

# 产气气杆菌茁霉多糖酶的研究

## I. 酶的提纯和性质

戈苏国 杨寿钧 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

产气气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) 10016 的茁霉多糖酶 (pullulanase E. C. 3. 2. 1. 41) 用 Sephadex G100 凝胶过滤、聚丙烯酰胺垂直板型凝胶电泳进行纯化, 得到了聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的纯酶。纯酶作用的最适温度为 50℃, 最适 pH 为 5.3—5.8, 耐热性较差, 50℃ 4 小时后仅存活力 10%。纯酶在 pH4.3—8.6 稳定。酶作用于糯米淀粉的米氏常数  $K_m$  为  $2.0 \times 10^{-4}$  克/毫升。用聚丙烯酰胺薄层凝胶等电聚焦测定酶的等电点 pI 为 3.8, 用 SDS 凝胶电泳测定酶的分子量为 51,000—52,000; 此酶是一种糖蛋白; 含糖总量为 6.5—7.0%; 纯酶能专一性的水解茁霉多糖、糯米淀粉, 也能分解糊精, 而不作用于糖原、纤维二糖以及环状糊精。

产气气杆菌茁霉多糖酶 (pullulanase E. C. 3. 2. 1. 41) 与植物、酵母和其它微生物来源的异淀粉酶 (isoamylase E. C. 3. 2. 1. 9) 一样, 能专一性的水解支链淀粉分支点的  $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷键, 当它与其它的淀粉酶联合作用时, 能促进淀粉的分解。但是, 它又不同于其它的异淀粉酶, 它不作用于糖原, 而能专一性的水解茁霉多糖为麦芽三糖。Bender<sup>[1]</sup> 等人首先从产气气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) 中分离得到此酶, 随后报道了酶的提纯、性质和结晶<sup>[2-4]</sup>。

江西食品发酵所, 1975 年从土壤中分离到一株产异淀粉酶高活力菌株产气气杆菌 10016, 并对产酶条件及酶的一般性质作了报道<sup>[5]</sup>。我们对该酶作了进一步提纯。通过底物专一性的实验, 该酶不作用于糖原, 而能水解茁霉多糖为麦芽三糖, 因此认为取名茁霉多糖酶更为恰当。本文主要报道酶的提纯及纯酶的物理化学性质。

## 材料和方法

(一) 粗酶制剂: 粗酶制剂是江西食品发酵

所提供, 生产菌种为产气气杆菌 10016, 酶活力为 43,000 单位/克。

(二) 主要化学试剂及仪器: Sephadex G100 为 pharmacia 产品; 茁霉多糖 (pullulan),  $\alpha$ -、 $\beta$ -、及  $\gamma$ -环状糊精均为日本林原公司产品, 其余化学试剂均为分析纯或化学纯。

紫外分光光度计为 Unicam SP 700 C 型, 72 型光电分光光度计为上海分析仪器厂产品, pH5-2 型 pH 计为上海第二分析仪器厂产品, 流动紫外光吸收计 Uvicord II 为 LKB 厂产品。

## (三) 酶活力测定方法

1. 碘色增加法: 参考 Kobayashi 的方法<sup>[6]</sup>, 反应体系为 1% 糯米淀粉 2.5 毫升, 0.1M 的醋酸缓冲液 (pH5.8) 0.5 毫升, 在 50℃ 水浴中预热 5 分钟, 然后加入 0.5 毫升酶液, 立即记录时间, 继续反应 1 小时。取出 2 毫升反应液加到 25 毫升 0.01N 硫酸中终止反应, 再加入 2 毫升 0.01N 碘-碘化钾溶液, 用蒸馏水稀释到 50 毫升, 室温放置 15 分钟, 在 620 毫微米波长, 1 厘米光径测定吸光度 (用蒸馏水做空白对照)。吸光度

本文于 1980 年 3 月 15 日收到。

江西食品发酵所提供菌种、粗酶制剂和糯米淀粉; 茁霉多糖和环状糊精为日本林原公司社长林原健先生赠给, 特此一并致谢。

每增加 0.01 为一个酶活力单位。

2. 3,5-二硝基水杨酸法<sup>[7]</sup>: 反应体系同上。在 50℃ 反应 1 小时后, 在沸水浴中煮沸 10 分钟终止反应。取 1 毫升反应液与 3 毫升 3,5-二硝基水杨酸试剂混合, 在沸水浴中煮沸 15 分钟, 冷至室温, 用蒸馏水稀释到 25 毫升, 在 550 毫微米, 1 厘米光径测定吸光度(用蒸馏水做空白对照)。

(四) 一般分析法: 蛋白质测定用 Lowry<sup>[8]</sup>法; 等电点测定用 Vesterberg 的聚丙烯酰胺薄层凝胶等电聚焦法<sup>[9]</sup>; 分子量用 SDS 凝胶电泳测定, 按 Weber 系统<sup>[10]</sup>进行; Disc 电泳按 Davis 方法<sup>[11]</sup>进行, 凝胶浓度为 7%, 用考马斯亮蓝 R250 染色。

### 结果和讨论

#### (一) 酶的提纯

1. 提取: 2 克粗酶粉加到 20 毫升蒸馏水中, 在 30℃ 的水浴中保温半小时, 不时加以搅拌, 用滤纸过滤, 除去残渣。滤液对蒸馏水透析 20 小时, 即为酶的提取液。

2. Sephadex G100 凝胶过滤: 取 7 毫升透析后的酶提取液加到预先用 0.01N

pH7.2 的磷酸缓冲液平衡好的 Sephadex G100 柱子上 (1.2 × 110 厘米), 并用相同的缓冲液洗脱。流出 30 毫升后, 开始用部分收集器收集, 用自动紫外吸收计检测, 每管 5 毫升, 流速为每小时 10 毫升。测定收集液各部分的蛋白浓度及酶活。结果见图 1。合并活力峰部分 (10 管—20 管) 做进一步提纯。

3. 聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳<sup>[12]</sup>进一步提纯: 取 6 毫升上述高活力部分的合并液加到聚丙烯酰胺垂直板凝胶上进行电泳。凝胶浓度为 7%, 电流 40—50 毫安, 使用 pH8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲液, 电泳时间为 1 小时。电泳毕, 分别从凝胶两边切下一条 0.5 厘米宽的胶条, 用 42% 的三氯乙酸配制的考马斯亮蓝 R250 溶液(浓度为 0.1%) 染色 1—2 分钟, 立即用 7% 的醋酸漂洗脱色, 对照显色后的两边胶条, 切下相应的凝胶, 用 5 毫升的蒸馏水在 4℃ 的冰箱中浸泡, 过滤除去凝胶, 浸液用 Disc 电泳鉴定为均一区带 (图 2), 提纯结果见表 1。

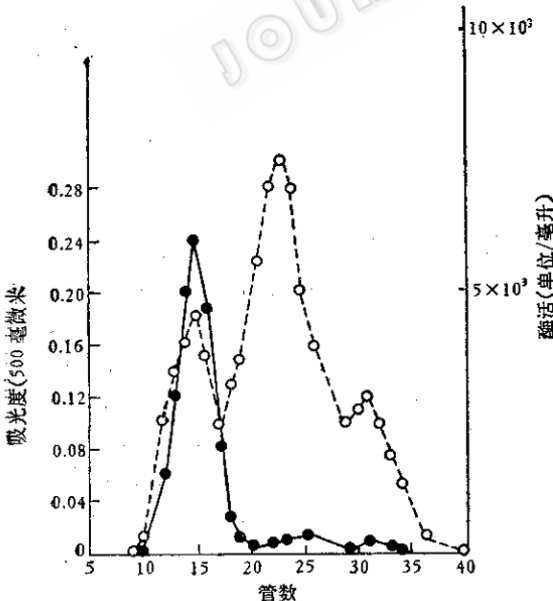


图 1 Sephadex G100 凝胶过滤图  
---○--- 蛋白    —●— 酶活

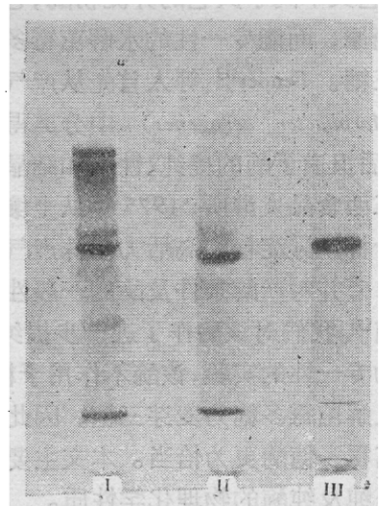


图 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳图  
I: 提取液  
II: Sephadex G100 凝胶过滤后  
III: 聚丙烯酰胺凝胶电泳提纯品。

表 1 茁霉素多糖酶的提纯

提纯步骤	总蛋白 (毫克)	总酶活 (单位)	比活 单位/毫克	回收率(%)	
				蛋白	酶活
提取液	20.6	2445	119	100	100
Sephadex G100 凝胶过滤	3.7	1754	474	18	71
垂直板电泳	2.4	828	345	12	34

## (二) 酶的性质

1. 酶作用的最适温度: 2.5 毫升的 1% 的糯米淀粉和 0.1M pH5.8 的醋酸缓冲液 0.5 毫升混合, 在不同温度下预先保温 2 分钟, 然后加入 0.5 毫升纯酶液, 在不同温度下继续反应 1 小时, 用碘色增加法测定酶活力。结果见图 3。酶作用的最适温度为 50℃。

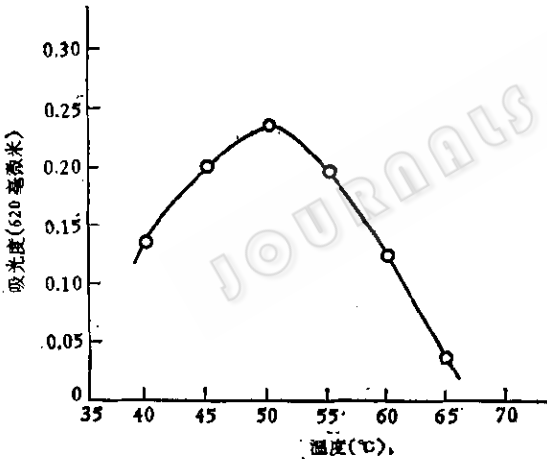


图 3 酶活力与温度的关系

2. 酶作用的最适 pH: 0.5 毫升纯酶液和 0.5 毫升 0.1M 的不同 pH 值的缓冲液, 在 50℃ 的水浴中预先保温 2 分钟, 加入 2.5 毫升 1% 的糯米淀粉溶液, 在 50℃ 的水浴中反应 1 小时测定酶活力, 结果见图 4, 酶作用的最适 pH 为 5.3—5.8。(pH 3.5—7.5 的缓冲液用磷酸-柠檬酸缓冲液, pH9.2—10 用碳酸缓冲液。不同 pH 值的缓冲液都经过 pH 计校正)

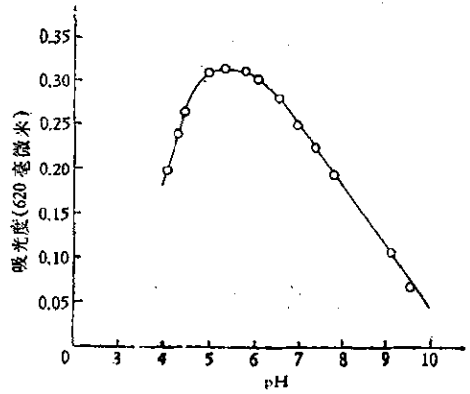


图 4 酶活力与 pH 的关系

3. 酶的热稳定性: 将酶液和 0.1M pH5.8 的醋酸缓冲液混合, 分别在不同温度下保温, 间隔一定时间取样, 测定酶活力, 结果见图 5。在不同温度下连续保温 4 小时后, 30℃ 的剩余活力为 87%, 40℃ 保留 67%, 50℃ 仅存 10% 的活力。此酶的热稳定性较差。

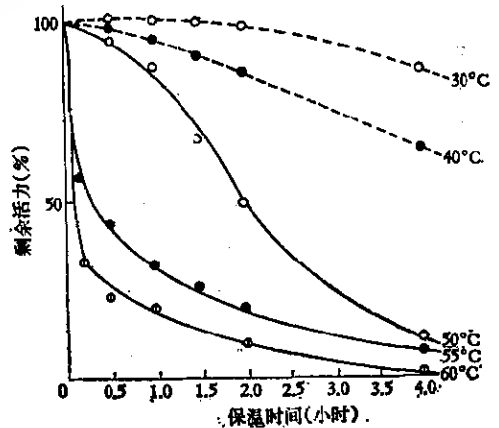


图 5 酶的热稳定性

4. pH 稳定性: 酶液和不同 pH 值的缓冲液在 40℃ 保温 1 小时后, 立即冷却, 用 0.2M 的 pH5.8 的醋酸缓冲液调回 pH, 测定酶活力。结果见图 6, pH 值小于 4 和大于 8.6 活力显著下降。

5. 酶作用于糯米淀粉的米氏常数: 以糯米淀粉为底物, 使反应液中淀粉的最终

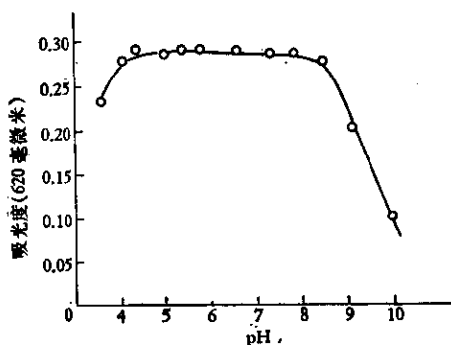


图6 酶的pH稳定性

浓度分别为 0.125, 0.25, 0.4, 0.5, 0.75 及 1%、用碘色增加法测定酶活力。以 1 小时内每毫升中的活力数代表酶反应速度(V), 按 Lineweaver-Burk 法作图(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  $2.0 \times 10^{-2}$  克/毫升。

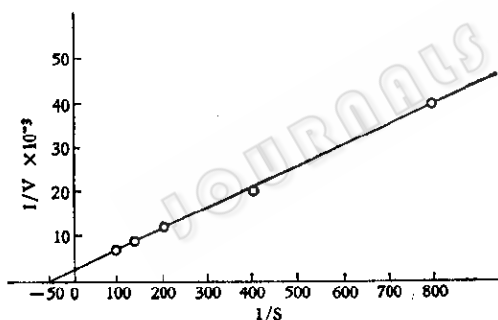
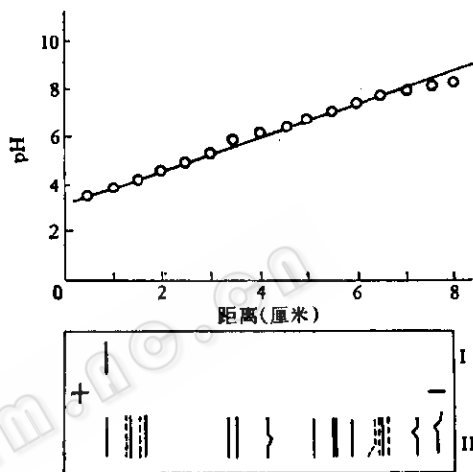


图7 底物浓度与反应速度的关系

6. 等电点的测定: 用 Vesterberg 的聚丙烯酰胺薄层凝胶等电聚焦测定。凝胶浓度 5%, 内含 2% 的载体两性电解质 "Ampholine" pH3—10 (瑞典 LKB 厂产品)。凝胶薄层大小为  $65 \times 105 \times 2$  毫米, 电泳在  $4^\circ\text{C}$  进行。200 伏电压进行 20 分钟, 500 伏电压 1.5 小时, 1000 伏 20 分钟。电泳毕, 在凝胶边上截取一条 1 厘米宽的胶, 按每 0.5 厘米的距离截成小段, 用 3 毫升除去  $\text{CO}_2$  的蒸馏水浸泡 4 小时, 测定浸泡液的 pH 值。以 pH 对距离作图(图 8)。电泳后

的凝胶板用 10% 的三氯乙酸固定并漂洗除去载体两性电解质, 用 0.1% 的考马斯亮蓝 R250 染色, 用醋酸:乙醇:水 (1:3:8 V/V) 溶液脱色。量出酶蛋白的区带位置, 从 pH-距离曲线上查得纯酶的等电点  $\text{pI}$  为 3.8。

图8 聚丙烯酰胺薄层凝胶等电点聚焦电泳图  
I 纯酶 II 粗酶提取液

7. 分子量的测定: 用 Weber<sup>[11]</sup> 等人的 SDS 凝胶电泳测定。大约 0.1 毫克纯酶冻干粉溶在 0.01M pH7.0 的磷酸缓冲液中 (内含 1% 的 SDS 和 1% 的巯基乙醇), 在  $37^\circ\text{C}$  的水浴中保温 2 小时, 使用的凝胶浓度为 10%, 标准蛋白质为牛血清清蛋白 (68,000), 过氧化氢酶 (60,000), 卵清蛋白

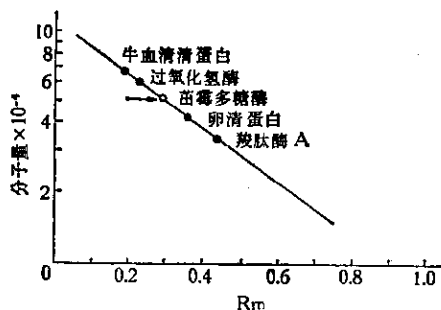


图9 蛋白质的迁移率与分子量的关系

(43,000), 羧肽酶 A(34,000)。结果见图 9。根据苗霉多糖酶的迁移率(Rm)从图中查得分子量为 51,000—52,000。

8. 总糖量的测定: 将 0.2—0.5 毫克的纯酶冻干粉溶解到 1 毫升水中, 加入预先配好的 8.5 毫升的地衣酚(orcinol)-硫酸试剂<sup>[13]</sup>, 在 80°C 水浴中加热反应 1 小时, 立即冷却到室温, 在 505 毫微米波长测定吸光度(用甘露糖做标准曲线)。从标准曲线上计算出此酶含糖总量为 6.5—7.0%。

9. 底物特异性: 分别配制各种底物溶液, 使其浓度均为 1%, 按前面的反应系统进行反应, 分别用碘色增加法和 3,5-二硝基水杨酸比色法测定酶活力。结果见表 2。苗霉多糖酶作用于糯米淀粉、苗霉多糖, 也能分解糊精, 而不能水解糖原、右旋糖酐(分子量 20,000 左右)、纤维二糖以及环状

糊精。这是由于苗霉多糖酶对底物特异性的要求所决定的。也就是说, 受到切开的  $\alpha$ -1,6-键的两头, 至少应含有两个以上的  $\alpha$ -1,4-葡萄糖单位。产气气杆菌苗霉多糖酶的最小底物是 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -麦芽糖基麦芽糖。因此, 它不能水解只用  $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷键连结起来的右旋糖酐。苗霉多糖酶也不能水解天然糖原, 这可能是由于糖原的分支结构比支链淀粉紧密, 使其难于达到分支的作用点之故。

### 参 考 文 献

- [1] Bender, H. and K. Wallenfels: *Biochem. Z.*, **334**: 79, 1961.
- [2] Wallenfels, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **22**: 254, 1966.
- [3] Ueda, S. and R. Ohba: *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 2381, 1972.
- [4] Ohba, R. and S. Ueda: *Agr. Biol. Chem.*, **37**: 2821, 1973.
- [5] 江西食品发酵所: *微生物学报*, **16**(4):282, 1976.
- [6] Kobayashi, T.: *Bull. Agr. Chem. Soc., Japan.*, **19**: 163, 1955.
- [7] Reese, E. T. and M. Mandels: *Methods in carbohydrate chemistry* ed by Whistler, R. L., Academic press, 1963, p. 139.
- [8] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- [9] Vesterberg, O.: *Biochim. Biophys. Acta*, **257**: 11, 1972.
- [10] Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406, 1969.
- [11] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404, 1964.
- [12] 中国科学院微生物研究所结构与功能组: *生物化学与生物物理进展*, 1976年, 第4期, 第36页。
- [13] Francois, C. et al.: *Biochem. J.*, **89**: 335, 1962.

表 2 酶对不同底物的作用

吸光度 底物	方法	
	碘色增加法 (620 毫微米)	3,5-二硝基 水杨酸法 (550 毫微米)
糯米淀粉	0.350	0.310
苗霉多糖	0.007	1.5
糊 精	0.152	0.267
糖 原	0	0
右旋糖酐	0.010	0.037
纤维二糖	0.010	0
$\alpha$ -环状糊精	0.007	0
$\beta$ -环状糊精	0.007	0.010
$\gamma$ -环状糊精	0.010	0.005

# STUDIES ON PULLULANASE FROM *AEROBACTER AEROGENES* I. PURIFICATION AND SOME PROPERTIES

Ge Su-guo Yang Shou-Jun Zhang Shu-zheng

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

The pullulanase (E. C. 3. 2. 1. 41) of *A. aerogenes* was purified by gel filtration on Sephadex G-100 column and preparative polyacrylamide slab gel electrophoresis. The purified enzyme showed a single band on Disc electrophoresis. The temperature optimum for enzyme activity was 50°C and the pH optimum was 5.3—5.8. The thermostability seemed low, as only 10% of the original enzyme activity was remained after incubation at 50°C for 4 hours. It was stable in the pH range

4.3—8.5. The Michaelis constant ( $K_m$ ) for glutinous rice starch was  $2.0 \times 10^{-3}$  g/ml. The isoelectric point is 3.8 as determined by isoelectric focusing on polyacrylamide gel. Its Molecular weight is 51000—52000 as estimated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. It acts on glutinous rice starch, pullulan and dextrin, but not on glycogen, dextran, cellobiose and cyclodextrins. This enzyme is a glycoprotein, containing 6.5—7.0% total sugar as mannose.