

影响红曲霉葡萄糖淀粉酶活力的因子

戈苏国 杨寿钧 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道了某些化学试剂对红曲霉葡萄糖淀粉酶两个分子型 E_3 和 E_4 活力的影响。在试验的十六种金属离子中, Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 稍有激活作用(+20%), 重金属离子 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 有不同程度的抑制作用(-20—40%), Ag^+ 则是一个强烈的抑制剂(-80%)。

尿素、SDS 和盐酸胍的蛋白变性作用是可逆的。

试验用的碳水化合物、多元醇和糖酸中, 葡萄糖酸 δ -内酯以及麦芽糖醇是 E_3 和 E_4 的竞争性抑制剂, K_i 值分别为 5.6×10^{-2} (%) 和 8.8×10^{-2} (%)。

E_3 和 E_4 对以上影响因子的反应相同。

红曲霉葡萄糖淀粉酶具有多型性, 过去曾报道过酶的两个型 E_3 和 E_4 的性质, 以及底物特异性的比较^[1-2]。为了进一步查明它们之间的区别, 我们就抑制剂对主要的两个型 E_3 和 E_4 的影响方面做了比较研究。

材 料 和 方 法

(一) 酶制剂

同前文报道^[2]。

(二) 酶的提纯

E_3 样品一小部分是用垂直板型凝胶电泳的方法得到的纯品^[3], 大部分的 E_3 样品和全部的 E_4 样品都是在过去 DEAE-纤维素柱层析方法^[4]的基础上进行了一些改进而得到的, 平衡液为 0.08M、pH5.0 的醋酸缓冲液, 洗脱液下限同平衡液(750ml), 上限为 0.12M 醋酸缓冲液(750ml), 进行梯度洗脱, 流速为每小时 20—25ml, 定时分段收集凝胶电泳均一的 E_3 和 E_4 样品。

(三) 主要的化学试剂

茁霉多糖 (Pullulan), α -、 β -、 γ -环状糊精 (α -、 β -、 γ -Cyclodextrin), 麦芽三糖醇 (Maltotriitol), 麦芽糖醇 (Maltitol), 异麦芽糖醇 (Isomaltitol) 等均为日本林原公司产品*, 赤藓糖醇、山梨糖醇等均为德国 E. Merk 产品, 葡萄糖酸 δ -内酯

为瑞士 Fluka 厂产品, α -甲基-D-葡萄糖, 阿拉伯糖醇均为英国 Light 厂产品, 其余均为国产分析纯或化学纯试剂。

(四) 酶活力的测定方法

1. 取 0.1ml 酶液(含酶蛋白 20—30 μ g), 加入 0.1ml 0.5M (pH4.5) 的醋酸缓冲液, 加水 0.3ml, 在 50℃ 的水浴中预热 2—3 分钟后, 加入 0.5ml 2% 的可溶性淀粉, 50℃ 反应 10 分钟, 热钝化 10 分钟, 取 0.1ml 反应液用 Somogyi-Nelson^[5] 法测定生成的葡萄糖量。(以在 520nm 波长下测得的吸光度值 A 表示酶活力。)

2. 葡萄糖氧化酶法测定酶活力^[6]: 若原反应体系中含有还原糖, 则以此方法测定生成的葡萄糖。反应体系同上。取 0.1ml 热钝化后的反应液用蒸馏水稀释至 2ml, 然后加 2ml 葡萄糖氧化酶试剂, 在 37℃ 水浴中反应 30 分钟, 加 4ml 5N 硫酸终止反应, 摇匀后以 525nm 波长下测定的吸光度 A 代表酶活力(用热钝化的酶做对照)。

(五) 化学试剂和金属离子对酶活力的影响

按酶活力测定方法 1 进行, 在反应体系中先加入酶液、缓冲液以及一定浓度的化学试剂或金属盐的溶液, 在 30℃ 保温半小时后再加入底物进行反应。

本文于 1980 年 8 月 27 日收到。

* 为林原健先生赠送, 特此致谢。

(六) 变性剂对酶活力的影响

先将一定浓度的变性剂和酶液 (20μg 左右) 在 30℃ 保温半小时, 取出一定体积的混合液按方法 1 测定剩余酶活力, 其余保温后的混合液用不同的方法除去变性剂, 测定活力恢复情况。

结果和讨论

(一) 不同金属离子对红曲霉葡萄糖淀粉酶活力的影响

共试验了 16 种不同的金属离子, 结果列在表 1 中。从表中看出, 不同的金属离子对 E₃、E₄、E₃₊₄ 以及硫酸铵沉淀样品 (简称粗样品) 的酶活力都有不同程度的影响, 提纯后的 E₃ 和 E₄ 比粗酶更加敏感。其中, Fe²⁺、Co²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 等对 E₃ 和 E₄ 稍有激活作用 (增加 20% 左右), 而 Fe³⁺、Pb²⁺、Hg²⁺ 等对 E₃ 和 E₄ 均有不同程度的抑制作用 (降低 20—40%), Ag⁺ 对酶有较严重的抑

表 1 金属离子对酶活力的影响
Table 1 Effect of Various Cations on Enzyme Activity

金属盐* Salt	相 对 活 力 Relative activity (%)			
	粗 样 品 crude sample	E ₃₊₄	E ₃	E ₄
None	100	100	100	100
MgCl ₂	117	109	121	116
FeSO ₄	125	124	122	124
CaCl ₂	100	112	114	118
CoCl ₂	106	120	123	124
BaCl ₂	104	106	102	104
MnCl ₂	98	95	96	95
NiCl ₂	100	95	100	89
NaCl	108	113	115	100
AlCl ₃	87	89	88	91
CrCl ₃	106	87	104	96
Pb(AC) ₂	100	82	79	64
FeCl ₃	65	79	63	79
CuCl ₂	98	70	76	70
HgCl ₂	79	63	59	60
AgNO ₃	25	22	20	20
EDTA-2Na	88	104	106	99

* 金属离子的浓度为 1mM

制作用 (降低 80%)。另外也可看出, 无论是激活还是抑制, 对 E₃ 和 E₄ 来说, 程度基本相似。

(二) 各种阴离子对酶活力的影响

使用 Cl⁻、SO₄²⁻、CO₃²⁻、NO₃⁻、CH₃COO⁻ 等阴离子的钙盐 (1mM) 进行试验, 在 30℃ 的水浴中保温半小时, 测定剩余酶活力。结果发现, 这些阴离子对酶活力没有明显的影响。

(三) 不同浓度的 Ca²⁺、Co²⁺ 对 E₃ 和 E₄ 的影响

改变 Ca²⁺ 和 Co²⁺ 的浓度, 在 30℃

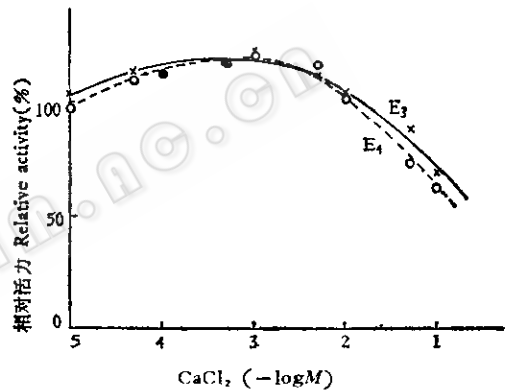


图 1 氯化钙浓度对 E₃、E₄ 活力的影响
Fig. 1 Effect of CaCl₂ on activity of E₃ and E₄

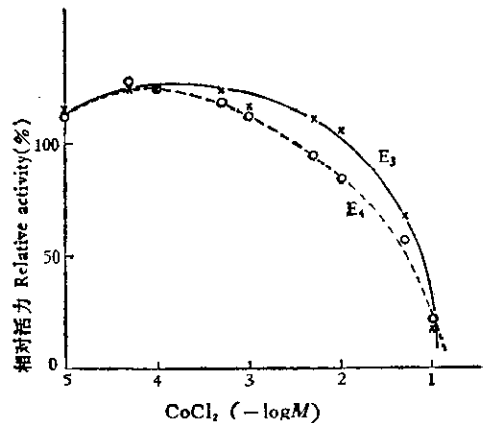


图 2 氯化钴浓度对 E₃、E₄ 活力的影响
Fig. 2 Effect of CoCl₂ on activity of E₃ and E₄

水浴中和酶液一起保温, 30 分钟后, 用 Somogyi-Nelson 法测定酶活力, 结果见图 1, 图 2。当 Ca^{2+} 在反应体系中的浓度为 1mM 时, 能激活 20% 左右, Ca^{2+} 浓度再继续增加, 反而产生抑制作用。当 Co^{2+} 浓度为 0.1mM 时, 能激活 25% 左右, 超过此浓度, 对酶活力反而产生抑制。

(四) 蛋白质变性剂对酶活力的影响

1. 尿素对 E_3 和 E_4 的影响: 8M 的尿素在 30°C 保温半小时后能使酶活力全部丧

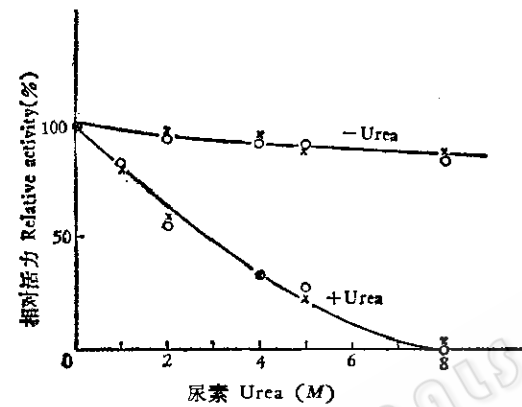


图3 尿素对 E_3 、 E_4 活力的影响

Fig. 3 Effect of urea on activity of E_3 and E_4

×——× E_3 ○——○ E_4

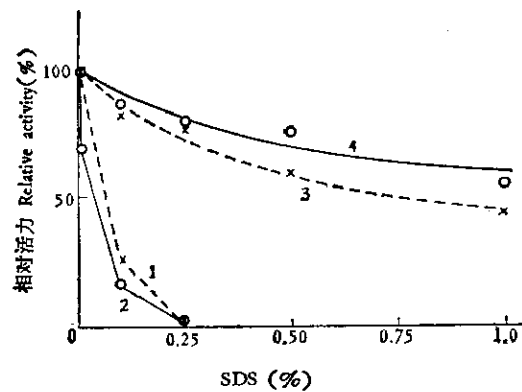
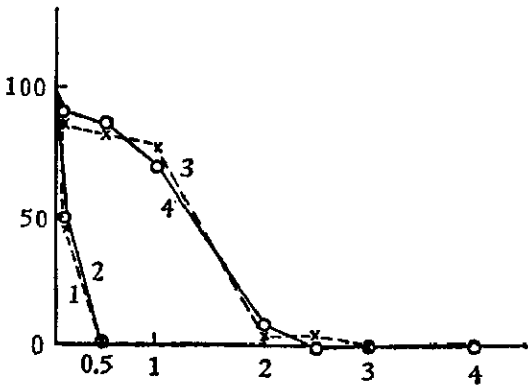


图4 SDS 对 E_3 和 E_4 活力的影响

Fig. 4 Effect of SDS on activity of E_3 and E_4

1. E_3 +SDS 2. E_4 +SDS
3. E_3 -SDS 4. E_4 -SDS



盐酸胍 Guanidine HCl (M)

图5 盐酸胍对 E_3 、 E_4 活力的影响

Fig. 5 Effect of guanidine HCl on activity of E_3 and E_4

1. E_3 +guanidineHCl 2. E_4 +guanidineHCl
3. E_3 -guanidineHCl 4. E_4 -guanidineHCl

失, 对蒸馏水透析 96 小时, 能使相对活力恢复到 80% 以上(图 3)。

2. SDS 对酶活力的影响: 不同浓度的 SDS 和酶液一起保温, 酶活力迅速下降, 当 SDS 的浓度为 0.25% 时, 活力完全失去, 参照 Lenard 等人^[7]的方法, 用阴离子交换树脂 Dowex 1 × 2 处理变性后的酶, 脱去 SDS, E_3 能恢复到 70%, E_4 能恢复到 80% 左右(图 4)。

3. 盐酸胍对酶活力的影响: 用不同浓度的盐酸胍处理酶 (30°C , 半小时) 测定剩余活力。0.5M 的盐酸胍能使 E_3 和 E_4 活力完全失去, 对蒸馏水透析 70 小时后, 相对活力能恢复到 70% 左右(图 5), 当盐酸胍的浓度超过 1M 时, 似乎活力没有明显恢复, 可能是由于透析时间不太够或是由于较高浓度的盐酸胍使其不可逆变性而引起的。

试验结果指出, 除掉三种不同的蛋白质变性剂后, 相对活力都有不同程度的恢复, 说明它们的蛋白变性作用是可逆的。这种现象与产气杆菌茁霉多糖酶变性后活力恢复情况类似^[8], 而不同于假单胞杆菌

异淀粉酶的变性情况^[9]。这种酶在 3M 盐酸胍或 0.1% 的 SDS 存在时,活力完全失去,用 8M 尿素处理后仅能保留 20% 的活力,将变性后的酶进行稀释或透析,都不能恢复活力。

(五) 碳水化合物及其衍生物对酶活力的影响

试验了 22 种不同的碳水化合物、多元醇和糖酸等对 E₃ 和 E₄ 活力的影响(表 2),结果发现,10mM 的葡萄糖酸 δ-内酯以及 14mM 的麦芽糖醇对 E₃ 和 E₄ 有比较强的抑制作用,其剩余活力为 30% 左右。其余均无明显影响。就这些化合物对 E₃ 和 E₄ 活力的影响来看也是非常一致的。

(六) 葡萄糖酸 δ-内酯和麦芽糖醇对 E₃ 和 E₄ 的抑制作用

以可溶性淀粉为底物(S),改变不同的底物浓度,分别检验葡萄糖酸 δ-内酯和麦芽糖醇对酶活力的影响,用 Lineweaver-Burk 法作图都可清楚地看到这两种抑制剂都能改变 K_m 值而不改变最大反应速度,属于竞争性抑制剂(图 6,图7),而且,这两种竞争性抑制剂各自对 E₃ 和 E₄ 的抑制是完全相同的。

根据图 6、图 7 中加入抑制剂后斜率在横轴上截距 $-\frac{1}{K_p}$ 分别为 24、25,根据公式:

$$-\frac{1}{K_p} = \frac{1}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$
$$K_i = \frac{[I]}{\frac{K_p}{K_m} - 1}$$

用作图法求得 K_m 为 1×10⁻²g/ml,在试验中使用的葡萄糖酸δ-内酯浓度 [I] 为 10mM (1.78 × 10⁻³g/ml),麦芽糖醇的浓度为 14mM (5 × 10⁻³g/ml),从而求得抑制剂常数 K_i 值分别为 5.6 × 10⁻²(%)

表 2 碳水化合物及其衍生物对酶活力的影响

Table 2 Effect of Carbohydrates and Derivatives on Enzyme Activity

碳水化合物及其衍生物 Carbohydrates and derivatives	浓度 Concn. (mM)	相对活力 Relative activity (%)	
		E ₃	E ₄
None	—	100	100
α-环状糊精 α-Cyclodextrin	1	92	95
	10	81	86
β-环状糊精 β-Cyclodextrin	1	91	93
	3	91	92
γ-环状糊精 γ-Cyclodextrin	1	91	91
	10	91	94
赤藓糖醇 Erythritol	1	101	103
	10	85	93
核糖醇 Adonitol	10	77	75
L-阿拉伯糖醇 L-Arabitol	10	85	94
麦芽三糖醇 Maltotriitol	3	85	85
D-山梨醇 D-Sorbitol	3	86	85
麦芽糖醇 Maltitol	14	32	29
异麦芽糖醇 Isomaltitol	42	91	86
茁霉多糖 Pullulan	0.15%	93	87
α-甲基-D-葡萄糖 α-Methyl-D-glucose	1	114	108
葡萄糖酸 δ-内酯 Glucono-δ-lactone	1	83	81
	10	30	32
α-D-半乳糖醛酸 α-D-Galacturonic acid	3	100	101
5-酮葡萄糖酸钠 5-Ketogluconate Na-salt	3	100	110
α-酮古洛糖酸 α-Ketogulonic acid	3	123	119
艾杜糖酸钙 Ca-idonate	3	108	100

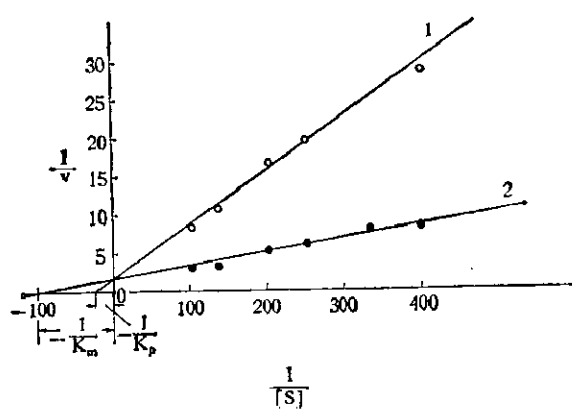


图6 葡萄糖酸 δ -内酯对 E_3 和 E_4 的抑制作用

Fig. 6 Inhibition of E_3 and E_4 by glucono- δ -lactone
1. +Glucono- δ -lactone 2. -Glucono- δ -lactone

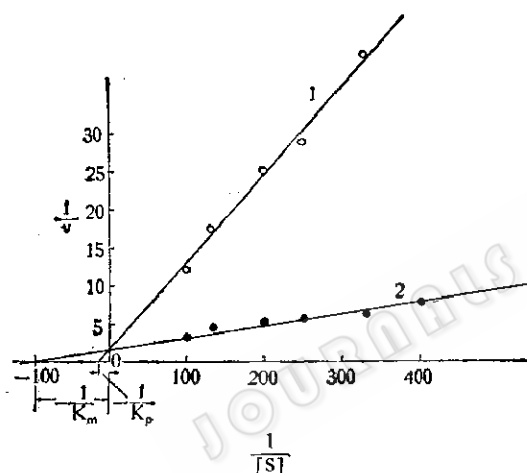


图7 麦芽醇对 E_3 和 E_4 的抑制作用

Fig. 7 Inhibition of E_3 and E_4 by maltitol
1. +Maltitol 2. -Maltitol

$8.8 \times 10^{-2}(\%)$ 。

根据 Marshall 报道^[10], 环状糊精是产气杆菌茁霉多糖酶的一个强烈的竞争性抑制剂, 而且对兔肌脱枝酶 (Rabbit-muscle debranching enzyme) 和甜玉米茁霉多糖酶也有显著的抑制作用, 然而它对直接脱枝枝链淀粉的纤维粘菌属异淀粉酶 (Cytophaga isoamylase) 却无明显的抑制作用。此外, 也有报道环状糊精对甘薯 β -淀粉酶及大麦 β -淀粉酶也有较强烈的抑制作用。

Ohnishi 等^[11]报道 β -环状糊精是 BLA 酶 (Bacterial Liquefying α -amylase) 的一个竞争性的抑制剂。然而, 在我们的试验条件下, 环状糊精对于红曲霉葡萄糖淀粉酶却无明显影响。看来, 环状糊精对不同类型的淀粉酶有无抑制作用还找不出什么规律。

过去曾有人报道, 葡萄糖酸 δ -内酯是葡萄糖苷酶的一个竞争性抑制剂^[9], 也是康氏木霉 (*Trichoderma Konigii*) 中 β -葡萄糖苷酶的一个竞争性抑制剂^[12], 对雪白根霉 (*Rhizopus niveus*) 的葡萄糖淀粉酶也有抑制作用, 而且引起差光谱的变化^[13]。在我们的试验中, 葡萄糖酸 δ -内酯对红曲霉葡萄糖淀粉酶虽也有竞争性的抑制作用, 但 K_i 值较大, 我们曾观察到它在 pH 及温度改变所引起的酶活下降过程中对酶并无明显的保护作用, 这可能是由于葡萄糖酸 δ -内酯对红曲霉葡萄糖淀粉酶的抑制虽是竞争类型, 但对酶的亲和力不够大而造成的。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所结构与功能组: 微生物学报, **20** (3): 263, 1980。
- [2] 王场声等: 微生物学报, **20** (4): 398, 1980。
- [3] 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 p 36。
- [4] 中国科学院微生物研究所结构与功能组: 微生物学报, **16** (3): 200, 1976。
- [5] Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, **153**: 375, 1944。
- [6] 唐国敏: 微生物学通报, **5**(4): 33-34, 1978。
- [7] Lenard, J.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **45** (3): 662, 1971。
- [8] 杨寿钧等: 微生物学报, **21**(1): 68, 1981。
- [9] Kitagawa, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **39** (5): 989, 1975。
- [10] Marshall, J. J.: *FEBS Letters*, **37**(2): 269, 1973。
- [11] Ohnishi, M.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **69**: 181, 1971。
- [12] 汪大受等: 生物化学与生物物理学报, **12**(3): 293, 1980。
- [13] Ohnishi, M. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **77**: 695, 1975。

FACTORS EFFECTING THE ACTIVITY OF GLUCOAMYLASE FROM *MONASCUS*

Ge Suguo Yang Shoujun Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The effect of some chemical reagents on the activity of the two molecular forms of glucoamylase from *Monascus rubiginosus* Sato have been investigated. Among the 16 metal ions tested, Fe^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} showed activating effect (+20%), while the heavy metal ions Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} showed inhibiting effect (−20—40%), and Ag^+ was a strong inhibitor (−80%).

Denaturation by urea, SDS and

guanidine hydrochloride was reversible.

Among the carbohydrates, polyols and sugar acids tested, glucono- δ -lactone and maltitol were found to be competitive inhibitors for E_s and E_a , with K_i values of $5.6 \times 10^{-2}(\%)$ and $8.8 \times 10^{-2}(\%)$ respectively.

Both E_s and E_a reacted in a similar way toward the above effectors.