

## 红曲霉葡萄糖淀粉酶的研究

### III. 葡萄糖淀粉酶两个分子型的比较\*

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 3.3491 的葡萄糖淀粉酶具有多型性, 将其中主要的两个分子型 E<sub>3</sub> 和 E<sub>4</sub> 提纯到凝胶电泳均一制品, 并进行了比较研究。其氨基酸组成相似, 差别最大的是丝氨酸, 相差 6 个残基, 其次是精氨酸, 差 3 个残基, 其他氨基酸相同或相差少于 2 个残基。氨基末端均为天冬氨酸和丝氨酸, 羧基末端为酪氨酸。两型酶都是糖蛋白, 含糖量稍有差别, E<sub>3</sub> 为 7%, E<sub>4</sub> 为 9%。其组成单糖以甘露糖为主, 其次是半乳糖, 还有痕量的木糖和葡萄糖。两型的分子量也很接近。根据氨基酸残基计算, Sephadex G-100 凝胶过滤和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测出的数值均在 54,000 左右。两型的等电点 (pI) 差别也很小, E<sub>3</sub> 为 4.00, E<sub>4</sub> 为 4.10。

红曲霉的葡萄糖淀粉酶具有多型性, 用凝胶电泳可分为 3—5 个带, 经过提纯已经得到了酶的结晶<sup>[1]</sup>, 并进行了电镜观察<sup>[2]</sup>。其中的第 4 带即 E<sub>4</sub> 已纯化到凝胶电泳均一, 并进行了一系列物理化学性质的测定<sup>[3]</sup>。为了比较 E<sub>3</sub> 和 E<sub>4</sub>, 我们又用板型凝胶制备电泳分别将 E<sub>3</sub> 和 E<sub>4</sub> 纯化<sup>[4]</sup>, 进一步比较研究了两型的组成及某些性质。本文报道此研究结果。

### 材料和方法

#### (一) 酶制剂

无锡酶制剂厂生产的红曲糖化酶, 生产菌种为 *Monascus* sp. 菌号 AS 3.3491, 酶活力每克 2 万单位。

#### (二) 化学试剂

2, 4-二硝基氟苯 (FDNB) 为西德 T. Schuchardt 公司产品, 二甲氨基苯磺酰氯 (DNS-Cl) 为英国 BDH 产品。标准 DNP-氨基酸为东风生化试剂厂出品。DNS-氨基酸为匈牙利 Rearing 公司产品, 羧肽酶 A (五次结晶) 为 Serva 公司产品。

地衣酚 (3, 5-甲苯二酚) 为北京化工厂产品, 再用苯:三氯甲烷 (3:2) 重结晶, 熔点 108—111℃。聚酰胺 6 或 66 薄膜为上海试剂四厂产品。载体两性电解质 pH 3—10, 为本实验室合成的<sup>[5]</sup>。十二烷基硫酸钠 (SDS) 为瑞士 Fluka 厂产品。所用已知分子量的蛋白质有细胞色素 C (天津立新制药厂), 天冬酰胺酶 (日本协和发酵公司), 胰凝乳蛋白酶卵清蛋白和 α-淀粉酶 (东风试剂厂), 过氧化氢酶 (匈牙利 Rearing 公司)。

#### (三) 分析方法

1. 氨基酸分析: 样品水解参照 Moore 等<sup>[6]</sup> 和 Benson 等<sup>[7]</sup> 的方法。用 Hitachi KLA-5 型氨基酸自动分析仪测定, 用已知氨基酸作标准, 按照 Spackman 等<sup>[8]</sup> 的方法计算氨基酸含量, 再按 Thorner 和 Olson<sup>[9]</sup> 法计算出每分子酶蛋白中的

本文于 1979 年 6 月 1 日收到。

\* 本文部分内容曾在日本京都第五届国际食品科学技术会议上报告过。摘要发表在会议摘要集 (Fifth International Congress of Food Science & Technology, Abstracts: 6a-04: 221, 1978.) 轻工业部皮革所金宝仲等同志协助测定氨基酸。生物物理研究所郭尧君同志协助测定紫外吸收, 特此致谢。

氨基酸残基数目。色氨酸按 Edelhoeh<sup>[10]</sup> 法用 Hitachi 556 型分光光度计测定 280 和 288 毫微米波长的吸光度来计算色氨酸残基。

2. 末端氨基酸测定: 用 FDNB 法<sup>[11,12]</sup> 和 DNS-Cl 法<sup>[12,13]</sup> 测定氨基末端。用羧肽酶 A 法<sup>[14,15]</sup> 测定羧基末端, 酶解后用上述氨基酸自动分析仪测定释放出的氨基酸。

3. 糖含量及组成测定: 总糖含量用地衣酚-硫酸法测定<sup>[16]</sup>, 按甘露糖计算。组成单糖用 HCl 水解后纸层析法测定<sup>[17,18]</sup>。

4. 等电点测定: 用聚丙烯酰胺凝胶薄层等电聚焦法测定<sup>[19,20]</sup>。

5. 分子量测定: 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定, 采用 Weber<sup>[21]</sup> 的磷酸缓冲液系统。

## 实验结果

### (一) 纯 E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub> 样品的制备

用板型凝胶制备电泳法制备<sup>[4]</sup>。通常将数十块板制备的样品分别用凝胶电泳检查确实为均一的带后再合并, 合并后仍需检查是否确属均一样品, 用 QAE-Sephadex 柱浓缩<sup>[3]</sup>, 对蒸馏水透析作为样品, 作组成分析用时则需冷冻干燥。

### (二) 氨基酸组成测定

称取冷冻干燥样品 1 毫克, 加 0.5 毫升三次蒸馏的恒沸点盐酸, 抽真空后封管, 于 105—110°C 水解 24 或 72 小时, 在真空干燥器里除去盐酸后溶于 2 毫升 pH2.2 柠檬酸缓冲液中, 用 Hitachi KLA-5 型氨基酸自动分析仪测定, 再按 Thornber 和 Olson<sup>[9]</sup> 法计算每分子酶蛋白中的氨基酸残基数, 为了测定色氨酸, 将冷冻干燥样品放在有 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的真空干燥器中干燥, 然后准确称取 1 毫克左右的样品溶于 4 毫升含有 6 M 盐酸胍的 pH 6.5, 0.02 M 磷酸缓冲液中, 用紫外分光光度计测定 280 和 288 毫微米波长处的克分子消光系数, 根据 Edelhoeh<sup>[10]</sup> 的方程式  $\epsilon_{288} = N_{Trp} 4815 + M_{Tyr} 385$  和  $\epsilon_{280} = N_{Trp} 5690 + M_{Tyr} 1280$ , 这里 N 和 M

分别是每克分子蛋白中色氨酸和酪氨酸克分子数, 结果见表 1。

通常计算每分子蛋白质中的氨基酸残基数, 要求蛋白质的分子量是已知的, 测定样品纯度高, 称量准确, 并且要校正水份和灰份。而用 Thornber 等的方法计算则不要求这样严格, 其原理是根据不同氨基酸含量之间的最小差别应至少为一个氨基酸残基, 据此推算各残基数目。计算结果 E<sub>3</sub>

表 1 葡萄糖淀粉酶 E<sub>3</sub> 和 E<sub>4</sub> 的氨基酸组成\*

氨基酸	每分子中残基数		差数
	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	
丙氨酸	57	58	1
丝氨酸	52	58	6
天冬氨酸	52	53	1
甘氨酸	40	40	—
亮氨酸	39	40	1
谷氨酸	39	39	—
苏氨酸	32	34	2
缬氨酸	30	32	2
酪氨酸	26	26	—
脯氨酸	24	22	2
精氨酸	19	16	3
苯丙氨酸	17	17	—
异亮氨酸	16	15	1
赖氨酸	12	12	—
甲硫氨酸	6	5	1
组氨酸	4	4	—
**胱氨酸	4	4	—
***色氨酸	14	12	2
总计	483	487	4

\* 用 Hitachi KLA-5 型氨基酸分析仪分析, 结果根据水解 24, 72 小时计算, 残基计算根据 Thornber 等的方法<sup>[9]</sup>。

\*\* 样品未经氧化。

\*\*\* 色氨酸测定用 Edelhoeh 方法<sup>[10]</sup>, 残基计算根据分子量 55000, 样品含水份 10%, 灰份 3%。

含有 483 个氨基酸,  $E_4$  含有 487 个氨基酸, 根据氨基酸残基计算出的分子量分别为 52740 和 52512, 这是净蛋白的分子量, 不包括糖的部分在内。按 Edelhoch 法同时能测定色氨酸和酪氨酸, 所得酪氨酸残基数  $E_3$  为 26.0,  $E_4$  为 24.4, 与用氨基酸分析仪测得者基本相符。

### (三) 氨基末端的定性测定

1. 用 FDNB 法测定。称 2 毫克左右冷冻干燥样品溶于 0.1 毫升 0.25 M  $\text{NaHCO}_3$  中, 加含有 FDNB 0.5 微升的无水乙醇 0.1 毫升, 在 40°C 反应 2 小时, 生成的黄色沉淀 (DNP-蛋白) 用丙酮洗数次以除去过剩的 FDNB, 再用乙醚洗, 干燥, 加 0.1 毫升重蒸三次的盐酸, 封管后在 105°—110°C 水解 15 小时, 开管后除去盐酸, 加少量蒸馏水, 用乙醚反复抽提几次, 抽提液合并, 此即为醚层。干后加丙酮溶解, 全部点样于聚酰胺 6 或 66 薄膜, 室温双向展开, 展开剂第一向为苯:冰乙酸(8:2)(为体积比, 下同), 第二向为甲酸:水(1:1), 根据多次试验与标准 DNP-氨基酸图谱比较, 找出可能的 DNP-氨基酸, 于第二向展开前, 点加该标准 DNP-氨基酸作比较, 结果见图 1, 2。在层析图谱上有两个 DNP-氨基酸, 其位置相当于天冬氨酸和丝氨酸。经过乙醚抽提过的水层也和醚层同样处理, 层析结果仅出现 DNP- $\epsilon$ -赖氨酸, 这是侧链氨基, 而不是末端氨基。

2. 用 DNS-Cl 法测定: 冷冻干燥样品 1 毫克左右, 加含 0.25 微克 DNS-Cl 的丙酮溶液 0.1 毫升, 40°C 反应 2 小时, 按上述方法除去过剩 DNS-Cl 后进行水解。水解液用乙酸乙酯抽提, 将乙酸乙酯层全部点样于聚酰胺 6 或 66 薄膜, 室温双向展开, 第一向第一次(I)为苯:冰乙酸(9:1), 第二次(II)为乙酸乙酯:甲醇:冰乙酸(20:1:1), 第二向为甲酸:水(3:200), 层析结

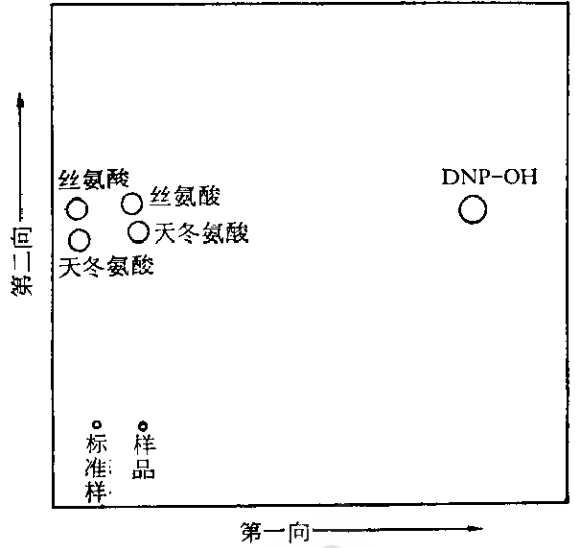


图 1 葡萄糖淀粉酶  $E_3$  的 DNP-氨基酸层析图谱  
(样品: 2.32 毫克, 醚层)

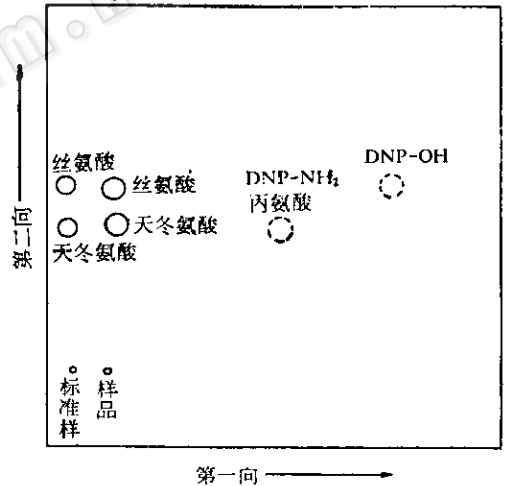


图 2 葡萄糖淀粉酶  $E_4$  的 DNP-氨基酸层析图谱  
(样品: 2.05 毫克, 醚层)

束, 在紫外灯下观察荧光, 结果见图 3, 4。末端氨基酸也是天冬氨酸和丝氨酸。

用两种方法测得的氨基末端均为两个氨基酸, 在层析图谱上用肉眼观察两者的颜色不相上下。因样品提纯困难, 未进行定量测定。

### (四) 羧基末端测定

取约 12 毫克样品用羧肽酶 A 分解, 样

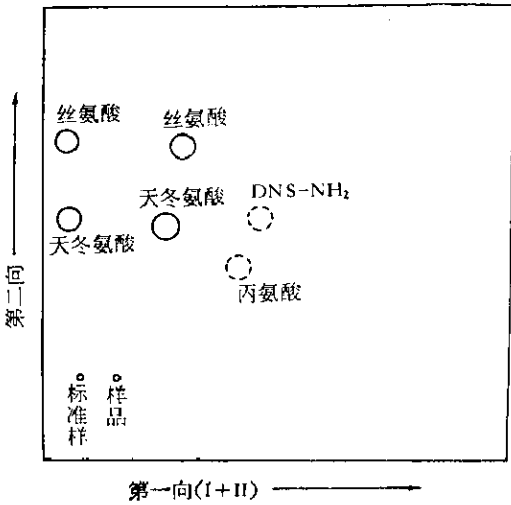


图3 葡萄糖淀粉酶 E<sub>3</sub> 的 DNS-氨基酸层析图谱 (样品 1 毫克, 乙酸乙酯层)

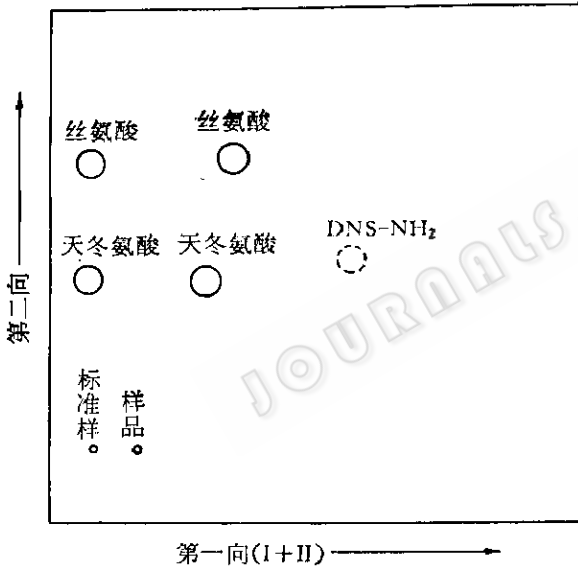


图4 葡萄糖淀粉酶 E<sub>4</sub> 的 DNS-氨基酸层析图谱 (样品 1.07 毫克, 乙酸乙酯层)

品: 羧肽酶 A 加入量的分子比为 10:1 或 50:1, 30°C 保温 0.5—2 小时, 释放出的羧基末端氨基酸用 Amberlite IR-120H<sup>+</sup> 纯化, 用 Hitachi KLA-5 型氨基酸自动分析仪分析结果见图 5, 6。羧基末端的第一个氨基酸在两型中均为酪氨酸, E<sub>3</sub> 的第二和第三为亮氨酸和丙氨酸, 而在 E<sub>4</sub> 似为丙氨酸和亮氨酸。也可能属于实验误差, 受样品量所限, 测定次数较少, 且收率偏低。

(五) 糖含量及其组成

1. 总糖含量: 取冷冻干燥样品 0.3—1 毫克, 溶于 1 毫升水中, 加入 8.5 毫升地衣酚-硫酸试剂<sup>[6]</sup>, 在 80°C 水浴中加热 1 小时, 用流水冷却, 在 505 毫微米波长比色,

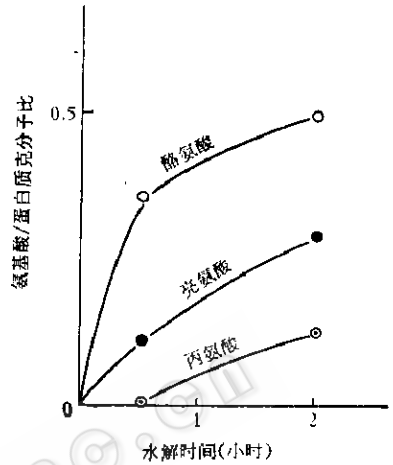


图5 葡萄糖淀粉酶 E<sub>3</sub> 的羧基末端

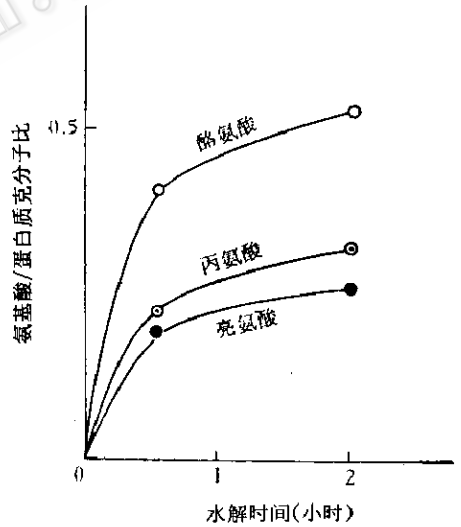


图6 葡萄糖淀粉酶 E<sub>4</sub> 的羧基末端

按甘露糖的标准曲线计算出 E<sub>3</sub> 含糖 7%, E<sub>4</sub> 含糖 9% (按干重计算)。

2. 糖组成: 取冷冻干燥样品 3 毫克, 放在小玻璃管中, 加 2 N 盐酸 0.8 毫升, 封管后在 100°C 水解 4 小时, 开管后在减压下除盐酸, 残渣溶于 1 毫升水中, 加少量 Amberlite IR-120H<sup>+</sup> 除去氨基酸和多肽, 离心, 上清液真空干燥, 溶于少量甲醇和水

(1:1)中,点样于 Whatman 1号滤纸,并点已知糖作对照,展开剂为正丁醇:吡啶:水(6:4:3),上行展开两次,用苯胺-邻苯二甲酸试剂<sup>[27]</sup>显色,在 105°C 加热 5—10 分钟;也可用苯胺-二苯胺-磷酸试剂<sup>[28]</sup>,在 80°C 加热 5—10 分钟显色,结果见图 7, 8。E<sub>3</sub> 和 E<sub>4</sub> 均含甘露糖和半乳糖以及痕迹量的木糖和葡萄糖。

### (六) 聚丙烯酰胺凝胶薄层等电聚焦测定等电点



图 7 葡萄糖淀粉酶 E<sub>3</sub> 单糖组分的纸层析图谱

\* 混合糖即木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖混合物



图 8 葡萄糖淀粉酶 E<sub>4</sub> 单糖组分的纸层析图谱

\* 混合糖即木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖的混合物

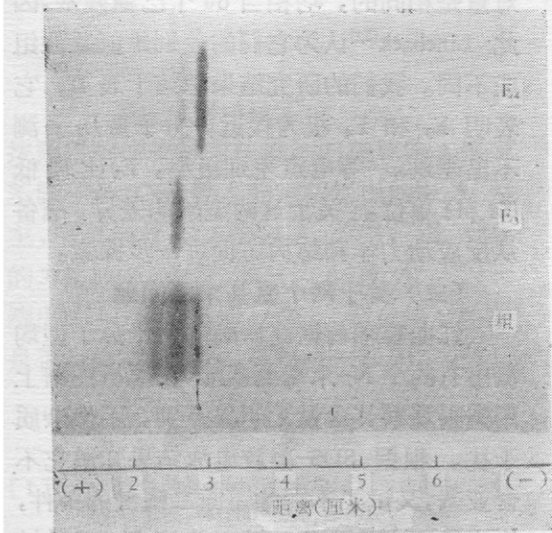


图 9 葡萄糖淀粉酶薄层凝胶等电聚焦图谱

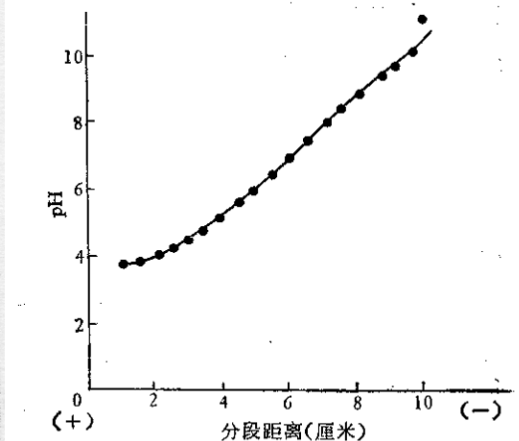


图 10 葡萄糖淀粉酶薄层凝胶等电聚焦 pH 梯度

的等电点  $pI$  为 4.00,  $E_4$  为 4.10。

### (七) SDS-凝胶电泳法测定分子量

按 Weber 等<sup>[21]</sup>的方法,凝胶浓度采用 10%, 标准样品溶于水,其浓度为 2 毫克/毫升,取样品 1 毫升,加等体积的磷酸缓冲液( $pH$  7.0, 0.02 M),其中含 SDS 2%,  $\beta$ -巯基乙醇 2%,在 37°C 保温 2 小时,然后对含 0.1% SDS 和 0.1%  $\beta$ -巯基乙醇的磷酸缓冲液( $pH$  7.0; 0.01 M)透析,作为加样液。未知分子量的蛋白质溶液同样处理,电泳时电流控制在每管 8 毫安,当前沿移动至凝胶底部 1 厘米处即结束,电泳时间约 5 小时。染色用考马斯亮蓝 R-250。按 Weber 法计算各带相对泳动率( $R_m$ ),以相对泳动率对分子量(对数坐标)作图,得到如图 11 的结果。分子量对数与  $R_m$  呈直线关系。这样求出  $E_3$  和  $E_4$  的分子量均为 54000。

## 讨 论

### (一) 氨基酸组成与已知酶的氨基酸组成的比较

已报道过氨基酸组成的葡萄糖淀粉酶来自以下几个菌种,如黑曲霉 (*Asp. ni-*

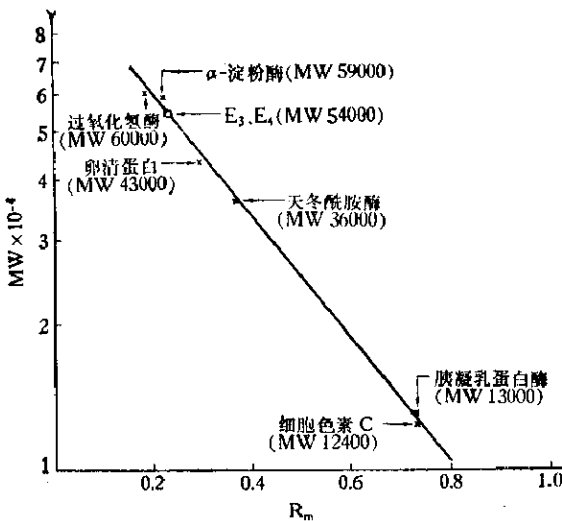


图 11 分子量(对数坐标)与蛋白质泳动率的关系

*ger*)<sup>[22]</sup>,另一株黑曲霉 NRRL 330<sup>[23]</sup>, 海枣曲霉 (*Asp. phoenicis*)<sup>[24]</sup>、内孢霉 (*Endomyces* sp.) IFO 0111<sup>[25]</sup>、爪哇根霉 (*Rh. javanicus*)<sup>[26]</sup>等。红曲霉的葡萄糖淀粉酶氨基酸组成与上述的前三种微生物产生的葡萄糖淀粉酶极为相似,按照表 I 中氨基酸残基多少的次序排列,则黑曲霉葡萄糖淀粉酶仅有 3 个氨基酸残基的位置与红曲霉不同,即苏氨酸上升至第 3 位,丙氨酸下降至第 4 位,精氨酸下降为 12 位。红曲霉同其他几个菌种比较大体相似,即排在前面的 7 种氨基酸虽互有变动但都在前 7 位,而与枯草杆菌的  $\alpha$ -淀粉酶<sup>[27]</sup>相比则有很大差异。

### (二) 两个分子型的差异究竟在哪里?

具有两个或两个以上分子型的葡萄糖淀粉酶,在其他菌种中也有不少报道。如黑曲霉<sup>[28]</sup>中酶 I 与酶 II 的等电点分别为 3.4 和 4.0,黑曲霉 NRRL 330<sup>[23]</sup>中酶 I 和 II 等电点分别为 3.5 和 4.0,分子量分别为 99000 和 112000。而在另外一株黑曲霉的葡萄糖淀粉酶(商品名 Takamine Diazyme)<sup>[22]</sup>中酶 I 分子量为 74900,含糖 13%,酶 II 分子量为 54300,含糖 18%,但二者含糖的绝对量是相同的,均相当 60 个已糖残基,因此 Lineback<sup>[22]</sup>认为它们的差别是氨基酸组成不同。我们的研究结果总结于表 II,它表明  $E_3$  和  $E_4$  极为接近,分子量几乎测不出差别。等电点差别极小, $E_3$  比  $E_4$  低 0.1 pH 单位。关于这两型酶的差异,准备从反应动力学和结构方面进一步探索。

### (三) 关于两个氨基末端问题

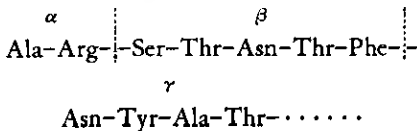
红曲霉葡萄糖淀粉酶的两个分子型均测出有两个 N-末端氨基酸,在层析图谱上用肉眼观察其含量无明显差别,不像杂质干扰。根据 SDS-凝胶电泳结果知道它不含亚基,又试了不同的还原二硫键的条件,均未能证实为两条肽链,为什么一条肽链

表 2 E<sub>3</sub> 和 E<sub>4</sub> 的比较

	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	测定方法
氨基末端	天冬氨酸 丝氨酸	天冬氨酸 丝氨酸	FDNB 和 DNS-Cl
羧基末端	酪氨酸 (亮氨酸, 丙氨酸)	酪氨酸 (丙氨酸, 亮氨酸)	羧肽酶 A
糖含量 (%)	7	9	地衣酚-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
组成单糖	甘露糖 半乳糖 痕量木糖 痕量葡萄糖	甘露糖 半乳糖 痕量木糖 痕量葡萄糖	纸层析
分子量	52740 53000 54000	52512 55000 54000	根据氨基酸残基计算 Sephadex G-100 过滤 SDS-PAGE
等电点 pI	4.00	4.10	薄层凝胶等电聚焦

有两个 N-末端氨基酸呢?

早期文献中有过类似的报道<sup>[29]</sup>, 如羧肽酶末端为天冬酰胺和丝氨酸, 该作者指出是由于该酶在偏碱性条件下不稳定的 N-末端氨基酸水解下来的缘故。现在知道羧肽酶 A 分子是不均一的, 又有 A<sub>α</sub>、A<sub>β</sub> 和 A<sub>γ</sub> 三个型, 其 N-末端分别为丙氨酸、丝氨酸和天冬酰胺, 其原因是在提取过程中受胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的分解而形成的, 如下所示<sup>[30]</sup>:



按照不同的提取方法得到的羧肽酶 A 组成不同, 用 Cox 等人的方法提出的以 A<sub>α</sub> 为主, 用 Anson 的方法以 A<sub>γ</sub> 为主, 用 Allan 的方法以 A<sub>β</sub> 为主, 其次为 A<sub>α</sub> 和 A<sub>γ</sub>, 因此测出的 N-末端不只一个。葡萄糖淀粉酶是否也有类似情况, 有待进一步研究证明。

### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 微生物学报, **16**:200-205, 1976。  
[2] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组:

- 生物化学与生物物理学报, **10**:349-354, 1978。  
[3] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 微生物学报, **17**:101-107, 1977。  
[4] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 生物化学与生物物理进展, 1976 年第 4 期, 36-39 页。  
[5] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 生物化学与生物物理进展, 1976 年第 2 期, 61-65 页。  
[6] Moore, S. and W. H. Stein: Methods in Enzymology, Vol. VI, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1963, p. 819.  
[7] Benson, J. V. and J. A. Patterson: in New Techniques in Amino Acid, Peptide, and Protein Analysis, ed. by A. Niederwieser and G. Pataki, Ann Arbor Science Publisher, Michigan, 1971, p. 37.  
[8] Spackman, D. H. et al.: Anal. Chem., **30**: 1190, 1958.  
[9] Thorner, J. P. and J. M. Olson: Biochemistry, **7**: 2242, 1968.  
[10] Edelhoeh, H.: *ibid.*, **6**: 1948, 1967.  
[11] Fraenkel-Conrat, H. et al.: Methods of Biochemical Analysis, Vol. 2, ed. by D. Glick, Interscience Publishers, New York, 1955, p. 359.  
[12] 陈远聪等: 生物化学与生物物理进展, 1975 年第 1 期, 38 页。  
[13] Seiler, N.: Methods of Biochemical Analysis, Vol. 18, ed. by D. Glick, Interscience Publishers, New York, 1970, p. 259.  
[14] Ambler, R. P.: Methods in Enzymology,

- Vol. 11, ed. by C. H. W. Hirs, Academic Press, New York, 1967, p. 155.
- [15] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术: 科学出版社, 1962年, 124页。
- [16] Marshall, R. D. and A. Neuberger: "Glycoproteins" by A. Gottschalk, Elsevier publishing Company, Amsterdam. 1972. p. 283.
- [17] Partridge, S. M.: *Nature*, **164**: 443, 1949.
- [18] Schwimmer, S. and A. Bevenue: *Science*, **123**: 543, 1956.
- [19] Vesterberg, O.: *Biochim. Biophys. Acta*, **257**: 11, 1972.
- [20] Vesterberg, O. *Science Tools*, **20**: 22, 1973.
- [21] Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406, 1969.
- [22] Lineback, E. R. et al.: *Cereal Chemistry*, **49**: 283, 1972.
- [23] Pazur, J. H. et al.: *Carbohydr. Res.*, **20**: 83, 1971.
- [24] Lineback, D. R. and W. E. Baumann: *ibid.*, **14**: 341, 1970.
- [25] Fukui, T. and Z. Nikuni: *Agr. Biol. Chem.*, **33**: 884, 1969.
- [26] Watanabe, K. and T. Fukinbara: *ibid.*, **37**: 2755, 1973.
- [27] Junge, J. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **234**: 556, 1959.
- [28] Lineback, D. R. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**: 539, 1969.
- [29] Thompson, E. O. P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **10**: 633, 1953.
- [30] Blackburn, S.: *Enzyme Structure and Function*, Marcel Dekker INC. New York and Basel, 1976. P. 169.

## GLUCOAMYLASE OF *MONASCUS* SP.

### III. COMPARISON OF THE TWO MOLECULAR FORMS

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

The glucoamylase from *Monascus* sp. exists in multiple molecular forms. The two major forms E<sub>3</sub> and E<sub>4</sub> have been purified and proved to be homogeneous by disc gel electrophoresis. Their chemical compositions and some basic properties have been compared with the following results. The amino acid compositions of the two forms are similar, merely differ by 6 serine and 3 arginine residues, and less than 2 for the other amino acids.

The amino- and carboxyl-terminal amino acids of E<sub>3</sub> and E<sub>4</sub> are identical, the carboxyl terminus being tyrosine, but it was unexpected that two amino-termini

(Asp and Ser) were found in both forms, which were composed of single peptide chain.

Both forms are glycoproteins, containing 7 and 9% total sugars as mannose. The component sugars are mannose, galactose and trace of xylose and glucose.

The molecular weight of the two forms are without significant difference, being about 54,000 daltons as estimated by gel filtration or SDS-poly-acrylamide gel electrophoresis. The isoelectric points (pI) of the two forms differ slightly, being 4.00 for E<sub>3</sub> and 4.10 for E<sub>4</sub>.