

红曲霉葡萄糖淀粉酶的紫外差光谱的研究

严自正* 郭尧君** 房月华** 张树政*

红曲霉葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3) 在凝胶电泳上呈现 3—5 个极为接近均具有酶活性的区带,测定了其中主要的两个分子型 E₃ 和 E₄ 的紫外吸收特性,它们在水, pH5.0 醋酸缓冲液, pH7.0 柠檬酸缓冲液中吸收光谱十分接近,吸收峰均在 280nm。E₃ 在水溶液中 280nm 时 $\epsilon = 11.3 \times 10^4$, $A_{280}^{1\%} = 20.4$, E₄ 在水溶液中 280nm 时 $\epsilon = 11.0 \times 10^4$, $A_{280}^{1\%} = 20.0$, E₃ 和 E₄ 在 0.1N NaOH 中吸收均增强且峰位红移,在 0.1N HCl 中吸收峰略为蓝移。

测定了 E₃ 和 E₄ 在 pH 3.1 和 pH 3.6 时的温度差光谱,在 pH 3.1 E₃ 和 E₄ ΔA 变化极小,在 pH 3.6, E₃ 比 E₄ ΔA 变化大,但转变温度 E₃ 和 E₄ 都在 56℃ 左右。E₃ 和 E₄ 酪氨酸光谱滴定行为极为接近,其 pK 值在 11.5 左右。

测定了 E₃ pH 差光谱和变性差光谱,以 pH 2.66 为参比溶液,在 pH 3.55、4.65、7.14 及 7.84 可以见到酪氨酸和色氨酸的差吸收峰。8M 尿素和 6M 盐酸胍均能使 E₃ 出现酪氨酸和色氨酸的负的差吸收峰。

早在 1956 年 Laskowski 等^[1]对胰岛素进行了 pH 差光谱研究,以后由 Herskovits^[2]、Fisher^[3]、Bello^[4,5] 等逐步完善了各种差光谱的技术,使紫外差光谱成为测定溶液构象的常用手段之一。关于淀粉酶类的紫外吸收特性的研究已有不少报道^[6-9]。关于葡萄糖淀粉酶,Ohnishi 等^[10,11]利用差光谱技术研究酶与底物相互关系及酶与侧链修饰剂 NBS 的关系。Ohga^[12]、Tsuboi^[13]、Hattori^[14]、Fukui^[15] 等报道了不同菌产生的葡萄糖淀粉酶在中性溶剂和碱性溶剂中的吸收光谱。

红曲霉产生的葡萄糖淀粉酶具有多分子型,在凝胶电泳上呈现 3—5 个极为接近的具有酶活性的区带,其中主要的两个分子型 E₃ 和 E₄ 已经纯化。曾用紫外吸收方法测定了色氨酸组成^[16,17],并测定了 E₄ 在水溶液中的紫外吸收光谱^[18],在本文我们用差光谱技术,对红曲霉葡萄糖淀粉酶在

各种溶剂中的吸收光谱、克分子吸光系数、温度差曲线、pH 及变性差光谱、酪氨酸光谱滴定等,进行了较为详细的研究。

材 料 和 方 法

(一) 材料: 酶制剂为无锡酶制剂厂生产的红曲霉糖化酶,酶活力每克 20,000 单位。生产菌为红曲霉 (*Monascus* sp), 菌号 AS3.3491,按已报道方法^{***[19]}制备得到硫酸铵沉淀样品;经 DEAE-纤维素柱层析未提纯的样品(含有 E₃ 和 E₄, 简称柱层析粗);经 DEAE-纤维素柱层析提纯在凝胶电泳上呈均一的 E₃ 和 E₄。四种样品是对蒸馏水透析并冷冻干燥的制品。

缓冲液除 pH 5.0 系用醋酸-醋酸钠缓冲液外,其他 pH 均用柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液,最终浓度均为 0.1M。

本文于 1980 年 5 月 15 日收到。

* 微生物研究所, ** 生物物理研究所。

*** 严自正等: 中国微生物学会 1979 年学术年会论文摘要汇编 p27, 1979 年。

(二) 仪器: 除温度差光谱用岛津(Shimazu) QR-50 分光光度计外,其余光谱均用日立(Hitachi) 双光束自记 340 紫外-可见-近红外分光光度计扫描。狭缝谱带宽度 1.5mm,吸收池光径 10mm。测定 pH 用 pH5-2 型(上海分析仪器厂)及酸度计 25 型(上海甘泉五金厂)。

(三) 测定方法 1. 吸收光谱: 将欲测样品先用蒸馏水配成母液,然后用缓冲液或酸碱稀释,测定吸收光谱。

2. 温度差光谱: 样品用 pH 3.6 及 3.1 缓冲液配制成一定浓度溶液。预先测定室温时 282 nm 处的吸光度,作为参比,然后逐步加热,40℃以前;每升高 3℃ 测定一次,40℃以后,每隔 2℃ 测定一次。为了避免由于混浊引起散射所造成的误差,我们同时测定了不同温度时样品在 340nm 的吸光度作为背景扣除,因 QR-50 系单光束分光光度计,所以 $\Delta A_{282nm} = (A_{282nm}^{40^\circ C} - A_{340nm}^{40^\circ C}) - (A_{282nm}^{室温} - A_{340nm}^{室温})$, 加热结束,测定样品 pH。

3. pH 差光谱: 样品用不同 pH 缓冲液配成酶浓度相同但 pH 不同的溶液。以 pH 2.66 的酶液作参比。测定结束,实测其 pH。

4. 变性差光谱: 样品、尿素及盐酸胍均用 pH 7 左右缓冲液配成母液,然后按 Herskovits^[2] 所述的双池方法进行。

5. pH 滴定: 样品用 pH 7 左右缓冲液配制,然后各加 3ml 于样品池及参考池,在样品池逐滴加入以 μ l 计的不同浓度的 NaOH 液,参考池加入相同量的蒸馏水,扫描光谱,然后用 25 型酸度计 321 型锂电极测 pH。

加,其他三种样品吸收光谱及在 280nm 处吸光度十分相近,见图 1。这种类型的吸收光谱和报道过的不同菌的葡萄糖淀粉酶^[12-14]、软化芽孢杆菌 (*Bacillus macerans*) 的淀粉酶^[8]、细菌 α -淀粉酶^[9]和大麦中 β -淀粉酶^[7] 吸收光谱十分相近,在有些图谱中没有出现明显的肩,这可能是我们所用仪器与前人不同所造成的。

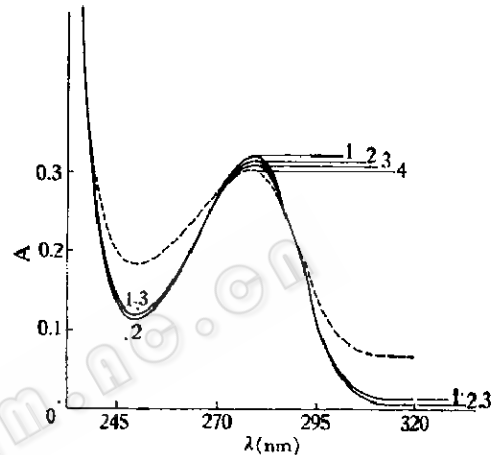


图 1 不同纯度葡萄糖淀粉酶在 pH5.0 醋酸缓冲液中的紫外吸收光谱

样品浓度 0.18mg/ml, 1: E₃, 2: 柱层析未提纯样品, 3: E₄, 4: 硫酸铵沉淀样品

Fig. 1 The UV spectra of glucoamylase samples in acetate buffer of pH5.0.

Enzyme: 0.18 mg/ml, 1: E₃, 2: unfractionated sample after DEAE-cellulose column chromatography, 3: E₄, 4: sample after ammonium sulfate precipitation

结果与讨论

(一) 吸收光谱: 经观察硫酸铵沉淀粗品、柱层析未提纯样品、E₃ 和 E₄ 在水溶液中、pH5.0 醋酸-醋酸钠缓冲液及 pH 7.0 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液中吸收光谱均不随时间而变化,结果四种样品在三种溶剂中吸收峰是一致的,最高在 280nm,最低在 250nm,在 290nm 处有一明显的肩。但硫酸铵沉淀粗品由于溶解不好使散射明显增

(二) 克分子吸光系数和 A_{1cm}^{1%}: 称取不同量样品溶于 3ml 溶剂中在 280 nm 测吸光度,结果样品浓度与吸光度呈直线关系。数据是用不同仪器,不同批数样品的测定数据的平均值,结果见表 1,不论克分子吸光系数或 A_{1cm}^{1%}, E₃ 和 E₄ 均较接近。曾报道米曲霉葡萄糖淀粉酶 A_{1cm}^{1%} = 14.98^[12], 内孢霉葡萄糖淀粉酶在 pH7 缓冲液中 A_{1cm}^{1%} = 13.2, 枯草杆菌 α -淀粉酶 A_{1cm}^{1%} = 19.8^[6], 大麦的 β -淀粉酶在 pH7 缓

表 1 葡萄糖淀粉酶 E₃ 和 E₄ 克分子吸光系数 (ε) 和 A_{1cm}^{1%}

Table 1 The molar absorptivity and A_{1cm}^{1%} of glucoamylase E₃ and E₄

样品 Sample	λ (nm)	ε (× 10 ⁴)	A _{1cm} ^{1%}	溶 剂 Solvent
E ₃	280	11.3	20.4	蒸馏水 Distilled water
		11.0	20.0	pH7.0 柠檬酸缓冲液 pH7.0 citrate buffer
		11.2	20.3	pH5.0 醋酸缓冲液 pH5.0 acetate buffer
E ₄	280	11.0	20.0	蒸馏水 Distilled water
		10.9	19.7	pH7.0 柠檬酸缓冲液 pH7.0 citrate buffer
		10.9	19.7	pH5.0 醋酸缓冲液 pH5.0 acetate buffer

* 分子量 55000, 样品含水份 10%, 灰份 3%。
 MW 55000, water content of sample 10%, ash 3%.

冲液中 A_{1cm}^{1%} = 15^[7]。

(三) 在酸碱中光谱: E₃ 和 E₄ 在 0.1N NaOH 中紫外吸收带明显红移, 高峰由中性溶液的 280nm 移至 288.5—289nm, 并出现两个峰, 吸光度明显增加。测定了样品在

pH 13 时酪氨酸全部解离后的光谱, 结果与在 0.1N NaOH 中一致。在 0.1N HCl 中吸收带略有蓝移, 高峰由 280nm 移至 277.5nm, 但吸光度基本不变, 见图 2。Yutani^[9] 认为在碱性溶剂中出现两个峰并明显红移是由于分子中有较多的酪氨酸和色氨酸残基所致。内孢霉葡萄糖淀粉酶^[15], 软化芽孢杆菌淀粉酶^[6], 细菌 α-淀粉酶^[9], 大麦 β-淀粉酶^[7], 在 0.1N NaOH 中吸收带也有此变化。大麦 β-淀粉酶^[7] 在 0.1N HCl 中吸收带也略蓝移, 这与红曲霉葡萄糖淀粉酶是一致的。看来淀粉酶类在中性碱性及酸性溶剂中吸收带非常相象, 吸光系数相近, 变性差光谱也很类似, 这一点可能是十分有兴趣的, 能否认为大多数淀粉酶类其生色团数量与环境可能会十分相近, 值得进一步比较研究。

(四) 温度差光谱: 由于红曲霉葡萄糖淀粉酶等电点在 pH4 左右^[17], 因此样品在 pH 4 左右加热很快发生混浊, 影响测

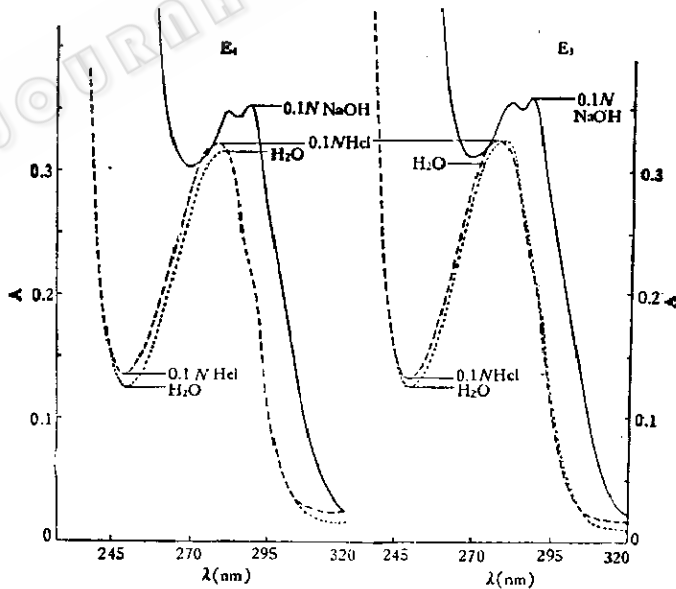


图 2 葡萄糖淀粉酶 E₃ 和 E₄ 在酸碱中的光谱变化 样品浓度: 0.18mg/ml

Fig. 2 The UV spectra of glucoamylase E₃ and E₄ in 0.1 N NaOH and 0.1 N HCl respectively

Enzyme: 0.18 mg/ml

注: 图内 Hcl 应为 HCl

定, 而 pH 高于 5 后, 酶即很快失活^[18], 因此我们采用 pH 3.6 及 pH 3.1 来观察 E_3 和 E_4 的热变性, 以 ΔA_{282} 为纵坐标, ΔA 是当温度改变后吸光度与原来温度吸光度差, 温度为横坐标, 结果见图 3。由图 3 在 pH 3.1, E_3 和 E_4 均为斜率很小的直线, 而在 pH 3.6, E_3 和 E_4 均为一曲线, E_3 的转变温度在 56°C, E_4 在 56.5°C。这表明, 在 pH 3.1 时, 由 30°—70°C 基本没有见到 E_3 和 E_4 构象变化, 这可能在 pH 3.1 时, 构象已发生了变化。在 pH 3.6 时, 当温度升高后, E_3 、 E_4 构象发生了明显变化, 两者转变温度虽接近, 但 E_3 曲线斜率比 E_4 大得多, 这表明 E_3 构象改变比 E_4 大, 但也可在 pH 3.6 时, E_4 构象已有部分发生了变化, 因而在 pH 3.6 时, 所观察到 E_4 的构象变化比 E_3 小。曾报道^[19] E_4 作用温度最适为 50—55°C, 超过 55°C, 酶活力迅速下降, 这与 E_4 转变温度 56.5°C 是一致的。

(五) pH 差光谱: 以 pH 2.66 溶液为参比, 测定了样品在 pH 3.55、4.65、7.14 及

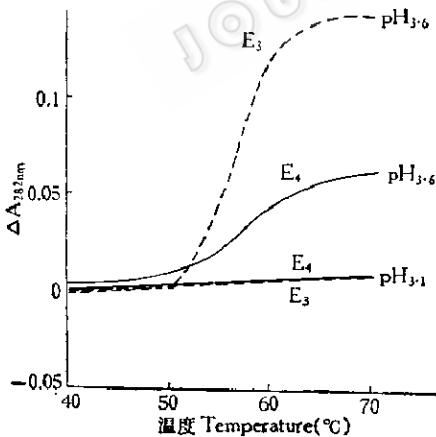


图 3 葡萄糖淀粉酶 E_3 和 E_4 温差曲线
样品浓度: 0.16mg/ml

Fig. 3 The temperature dependence of absorbivity of glucoamylase E_3 and E_4 at 282nm

Enzyme: both E_3 and E_4 0.167mg/ml at pH 3.1; E_3 0.164mg/ml and 0.166mg/ml at pH 3.6; citrate-phosphate buffer

7.84 的差光谱, 试验在室温进行, 结果见图 4。pH 从 2.66 变到 3.55 就能出现差光谱。当 pH 3.55、4.65、7.14 及 7.84, 在 280 及 286.5nm 均出现酪氨酸差峰, 在 280 及 292nm 处出现色氨酸的差峰。由于 pH 3.55 及 4.65 接近于等电点, 使样品溶解度降低而引起了散射的干扰, 因此在 292nm 处色氨酸峰不像在 pH 7.14 及 7.84 时那么明显。在 pH 7.14 出现差光谱与细菌 α -淀粉酶^[9] 在 20% 乙二醇中差光谱十分相近, 该作者根据吸光度增加认为大约 9 个分子色氨酸对 20% 乙二醇是敏感的, 也就是暴露在分子表面的。由于 pH 引起差光谱原因不同于溶剂微扰, 因而对红曲霉葡萄糖淀粉酶构象变化信息尚难推测。

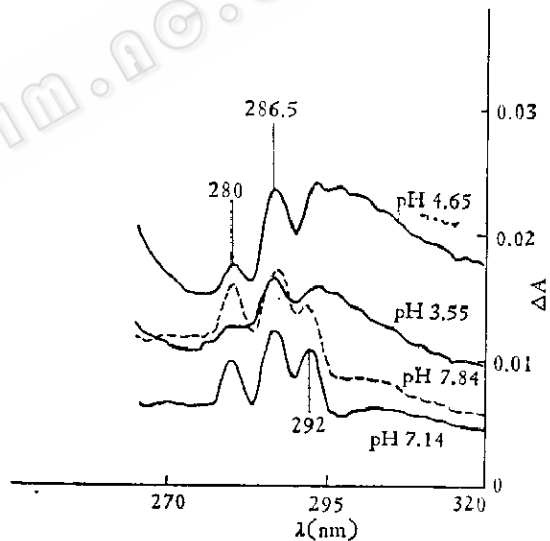


图 4 葡萄糖淀粉酶 E_3 的 pH 差光谱
样品浓度: 0.5 mg/ml

Fig. 4 The difference spectra of glucoamylase E_3 in citrate-phosphate buffer of different pH values

Enzyme: 0.5mg/ml

(六) 变性差光谱: 在 pH 7.0 用 8M 尿素和 6M 盐酸胍使 E_3 变性, 结果两种变性剂均能引起光谱改变, 但是两者是有差异的, 虽然两者均能在 287nm 及 293nm 处给出两个负峰, 但盐酸胍在 280nm 处给出的

肩比尿素明显,表明盐酸胍不仅使色氨酸残基环境发生了变化,并使酪氨酸残基环境也发生变化。很多研究者^[19]认为蛋白质结构在 5—6M 盐酸胍中呈不折叠状态,而 8M 尿素仅能使蛋白质变性,其结构变化尚不清楚。Nishida^[6]报道过枯草杆菌 α -淀粉酶用 3M 尿素加 0.1N HCl 使淀粉酶变性后出现差光谱也是负峰,差峰变化也在 293 和 287nm 左右,而当 3M 尿素加 1/25N 硼酸盐变性时在 280nm 处也能出现肩,这与我们的结果是一致的,Yutani^[9]报道细菌 α -淀粉酶用 8M 尿素加 0.1N HCl 变性出现差光谱也是如此,他认为在 292nm 出现负峰也是由于埋藏在分子内部的色氨酸暴露到分子表面而引起变性蓝移,用他的推论,红曲霉葡萄糖淀粉酶在 8M 尿素溶液中仅仅使隐藏在分子内部的一个色氨酸成为暴露的。由于样品提纯困难,对 E₄ 没有进行 pH 及变性差光谱的测定。

(七) 酪氨酸光谱滴定: 在蛋白质溶液中加入碱后,酪氨酸即会逐渐解离,使光谱发生红移,且吸光度大大增加。以加碱后与不加碱的差值 ΔA_{295} 为纵坐标,样品 pH 为横坐标,作一曲线,曲线的中点即 pK 值^[6],由图 6 得出 E₃ 和 E₄ pK 值约在 11.5 左右,二者滴定行为没有明显差别。游离酪氨酸的 pK 值是 9.7,但一般在蛋白质中酪氨酸均有较高 pK 值^[6],而 E₃ 和 E₄ pK 值竟在 11 以上,这表明 E₃ 和 E₄ 中酪氨酸可能具有氢键或被遮盖,或埋藏较深不易解离。所以 8M 尿素还不能改变它的环境,6M 盐酸胍才使它有所改变而在 280nm 处出现肩。从 E₃ 和 E₄ 中酪氨酸的 pK 值接近看来,两者的酪氨酸侧链环境似乎是相同的。

(八) 根据光谱变化,计算色氨酸和酪氨酸含量: 用图 6 滴定终了 ΔA 的变化,可以计算出 E₃ 的 $\Delta \epsilon_{295nm} = 60906$, E₃ 在 0.1M NaOH 中 $\Delta \epsilon_{280nm} = 125000$, 根据

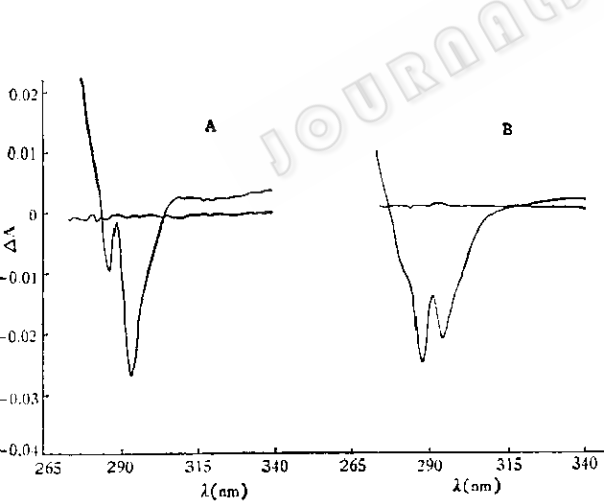


图 5 葡萄糖淀粉酶 E₃ 的变性差光谱

A: 8M 尿素 pH7.0, B: 6M 盐酸胍 pH7.0, 样品浓度: 0.6mg/ml

Fig. 5 The difference spectra of glucoamylase E₃ in denaturant vs. that in citrate-phosphate buffer of pH7.0 Enzyme: 0.6mg/ml; A: 8M urea; B: 6M guanidine hydrochloride

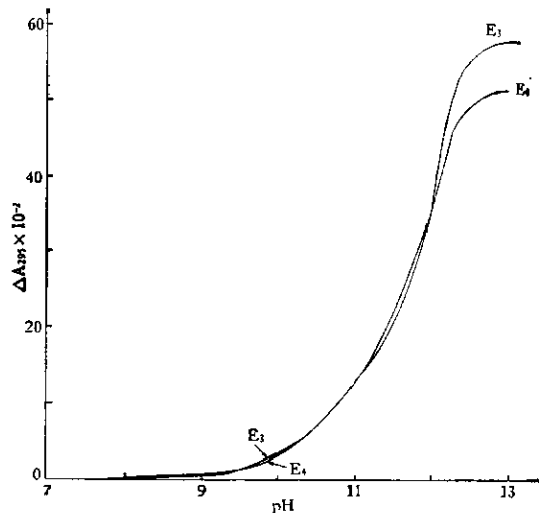


图 6 葡萄糖淀粉酶 E₃ 和 E₄ 酪氨酸光谱滴定曲线 样品浓度: 0.6mg/ml, 室温

Fig. 6 The spectrophotometric titration curves of glucoamylase E₃ and E₄ Enzyme: 0.6mg/ml

Yutani 所用方程式^[9]:

$2350X + 491Y = 60906$ 及 $1576X + 5225Y = 125000$, 这里 X 和 Y 分别是酪氨酸和色氨酸的残基数. 计算结果, 每分子E₃有色氨酸 14 个, 酪氨酸 23 个, E₄有色氨酸

13 个, 酪氨酸 21 个, 这和过去用其他方法测出的残基数^[17] (列于表 2) 进行比较, 从表 2 可以看出不同方法测出结果还是较为接近的。

表 2 葡萄糖淀粉酶酪氨酸和色氨酸含量

Table 2 The tyrosine and tryptophan residues in glucoamylase E₃ and E₄

氨基酸 Amino acid	样品提纯方法 Purification method	测定方法 Assay method	每分子残基数 Residue/mole	
			E ₃	E ₄
色氨酸 Tryptophan	凝胶制备电泳 Preparative gel electrophoresis	Edelhoc 方法 ^[17]	14	12
	DEAE-纤维素柱层析 DEAE-cellulose column chromatog.	Yutani 方法 ^[9]	14	13
酪氨酸 Tyrosine	凝胶制备电泳 Preparative gel electrophoresis	Edelhoc 方法 ^[17]	26	24
	DEAE-纤维素柱层析 DEAE-cellulose column chromatog.	Yutani 方法 ^[9]	23	21
	凝胶制备电泳 Preparative gel electrophoresis	盐酸水解 ^[17] HCl hydrolysis	26	26
	DEAE-纤维素柱层析 DEAE-cellulose column chromatog.	同上 ditto	24*	24*

* unpublished

参 考 文 献

- [1] Laskowski, M. Jr. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **19**: 581, 1956.
- [2] Herskovits, T. T.: *Methods in Enzymology*, Vol. 11, ed. by Hirs, C. H. W., Academic press New York, 1967. p 748.
- [3] Fisher, H. F. and D. G. Cross: *Arch. Biochem. Biophys.*, **110**: 217, 1965.
- [4] Bello, J.: *Biochemistry*, **8**: 4543, 1969.
- [5] Bello, J.: *ibid* **9**: 3562, 1970.
- [6] Nishida, A. et al.: *Agr. Biol. Chem*, **31(6)**: 682, 1967.
- [7] Visuri, K. and M. Nummi: *Eur. J. Biochem.*, **28**: 555, 1972.
- [8] Depinto, J. A. and L. L. Campbell: *Biochemistry*, **7(1)**: 114, 1968.
- [9] Yutani, A. et al.: *J. Biochem.*, **65**:201, 1969.
- [10] Ohnishi, M. and K. Hiromi: *J. Biochem.*, **79**: 11, 1976.
- [11] Ohnishi, M. et al.: *J. Biochem.*, **77**: 695, 1975.
- [12] Ohga, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **30(10)**: 967, 1966.
- [13] Tsuboi, A. et al.: *ibid.*, **38(3)**: 543, 1974.
- [14] Hattori, Y. and I. Takeuchi, *ibid.*, **25(12)**: 895, 1961.
- [15] Fukui, T. and Z. Nikuni: *ibid.*, **33(6)**: 884, 1969.
- [16] 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(3)**: 200, 1976.
- [17] 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*, **20(3)**: 263, 1980.
- [18] 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(2)**: 101, 1977.
- [19] Edelhoc, H.: *Biochemistry*, **6**: 1948, 1967.

STUDIES ON UV DIFFERENCE SPECTRA OF GLUCOAMYLASE FROM *MONASCUS* SP.

Yan Zizheng Guo Yaojun Fang Yuehua Zhang Shuzheng

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

The glucoamylase (E. C. 3,2,1,3) from *Monascus* sp. showed three to five bands on polyacrylamide gel electrophoresis. Each of them exhibited glucoamylase activity. Comparative studies on the UV spectra and difference spectra of the two major forms E_3 and E_4 have been carried out. The UV absorption maxima of both E_3 and E_4 were 280 nm, either in water, acetate buffer of pH 5.0 or citrate buffer of pH 7.0. The molar absorptivity (ϵ) and $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ determined at 280 nm in water were as follows: E_3 : $\epsilon=11.3 \times 10^4$, $A_{1\text{cm}}^{1\%}=20.4$; E_4 : $\epsilon=11.0 \times 10^4$, $A_{1\text{cm}}^{1\%}=20.0$. The absorption spectra of E_3 and E_4 showed red shifts in 0.1N NaOH and slight blue shifts in 0.1N HCl.

The temperature difference spectra of E_3 and E_4 showed that at pH 3.1 the spectra of E_3 and E_4 changed very slightly with temperature, while at pH 3.6, absorbance of E_3 changed more abruptly than that of E_4 . The thermal denaturation of both forms took place at 56°C. The spectrophotometric titration curves of E_3 and E_4 were very similar with an apparent pK of 11.5.

The difference spectra of E_3 at different pH values (3.55, 4.65, 7.14, 7.84) with reference to that at pH 2.66 revealed typical peaks contributed by tryptophan and tyrosine. The difference spectra of E_3 in 8M urea and 6M guanidine hydrochloride had negative peaks at 287 and 293 nm.