

红曲霉葡萄糖淀粉酶的底物特异性

王杨声 孙晋武 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

红曲霉 (*Monascus* sp.) AS 3.3491 的葡萄糖淀粉酶具有多型性, 其中的两个主要组分 E_3 和 E_4 得到了凝胶电泳均一的样品。比较了它们的底物特异性, 同时与粗酶液和未分纯的 E_{3+4} 作了比较。

从酶对底物的分解限度来看, 粗酶液能 100% 的分解可溶性淀粉、直链淀粉、支链淀粉、糖原、玉米淀粉、马铃薯淀粉、麦芽糖和麦芽三糖, 也能分解茁霉多糖 (Pullulan) (35.8%), 潘糖 (Panose- α -葡萄糖基麦芽糖) (27.3%), 异麦芽糖 (9.6%), 右旋糖酐 (5%), 龙胆二糖 (1.9%)。纯化的 E_3 和 E_4 仅能 100% 地分解糖原、麦芽糖和麦芽三糖, 对其他底物的分解限度则有不同程度的降低, E_3 , E_4 和 E_{3+4} 之间没有明显差别, 可以看出粗酶液中有能分解 α -1, 6-糖苷键的酶存在。各种酶样品均不能分解环状糊精 (α , β 和 γ), 纤维二糖、龙胆二糖和鞣糖。

比较了各种酶样品对不同底物包括不同平均链长的糊精的反应初速度, 在用同样的百分浓度下, 对麦芽糖、麦芽三糖、支链淀粉、可溶性淀粉等的反应初速度高, 而对直链淀粉的反应初速度要低得多, 这与它没有分枝, 非还原性末端较少有关。对不同平均链长的小分子糊精的反应初速度随着链长的增加而增加。而对异麦芽糖的水解速度仅相当于麦芽糖的 1% 左右, E_3 , E_4 和 E_{3+4} 之间无明显的差别。

用麦芽糖和可溶性淀粉为底物, 比较了 E_3 和 E_4 的 K_m 值和 V_{max} 值。两种酶对麦芽糖的 K_m 值均为 $1.38 \times 10^{-1}(\%)$, 对于可溶性淀粉的 K_m 值均为 $1.05(\%)$, V_{max} 也基本相同。

E_3 和 E_4 对可溶性淀粉的水解产物均为 β -葡萄糖, 两种酶均能催化葡萄糖合成少量寡糖。

红曲霉葡萄糖淀粉酶的提纯, 结晶及一些基本性质如前文报道^[1, 2], 通过聚丙烯酰胺垂直板型凝胶电泳^[3]制备得到凝胶电泳均一的 E_3 和 E_4 纯品, 进一步研究它们的性质, 比较了它们的底物特异性, 对可溶性淀粉的水解产物的构型进行了研究, 并观察了由葡萄糖合成寡糖的作用。

材料和方法

(一) 酶制剂

无锡酶制剂厂生产的红曲霉葡萄糖淀粉酶, 生产菌株为 *Monascus* sp. AS 3.3491, 酶活力为每克 2 万单位。 α -淀粉酶也由无锡酶制剂厂提供, 由枯草杆菌 BF7658 的变种 129 产生, 其酶活

力为每克 2538 单位。

(二) 化学试剂

茁霉多糖; α -, β -, γ -, 环状糊精; 麦芽糖; 麦芽三糖皆为日本林原生物化学公司产品*。直链淀粉和支链淀粉为中国科学院有机化学研究所**提供。纤维二糖(生物试剂, 上海开明化学厂), 鞣糖 (trehalose) (生化试剂, 上海试剂二厂), 龙胆二糖(层析试剂, 瑞士 Fluka AG.), 玉米淀粉(华北制药厂), 马铃薯淀粉 (E. Merck), 可溶性淀粉(浙江菱湖淀粉厂), 糖原(生化试剂, 南京药学院实验室), 右旋糖酐(平均分子量 45,380, 天津工农兵食品厂), 葡萄糖氧化酶液 (110 单位/毫

本文于 1979 年 8 月 15 日收到。

* 为林原生物化学公司社长林原健先生赠给。

** 为屠传忠同志赠给, 特此致谢。

升, 北京化工厂), 活性炭(平均粒径 0.43—0.50 毫米, 北京市医药公司)。

(三) 分析方法

1. 酶活力、蛋白质的测定: 同前报^[1]。酶活力测定时不加酶的淀粉反应液在同样条件下反应同样时间作为对照。酸水解后糖含量的测定用 3, 5-二硝基水杨酸比色法^[4], 或葡萄糖氧化酶法^[5]。

2. 糖的纸层析: 展开剂: 正丁醇: 吡啶: 水 (6:4:3 体积比); 显色剂: 100 毫升 4% (W/V) 二苯胺的丙酮液, 100 毫升 4% (V/V) 苯胺的丙酮溶液和 20 毫升 85% 磷酸混合, 80℃ 显色 10 分钟。

3. 旋光度的测定: 用 WZZ 自动指示旋光仪测定(上海光学仪器修理厂)。

实验结果和讨论

(一) 样品和底物的制备

1. 原酶液

酶制剂加水后于 37℃ 浸出, 加入硫酸铵达 70% 饱和度, 离心得到沉淀, 沉淀溶于少量蒸馏水中^[4]即为原酶液。

2. E_3 , E_4 纯品和未经分离的 E_{3+4} 的混合液。

上述原酶液经 Sephadex G-25 柱脱盐, DE-11 DEAE-纤维素柱层析, 收集含有带 3 和带 4 的部分, 以 QAE-Sephadex A-50 柱浓缩^[4], 经聚丙烯酰胺凝胶板电泳制备^[3], 将每块板上切下的样品分别合并, 再经过聚丙烯酰胺盘状凝胶电泳鉴定得到 E_3 , E_4 纯品。经板电泳 E_3 和 E_4 没有分开的部分即实验用的 E_{3+4} 混合液。

3. 潘糖和异麦芽糖的制备

100 毫升 30% 的麦芽糖溶液(内含 10 毫升 pH4.5 0.5M 醋酸缓冲液), 加入含转移葡萄糖苷酶(用 Asp·niger EN-257)的培养液 40 毫升, 45℃ 恒温反应 24 小时, 纸层析分离, 将含有异麦芽糖和潘糖的纸条剪下分别合并, 以蒸馏水浸泡一天, 浸出

液真空浓缩。

4. 不同链长糊精的制备

20 克直链淀粉, 加水 80 毫升调成淀粉乳, 用 0.1N NaOH 调 pH 至 6.2—6.5, 加入 α -淀粉酶浸出液(19 单位/克淀粉)在 92°—94℃ 液化。然后用 0.1N HCl 调 pH 4.5—4.8, 在 15 磅灭菌 10 分钟, 室温高速离心, 澄清液通过活性炭-硅藻土柱 (43.2×26 厘米), 分别以水, 7.5%, 15%, 20%, 25%, 30% 的酒精溶液洗脱, 得到 I—VII 7 种不同平均链长的糊精, 分别减压浓缩。各组分的纸层析图谱见图 1。

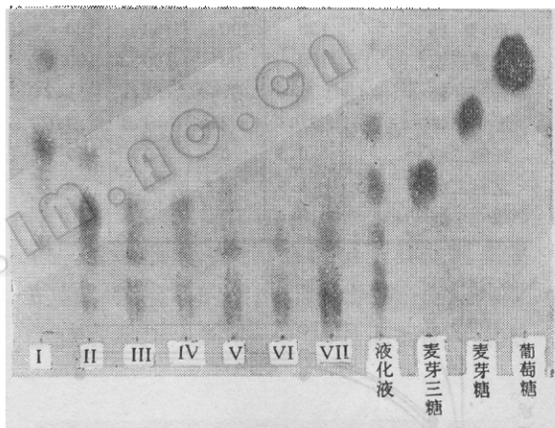


图 1 不同链长糊精的纸谱

图中 I—VII 是经柱层析后的各组分

(二) 底物特异性的研究

1. 酶对各种底物的水解限度

多糖底物: 反应液中底物的浓度为 0.25% (直链淀粉、糖原为 0.1%) 内含 2 毫升 0.5M pH4.5 醋酸缓冲液, 加入不同种类的酶 200 单位, 反应液最终体积为 20 毫升, 50℃ 水浴反应, 不同时间取样, 以 3, 5-二硝基水杨酸法测定糖含量, 以酸水解 (10 毫升底物作用液内含 1 毫升 25% 盐酸, 100℃ 沸水浴水解 2.5 小时) 得出的糖量作为 100%, 计算出酶的水解限度, 结果见表 1。酶的水解曲线见图 2—6。

寡糖底物: 反应液中底物的浓度为

表 1 红曲霉葡萄糖淀粉酶
对不同底物的水解限度(%)

底物	酶类	原酶液	E ₃	E ₄	E ₃₊₄
可溶性淀粉		100	89.4	91.8	90
直链淀粉 (0.1%)		100	100	97.2	93.1
支链淀粉		100	91.3	80	78
糖原 (0.1%)		100	100	100	100
玉米淀粉		100	76.5	78.8	75.3
马铃薯淀粉		100	79	80.5	68.2
茁霉多糖		35.8	8.7	8.7	7.4
右旋糖酐		5	0	0	0
α-环状糊精		0	0	0	0
β-环状糊精		0	0	0	0
γ-环状糊精		0	0	0	0
麦芽糖		100	100	100	100
麦芽三糖		100	100	100	100
异麦芽糖		9.6	1.4	1.1	1.2
潘糖		27.3	2.9	3.0	3.6
纤维二糖		0.5	0	0	0
龙胆二糖		1.9	0	0	0
草糖		0	0	0	0

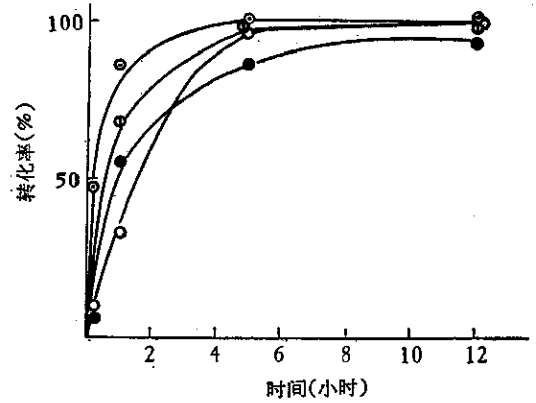


图 3 直链淀粉的酶解曲线

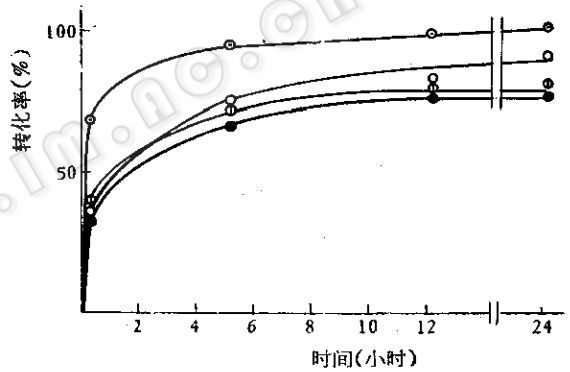


图 4 支链淀粉的酶解曲线

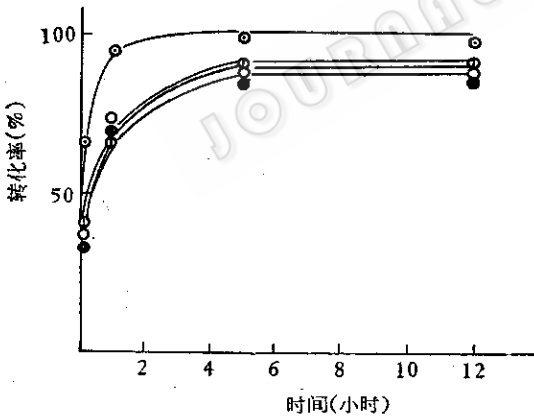


图 2 可溶性淀粉的酶解曲线

图 2-6 中符号说明: —○—○—原酶液

—○—○—E₃ —□—□—E₄ —●—●—E₃₊₄

0.1%, 内含 10% 0.5M pH4.5 醋酸缓冲液, 加酶量为 10 单位/毫升反应液, 50℃ 水浴作用 24 小时, 不同时间取样, 用葡萄糖氧化酶法^[5]测出葡萄糖含量。另外以蒽酮法^[6]测出各种底物的反应液中的糖含量, 以此作为 100%, 计算出酶解的限度, 其结果见

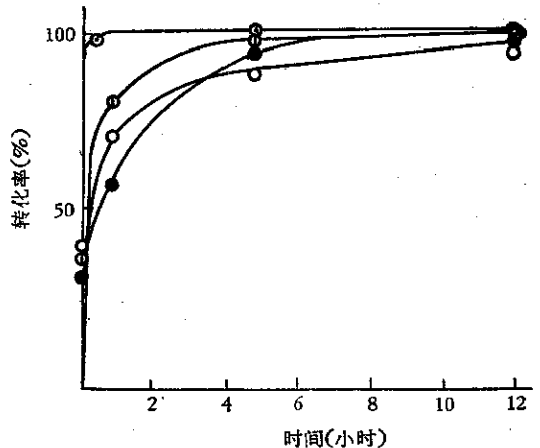


图 5 糖原的酶解曲线

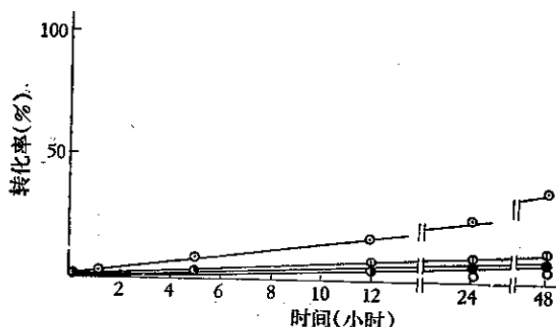


图6 茁霉多糖的酶解曲线

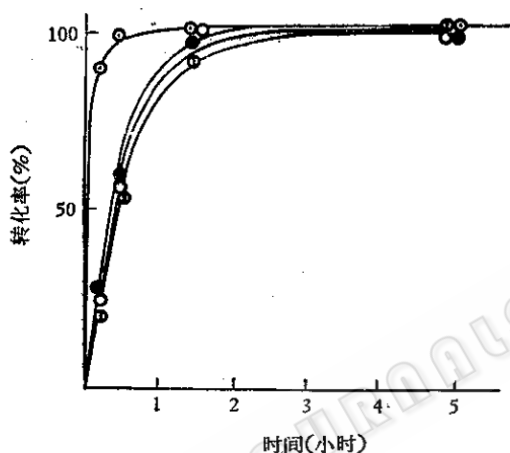


图7 麦芽糖的酶解曲线

图7, 8中符号说明: —○—○— 原酶液
—○—○— E_3 —①—①— E_4 —●—●— E_{3+4}

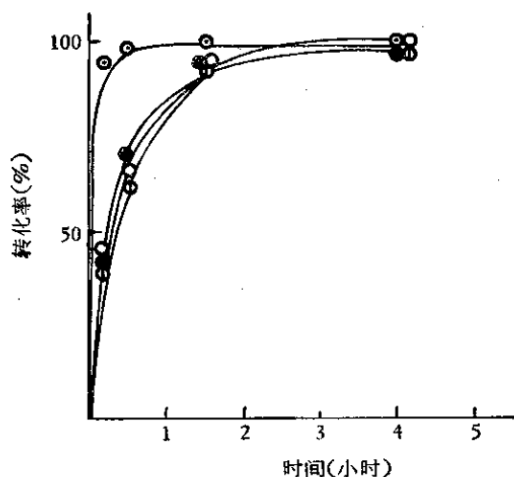


图8 麦芽三糖的酶解曲线

表1, 酶的水解曲线见图7, 8。

表1所列的多糖底物除直链淀粉和糖原的浓度为0.1%以外,其余的底物浓度都为0.25%,作用时间全为48小时。寡糖底物的浓度全为0.1%,作用时间为24小时。

由表1可以看出,粗酶液对各种底物的酶解限度都高于 E_3 和 E_4 纯品,如粗酶液能100%地分解可溶性淀粉,直链淀粉、支链淀粉、糖原、玉米淀粉、马铃薯淀粉、麦芽糖和麦芽三糖,纯化的 E_3 和 E_4 除对糖原、麦芽糖和麦芽三糖能100%地分解外,对其他底物的酶解限度都有不同程度的降低, E_3 和 E_4 之间没有明显的差别,它们与 E_{3+4} 也基本相同,水解曲线也很相似。此外,原酶液稍能水解 E_3 和 E_4 纯品所不能水解的含有其他键的寡糖,如纤维二糖(β 1-4键)和龙胆二糖(β 1-6键),对茁霉多糖的酶解限度也比 E_3 和 E_4 纯品大得多,这说明原酶液中可能存在能分解其他糖苷键的酶。纸层析的结果证明葡萄糖淀粉酶对上述底物作用的唯一产物是葡萄糖(见图

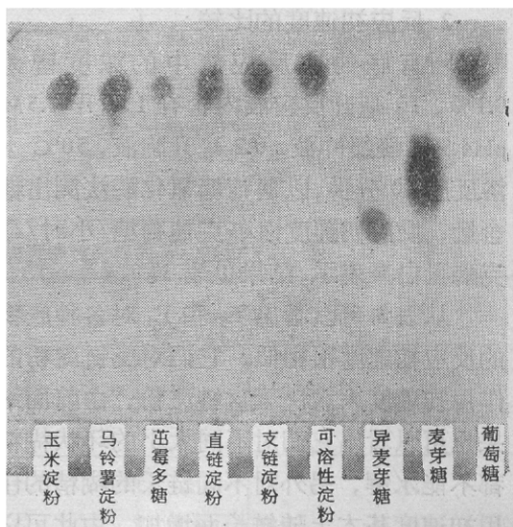


图9 E_3 对各种底物作用产物的纸层析图谱
原酶液、 E_4 、 E_{3+4} 对这些底物的纸层析图谱都与此相同,4种酶对以麦芽糖和麦芽三糖为底物的作用图谱也与此相同。

9)。4 种酶样品对环状糊精 (α , β , γ) 以及蕈糖都不能水解。在以前的报道中,不同来源的葡萄糖淀粉酶对蕈糖的作用是不一致的,*Piricularia oryzae* 的葡萄糖淀粉酶能水解 α , α -蕈糖 0.24%^[15], *Asp. niger* 的纯化酶也有水解作用^[16],而 *Asp. awamori* 的葡萄糖淀粉酶则不能水解 α , α -蕈糖。

E_3 和 E_4 能完全水解麦芽寡糖中的 α -D-(1 \rightarrow 4) 键如麦芽糖和麦芽三糖,另外也能部分水解寡糖中的 α -D-(1 \rightarrow 6) 键,而水解 α -D-(1 \rightarrow 6) 键的速度远远低于 α -D-(1 \rightarrow 4) 键(约为 1%) (见表 2),这和其他霉菌所产生的葡萄糖淀粉酶作用情况是一致的^[13,14],但高粱红曲霉的葡萄糖淀粉酶对异麦芽糖不能水解^[9]。

表 2 酶对麦芽糖和异麦芽糖的水解速度*

底 物	原酶液	E_3	E_4	E_{3+4}
麦 芽 糖	57	43.6	43.1	58
异麦芽糖	2,3	0.61	0.43	0.53

* 作用条件同前,作用 1.5 小时后测定,水解速度以毫克葡萄糖/小时/毫克酶蛋白表示。

2. 反应初速度的比较

所有底物在反应液中的浓度皆为 0.1%, 10 毫升反应液内含有 1 毫升 0.5M pH4.5 醋酸缓冲液,0.2 毫升酶液,50℃ 水浴反应 10 分钟,以葡萄糖氧化酶法测出糖含量,反应初速度以毫克葡萄糖/小时/毫克酶蛋白来表示,结果见表 3。

从表 3 可以看出 E_3 和 E_4 对各种底物的反应初速度很相似,它们对支链淀粉的作用初速度大大快于直链淀粉,由前面结果也可以看出它们对不同大小的环状糊精都不能水解,另外对不同链长的糊精的作用初速度基本上随链长而增加,由此可以推测红曲霉的葡萄糖淀粉酶作用机制是与文献报道一致的。*Aspergillus*^[12] 和 *Endomycetes*^[13] 的葡萄糖淀粉酶水解多糖是从分子

的非还原性末端开始,逐个切下葡萄糖,按多链机制作用。

表 3 酶对不同底物反应初速度*的比较

底物 \ 酶类	原酶液	E_3	E_4	E_{3+4}
麦 芽 糖	66	70	56	59
麦芽三糖	183	179	183	192
可溶性淀粉	222	95	94	100
直链淀粉	63	15	14	16
支链淀粉	246	106	101	109
玉米淀粉	179	44	45	42
马铃薯淀粉	204	52	53	57
糖 原	151	50	43	52
糊 精 I	19	18	18	18
糊 精 II	258	232	234	246
糊 精 III	314	318	304	316
糊 精 IV	314	290	296	300
糊 精 V	362	324	324	326
糊 精 VI	362	355	338	360
糊 精 VII	375	375	375	410

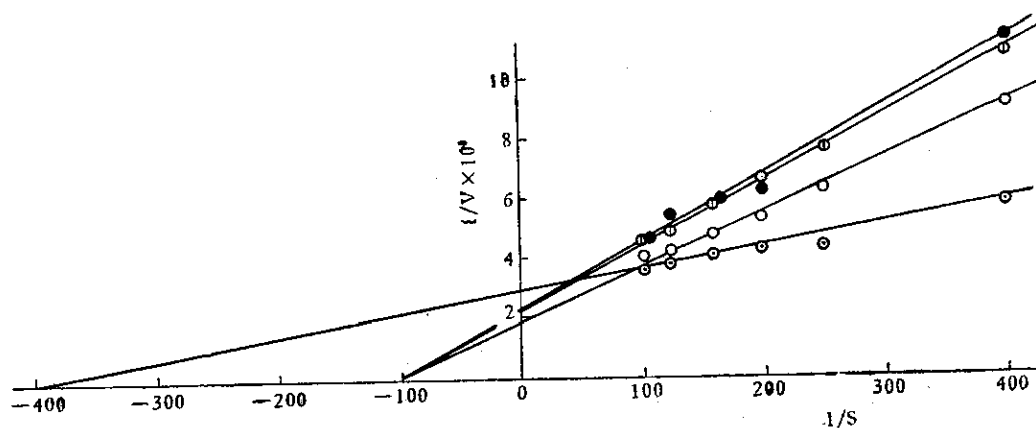
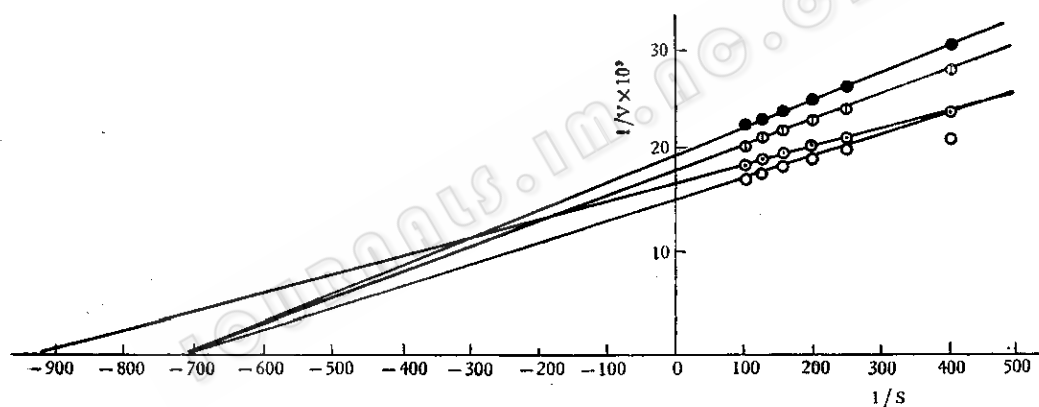
* 反应初速度的单位: 毫克葡萄糖/时/毫克酶蛋白。

3. 米氏常数 K_m 及最大速度 V_{max} 的比较

以可溶性淀粉和麦芽糖为底物,分别配制 0.25%, 0.4%, 0.5%, 0.625%, 0.8%, 1.0% 等 6 种底物浓度,反应液总体积为 10 毫升(内含 1 毫升 0.5M pH4.5 醋酸缓冲液),其中加入酶液 0.2 毫升,50℃ 作用 10 分钟,以葡萄糖氧化酶法测出酶活力,按 Lineweaver-Burk 法作图(图 10, 11)求出米氏常数和最大速度(表 4)。

由表 4 可见, E_3 和 E_4 对可溶性淀粉的米氏常数是相同的,比原酶液大。这个值与高粱红曲霉的两种葡萄糖淀粉酶^[9]相比,显得大些。 E_3 和 E_4 对麦芽糖的 K_m 值也完全相同,而且与高粱红曲霉的两种葡萄糖淀粉酶都很接近^[9]。

根据我们的实验结果,无论是从 K_m 值还是 V_{max} ,从对各种底物的反应初速度

图 10 红曲霉原酶液, E_3 , E_4 , E_{3+4} 作用于可溶性淀粉的 Lineweaver-Burk 图—○—○— 原酶液 —○—○— E_3 —①—①— E_4 —●—●— E_{3+4} 图 11 红曲霉原酶液, E_3 , E_4 , E_{3+4} 作用于麦芽糖的 Lineweaver-Burk 图—○—○— 原酶液 —○—○— E_3 —①—①— E_4 —●—●— E_{3+4} 表 4 红曲霉葡萄糖淀粉酶对麦芽糖和可溶性淀粉的 K_m 值和 V_{max} 值

酶类	底物	麦 芽 糖		可 溶 性 淀 粉	
		K_m (%)	V_{max} (毫克葡萄糖/分/毫克酶蛋白)	K_m (%)	V_{max} (毫克葡萄糖/分/毫克酶蛋白)
	原酶液	1.08×10^{-1}	14.25	2.7×10^{-1}	82.11
	E_3	1.38×10^{-1}	14.31	1.05	116.11
	E_4	1.38×10^{-1}	14.45	1.05	118.36
	E_{3+4}	1.38×10^{-1}	13.99	1.05	124.58

还是从酶解限度来看,红曲霉的 E_3 和 E_4 在反应动力学上十分相似。而高粱红曲霉^[9]产生的两种类型的葡萄糖淀粉酶对多糖的水解限度基本相同,但酶 I 和酶 II 对各种底物亲和力并不相同,它们的水解初速度也不相同。其他霉菌如 *Aspergillus oryzae*^[10] 产生的三种多型性葡萄糖淀粉酶的底物特异性并不相同,其中酶 II, 酶 III 尽管具有相同的分子量和一些理化性质,但它们对淀粉的 K_m 值不同,对淀粉、直链淀粉、支链淀粉、糖原的水解初速度也不相同。另外 Smiley^[11] 等发现黑曲霉的多型性酶在反应动力学上也不相同,特别是对糖原底物的米氏常数不同。这些与我们的红曲霉的 E_3 和 E_4 在反应动力学上如此相似的情况是不同的。

(三) 分解产物的构型

反应液中可溶性淀粉的浓度为 0.5%, 内含 10% pH4.5 0.5M 醋酸缓冲液, 反应温度 30℃, 加入酶量为 40 单位/毫升反应液, 反应不同时间测其旋光度, 等旋光度趋于稳定时, 加入固体无水碳酸钠使反应液 pH 到 10, 立即再测其旋光度。以旋光度读数对时间作图, 结果见图 12。

在图 12 中虚线部分表示加无水碳酸钠后旋光度的变化, 在不加酶的反应液中加相同量的无水碳酸钠后旋光度并不改变。由图 12 可以看出, 在酶的反应液中加碱后旋光度明显增加。文献报道, α -淀粉酶对淀粉的水解产物是 α -型, 而 β -淀粉酶的水解产物是 β -构型, 不管作用刚开始生成的产物是 α 型或是 β 型, 它们在溶液中都会逐渐发生变旋作用, 直至在两种构型之间建立平衡为止。而加碱能促进变旋作用^[7], 因此, 若在 α -产物的反应液中加入碱后则将引起旋光度数值的降低, 若在 β -产物的反应液中加入碱, 则将引起旋光度数值的增加^[8], 根据加碱后旋光度增加的情

况来看, 红曲霉葡萄糖淀粉酶作用于可溶性淀粉所生成的产物是 β -葡萄糖, 这和高

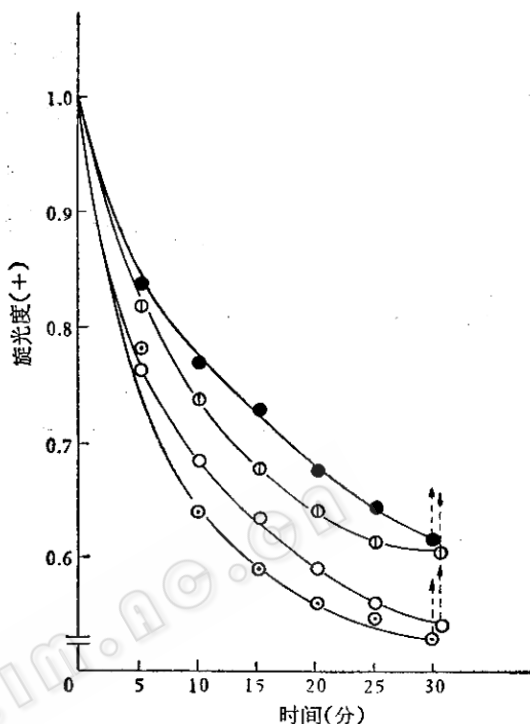


图 12 红曲霉葡萄糖淀粉酶对可溶性淀粉作用的旋光度变化

—○—○— 原酶液 —○—○— E_3
—○—○— E_4 —●—●— E_3+E_4

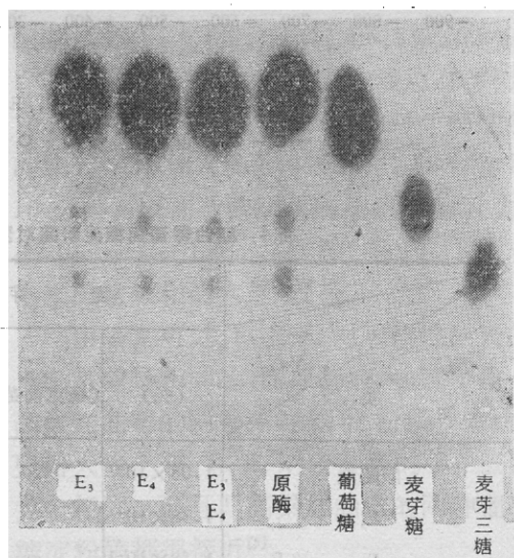


图 13 红曲霉葡萄糖淀粉酶的逆合成作用
底物: 40% 葡萄糖, 反应时间: 48 小时

梁红曲霉的情况是一致的^[9]。

(四) 逆合成作用

40% 葡萄糖水溶液 3 毫升, 加入 0.5M pH4.5 醋酸缓冲液 0.5 毫升, 分别加入各种酶液各 500 单位, 50℃ 水浴反应 8, 24, 48 小时取样, 沸水浴 10 分钟, 然后进行纸层析, 结果见图 13。

由实验结果得知在酶作用 8 小时后就出现少量二糖、三糖斑点, 24 小时, 48 小时略有增加, 但生成的量很少, 说明 E₃ 和 E₄ 都具有催化葡萄糖合成少量寡糖的能力。Piricularia oryzae 产生的酶也观察到逆合成作用, 生成麦芽糖和异麦芽糖^[15]。

参 考 文 献

- [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—205, 1976。
- [2] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能组: 微生物学报, 17(2):101—107, 1977。
- [3] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能组: 生物化学与生物物理进展, 1976 年第 4 期, 38—39 页。
- [4] Reese, E. T. and M. Mandels,: Methods in Carbohydrate Chemistry, ed by Whistler, R. L., Academic Press, 1963, p. 139.
- [5] 唐国敏: 微生物学通报, 5(4):33—34, 1978 年。
- [6] 张宽厚<细菌生理学>, 人民卫生出版社, 1963 年, 275 页。
- [7] Thoma, J. A. and D. E. Koshland,: J. Biol. Chem., 235: 2511, 1960.
- [8] John, R. and F. Dexter,: Archives of Biochemistry and Biophysics, 104: 338—345, 1964.
- [9] Hiroshi, I. and M. Shigeru,: J. Gen. Appl. Microbiol., 24: 185—192, 1978.
- [10] Miah, M. N. N. and S. Ueda,: Die Stärke, 29: 235—239, 1977.
- [11] Smiley, D. E. et al.: Archives of Biochemistry and Biophysics, 144: 694, 1971.
- [12] Pazur, J. H. et al.: J. Biological Chemistry, 234: 1966, 1959.
- [13] Yukihiro, H. and T. Itsuo,: Agr. Biol. Chem., 26: 316—322, 1962.
- [14] Lineback, D. R. et al.: Archives of Biochemistry and Biophysics, 134: 539, 1969.
- [15] Yuhki, A. et al.: Die Stärke, 29: 265—272, 1977.
- [16] Pazur, J. H. and K. Kleppe,: J. Biol. Chem., 237: 1002, 1962.
- [17] Watanabe, K. and T. Fukimbara,: J. Ferment. Technol., 44: 25, 1966.
- [18] Watanabe, K. and T. Fukimbara, J. Ferment. Technol., 44: 646, 1966.

SUBSTRATE SPECIFICITY OF GLUCOAMYLASE FROM *MONASCUS* SP.

Wang Yang-sheng Sun Jin-wu Zhang Shu-zheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Substrate specificity of the two forms of glucoamylase E_3 and E_4 was examined and compared with the crude enzyme and an unpurified sample of E_{3+4} with the following results:

1. Degree of Hydrolysis

The crude enzyme hydrolyzed soluble starch, amylose, amylopectin, glycogen, corn starch, potato starch, maltose, and maltotriose to 100%, and partially hydrolyzed pullulan (35.8%), panose (27.3%), iso-maltose (9.6%), dextran (5%) and gentiobiose (1.7%). The pure enzymes E_3 and E_4 hydrolyzed only glycogen, maltose and maltotriose to 100%. The degree of Hydrolysis of other substrates were somewhat lowered, which suggests the presence of other enzymes capable of hydrolyzing α -(1-6) glucosidic linkages in the crude enzyme. There was no apparent difference between E_3 and E_4 and E_{3+4} . None of the four preparations can attack cyclo-dextrins (α , β , γ), cellobiose, gen-

tiobiose and trehalose.

2. Initial Rate of Reaction

The initial rates of hydrolysis of maltose, maltotriose, amylopectin and soluble starch were much higher than that of amylose, which is consistent with its linear structure and deficient in nonreducing ends. The initial rates of hydrolysis of oligo-dextrins were increased with the increase of chain length of the dextrins.

Isomaltose was hydrolyzed at an initial rate 100 times slower than maltose. No difference was exists between E_3 and E_4 .

3. K_m and V_{max} values

The K_m values of E_3 and E_4 for maltose ($1.38 \times 10^{-1}\%$) and soluble starch (1.05%) were similar and the V_{max} values also similar.

Both E_3 and E_4 hydrolyzed starch to β -glucose. In concentrated glucose solution, reversible synthesis of oligosaccharide was observed.