

水不溶酶的研究

III. 提高水不溶葡萄糖淀粉酶活力的因子

杨廉婉 孔祥荃

(中国科学院微生物研究所,北京)

近几年来关于水不溶葡萄糖淀粉酶(以下简称不溶糖化酶)的报告^[1-4]多偏重于制备、性质和糖化方式的研究,尚未见到提高不溶糖化酶活力及其机理方面的工作报道。鉴于这方面的研究具有实践和理论的意义,我们在前一工作^[5]的基础上,对提高不溶糖化酶活力及其原因作了一些探讨。

材料和方法

(一) 酶的来源和试剂

1. 葡萄糖淀粉酶: 黑曲霉 (*Asp. niger* M-85) 发酵液,用 2% 酸性白土处理后,加入 75% 饱和度的硫酸铵,使之沉淀制成酶制剂,再经自来水透析后使用。

2. 甘蔗渣纤维素纸浆(含芒秆 15%),由北京造纸二厂供给,打浆度(SR°)为 62。

其它试剂同前文^[5]。

(二) 氮的定量测定^[10]

取 1 毫升样品加 2 毫升奈斯勒(Nessler)试剂和 7 毫升蒸馏水,15 分钟后于 500 毫微米波长比色测定。(用硫酸铵作标准曲线,其中氮的浓度控制在 3—15 微克分子)。

(三) 酪氨酸的定量测定

参考蛋白酶活力测定方法^[11]在碱性溶液中,用福林-酚试剂同酪氨酸含有的酚基生成蓝色化合物,用 72 型分光光度计,在 660 毫微米波长比色。

(四) 自然酶和不溶酶活力的测定

葡萄糖值的测定;蛋白质含量的测定同前文^[9,12]。

(五) 不溶糖化酶的制备

重氮化的对氨基苯磺酰乙基纤维素(简称 ABSE-纤维素)的制备同前文^[9]。其中对-β-硫酸酯乙酰胺苯胺(简称 SESA)的用量,每克载体加 0.5—1.25 克。酶偶联反应在 0—5℃ 时,每克载体

滴加 4 毫升浓酶液,用 0.5M 碳酸钠调 pH 8.0—8.5,搅拌均匀。偶联时间 0.5—5 小时后,用蒸馏水洗 7—8 次,每次约 80 毫升,即得不溶糖化酶。

实验结果

(一) 提高 ABSE-纤维素糖化酶活力的因子

1. 几种铵盐对制备不溶糖化酶活力的影响: 前文^[9]报道了硫酸铵能够提高不溶糖化酶的活力,为了选择适合的铵盐进一步提高不溶糖化酶的活力,又测定了其它几种铵盐的作用(表 1)。表 1 中 5 种铵盐的含氮量均控制在 2422 微克分子/克载体。把它们分别加到等量的酶液中,然后滴加到重氮化的载体上,搅拌均匀,制成不溶酶并测定其活力。结果表明:5 种铵盐均可提高不溶糖化酶的活力,但以加硫酸铵制备的不溶酶活力最高,为 12960 单位/克,比对照提高活力 50%。

2. 不同量的硫酸铵对制备不溶糖化酶活力的影响: 在制备不溶糖化酶时,为了获得较高的酶活力,选择硫酸铵和酶适当的配比是重要的因素之一。表 2 中硫酸铵量分别为 80 毫克/克载体,160 毫克/克载体和 240 毫克/克载体。结果:加 160 毫克/克载体硫酸铵制备的不溶酶活力最高。相对活力 40.4%;回收率 35.3%。

3. 等量硫酸铵加到不同量酶液中对制备不溶糖化酶活力的影响: 表 3 中给酶量在 30606 单位—45070 单位/克载体之间,分别加入 160 毫克硫酸铵,在此条件下制备的不溶糖化酶相对活力和回收率较高者为:给酶量 30606 单位/克载体—40170 单位/克载体。

4. 加硫酸铵的不同方式对制备不溶糖化酶活力的影响: 表 4 列出的一种方式是将不加硫酸铵制备的不溶糖化酶浸泡于 1M 硫酸铵液中,4.5 小

本文于 1976 年 3 月 13 日收到。

表 1 5种铵盐对制备不溶糖化酶活力的影响

铵盐名称	偶联氮量 (微克分子/克载体)	偶联酶量 (单位/克载体)	偶联蛋白量 (毫克/克载体)	表现活力 (单位/克)
对照	—	35646	39.2	8640
硫酸铵	502	31866	34.0	12960
柠檬酸铵	462	31866	35.2	11232
醋酸铵	302	32406	34.6	10152
氯化铵	342	24846	28.0	10368
磷酸二氢铵	262	29166	31.8	9936

注: 给酶量: 35646 单位/克载体。偶联酶量: 为结合到载体上的酶量。表现活力: 不溶酶的活力。

表 2 不同量的硫酸铵对制备不溶糖化酶活力的影响

给硫酸铵量 (毫克/克载体)	偶联氮量 (微克分子/克载体)	偶联酶量 (单位/克载体)	偶联蛋白量 (毫克/克载体)	表现活力 (单位/克)	相对活力 (%)	回收率 (%)
0	—	39052	34.8	9288	23.7	23.7
80	140	39052	34.8	11232	28.7	28.7
160	440	34192	27.4	13824	40.4	35.3
240	540	28792	25.2	11016	38.2	28.2

注: 相对活力 = $\frac{\text{表现活力}}{\text{偶联酶量}} \times 100\%$ 。回收率 = $\frac{\text{表现活力}}{\text{给酶量}} \times 100\%$ 。给酶量: 39052 单位/克载体。

表 3 等量硫酸铵加到不同量酶液中对制备不溶糖化酶活力的影响

给酶量 (单位/克载体)	偶联酶量 (单位/克载体)	偶联蛋白量 (毫克/克载体)	偶联氮量 (微克分子/克载体)	表现活力 (单位/克)	相对活力 (%)	回收率 (%)
30606	30606	25.8	182	11146	36.4	36.4
35070	30750	29.6	242	12960	42.1	36.9
40170	36120	33.8	302	14602	40.4	36.3
45270	42032	41.0	422	15034	35.7	33.2

表 4 加硫酸铵的不同方式对制备不溶糖化酶活力的影响

加硫酸铵的方式	偶联酶量 (单位/克载体)	偶联蛋白量 (毫克/克载体)	偶联氮量 (微克分子/克载体)	表现活力 (单位/克)	相对活力 (%)	回收率 (%)
对照*	39852	41.6	—	8640	21.7	21.7
不加硫酸铵制备的不溶酶浸泡于 1M 硫酸铵中	39852	41.6	—	11016	27.6	27.6
酶和硫酸铵混合均匀滴加到重氮化的载体上, 制成不溶酶	34452	34.4	480	13824	40.1	34.7

* 不加硫酸铵制备的不溶酶。给酶量: 39852 单位/克载体。给硫酸铵量: 160 毫克/克载体。

时后,用蒸馏水洗净;另一种方式将酶和硫酸铵混合均匀滴加到重氮化的载体上,制成不溶酶结果以后一种方式制备的不溶糖化酶活力高,相对活力40.1%,回收率34.7%。

5. 尿素处理载体的效果: 将甘蔗渣纤维素纸浆放入70% 尿素溶液中煮沸5分钟,然后用蒸馏

水洗净。将此制成重氮化的载体,同未处理的载体进行比较。从表5可见: 用尿素处理的载体制备的不溶酶比未处理的活力稍高些。用尿素处理的载体加硫酸铵制备的不溶酶相对活力45%;回收率40.9%,比未用尿素处理又不加硫酸铵所制备的不溶酶活力高一倍。

表5 尿素处理载体的效果

载体处理的方法	给硫酸铵量 (毫克/克载体)	偶联氮量 (微克分子/克载体)	偶联酶量 (单位/克载体)	偶联蛋白量 (毫克/克载体)	表现活力 (单位/克)	相对活力 (%)	回收率 (%)
未处理	0	—	35867	32.0	7344	20.4	20.4
	160	720	32628	28.2	12960	39.7	36.1
尿素处理	0	—	35867	32.0	8640	24.1	24.1
	160	700	32628	28.0	14688	45.0	40.9

给酶量: 35867 单位/克载体。

(二) 稳定性

将加硫酸铵160毫克/克载体制备的不溶糖化酶在55°C pH 4.5的1%可溶性淀粉液中,连续

搅拌测定10次,仍保持原有酶活力的94%(表6)。在0—4°C保存3个月的不溶糖化酶活力,仍保持原来的水平。

表6 连续测定不溶糖化酶活力的变化

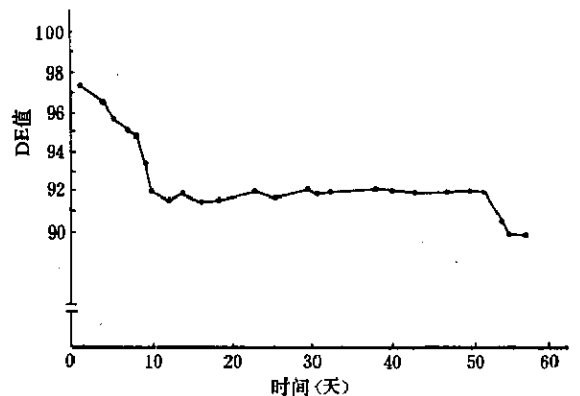
测定次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
表现活力(单位)	12960	10800	10800	10800	10584	10584	10584	10584	9976	10152
游离酶情况	有	无	无	无	无	无	无	无	无	无

(三) 糖化试验

前文^[9]报道了柱型糖化试验,选用55°C连续糖化13天,保持原有酶活力的74.9%,初步看来稳定性较差,有待进一步解决。因此,在下列试验中(见图)采用45°C柱型连续糖化52天,葡萄糖值为97.4(1天)—92.7(52天)。经过56天后,测定不溶酶活力仍保持原有酶活力的52.7%。

讨 论

以上结果表明,在制备不溶糖化酶时加入硫酸铵、柠檬酸铵、醋酸铵、氯化铵、磷酸二氢铵以及用尿素处理载体,均能在不同程度上提高不溶糖化酶活力。其中以加硫酸铵和尿素处理载体后,再加硫酸铵制备的不溶酶,活力提高的最显著。



ABSE-纤维素-糖化酶柱型糖化

用70% 尿素处理的载体加硫酸铵160毫克/克载体制备的不溶糖化酶4.5克(表现活力8640单位/克),装在3×30公分柱内,在45°C, pH 4.5条件下,经过滤的淀粉液(浓度28—31.8%),平均流速9.8毫升/小时。

关于硫酸铵提高不溶糖化酶活力的报告较少。中国科学院上海生物化学研究所固相酶组在制备不溶5'-磷酸二酯酶时, Sato等^[13]在制备不溶氨基酰化酶时分别加入硫酸铵, 提高了不溶酶的活力, 但他们对硫酸铵提高不溶酶活力的原因未予报道。我们的工作表明(表2): 随着给硫酸铵量的增加, 结合到载体上的酶相应地减少, 但在硫酸铵和给酶量一定配比时, 不溶糖化酶活力显著增加。每克载体给酶量3万—4万单位, 给硫酸铵量160毫克较为适宜。相对活力36—42%; 回收率35%左右。这说明加入的硫酸铵在弱碱性条件下游离出的氨和重氮盐偶联, 形成重氮氨基化

合物^[14]。一方面占据了重氮盐的部分位置, 或多或少地影响酶同重氮化载体的偶联, 但另一方面, 消除了部分空间障碍, 增加酶和底物的接触, 从而提高了不溶糖化酶的活力。

Koltun^[15]报道酪氨酸的酚基可同重氮盐偶联成单偶氮衍生物。为了进一步证明上述论点, 我们把酪氨酸和酶混合后, 滴加到重氮化的载体上, 得到同样的结果。酪氨酸同重氮盐偶联, 虽然影响酶同载体的偶联, 但它同样起到部分消除空间障碍的作用, 因而提高了不溶糖化酶的活力(表7)。

表7 酪氨酸对制备不溶糖化酶活力的影响

加酪氨酸量 (毫克) (克载体)	偶联酪氨酸量 (毫克) (克载体)	偶联酶量 (单位) (克载体)	偶联蛋白量 (毫克) (克载体)	表现活力 (单位) (克)	相对活力 (%)	回收率 (%)
0	—	38590	34.6	8640	22.3	22.3
2	2	34810	29.0	10152	29.1	26.3

给酶量: 38590 单位/克载体

ABSE-纤维素糖化酶柱型连续糖化淀粉液化液, 在45°C pH 4.5条件下, 经过56天保持原酶活力的52.7%。从稳定性来看, 45°C比55°C^[9]连续糖化好, 但45°C糖化效率比55°C^[9]低。因此, 提高糖化效率是值得今后研究的问题之一。

用尿素处理载体后再加硫酸铵制备的不溶糖化酶比未处理的活力高一倍, 其原因可能是尿素破坏了纤维素的氢键, 增加不溶糖化酶同底物反应的表面积。

参 考 资 料

- [1] Wilson, R. J. and Lilly, M. D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **11**: 349—362, 1969.
- [2] 前田英胜、铃木英雄: 日农芸化学会志, **44**: 547—555, 1970。
- [3] 前田英胜、宫道慎二、铃木英雄: 醱酵协会志, **28**: 391—397, 1970。
- [4] Bachler, M. J. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **12**: 85—92, 1970.

- [5] Smily, K. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **13**: 309—317, 1971.
- [6] O'Neill, S. P. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **13**: 337—352, 1971.
- [7] Maeda, H. and Suzuki, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 1581—1593, 1972.
- [8] Maedam, H. and Suzuki, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 1839—1842, 1972.
- [9] 黎高翔等: 微生物学报, **13**(1): 31—37, 1973。
- [10] Peterson, R. E. and Ciegler, A.: *Appl. Microbiol.*, **17**: (6), 929—930, 1969.
- [11] Anson, M. L.: *J. Gen. Phys.*, **22**: 79—89, 1938.
- [12] 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。
- [13] Sato, T. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**: 788—796, 1971.
- [14] Bucherer, H. T., Wolff, S.: *Ber.*, **1**: 881, 1909.
- [15] Koltun, W. L.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**: 5681—5689, 1957.