

红曲霉葡萄糖淀粉酶的研究

II. 进一步提纯及其性质

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 (*Monascus* sp.) AS 3.2199 的葡萄糖淀粉酶(E. C. 3.2.1.3)的凝胶电泳图谱表现为 5 个带。过去曾经提纯得到过以带 3 和带 4 为主的制品。结晶的样品仍具有两个带。现将 DEAE-纤维素柱层析的条件加以改变,即以 0.01M、pH5.8 的吡啶-盐酸缓冲液及 NaCl 浓度梯度(0—0.2M)洗脱,可以得到以带 4 为主的制品,经在同样条件下再层析即得到凝胶电泳均一的纯带 4 样品。纯酶作用的最适条件为 pH4.5,温度 50—55℃。耐热性较差,在 55℃ 保温 5 小时后,酶活力仅存 13%。酶作用于可溶性淀粉的米氏常数 K_m 为 1.05×10^{-4} (克/毫升)。Ag⁺、Fe⁺⁺⁺、8-羟基喹啉和碘乙酸对酶有抑制作用。用等电聚焦法测定出来的等电点 pI 为 4.04(5—7℃)。紫外吸收光谱最高吸收值在 282 毫微米,最低吸收值在 252 毫微米。超离心沉降分析表现为均一样品,样品浓度为 10 毫克/毫升时测得的沉降常数 $S_{w, 20}$ 为 5.55S, 浓度 0.27 毫克/毫升时,测得的 $S_{w, 20}$ 为 4.8S。用凝胶过滤法在 Sephadex G 100 柱上测出分子量为 55,000。

前报报道了红曲霉葡萄糖淀粉酶的提纯及结晶^[1]。该酶具有多型性,其凝胶电泳图谱表现出 5 个相距很近的带,经过初步提纯得到了分别以带 3 或带 4 为主的制品,结晶样品的凝胶电泳图谱仍为两带。因此我们对层析的条件作了改进,经过再层析,可以得到凝胶电泳均一的纯带 4 样品,用此样品测定了酶的一些基本性质。本文报道此研究结果。

材料和方法

(一) 材料

酶制剂为无锡酶制剂厂生产的红曲霉糖化酶,酶活力每克 20,000 单位,生产菌种为红曲霉 (*Monascus* sp.) 3.2199。DEAE-纤维素 DE-11 及 DE-32 为 Whatman 厂产品。QAE-Sephadex A-50、Sephadex G-25、G-100、蓝色葡聚糖(Blue dextran) 为 Pharmacia 厂产品。

(二) 分析及测定方法

酶活力、蛋白质、pH、电导率的测定及凝胶电泳方法均同前报^[1]。凝胶电泳后凝胶柱的紫外光密度扫描是将凝胶柱在三氯乙酸中固定后,用 Joyce Loebl 紫外扫描器在 260 毫微米进行。等电点的测定用电聚焦仪(LKB 厂生产)进行,所用两性载体 pH 范围为 3.5—5,用甘油代替蔗糖制备密度梯度(0—55%)。因为蔗糖在正极的酸性环境中经过较长时间后分解成还原糖,对酶活测定有干扰。超离心沉降分析用 Omega II 超速离心机*,和日立 UCA-1A 型超速离心机**,紫外吸收光谱用 Unicam Sp700C 型和岛津** 分光光度计测定。凝胶过滤法使用 Sephadex G-100 测定分子量,并用流动式紫外光吸收计(Uvicord II、LKB 产品)及自动记录仪记录流出峰。

本文于 1976 年 11 月 17 日收到。

* 动物所新技术室代为测定。

** 生物物理所中心实验室代为测定。

结果及讨论

(一) DEAE-纤维素柱层析及再层析

样品及纤维素的预处理均同前报^[1],不同的是起始缓冲液改用吡啶-盐酸缓冲液(0.01M, pH5.8),用 NaCl 直线浓度梯度洗脱,下限为起始缓冲液 1,100 毫升,上限为同样缓冲液含 0.2M NaCl 1,100 毫升。层析结果见图 1。

因为起始缓冲液离子强度低,NaCl 浓度梯度上升也较缓慢,所以 90 管以前没有蛋白质出现。从图 1 右上角所附凝胶电泳示意图可以看出,95 号管有两条带,以带 4 为主,105 号管以带 3 为主,合

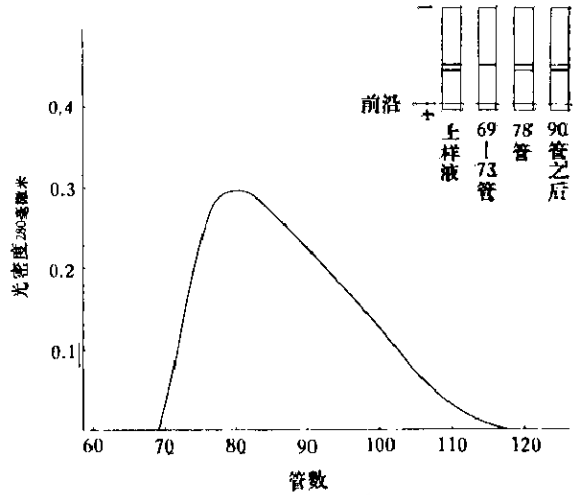


图2 葡萄糖淀粉酶再层析图谱
其中酶蛋白 140 毫克, NaCl 梯度 0.06—0.13 M, 其他条件同图 1。

表 1 为 5 批样品再层析的结果,酶比活稍有提高,收率在 10—30%,收率变动较大,主要与一次层析时收集的样品量大小有关,一次层析时收集的量大,则再层析收率偏低。

层析前后及再层析后样品的凝胶电泳图谱见图版 I-1,紫外光密度扫描结果见图 3。说明样品已达到了凝胶电泳均一的程度。

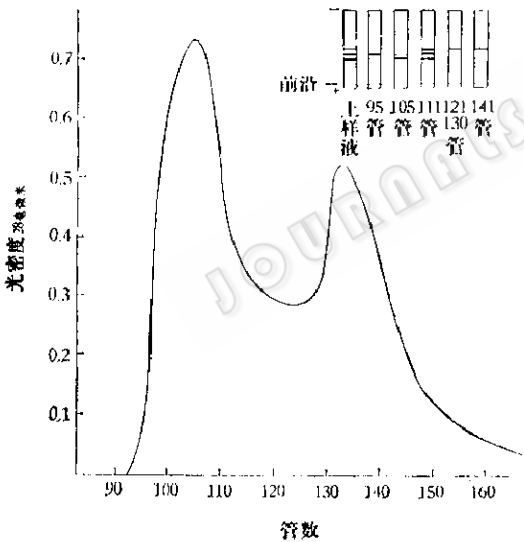


图1 葡萄糖淀粉酶在DEAE-纤维素柱上一次层析图谱

DE-11 纤维素(1.7×40厘米),酶蛋白400毫克,缓冲液见正文,流速 45 毫升/小时,每管收集12毫升,右上角所附图为各相当管的凝胶电泳示意图。

并 91—105 号管进行再层析,结果如图 2 (实际上为两批一次层析的样品合并进行再层析)。峰的前沿几管仅含带 4(见图 2 右上角附图),为凝胶电泳均一的样品。通常是将 2—5 批一次层析样品合并进行再层析。

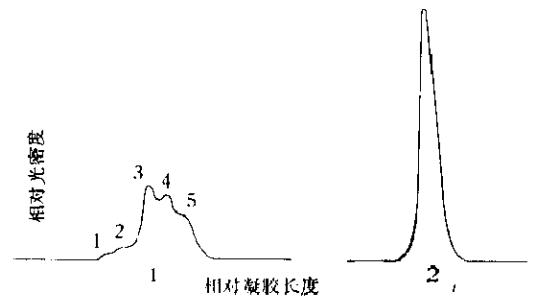


图3 凝胶电泳柱光密度(260毫微米)扫描图谱
1.层析前样品有 5 带(1,2,3,4,5)
2.再层析纯品(第 13 批)

关于蛋白质的离子交换层析,有人认为若用阴离子交换剂则应使用阳离子缓冲液。所以我们试用了吡啶,但吡啶有较高的紫外吸收值,所以降低浓度至 0.01M,此时其紫外吸收可忽略不计。另外一般认

表 1 再层析的结果

批号	纤维素型号	上样液				提纯液				收率(%)	
		体 积 (毫升)	总蛋白质 (毫克)	总酶活 (单位)	比 活 (单位/毫克)	体 积 (毫升)	总蛋白质 (毫克)	总酶活 (单位)	比 活 (单位/毫克)	蛋白质	酶活
11	DE-11	260	139	154,000	1,110	65	9.56	12,880	1,350	6.88	8.35
13	DE-32	250	88	87,000	990	90	23.7	26,700	1,125	26.9	30.7
14	DE-11	545	194	248,000	1,280	145	24.9	31,300	1,255	12.8	12.6
15	DE-32	1,117	301.7	—	—	110	57	59,400	1,040	18.9	—
16	DE-32	300	125	144,000	1,150	70	13.3	13,830	1,040	10.6	9.6

为，DE-32 比 DE-11 应有较高的分辨率，但我们试用的结果并没有多大改善，可能是带 3 和带 4 性质过于接近，不好分离。

用现有的方法虽然能得到带 4 纯品，但不能得到带 3 纯品。所得纯品的量也太少，一般合并 2—5 批一次层析样品进行再层析，才可以得到带 4 纯品 10—60 毫克左右。因此我们又试用了平板凝胶电泳制备法，可以同时得到带 3 和带 4 纯品^[2]。在以下的试验中，大多是用柱层析制备的带 4 纯品，少部分是用凝胶电泳法制备的。

(二) 酶的性质

1. 酶作用的最适 pH：配制 0.1M 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液，共 12 个不同的 pH 值(2.5—8)。各取 3.3 毫升，加 2% 可溶性淀粉溶液 5 毫升，加水至 9.9 毫升，在 50℃ 保温，然后再加酶液 0.1 毫升，在 50℃ 反应 10 分钟，在沸水浴中加热 10 分钟停止反应后，测还原糖并计算酶活，结果见图 4，最适 pH 为 4.5。与已报道的葡萄糖淀粉酶的最适 pH 相比较，和紫色红曲霉的(4.5)^[3]相同，与黑曲霉(4.8)^[4]、(4.5—5.0)^[5]、及海枣曲霉(4.6)^[6]也比较接近。

2. 酶作用的最适温度：分别在 20—80℃ 每间隔 5℃ 的温度下保温，测定酶活力，结果见图 5。最适温度为 50—55℃，超过 55° 酶活力迅速下降。

3. 酶的热稳定性：将酶液分别在 25、45、50 及 55℃ 保温，每隔 1 小时取样测定酶活力，结果见图 6。在以上各温度放置 5

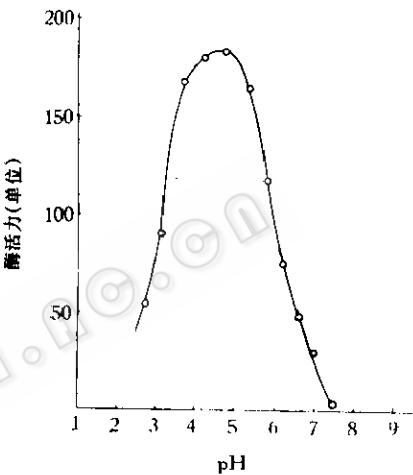


图 4 酶活力与 pH 的关系(14 批样品)

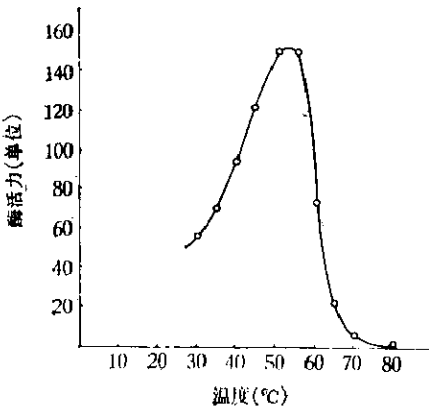


图 5 酶活力与温度的关系(14 批样品)

小时后,25℃ 基本不失活,45℃ 略有失活,50℃ 酶活力保留 75%,55℃ 酶活力仅存 13%。此酶的耐热性较差。

4. 酶作用于可溶性淀粉的米氏常数：以可溶性淀粉为底物，使反应液中淀粉的终浓度(S)分别为 0.125、0.25、0.4、0.5、

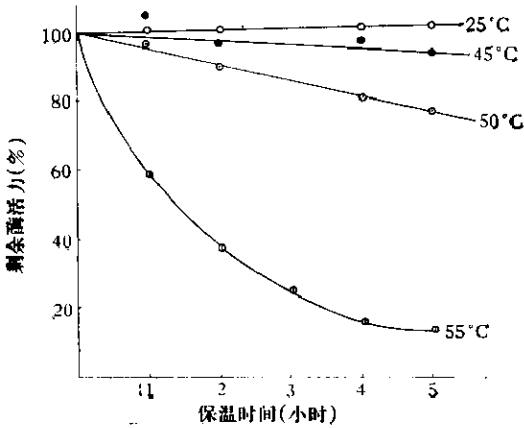


图6 酶的热稳定性

0.625、0.8 及 1.0%。按常法测定酶活力,以 10 分钟的活力单位代表酶反应速度(V),按 Lineweaver-Burk 法以 $\frac{1}{V}$ 对 $\frac{1}{S}$ 作图 (图 7)。根据直线在横轴上的截距 ($-\frac{1}{K_m}$), 求出米氏常数 K_m 为 1.05×10^{-4} (克/毫升)。

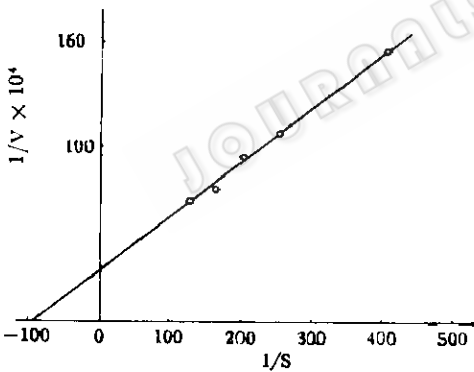


图7 底物浓度与反应速度的关系
($\frac{1}{V}$ 对 $\frac{1}{S}$ 作图)

5. 金属离子及酶抑制剂对酶活力的影响: 试验了一些金属离子、金属离子络合剂以及某些巯基试剂等对酶活力的影响。先将酶液对蒸馏水透析 24 小时, 取酶液 0.2 毫升, 加水 2.8 毫升, 0.5M pH4.5 醋酸缓冲液 1 毫升, 各种试剂各分别加入 1 毫升, 在室温 (20°C 左右) 放置半小时, 然后放在 50°C 水浴中, 加入 5 毫升预热至 50°C 的 2%

可溶性淀粉溶液开始酶反应, 各试剂在反应液中的终浓度为 $1 \times 10^{-3}M$, 仅对氯汞苯甲酸盐 (PCMB) 浓度为 $1 \times 10^{-4}M$ (因它在 pH 4.5 时溶解度不能达到 $10^{-3}M$)。按常法测定酶活力, 结果见表 2。在金属离子中, Ag^{+} 和 Fe^{+++} 有强烈的抑制作用, 其次为 Hg^{++} , 而 Mn^{++} 和 Cu^{++} 有较弱的抑制作用, Fe^{++} 似有弱的激活作用。在金属络合剂中, 8-羟基喹啉有强抑制作用, 巯基试剂碘乙酸有强抑制作用, PCMB 在 $10^{-4}M$ pH4.5 时无抑制作用。

关于葡萄糖淀粉酶的抑制剂报道很少, 仅看到较高浓度 ($10^{-3}M$) 的 Hg^{++} 对内孢霉的酶有抑制作用, $3 \times 10^{-5}M$ 的 PCMB 没有抑制作用^[7]。

表2 金属离子及酶抑制剂对酶活力的影响

试 剂	相对酶活力(%)	试 剂	相对酶活力(%)
Li_2SO_4	104	$AlCl_3$	100
$MgCl_2$	104	$PbAc_2$	98
$ZnSO_4$	100	$HgCl_2$	73
$CaCl_2$	104	$AgNO_3$	20
$BaCl_2$	99	8-羟基喹啉	38
$MnCl_2$	83	邻二氮菲	86
$CdSO_4$	95	EDTA(透析)	113
$CuSO_4$	86	PCMB	109
$FeSO_4$	117	碘乙酸	23
$Fe_2(SO_4)_3$	27	对水透析	100

6. 等电点: 用等电聚焦法测定等电点, 电压 700 伏, 聚焦时间 22 小时。电泳完毕, 通过蠕动泵放出聚焦柱内容物, 经过紫外光吸收计记录 280 毫微米的透光率, 并用部分收集器收集, 每管 2.5 毫升, 然后测定每管的 pH 及蛋白峰相应各管的酶活力。测定结果见图 8A, 蛋白峰与酶活力峰符合, 在 5—7°C 测得等电点 pI 为 4.04。另外用两性载体和甘油不加酶作空白试验 (图 8B), 可以看出紫外吸收曲线在 5 管和 40 管处有较高的峰, 20 管附近有些小峰, 这些峰不是酶样品本身引起的。文献中报

道黑曲霉的葡萄糖淀粉酶有两个组分,其等电点分别为3.4及4.0^[5],内孢霉的酶等电点为4.8—5.5^[8]。

7. 紫外吸收光谱: 用 Sp 700C 型分光光度计,自动记录不同波数的透光率,根据该仪器的说明,将波数改算为波长,结果见图9。波长座标是不等距的,带4纯品的水溶液最高吸收值在282毫微米,最低吸收值在252毫微米。用岛津分光光度计测得的结果也是一致的。

8. 超离心沉降分析: 用 Omega II 超速离心机在 20℃ 测定,转速 58,000 转/分,每隔 10 分钟照像记录 1 次,结果见图版 I-2。样品表现为超离心均一,测得的沉降系数 S_w , 20, 为 5.55 S, 样品浓度为 1%, 未经外推至无限稀释浓度。与凝胶过滤法测出的分子量相比,此 S 值似乎偏大一些,另外冷冻干燥的样品,其凝胶电泳图谱上出现分子量较大的带,可能是在冻干时形成的聚合体,所以又用未经冻干的样品用低浓度 (0.27 毫克/毫升) 进行超离心试验,用日立 UCA-1A 型超离心机,紫外光吸收检测蛋白带,所得沉降系数为 4.8S。

9. 分子量: 用凝胶过滤法测定分子量。将 Sephadex G-100 在蒸馏水中充分溶胀后,再用缓冲液平衡,然后装柱(床尺寸 1.2×120 厘米),用已知分子量的蛋白质作标准样品,加样 0.3 毫升(含蛋白质 3 毫克)。洗脱液为 0.1M pH 4.5 醋酸缓冲液,含叠氮钠 0.02%。柱出口用细聚乙烯管连接紫外吸收计及记录仪。为了准确测量流出体积,加样后开始用 50 毫升滴定管(预

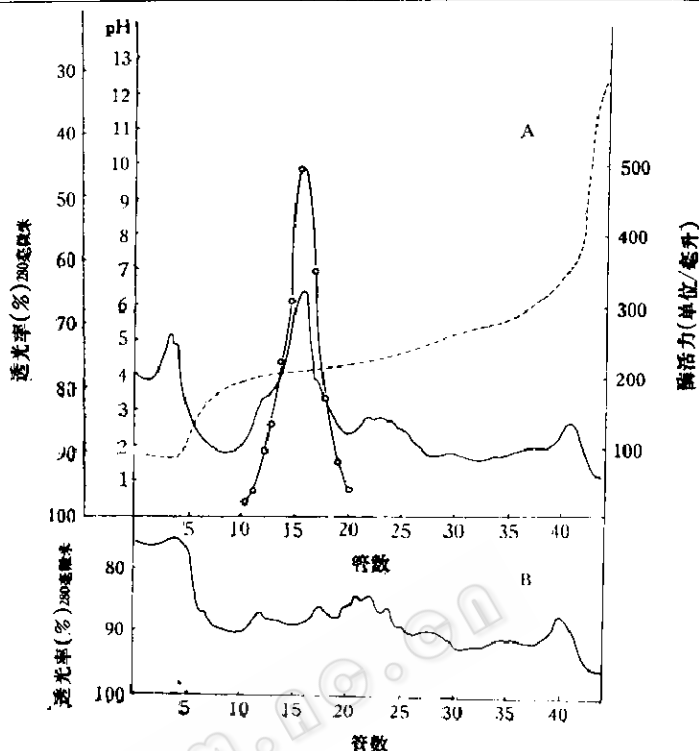


图8 葡萄糖淀粉酶等电聚焦图谱
等电聚焦柱 110 毫升, Ampholine pH3.5—5,
电压 700 伏,时间 22 小时,酶蛋白 5 毫克(14 批)
—— 280 毫微米透光率; ---- pH; ○——○ 酶活力
A, 为试验结果; B, 为空白对照的紫外光吸收图谱。

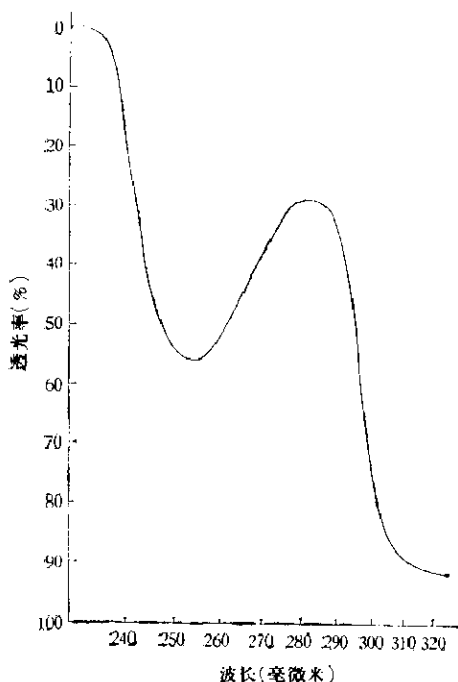


图9 葡萄糖淀粉酶的紫外吸收光谱
带4纯品 2.06 毫克溶于6毫升水中

先将 50 毫升刻度以下部分充满水)收集洗脱液,至记录纸上峰尖达到最高处刚要转低时,读取流出液总体积,再经过校正,即减去柱床下面过滤板开始至比光管部分的死体积(在本试验中为 1 毫升),即得洗脱体积(V)。用蓝色葡聚糖标定间隙体积(V_0),

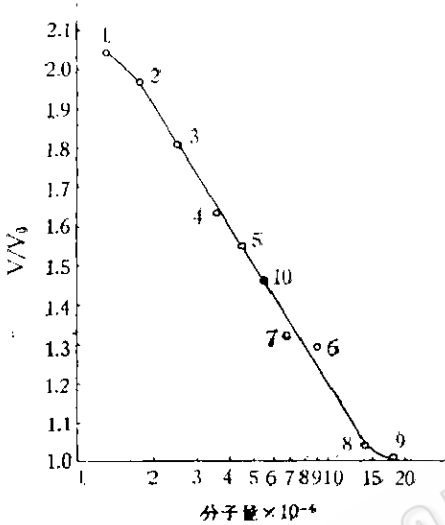


图 10 凝胶过滤法测定的蛋白质

V/V_0 与分子量(对数座标)的关系

Sephadex G-100 柱(1.2×120 厘米),总体积 150 毫升,洗脱液流速 11—13 毫升/小时·厘米²,静水压 55 厘米,温度 25—27°C,样品为凝胶电泳平板分离的带 4 纯品 3 毫克 标准蛋白质及其分子量如下:

1. 细胞色素 C (马心) 13,000
2. 肌红蛋白 17,800
3. α -胰凝乳蛋白酶原 25,000
4. 肌红蛋白二聚体* 35,600
5. 卵清蛋白 45,000
6. 卵清蛋白二聚体* 90,000
7. 牛血清蛋白 69,000
8. 牛血清蛋白二聚体* 138,000
9. γ -球蛋白 156,000
10. 葡萄糖淀粉酶 55,000

* 为原样品中的含有物,其分子量恰好相当单体的二倍,故按二聚体计算

在本试验中为 50.5 毫升。用二硝基苯-丙氨酸(DNP-丙氨酸)标定总体积(V_0)为 153.4 毫升,空柱用水标定为 150 毫升,在半对数座标纸上,以 $\frac{V}{V_0}$ 对分子量(对数座标)作

图,得出标准曲线,根据未知样品的 $\frac{V}{V_0}$ 值,在曲线上求出其分子量。葡萄糖淀粉酶平板凝胶电泳纯化的带 4 纯品分子量为 55,000(见图 10)。

考虑到葡萄糖淀粉酶可能对交联葡聚糖有亲和力,因而表现出偏小的分子量。所以同时又用 Bio-gel P 100 进行了测定,所得结果基本一致。

文献中报道的葡萄糖淀粉酶的沉降系数和分子量有:黑曲霉 5.44S,分子量 97,000^[9];内孢霉 4.37S,分子量 55,000^[7];鲁氏毛霉的两个成分分别为 4.39S,分子量 59,000 和 4.29S,分子量 49,000^[10]。

参 考 资 料

- [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, 1976.
- [2] 同上: 生物化学与生物物理进展, 1976, (4), 36.
- [3] 福本寿一郎等: 科学 & 工业, 35: 412, 1961.
- [4] Pazur, J. H. and Ando, T.: J. Biol. Chem., 234 (8), 1966, 1959.
- [5] Lineback, D. R. et al.: Arch. Biochem. Biophys., 134: 539, 1969.
- [6] Lineback, D. R. et al.: Carbohydr. Res., 14 (3): 341, 1970.
- [7] Fukui, T. and Nikuni, Z.: Agr. Biol. Chem., 33: 884, 1969.
- [8] Hattori, Y. and Takenchi, I.: Agr. Biol. Chem., 25: 895, 1961.
- [9] Pazur, J. H. and Kleppe, K.: J. Biol. Chem., 237 (4): 1002, 1962.
- [10] Tsuboi, A. et al.: Agr. Biol. Chem., 38: 543, 1974.

GLUCOAMYLASE OF *MONASCUS* SP.

II. FURTHER PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

Enzyme Structure and Function Research Group, Institute of
Microbiology, Academia Sinica

(Beijing)

The glucoamylase (E. C. 3.2.1.3) of *Monascus* sp. (AS 3.2199) exists in multiple forms separable by disc gel electrophoresis as 5 bands. Formerly, we had obtained two chromatographic fractions which contain band 3 or band 4 as the main component. The crystallized preparations also showed two bands on disc gel electrophorograms.

By modification of the chromatographic procedure, thus, by substitute the acetate buffer solution with pyridine-HCl (0.01 M, pH 5.8) and eluted with NaCl concentration gradient (0—0.2 M). A fraction containing mainly band 4 was obtained, and by rechromatography at the same conditions, pure band 4 was obtained.

The optimum pH for enzyme activity

was 4.5 and the temperature optimum was 50—55°C. The thermostability seemed low, as only 13% of the original enzyme activity was remained after incubation at 55°C for 5 hrs. The Michaelis constant (K_m) for soluble starch was 1.05×10^{-4} (g/ml). Ag^+ , Fe^{+++} , 8-hydroxyquinoline and iodoacetate inhibited enzyme action. The ultraviolet absorption spectrum showed maximum at 282 nm and minimum at 252 nm. It was homogeneous by ultracentrifugal analysis with sedimentation coefficient S_w , 20 of 5.55 S when analyzed at a concentration of 10 mg/ml and 4.8 S at 0.27 mg/ml. Its molecular weight was 55,000 daltons as estimated by gel filtration on Sephadex G-100.