱,上柱结束后,用含有 0.5N NaCl 的起始缓冲液洗脱。用 Uvicord II 监测,收集 280 毫微米吸收峰部分。

浓缩的结果见表 3,比上柱液浓缩 20 倍(比原洗脱液浓缩 10 倍),收率 90% 左右。

表 2 葡萄糖淀粉酶的提纯\*

| 提纯步骤         | 体积<br>(毫升)             | 酶活<br>(单位/毫升) | 总酶活<br>(单位) | 蛋白质<br>(毫克/毫升) | 总蛋白质<br>(毫克) | 比活<br>(单位/毫克) | 提纯<br>倍数 | 得率 (%) |      |
|--------------|------------------------|---------------|-------------|----------------|--------------|---------------|----------|--------|------|
|              |                        |               |             |                |              |               |          | 酶活     | 蛋白   |
| 酶浸出液         | 28.5<br>(酶制剂)<br>7.8 克 | 6,820         | 195,000     | 18.0           | 512.0        | 379           | 1        | 100    | 100  |
| 硫酸铵<br>沉淀    | 5.9                    | 41,600        | 244,000     | 70.0           | 413.0        | 595           | 1.57     | >100   | 80   |
| G-25<br>脱盐   | 14                     | 16,700        | 233,000     | 23.5           | 329.0        | 710           | 1.87     | >100   | 63.9 |
| 洗脱液<br>部分 I  | 110                    | 164           | 18,000      | 0.168          | 18.4         | 978           | 2.59     | 9.2    | 3.5  |
| 洗脱液<br>部分 II | 130                    | 276           | 35,800      | 0.300          | 39.0         | 921           | 2.43     | 18.4   | 7.6  |

\* 此次所用酶制剂为 3.2199 菌株生产的每克 8 万单位的制品。前三步的体积是根据柱层析上柱液的量折合而成的。

表 3 洗脱液的浓缩

| 样 品 | 体 积<br>(毫升) | 酶 活<br>(单位/毫升) | 总酶活<br>(单位) | 蛋 白 质<br>(毫克/毫升) | 总蛋白质<br>(毫克) | 比 活<br>(单位/毫克) | 得 率 % |     |
|-----|-------------|----------------|-------------|------------------|--------------|----------------|-------|-----|
|     |             |                |             |                  |              |                | 酶 活   | 蛋 白 |
| 上柱液 | 1200*       | 97.4           | 11,700      | 0.105            | 126          | 926            | 100   | 100 |
| 浓缩液 | 50          | 2,180          | 10,910      | 2.06             | 103          | 1060           | 93    | 82  |

\* 原柱层析洗脱液 600 毫升稀释成的。

#### 四、酶的结晶

按 Jakoby 的方法<sup>[14]</sup>,先将酶蛋白用硫酸铵沉淀下来,再在 0℃ 用逐步降低浓度的硫酸铵溶液抽提,然后在室温结晶。这

是利用酶蛋白在低温溶解度高,逐步升高温度时溶解度降低的性质,使之析出结晶。具体操作如下:取上述提纯并浓缩的部分 I 或 II 洗脱液,对蒸馏水彻底透析除盐,在冰浴中慢慢加入预先磨细的分析纯硫酸

铵至饱和,放冰箱中过夜,在 0°C 离心,弃去上清液。根据前面硫酸铵分级抽提试验的结果,选用饱和度为 60、56、54、52 及 50% 的硫酸铵溶液依次抽提,放冰浴中 20—30 分钟。在 0°C (有时低至 -5—-7°C) 离心, 12,000 转/分, 20 分钟。立即将上清液倒入玻璃磨口塞试管中,放入 4°C 冰箱中,然后每隔 10—12 小时交替放置在 7°C 和 4°C 冰箱中,过 5 天左右即出现大量沉淀。继续在 7°C 放置长时间,每隔 1—2 周用偏光显微镜检查,数周后即出现针状结晶及晶簇。随时间延长,晶簇增多并长大(50—100 微米)。由麦捆状图版 I-2a, 2b 变成放射状(图版 I-2a)以至球状(图版 I-2c)。在正交偏光显微镜下,放射

状晶簇的第一、三象限亮度较强(白色)。第二、四象限则为黑色(见图版 I-2a, 2b)。球状晶簇表现出斜的黑十字形消光(图版 I-2c) 摇动试管可以见到明显的丝光。三批结晶试验结果汇总于表 4。可以看出在 56, 54 及 52% 饱和度的硫酸铵抽提液中均可形成结晶。

将结晶悬液在 7°C 离心,母液倒入另一试管,将结晶溶于与母液等体积的蒸馏水中。分别测定蛋白及酶活,并经凝胶电泳鉴定,结果见表 5。第一批 56% 盐饱和度的抽提液(1—56)中,结晶物蛋白质含量相当于母液的 7 倍。比活高一倍。第二批 52% 饱和度的(2—52)结晶物蛋白质含量相当于母液的 4 倍多。比活略高。因

表 4 葡萄糖淀粉酶的结晶情况

| 实验批号 | 起始样品                      | 硫酸铵抽提液 |    | 出现混浊时间<br>(小时) | 蛋白质沉淀量<br>(目测)* | 看到结晶时间<br>(天) |
|------|---------------------------|--------|----|----------------|-----------------|---------------|
|      |                           | 饱和度 %  | 毫升 |                |                 |               |
| 1    | 部分 II 23 毫升<br>蛋白质 65 毫克  | 60     | 2  | —              | —               | —             |
|      |                           | 56     | 2  | 72             | +++             | 60            |
|      |                           | 54     | 2  | 1.5            | +++             | 45            |
|      |                           | 52     | 3  | 20             | +++             | 胶冻状           |
|      |                           | 50     | 2  | —              | —               | —             |
| 2    | 部分 I 30 毫升<br>蛋白质 100 毫克  | 56**   | 2  | >72            | +               | —             |
|      |                           | 54     | 2  | 1              | +++             | 50            |
|      |                           | 52     | 2  | 1              | +++             | 40            |
| 3    | 部分 II 30 毫升<br>蛋白质 130 毫克 | 60     | 3  | —              | —               | —             |
|      |                           | 56     | 3  | >72            | +               | —             |
|      |                           | 54     | 3  | 24             | +++             | 42            |
|      |                           | 52     | 3  | 24             | +++             | 25            |

\* — 不出现沉淀, +++ 占试管液体一半以上。 \*\* 因操作不慎,实际上是 53.7% 饱和度。

表 5 结晶及母液的蛋白质及酶活

| 结晶批号    | 蛋白质*<br>(毫克/毫升) | 比活*<br>(单位/毫克) |
|---------|-----------------|----------------|
| 1—56 结晶 | 3.72            | 782            |
| 母液      | 0.53            | 373            |
| 2—52 结晶 | 19.9            | 814            |
| 母液      | 4.6             | 722            |

\* 用 280 毫微米光吸收法测定,不损失样品,但测定值偏高,故比活偏低。

为蛋白质测定用紫外吸收法,比用 Lowry 法测出的数值偏高,故比活偏低。凝胶电泳均现两带。看来用结晶方法不能分开这两条带。

## 讨 论

### 一、酶的多形性及提纯上的困难

关于葡萄糖淀粉酶的多形性已有报

道,例如黑曲霉<sup>[1-3]</sup>,海枣曲霉(Asp. Phoenicis)<sup>[4]</sup>和鲁氏毛霉<sup>[8]</sup>等的该酶均有两个组分。两个组分的分子量和等电点不同,用DEAE-纤维素柱层析可以分开。我们发现红曲霉的葡萄糖淀粉酶有3—5个有活力的组分,性质极为接近,仅能用凝胶电泳分开,给提纯工作带来很大困难。我们在层析条件方面作了多次试验,得到现在的结果。虽经再层析也未能得到凝胶电泳均一的样品。提纯倍数不高,收率也不高。这主要是酶的多形性造成的。因为弃去的大部分蛋白质也都是具有活力的酶。如何将带3和4分离纯化,正在研究中。

## 二、酶的结晶

日本人赤嵜等<sup>[14]</sup>曾由高峰淀粉酶得到了 $\alpha$ -淀粉酶的结晶。其方法主要是利用利凡诺(Rivannol)与酶形成复合物的特性进行纯化,再在丙酮中结晶。其后福本等<sup>[4,5]</sup>利用类似的方法,得到了德氏根霉和黑曲霉的葡萄糖淀粉酶的结晶。他们也曾用同样方法用于红曲霉制剂的提纯,但未能得到结晶。我们用Jakoby的方法,首次得到了红曲霉葡萄糖淀粉酶的结晶。

Jakoby的方法曾成功地用于100多种酶的结晶。但所得结晶大多是1—4微米的微晶。我们将放置温度由普通室温降低至7°C左右,并延长放置时间,得到了较大的结晶。关于结晶的一些性质正在进一步研究。

## 参 考 资 料

- [1] Pazur, J. H. and Ando, T.: *J. Biol. Chem.*, **234** (8): 1966, 1959.
- [2] Lineback, D. R. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**: 539, 1969.
- [3] Pazur, J. H. et al.: *Carbohydr. Res.*, **20**: 83—96, 1971.
- [4] Lineback, D. R. and Baumann, W. E.: *Carbohydr. Res.*, **14**: 341—353, 1970.
- [5] 福本寿一郎ら: 酵素化学シンポジウム, **9**: 94, 1954.
- [6] Tsuboi, Y. et al.: *Nature*, **181**: 770, 1958.
- [7] Fukui, T. and Nikuni, Z.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**: 884—891, 1969.
- [8] Tsuboi, A. et al.: *ibid.*, **38**: 543—550, 1974.
- [9] 何秉旺等: 微生物学报, **13**: 142—150, 1973.
- [10] Reese, E. T. and Mandels, M.: *Methods in Carbohydrate Chemistry* p. 139, ed. by Whistler, R. L., Academic Press, 1963.
- [11] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- [12] Kalekar, H. M.: *ibid.*, **167**: 461, 1947.
- [13] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404, 1964.
- [14] Jakoby, W. B.: *Methods in Enzymology*, Vol. 22, p. 248, 1971.
- [15] Akabori, S. et al.: *J. Biochem.*, **41**: 577, 1954.
- [16] 福本寿一郎ら: “科学と工业”, **35**: 412, 1961.

# GLUCOAMYLASE OF *MONASCUS* SP.

## I. PURIFICATION AND CRYSTALLIZATION

ENZYME STRUCTURE AND FUNCTION RESEARCH GROUP,

INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, ACADEMIA SINICA

(Beijing)

Glucosylase of *Monascus* sp. has been shown to exist in multiple forms, separable by polyacrylamide gel disc-electrophoresis as nearly located bands. After ammonium sulfate fractionation, gel filtration and DEAE-cellulose column chromatography, two fractions of the eluate were obtained. Fraction I mainly consists of band 4, while fraction II, mainly of band 3. Both fractions have been purified 2.5-fold with a total recovery

of 27%.

Crystallization of glucosylase was achieved by extracting the enzyme protein with ammonium sulfate solutions of decreasing concentration at 0° and standing at 7° for several weeks. Crystals separated out in extracts of 56, 54, and 52% of salt saturation as needles or clusters of needles like wheat-sheaf, or in radial or globular forms. The large diameter of the clusters is 50—100  $\mu$ m.