

产气气杆菌茁霉多糖酶的研究

II. 化学试剂对酶活力的影响

杨寿钧 戈苏国 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

研究了某些化学试剂对产气气杆菌 *Aerobacter aerogenes* 的茁霉多糖酶 (Pullulanase EC 3.2.1.41) 活力的影响。Hg²⁺, Cu²⁺, Al³⁺, Fe³⁺ 等金属离子对酶活力有强烈的抑制作用, Ca²⁺, Mg²⁺ 有激活作用。1 × 10⁻³ M 的 β-环状糊精完全抑制酶的活力, 是竞争性抑制剂, 其抑制常数 K_i 为 0.55 × 10⁻³ M。8M 尿素, 1.0 M 的盐酸胍, 0.5% 的 SDS 等蛋白质变性剂导致酶活力的完全丧失, 在反应体系中有 5 × 10⁻⁴ M 的 Ca²⁺ 时, 对酶有明显的保护作用。色氨酸残基的专一性修饰剂 N-溴代琥珀酰亚胺 (简称 NBS) 在 1 × 10⁻⁴ M 的浓度下使酶活力完全丧失, 甚至在 1 × 10⁻³ M 的浓度下, 只保留 9% 的活力, 酶液在用 NBS 处理前加入不同浓度的底物, 对活力有明显的保护作用, 表明色氨酸残基对于茁霉多糖酶的活力是十分重要的。

产气气杆菌的茁霉多糖酶能够专一性的水解支链淀粉分支点的 α-1, 6-糖苷键, 但不同于其他的异淀粉酶 (Isoamylase EC 3.2.1.9) 它不作用于糖原, 却能水解茁霉多糖 (Pullulan) 为麦芽三糖。前文^[1]报道了酶的提纯和性质, 本文主要报道某些化学试剂对酶活力的影响。

溶液 0.5 毫升, 0.5 M pH 5.8 醋酸缓冲液 0.1 毫升, 蒸馏水 0.3 毫升, 在 50℃ 水浴中预热 5 分钟, 然后加入 0.1 毫升酶液, 加入的酶蛋白量一般控制在 10—20 微克, 立即记时, 反应 10 分钟, 在沸水浴中煮沸 10 分钟终止反应, 用 Somogyi-Nelson 法^[2]测定还原糖, 并规定每分钟释放一微克分子还原糖的酶量为一个酶活力单位。

材料和方法

(一) 化学试剂

酶制剂为江西食品发酵工业研究所提供*, 酶活力每克 43,000 单位, 生产菌种为产气气杆菌 *Aerobacter aerogenes* 按前文报道提纯^[1]。茁霉多糖, α-, β-, γ-环状糊精均为日本林原公司产品*, N-溴代琥珀酰亚胺 (简称 NBS) 为北京化工厂产品, WSCCD^[1], NEM, DTNB, NAI 均为 E-Merck 厂产品, PCMB 为 Light 厂产品, 氮二杂菲, SDS 为 Fluka 产品。除 NBS 在使用前用水重结晶两次外, 其余试剂均未做进一步的提纯。

(二) 酶活力测定方法

1. 碘色增加法: 同前报^[1]。
2. 测定还原糖法: 反应体系为 2% 茁霉多糖

结果和讨论

(一) 不同金属离子和金属螯合剂对酶活力的影响

反应体系用测定还原糖法的体系。将酶液、不同金属离子及金属螯合剂溶液 (使

本文于 1979 年 8 月 18 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。

1) 本文引用缩写名称:

WSCCD: Water soluble N-Cyclohexyl-N'-[β-(N-methylmorpholinio)-ethyl]-carbodiimide-p-toluene sulfonate; NEM: N-Ethylmaleimide; DTNB: 2, 2'-Dinitro-5, 5'-dithio-dibenzoic acid; NAI: N-Acetylimidazole; PCMB: p-Chloromercuribenzoic acid; SDS: Sodium dodecyl sulfate.

反应液中金属离子或金属螯合剂的浓度为 $1 \times 10^{-3}M$), 在 $30^{\circ}C$ 放置 30 分钟, 以不加金属离子及金属螯合剂的酶液为对照, 测定剩余活力, 结果列于表 1 中。

表 1 金属离子和金属螯合剂对酶活力的影响

| 金属盐 | 相对活力 (%) | 金属盐 | 相对活力 (%) |
|-------------------|----------|-------------------|----------|
| 对照 | 100 | PbAc ₂ | 31 |
| MgCl ₂ | 104 | FeCl ₃ | 11 |
| CaCl ₂ | 104 | AlCl ₃ | 7 |
| CoCl ₂ | 100 | CuCl ₂ | 5 |
| BaCl ₂ | 98 | HgCl ₂ | 0 |
| NaCl | 92 | EDTA-2Na | 26 |
| CrCl ₃ | 85 | 8-羟基喹啉 | 78 |
| MnCl ₂ | 72 | 氮二杂菲 | 79 |

苗霉多糖酶稍受 Mg^{2+} , Ca^{2+} 激活, 严重地受 Hg^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} 等的抑制; EDTA 和金属螯合剂 8-羟基喹啉, 氮二杂菲等对酶活力有不同程度的抑制。表明苗霉多糖酶的反应需要一定的金属离子。

(二) 不同浓度的 Ca^{2+} 对酶活力的影响

取酶液 0.5 毫升, $0.1M$ pH5.8 的醋酸缓冲液 0.1 毫升, 不同浓度的 $CaCl_2$ 溶液 0.1 毫升, 在 $30^{\circ}C$ 放置 30 分钟, Ca^{2+} 在反应液中的浓度分别为 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , $1 \times 10^{-5}M$ 等, 然后在 $50^{\circ}C$ 的水浴中加入 1% 的糯米淀粉溶液 2.5 毫升, 反应一小时。以不加 Ca^{2+} 的酶液为对照, 用碘色增加法测定酶活力。结果见图 1。

当 Ca^{2+} 浓度小于 $1 \times 10^{-3}M$ 时, 对酶活力有明显的激活作用, Ca^{2+} 的浓度为 $1 \times 10^{-4}M$ 时, 活力提高 22%, 增加 Ca^{2+} 浓度, 活力反而降低。浓度超过 $1 \times 10^{-3}M$ 时, 对酶活力有明显的抑制作用。

(三) 碳水化合物对酶活力的影响

反应体系的其它成份不变, 将酶液和不同碳水化合物溶液 (使反应液中的浓度达到实验要求), 在 $30^{\circ}C$ 放置 30 分钟, 以

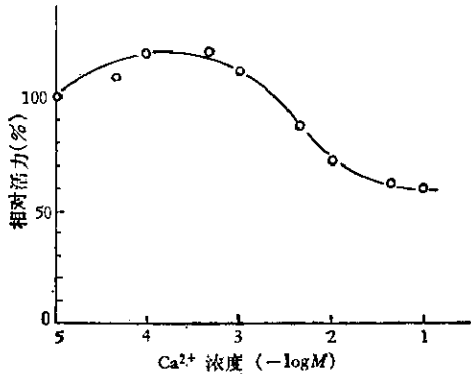


图 1 不同浓度的 Ca^{2+} 对酶活力的影响

不加碳水化合物的酶为对照, 用碘色增加法测定酶活, 结果见表 2。

表 2 碳水化合物对酶活力的影响

| 碳水化合物 | 最终浓度 (M) | 相对活力 (%) |
|--------------------|--------------------|----------|
| 对 照 | — | 100 |
| 葡萄糖酸- δ -内酯 | 1×10^{-3} | 93 |
| 麦芽三糖 | 1×10^{-3} | 88 |
| α -环状糊精 | 1×10^{-3} | 46 |
| β -环状糊精 | 1×10^{-3} | 0 |
| γ -环状糊精 | 1×10^{-3} | 52 |

β -环状糊精在实验条件下完全抑制酶活力, α -及 γ -环状糊精抑制大约 50% 的活力。虽然葡萄糖酸- δ -内酯是葡萄糖苷酶的竞争性抑制剂^[3], 但对苗霉多糖酶没有抑制作用。Kitagawa 等人^[4]曾报道麦芽三糖是假单孢杆菌异淀粉酶 (Pseudomonas Isoamylase EC 3.2.1.9) 的竞争性抑制剂, 在对苗霉多糖酶的实验中, 麦芽三糖浓度为 $1 \times 10^{-3}M$ 时, 剩余活力为 88%; 在同一篇文章中也报道了 β -环状糊精对假单孢杆菌异淀粉酶没有抑制作用。从不同碳水化合物对这两个酶活力影响的差别表明; 两个酶都能水解支链淀粉分支点的 α -1, 6-糖苷键, 但是他们的作用方式显然有所不同。

用两组不同浓度的苗霉多糖溶液 ($S_1 = 0.25\%$, $S_2 = 0.1\%$) 为底物, 在不同

浓度的 β -环状糊精存在下 (抑制剂浓度 $[I] = 0.5 - 2.5 \times 10^{-5} M$) 用测定还原糖的方法测定酶活, 以 10 分钟每毫升酶液中的活力单位代表反应速度 (v), 按 Dixon^[5] 法以 $1/v$ 对 $[I]$ 作图 (图 2)。从图中可以看到, β -环状糊精对产气杆菌苗霉多糖酶是竞争性抑制剂, 其抑制常数 K_i 为 $0.55 \times 10^{-5} M$ 。

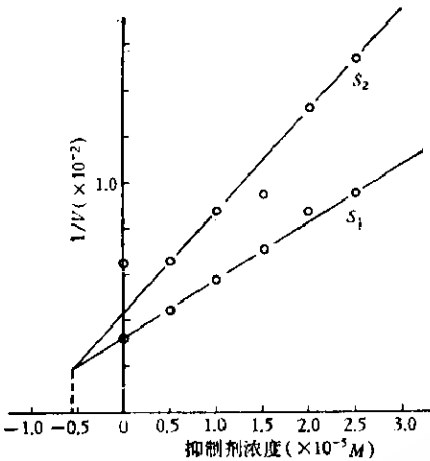


图 2 β -环状糊精的浓度 (I) 与反应速度 (v) 的关系 ($1/v$ 对 I 作图)
底物浓度 $S_1 = 0.25\%$, $S_2 = 0.10\%$

(四) 蛋白质变性剂对酶活力的影响以及 Ca^{2+} 的保护作用

反应体系不变, 酶液用不同浓度的蛋白质变性剂 (用 $0.1 M$ pH 5.8 的醋酸缓冲液配制) 进行处理, 以不加变性剂的酶液活力为 100%, 用碘色增加法测定剩余活力。在测定过程中, 发现盐酸胍对测定活力有影响, 因此用不同浓度的盐酸胍加入沸水浴煮沸 10 分钟后的酶液为空白。结果见图 3—5。

8M 的尿素, 1.0M 的盐酸胍和 0.5% 的 SDS, 使酶活力完全丧失, 对蒸馏水透析除去变性剂后, 活力有不同程度的恢复。反应体系中有 $5 \times 10^{-4} M$ Ca^{2+} 时, 对酶有明显的保护作用。

从三种蛋白质变性剂对活力影响结果

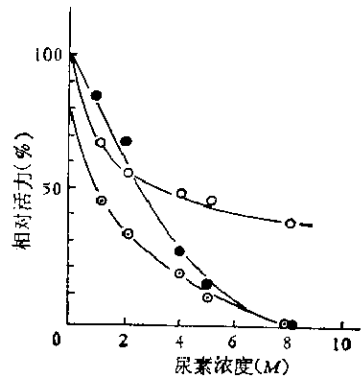


图 3 尿素对酶活力的影响

○—○ 变性剂和酶液在 $30^\circ C$ 保温 1 小时;
○—○ 保温后对蒸馏水透析 40 小时;
●—● 变性剂和酶液在 $5 \times 10^{-4} M$ Ca^{2+} 存在下, $30^\circ C$ 保温 1 小时

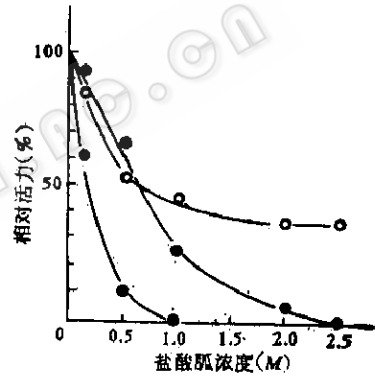


图 4 盐酸胍对酶活力的影响

[图例同图 3]

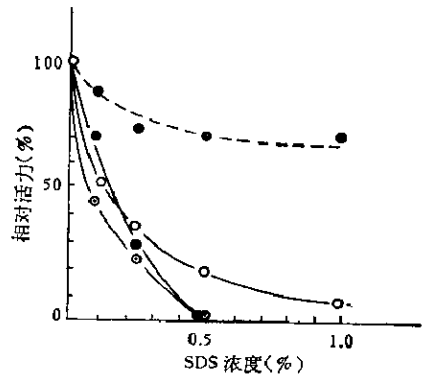


图 5 SDS 对酶活力的影响

●—● 变性剂和酶液在 $30^\circ C$ 放置 1 小时后, 用 Dowex 1 树脂除去 SDS (其余图例同图 3)

可以看出: SDS 的影响最显著, 0.1% 浓度的 SDS 引起 50% 活力丧失, Ca^{2+} 对酶的保

表 3 蛋白质侧链修饰剂对酶活力的影响

| 化 合 物 | 最终浓度 (M) | 相对活力 (%) | 化 合 物 | 最终浓度 (M) | 相对活力 (%) |
|-------|--------------------|-------------|-------|--------------------|-------------|
| 对 照 | | 100 | NAI | 1×10^{-3} | 84 |
| PCMB | 1×10^{-4} | 94 | WSCCD | 1×10^{-3} | 93 |
| 碘 乙 酸 | 1×10^{-3} | 100 | NBS | 1×10^{-3} | 0 |
| NEM | 1×10^{-3} | 98 | NBS | 1×10^{-4} | 0 |
| DTNB | 1×10^{-3} | 65 | NBS | 1×10^{-5} | 9 |

护作用也不明显; 用 Dowex 1 醋酸型树脂处理除去 SDS 后, 活力有明显的恢复。Lenard^[6] 用 Dowex 2 \times 10 树脂从反应体系中可以除去 99% 的 SDS, 蛋白质回收率达 80—95%, 用同样的方法除去影响苗霉多糖酶活力的蛋白质变性剂 SDS 时, 蛋白回收率只有 70%, 酶活力也有较大的损失。

(五) 蛋白质侧链修饰剂对酶活力的影响

反应体系与测定还原糖法相同。酶液和不同的蛋白质侧链修饰剂 (使试剂在反应液中的浓度达到实验要求浓度), 在 30℃ 保温放置 30 分钟, 以不加修饰剂的酶液为对照, 测定剩余活力, 结果列于表 3。

典型的巯基试剂 DTNB, 碘乙酸, PCMB, NEM 等对酶活力有不同程度的弱抑制作用。虽然巯基对于高峰淀粉酶 A^[7], β -葡萄糖苷酶^[8] 和 β -淀粉酶^[9] 等的活性是十分重要的, 但对于苗霉多糖酶的活性看来并不是必需的。

酪氨酸残基修饰剂 NAI、羧基修饰剂 WSCCD 在我们的实验条件下不影响酶活力。色氨酸残基修饰剂 NBS 在 $1 \times 10^{-4}M$ 的浓度下, 引起酶的活力全部丧失, 当浓度为 $1 \times 10^{-5}M$ 时, 也只有 9% 的剩余活力, 表明色氨酸残基对于苗霉多糖酶的活力是十分必需的。

(六) 底物保护作用

为了确定色氨酸残基是否与酶的活性部位有关, 我们进行了底物的保护试验; 酶

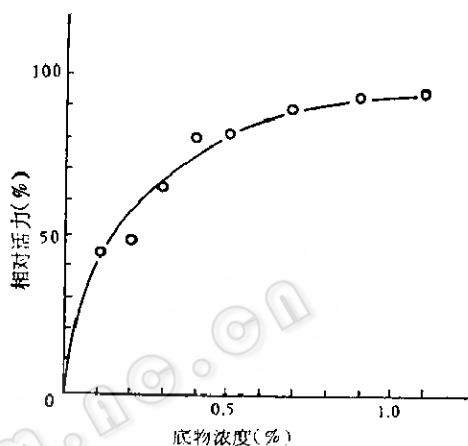


图 6 不同浓度的底物对酶活力的保护作用

液在 NBS 处理前三分钟, 加入不同浓度的苗霉多糖溶液, 然后加入 10 微克分子的 NBS, 在 30℃ 放置 30 分钟, 以不加底物和 NBS 的酶液为对照, 用测定还原糖法测定剩余活力, 结果见图 6。底物对酶活力有明显的保护作用, 酶的剩余活力随底物浓度的增加而增加, 当底物浓度为 0.5% 时, 剩余活力为 82%。这些结果表明色氨酸残基位于酶的活性位区, 当酶和底物亲合形成中间复合物后, 阻止了 NBS 对色氨酸的作用, 从而表现出对酶活力的保护作用。Amemura 等人^[10]也曾报道色氨酸残基对于苗霉多糖酶的活性是必需的。

参 考 文 献

- [1] 戈苏国、杨寿钧、张树政: 微生物学报, 20(4): 415—420, 1980 年。
- [2] Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, 153: 375, 1944.
- [3] Marshall, J. J.: *FEBS lett.*, 37: 269, 1973.
- [4] Kitagawa, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 39:

- 989, 1975.
- [5] Dixon, M.: *Biochem. J.*, **55**: 170, 1953.
- [6] Lenard, J.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **45**: 662, 1971.
- [7] Kato, I. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **63**: 479, 1968.
- [8] Duerksen, J. D. and H. Halvorson: *J. Biol. Chem.*, **233**: 1113, 1958.
- [9] Spradlin, J. and J. A. Thoma: *J. Biol. Chem.*, **245**: 117, 1970.
- [10] Amemura, A. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **77**: 575, 1975.

STUDIES ON THE PULLULANASE FROM *AEROBACTER AEROGENES*

II. EFFECT OF SOME CHEMICALS ON THE ACTIVITY OF PULLULANASE

Yang Shoujun Ge Suguo Zhang Shuzheng

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

The effect of some chemicals on the activity of pullulanase was investigated. Metal ions such as Hg^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} clearly inhibited its activity, while Ca^{2+} , Mg^{2+} stimulated. β -Cyclodextrin at a concentration of $1 \times 10^{-3} M$ completely inhibited the activity. It was a competitive inhibitor with an inhibition constant (Ki) of $0.55 \times 10^{-5} M$. Denaturants such as 8 M urea, 1 M guanidine hydrochloride and 0.5 % SDS led to complete loss of activity. When the reaction mixture contains $5 \times 10^{-4} M$ of Ca^{2+} the enzyme was

protected from denaturation. N-Bromosuccinimide, which was known to be a specific modification reagent of tryptophan residues, exhibited a strong inhibitory effect, even at a concentration of $1 \times 10^{-5} M$ while only 9% of the enzyme activity remained. The enzyme activity was clearly protected by addition of substrate of different concentrations before NBS treatment, which suggested that tryptophan residue is important for the activity of pullulanase.