

固定化酶的研究

IV. 固定化葡萄糖淀粉酶的性质

黎高翔 孙万儒 寇秀芬 张绍恺

(中国科学院微生物研究所, 北京)

黑曲霉 (*Asp. niger*) M85 的葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3) 经 DEAE 纤维素柱层析被部分提纯。在测定条件下, 此制剂不含有 α -淀粉酶。用此提纯酶共价键合到 ABSE 纤维素上制得固定化葡萄糖淀粉酶。

比较研究了固定化葡萄糖淀粉酶和自然酶的一些性质: 1. 两种型式的酶活力的最适 pH 均为 4.5—4.6; 2. 固定化酶活力的最适温度低于自然酶; 3. 在无底物存在下, 固定化酶的 pH 和热稳定性与自然酶相同; 4. 对淀粉、糊精、麦芽糖三种底物, 固定化酶的表现米氏常数 (K_m) 分别为 1×10^{-3} (克/毫升)、 1.66×10^{-3} (克/毫升)、 2.7×10^{-3} (克/毫升), 自然酶的米氏常数 (K_m) 分别为 5.5×10^{-3} (克/毫升)、 4.7×10^{-3} (克/毫升)、 1.49×10^{-3} (克/毫升)。固定化酶的 K_m 值高于自然酶 K_m 值。固定化酶对不同分子量的底物的相对反应速度亦不同于自然酶; 5. 尿素对酶活力有抑制作用, Sn^{2+} 和 Al^{3+} 对酶稍有抑制, 而酶活力不受金属络合剂 EDTA 抑制。其他所试验过的金属离子对酶活力没有影响。

自然酶固定化在支持体后, 其结构状态和环境发生了变化, 从而往往使得固定化酶的性质, 发生有别于自然酶的改变, 深入了解这种改变的因果关系, 有助于阐明固定化酶和微环境的相互作用机理。前文报道了固定化葡萄糖淀粉酶的制备^[1], 所使用的为粗酶制剂。以后, 我们用部分提纯了的黑曲霉葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3), 比较了固定化酶和自然酶的一些性质, 本文报道此研究结果。

材料和方法

(一) 酶及试剂

黑曲霉 (*Asp. niger*) M85 葡萄糖淀粉酶发酵液, 用 2% 酸性白土处理后, 加入 75% 饱和度的硫酸铵沉淀制成粗酶制品, 经透析后用于柱层析。DEAE 纤维素 DE11 为 Whatman 厂出品。甘蔗渣纤维素纸浆 (含芒杆 15%), 由北京造纸二厂提供, 打浆度 (SR°) 为 62。对 β -硫酸酯乙磺基苯胺 [4-(α -sulfoethylsulfonyl)-aniline 简称 SESA] 为天津染料厂产品。其他试剂均为分析纯或保证试剂。

(二) 酶的柱层析

酶的柱层析参考 Pazur 和 Ando 方法^[2]进行, 26 克 DEAE 纤维素 DE11 经水浮选后, 分别用 1N NaOH 及 1NHCl 先后交替处理各二次, 每次处理后均用水洗净、最后用 0.025M pH8.0 的柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲液平衡后, 装柱使用, 柱为 3.2×32 厘米。用相同的平衡缓冲液透析的葡萄糖淀粉酶液 79 毫升 (酶活力为 1960 单位/毫升, 蛋白质含量为 3.84 毫克/毫升, 酶比活力为 510 单位/毫克蛋白质) 加入柱后进行层析、分段洗脱液依次为 0.025M pH8.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 500 毫升, 0.05M pH6.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 500 毫升, 0.05M pH4.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 1200 毫升。流速为 30 毫升/小时, 每管收集 15 毫升。层析洗脱液的葡萄糖淀粉酶主峰部分用于制备固定化酶和酶性质的比较研究。

(三) 分析及测定方法

本文于 1978 年 3 月 24 日收到。

1. 葡萄糖淀粉酶活力测定: 自然酶活力测定用 10 毫升底物 (1% 可溶性淀粉液, 含 0.05 M pH4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液) 加入 0.25 毫升酶液, 于 55℃ 反应 10 分钟立刻移入沸水浴停止反应。固定化酶活力测定的反应温度、pH、底物浓度、时间均同自然酶, 200 毫升反应液在电动搅拌下进行, 用带砂芯漏斗的吸管吸滤取出反应液。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。

2. α -淀粉酶活力测定: pH5.7 的 2% 淀粉液 10 毫升, 加酶液 0.2 毫升, 60℃, 不同时间取 0.5 毫升, 加稀碘液 [2 毫升碘原液 (碘 11 克和碘化钾 22 克, 加水至 500 毫升) 和 20 克碘化钾加蒸馏水定容至 500 毫升] 5 毫升, 以 2% 标准糊精液对照比色, 终点颜色为红棕色。以每小时液化 1 毫升 2% 淀粉为糊精的酶量定义为 1 个酶活力单位。

3. 还原糖量的测定: 酶反应液的还原糖量用 Willstätter-Schudel 次碘酸盐法^[1]。或使用由 Nelson 改进的 Somogyi 法^[2]的比色法^[3]用 72 型分光光度计在 660 毫微米波长比色测定。

4. 蛋白质含量的测定: 按 Lowry^[4] 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。并使用 Unicam SP700C 型紫外分光光度计在 280 毫微米波长的光吸收测定。

5. pH 测定: 用瑞士出品的 Poly metron 42/B 型 pH 计。

6. 温度测定: 用标准精密温度计。

(四) 固定化葡萄糖淀粉酶的制备

用重氮化法将酶偶联到对氨基苯磺酰乙基纤维素 (ABSE 纤维素) 上, 方法同前文^[1]。

结果及讨论

(一) DEAE 纤维素柱层析

葡萄糖淀粉酶粗制品柱层析图谱出现四个蛋白质峰 (见图 1), 第一峰在 pH7.7、15—30 管部分, 第二峰在 pH7.5—6.5、60—65 管部分, 第三峰在 pH6.5—6.2、65—80 管部分, 第四峰在 pH4.6—4.1、99—110 管

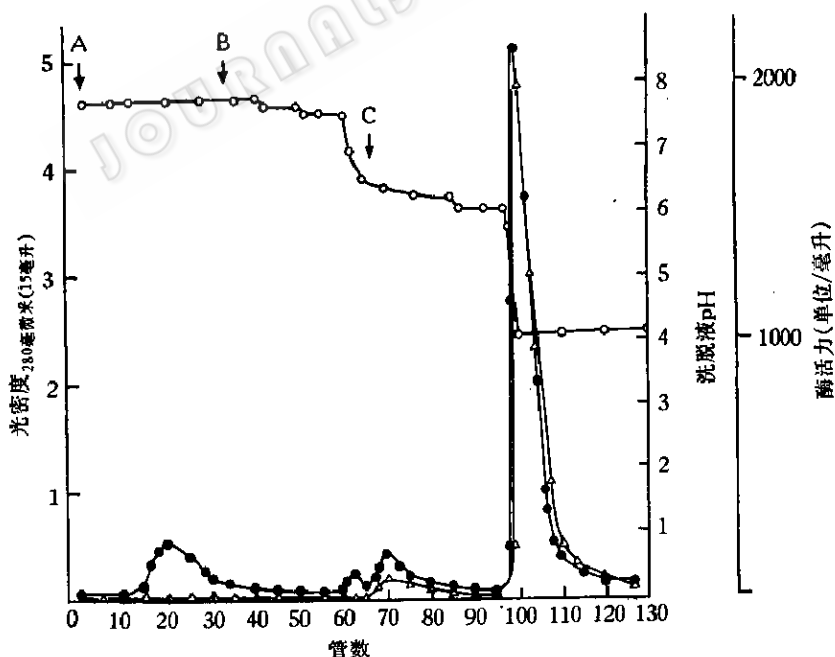


图 1 DEAE 纤维素层析分离葡萄糖淀粉酶图谱

●——● 蛋白质; $\triangle$ —— $\triangle$ 酶活力; ○——○ pH

A. 0.025 M pH8.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液; B. 0.05 M pH6.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液;
C. 0.05 M pH4.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液。

部分。而葡萄糖淀粉酶活力只出现在后二个峰部分,与蛋白质峰相一致,能水解可溶性淀粉、糊精及麦芽糖(见表1)。而酶活力主要在第四蛋白质峰部分,经测定没有 α -淀粉酶活力(见表2)。合并100—106管洗脱液,酶活力为1277单位/毫升,蛋白质为1.45毫克/毫升,酶比活力为892单位/毫克蛋白质。此部分用于酶性质的研究。

表1 DEAE 纤维素柱层析酶活力百分数

层析部分	淀 粉	糊 精	麦芽糖
第三峰部分	100	109	25.0
第四峰部分	100	89	10.8

注:按上述酶活力测定法,底物浓度均为1%。

表2 柱层析前后酶活力比较

制 剂	酶活力(单位)	
	糖化酶	α -淀粉酶
层析前浓缩酶制剂*	6804	2142
层析第四峰部分浓缩制剂**	6237	0

* 0.33 毫升; ** 1.00 毫升。

(二) 酶的性质

1. 酶作用的最适 pH:

用 0.1M 柠檬酸-0.2M 磷酸氢二钠配制 8 种不同 pH 值的缓冲液,各取 60 毫

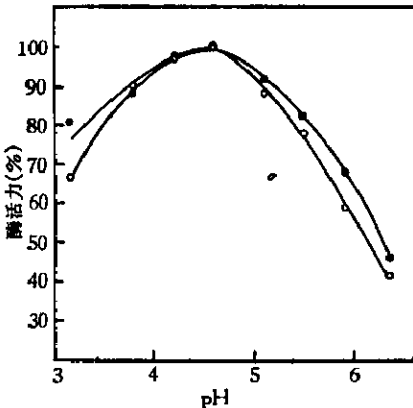


图2 葡萄糖淀粉酶 pH 活力曲线

固定化酶及自然酶分别用 0.125 克(活力 16848 单位/克)和 200 微克在不同 pH 的 0.1M 柠檬酸-0.2M 磷酸氢二钠缓冲液中,其他条件按上述测定法。

○——○固定化酶; ●——●自然酶

升加入淀粉液 180 毫升,使最终浓度为1%淀粉溶液,最终 pH 值变化在 3.18—6.38 范围,加入酶在 55℃ 反应 10 分钟,停止反应后测定还原糖量计算酶活力,结果见图2。固定化酶及自然酶活力的最适 pH 均为 4.5—4.6 之间,说明这载体及底物对固定化葡萄糖淀粉酶不发生电荷效应。这与已报道的黑曲霉葡萄糖淀粉酶最适 pH (4.8)^[2]、(4.5—5.0)^[7] 比较接近。

2. 酶活力的最适温度

酶促反应在 10 分钟时,分别在 51—75.5℃ 间隔的不同温度下保温,测定酶活力,结果见图3。温度在 70℃ 自然酶活力最高,温度在 65℃ 固定化酶活力最高。固定化酶温度活力曲线向低温迁移。这与 Marsh 等报道的^[8] 多孔玻璃键合葡萄糖淀粉酶的温度活力曲线向高温迁移的结果相反。

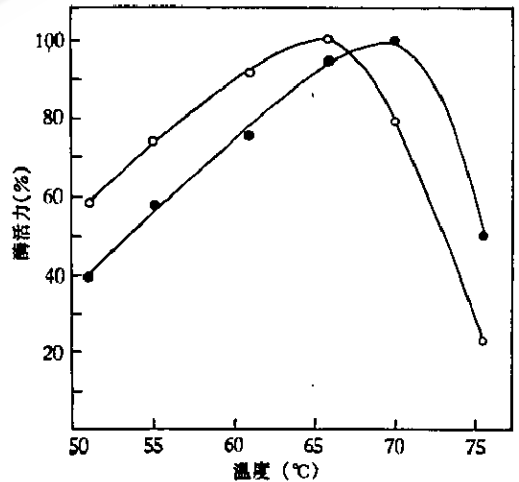


图3 酶活力与温度的关系

固定化酶及自然酶用量分别为 0.125 克(10368 单位/克)及 100 微克,其他条件按上述测定法测定酶活力。

○——○固定化酶; ●——●自然酶

3. 对 pH 的稳定性

将酶在不同 pH 下,22—23℃ 保温 48 小时后测定酶活力,固定化酶和自然酶对 pH 的稳定性没有显著差异,在 pH3—6 范

围内较稳定(见图4)。固定化酶在 pH7—9 范围略较自然酶稳定。

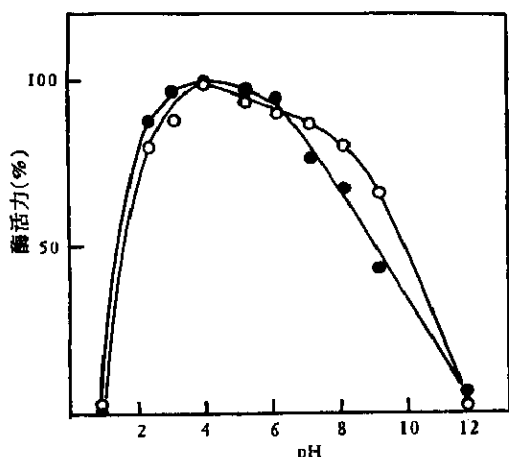


图4 不同 pH 的稳定性曲线

pH1 用 0.05M 氯化钾-盐酸缓冲液, pH2.2—8 用 0.05M 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液, pH9—12 用 0.025M 硼砂-氢氧化钠缓冲液。固定化酶及自然酶分别用 0.2 克 (9340 单位/克) 及 150 微克在不同 pH 处理后按上述测定法测定酶活力。

○——○ 固定化酶; ●——● 自然酶

4. 酶的热稳定性

将固定化酶及自然酶在无底物条件下分别在 pH4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液(最终浓度为 0.05M) 中, 在温度分别为 51、56、

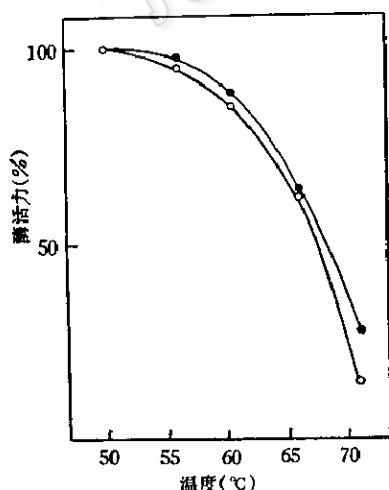


图5 酶的热稳定性

用固定化酶 0.1 克 (14580 单位/克) 及自然酶 190 微克热处理后, 按上述测定法测定酶活力。

○——○ 固定化酶; ●——● 自然酶

60.5、65.5—66、71°C 下保温 15 分钟, 立刻冰浴冷却后测定酶活力。在各种温度下固定化酶和自然酶的热稳定性没有差异 (见图 5)。

5. 米氏常数 (K_m)

用可溶性淀粉、糊精、麦芽糖作为底物, 分别以不同浓度, 在 55°C pH4.5 下测定酶活力, 以 10 分钟的酶活力单位代表酶反应速度 (V), 按莱因威弗和伯克 (Lineweaver 和 Burk) 法以 $\frac{1}{V}$ 对 $\frac{1}{S}$ 作图, 根据直线在横轴上的截距 ($-\frac{1}{K_m}$) (图 6, 图 7, 图 8), 求出米氏常数 K_m (表 3)。

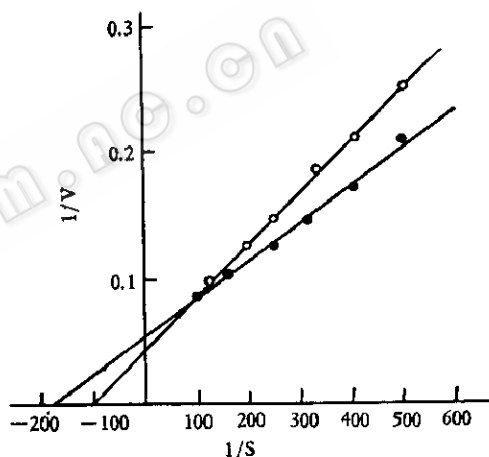


图6 淀粉浓度与反应速度的关系

用固定化酶 0.125 克及自然酶 139 微克, 淀粉浓度为 0.2—1.0% 范围测定。

○——○ 固定化酶; ●——● 自然酶

表3 葡萄糖淀粉酶的米氏常数

底 物	固定化酶 K'_m ($\times 10^{-2}$ 克/毫升)	自然酶 K_m ($\times 10^{-3}$ 克/毫升)
淀 粉	1.00	5.50
糊 精	1.66	4.70
麦芽糖	0.27	1.49

结果表明固定化葡萄糖淀粉酶的表现米氏常数 (K'_m) 较自然酶的米氏常数 (K_m) 大, 即固定化酶对底物的亲和力小, 这与大多数报道的固定化葡萄糖淀粉酶 K'_m 增大

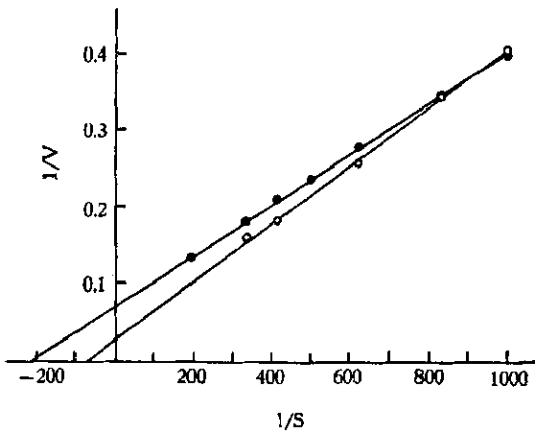


图7 糊精浓度与反应速度的关系

用固定化酶 0.125 克及自然酶 122 微克, 糊精浓度为 0.1—0.5% 范围。

○——○ 固定化酶; ●——● 自然酶

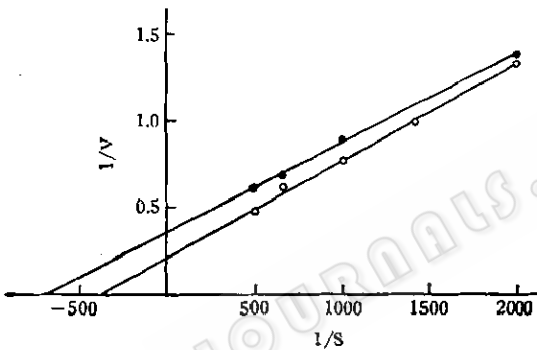


图8 麦芽糖浓度与反应速度的关系

用固定化酶 0.125 克及自然酶 122 微克, 麦芽糖浓度为 0.05—0.2% 范围测定。

○——○ 固定化酶; ●——● 自然酶

的结果一致^[9-13], 这与固定化载体的空间障碍和扩散限制有关。但 Caldwell 等报道^[14] 固定化酶 K'_m (淀粉 11.6 毫克/毫升) 与自然酶 K_m (淀粉 9.4 毫克/毫升) 差别不大。O'Neill 等报道^[15] 用带正电荷的二氨基 4,6 二氯均三嗪活化 DEAE 纤维素制备的固定化酶 K'_m (麦芽糖 1.4mM) 比自然酶 K_m (麦芽糖 6.1mM) 低。

据报道^[9, 11] 随底物分子量逐渐变小, 固定化酶相对活力逐渐增高, 而 K'_m 值逐渐接近自然酶 K_m 值。我们用相同浓度的

不同分子量底物, 固定化酶的相对反应速度随底物分子量变小而有增加的趋势 (见表 4)。

表4 酶对不同分子量底物的相对反应速度*

	淀粉	糊精	麦芽糖
自然酶	100	89	10.8
固定化酶	100	135	29.3
固定化酶 自然酶 $\times 100\%$	100	151	271

* 以淀粉反应速度为 100, 底物浓度均为 1%。

6. 金属离子及尿素对酶活力的影响

将酶液对重蒸馏水透析过夜或固定化酶用重蒸馏水洗净, 然后在不同金属离子存在下测定酶活力。金属离子对固定化酶及自然酶的影响相同, 没有发现显著的激活或抑制作用。 Sn^{2+} 、 Al^{3+} 稍有抑制。EDTA、对酶无抑制作用 (表 5)。

表5 金属离子对葡萄糖淀粉酶活力的影响

金属离子* 浓度 ($1 \times 10^{-3} \text{M}$)	固定化酶活力 (%)	自然酶活力 (%)
不添加	100	100
K^+	108	107
Ca^{2+}	110	100
Mg^{2+}	113	106
Mn^{2+}	116	106
Zn^{2+}	114	111
NH_4^+	121	108
Ba^{2+}	107	107
Ni^{2+}	89	111
Sn^{2+}	76	81
Co^{2+}	107	98
Fe^{3+}	81	90
Ag^+	91	94
Al^{3+}	76	86
Cu^{2+}	96	96
EDTA	100	104

* 除 AgNO_3 及 EDTA 外, 均为氯化物, 均用重蒸馏水配制, 按上述测定方法测定酶活力。

而尿素对酶活力的抑制作用固定化酶较自然酶敏感 (图 9)。前田^[9] 亦报道尿素抑制葡萄糖淀粉酶。

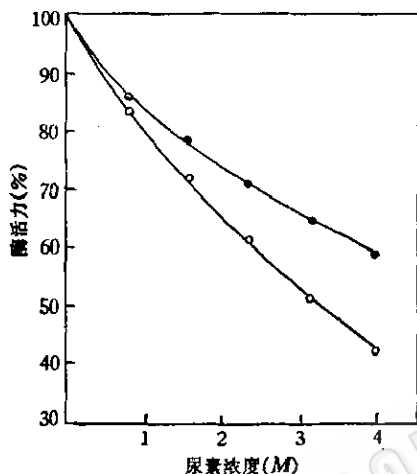


图9 尿素对酶活力的抑制作用

固定化酶及自然酶分别用 0.125 克 (18576 单位/克) 及 151 微克按上述测定方法测定酶活力。

○ —○ 固定化酶; ● —● 自然酶

参 考 文 献

- [1] 黎高翔等: 微生物学报, 13(1):31—37, 1973。
 [2] Pazur, J. H. & Ando, T.: *J. Biol. Chem.*,

- 234(8):1966, 1959.
 [3] Willstätter, E. & Schudel, C.: *Ber.*, 51: 780, 1918.
 [4] Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 117:771, 1937.
 [5] Nelson, N.: *Ibid.*, 153:375, 1944.
 [6] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
 [7] Lineback, Dir. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 134:539, 1969.
 [8] Marsh, D. R., et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 15:483, 1973.
 [9] 前田英胜、铃木英雄: 日本农芸化学会志, 44: 547, 1970。
 [10] 宇佐美、昭次、白崎春海: 发酵工学杂志, 48: 506, 1970。
 [11] Maeda, H. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 16: 1517, 1974.
 [12] Brillouet, J. M. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 19:125, 1977.
 [13] 川嶋浩二、梅田圭司: 日本食品工业学会志, 23: 316, 1976。
 [14] Caldwell, K. D. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 18:1589, 1976.
 [15] O'Neill, S. P. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 13:337, 1971.

STUDIES ON IMMOBILIZED ENZYME

IV. PROPERTIES OF IMMOBILIZED GLUCOAMYLASE

Li Gao-xiang, Sun Wan-ru, Kou Xiu-fen, Zhang Shao-kai

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Glucoamylase (EC 3.2.1.3) of *Asp. niger* (M 85) has been partially purified by DEAE-cellulose column chromatography. The preparation shows no α -amylase activity under our assay conditions. Immobilized glucoamylase was prepared by covalent bonding of the purified enzyme to ABSE-cellulose.

Some characteristics of the immobilized enzyme and native enzyme have been comparatively investigated. The optimum pH for both enzymes was 4.5—4.6 and the temperature optimum for the immobilized enzyme was lower than that of the native enzyme. The pH stability and thermal stability of bound glucoamylase were almost identical with those of

the native one in the absence of substrate. However, the Michaelis constant (K_m) of bound glucoamylase for soluble starch, dextrans and maltose were 1×10^{-3} (g/ml), 1.66×10^{-3} (g/ml) and 2.7×10^{-3} (g/ml), respectively. While, those of the native one were 5.5×10^{-3} (g/ml), 4.7×10^{-3} (g/ml) and 1.49×10^{-3} (g/ml). The K_m value of immobilized enzyme was higher than that of the native one. The relative activity of immobilized enzyme toward substrates of different molecular weight differed from that of the native enzyme. The enzyme activity was inhibited by urea, while it was only slightly inhibited by Sn^{2+} , Al^{3+} , but not inhibited by metal chelating reagent such as EDTA.