

红曲霉葡萄糖淀粉酶中糖肽结合方式的研究

戈苏国 杨寿钧 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

王 维 通

(中国科学院化学研究所, 北京)

红曲霉葡萄糖淀粉酶具有多型性, 它的主要的两个型 E_s 和 E_d 都是糖蛋白。用气相色谱法测定了 E_s 和 E_d 中各种单糖组分。在 E_s 中, 糖残基数为: 甘露糖 16, 半乳糖 2, 木糖 2, 阿拉伯糖 2, 葡萄糖 1, 总残基数为 23; 在 E_d 中残基数为: 甘露糖 19, 半乳糖 3, 木糖 3, 阿拉伯糖 3, 葡萄糖 1, 共 29 个残基。

当 E_s 和 E_d 用稀碱处理后, β -消去反应导致了丝氨酸、苏氨酸残基数的减少, 并且在 240nm 处表现出较为明显的光吸收。在上述反应体系中加入硼氢化钠, 则丙氨酸和 α -氨基酸增加。由此说明, 糖是以 O-糖苷键方式与蛋白质肽链上的丝氨酸或苏氨酸连结的。

红曲霉葡萄糖淀粉酶具有多型性, 过去曾报道过酶的提纯、性质、结晶、抑制剂、蛋白质侧链修饰剂对酶活力的影响, 以及两个主要分子型 E_s 和 E_d 的比较^[1-3]。本文报道红曲霉葡萄糖淀粉酶中糖肽结合方式的研究结果。

材料和方法

(一) 酶制剂

无锡酶制剂厂生产的红曲糖化酶, 生产菌种为 *Monascus rubiginosus* Sato, 菌号为 AS 3.3491, 酶活力为 20,000u/g。

(二) 化学试剂及仪器

甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖和木糖均为美国 Packard-Becker, B. V. 产品; 硼氢化钠为 Aldrich, Chemical. Co. Ltd 产品; 103 型气相色谱仪为上海分析仪器厂产品; 荧光仪为上海沪江仪器厂产品, 紫外分光光度计为 Unicam SP-700 型。

(三) 分析方法

蛋白质测定用 Lowry 法^[4], 单糖组成用气相色谱^[5]进行测定, 氨基酸组成用 Hitachi 835 型氨基酸自动分析仪测定。

结果和讨论

(一) 气相色谱法测糖

1. 水解条件:

使糖蛋白中糖释放有各种各样的方法。对糖蛋白中糖的水解也因种类不同而异。岩藻糖和唾液酸等对酸特别敏感, 然而氨基糖的释放则需比较强烈的条件^[6]。我们曾改变水解条件, 用 0.05N 盐酸 100℃ 水解 4 小时, 或用 0.1N 硫酸 100℃ 1 小时均无单糖释放; 使用 4—6N 盐酸 100℃ 水解 4 小时, 也未观察到氨基糖存在。因而, 采用了一般水解中性糖的条件。

2. 样品的水解、还原和乙酰化

将 106mg 酶样品和 0.5mg 肌醇放入 2ml 2N 盐酸中, 100℃ 水解 4 小时, 在氮气流中(50℃)浓缩至干, 相继加入 10mg 硼氢化钠, 1ml 1N 氨水, 2ml 蒸馏水, 室温放置一小时, 然后加入 0.5ml 冰醋酸终止反应, 在氮气保护下吹干, 加入甲醇 1ml, 吹干,

本文于 1981 年 10 月 9 日收到。

反复五次,加入 1ml 乙酸酐,封管,120℃ 乙酰化三小时,吹干,用二氯甲烷 (0.5ml) 萃取,离心,取上清液上柱。

3. 色谱条件

色谱柱为长 2m、内径 3mm 的不锈钢柱,内装担体 Chromosorb W AW DMCS 60—80 目,上面涂渍 3% ECNSS-M。柱温 180℃,气化室温度 325℃,检测器为氢火焰离子化检测器,温度为 240℃,载气为氮气,柱前压 2.6Kg/cm²,空气流速 370ml/分钟,氢气流速 80ml/分钟,放大器高阻 10⁹ 欧姆,记录仪满标 4mV,纸速 8mm/分钟,进样量 1μl,色谱分离情况见图 1。

所得糖的组分用另一柱子 (OV-225 3%/chromosorb W AW DMCS) 进一步证实为甘露糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和葡萄糖。以肌醇作内标,已知 E₃ 和 E₄ 的分子量为 55,000, E₃ 和 E₄ 中含总糖分别为 7% 和 9%^[5],计算出各种单糖的残基数。计算结果见表 1。

E₃ 和 E₄ 中糖的残基数稍有差别, E₄ 比 E₃ 多 6 个糖残基,其中包括甘露糖残基 3 个,半乳糖、木糖、阿拉伯糖残基各一个,葡萄糖的残基数相同。过去我们曾用纸层析方法测定过 E₃ 和 E₄ 中糖组分,但未观察到阿拉伯糖,这是由于阿拉伯糖和甘露糖的 R_f 值极为相近,后来我们将此混合点在显色前剪下,抽提后反复上行五次,用苯胺-邻苯二甲酸显色,斑点的下面部分呈浅棕色,在紫外灯下有明亮荧光的是甘露糖,上面部分呈红色、无荧光是阿拉伯糖。

(二) 碱性 β-消去反应

碱性 β-消去反应被广泛应用于阐明糖蛋白的结构。当糖蛋白受到温和的碱处理时,由于糖与蛋白质的丝氨酸和苏氨酸的 β-位羟基之间形成的 O-糖苷键对碱不稳定,而 N-糖苷键是稳定的,所以可以通过碱处理后糖蛋白中丝氨酸和苏氨酸残

基数的减少来确定 O-糖苷键的存在^[9]。

1. 测定碱处理后糖蛋白紫外吸收光谱的变化

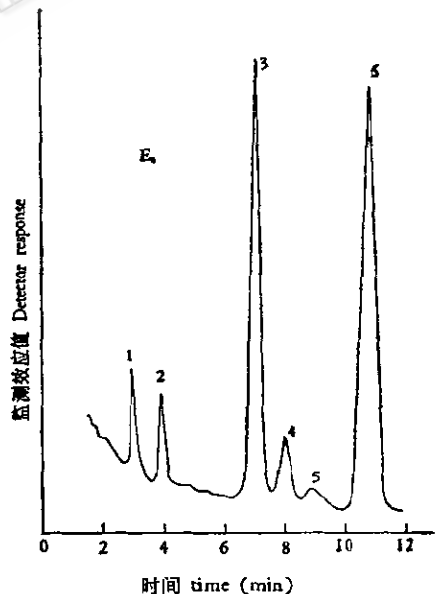
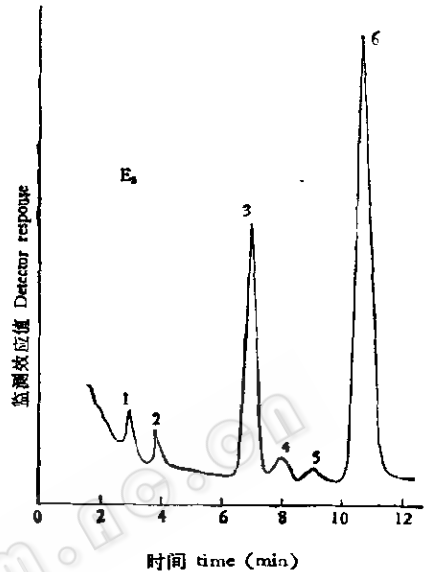


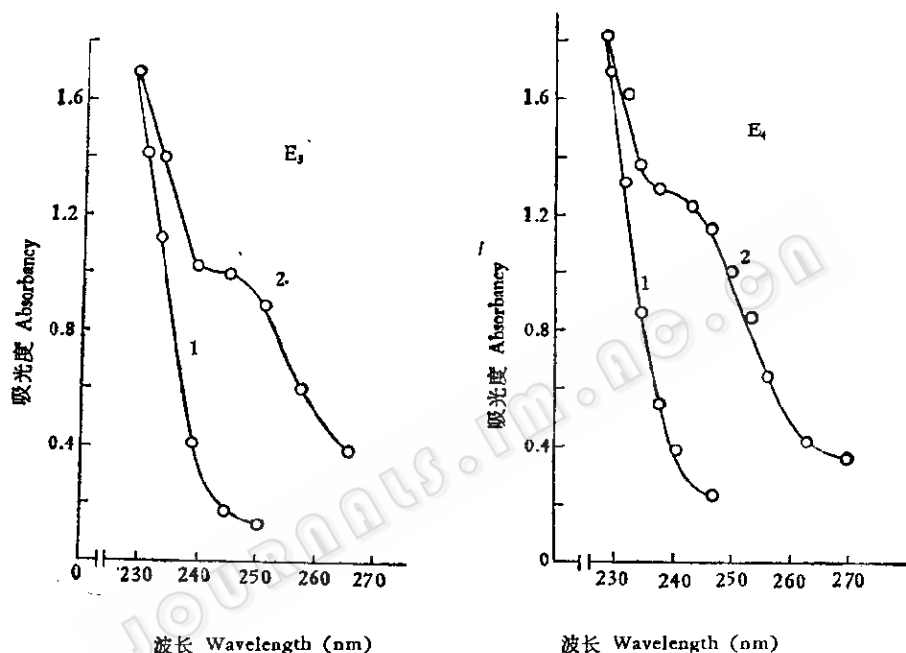
图 1 E₃ 和 E₄ 中糖的气相色谱图

Fig. 1 Gas Chromatogram of The sugars in E₃ and E₄

1. 阿拉伯糖 Arabinose 2. 木糖 Xylose 3. 甘露糖 Mannose 4. 半乳糖 Galactose 5. 葡萄糖 Glucose 6. 肌醇 Inositol

表 1 E_3 和 E_4 中各单糖组分的残基数Table 1 The Sugar Composition (residue/mole) in E_3 and E_4

样品 Sample	糖 Sugar 残基 Residue	甘露糖 Mannose	半乳糖 Galactose	木糖 Xylose	阿拉伯糖 Arabinose	葡萄糖 Glucose	总数 Total
E_3		16	2	2	2	1	23
E_4		19	3	3	3	1	29

图 2 碱处理后 E_3 和 E_4 的紫外吸收光谱Fig. 2 UV spectra of E_3 (A) and E_4 (B) after alkali treatment

1. - NaOH 2. + NaOH

在用碱处理时,与 O-糖苷键连结的丝氨酸生成 α -氨基丙烯酸,苏氨酸生成 α -氨基丁烯酸,这种不饱和氨基酸的形成,可以利用在 240nm 波长紫外吸收的增加进行测量,这是证明 β -消去反应的简易方法^[10]。

E_3 和 E_4 (0.2 mg/ml) 放在 0.2M 的氢氧化钠水溶液中,在 45℃ 保温半小时,测定紫外吸收光谱,同时测定未处理酶的紫外吸收光谱,结果见图 2。从图 2 中看出,处理后的 E_3 和 E_4 在 240nm 产生了明显的吸收,说明在酶分子中存在 O-糖苷

键。

2. β -消去反应中氨基酸残基的变化

为了进一步测定在 β -消去反应中的定量关系,在反应体系中加入还原剂硼氢化钠, α -氨基丙烯酸被还原成丙氨酸, α -氨基丁烯酸还原成 α -氨基丁酸^[11],即在 β -消去反应中,丝氨酸、苏氨酸的减少和丙氨酸、 α -氨基丁酸的增加之间会有一定的关系。

分别将 2mg E_3 和 E_4 溶解在 2ml 0.2N 的氢氧化钠溶液中 (内含 1M 的硼氢化钠),在氮气保护下,45℃ 保温 24 小时,而

表2 碱性 β -消除反应前后每克分子酶中氨基酸残基的变化Table 2 Change of amino acid residues per mole of enzyme before and after alkali- β -elimination

样品 Sample	氨基酸残基 Amino acid residues	反应前 Before	反应后 After	残基差 Difference
E ₃	丝氨酸 Ser	59	51	-8
	苏氨酸 Thr	32	28	-4
	丙氨酸 Ala	63	69	+6
	α -氨基丁酸 α -ABA*	0	4	+4
E ₄	丝氨酸 Ser	59	50	-9
	苏氨酸 Thr	33	30	-3
	丙氨酸 Ala	61	70	+9
	α -氨基丁酸 α -ABA	0	4	+4

* α -ABA: α -amino-n-butyric acid

后加等体积浓盐酸,通氮气封管,110℃水解 22 小时,真空干燥,进行氨基酸分析。用蒸馏水代替碱做同样处理作为对照,结果见表 2。

从测定结果看出, E₃ 中失去丝氨酸 8 个、苏氨酸 4 个,增加丙氨酸 6 个、 α -氨基丁酸 4 个;在 E₄ 中失去丝氨酸 9 个、苏氨酸 3 个,增加丙氨酸 9 个, α -氨基丁酸 4 个。过去我们在用碱处理酶时,未用氮气保护,在 E₃ 中失去丝氨酸 12 个、苏氨酸 13 个;在 E₄ 中失去丝氨酸 17 个、苏氨酸 11 个,这是由于丝氨酸和苏氨酸易被破坏造成的。最近,我们在整个反应中都采用氮气保护,得到了上面结果。从糖的分析知道,在每克分子的 E₃ 和 E₄ 中分别有 23、29 个糖残基,连结到肽链上分别有 10—12、12—13 个连结点(表 2),推测糖链是比较短的,这种情况类似于黑曲霉葡萄糖淀粉酶 I 中糖残基与肽链的连结^[12],该酶中有 100 个糖残基,45 个连结点,糖侧链是以 D-甘露糖残基通过 O-糖苷键连结到蛋白质的 L-丝氨酸或 L-苏氨酸上。

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, 16: 200, 1976。
- [2] 中国科学院微生物研究所结构与功能组: 微生物学报, 17: 101, 1977。
- [3] 杨寿钧等: 微生物学报, 22(2): 132, 1982。
- [4] 戈苏国等: 微生物学报, 22(2): 126, 1982。
- [5] 中国科学院微生物所结构与功能组: 微生物学报 20: 263, 1980。
- [6] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- [7] Albersheim, P. et al.: *Carbohydr. Res.*, 5: 340, 1967.
- [8] Marshall, R. D. et al.: in "Glycoproteins" ed by A. Gottschalk, Elsevier Publishing Company, Amsterdam. 1972, pp. 246—247.
- [9] Downs, F. and W. Pigman.: in "Methods in Carbohydrate Chemistry" Vol 7. Academic press. New York. 1976, pp. 200—201.
- [10] Planter, J. J. and D. M. Carlson: *Anal. Biochem.*, 65: 153, 1975.
- [11] Payza, N. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 129: 68, 1969.
- [12] Pazur, J. H. et al.: *Carbohydr. Res.*, 84: 103—104, 1980.

BONDING BETWEEN SUGAR AND PEPTIDE CHAIN IN GLUCOAMYLASE FROM *MONASCUS RUBIGINOSUS*

Ge Suguo Yang Shoujun Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Wang Weitong

(Institute of Chemistry, Academia Sinica, Beijing)

Glucoamylase of *Monascus rubiginosus* Sato has been shown to exist in multiple forms. Both molecular forms E_3 and E_4 are glycoproteins.

The sugar compositions of E_3 and E_4 were analyzed by gas liquid chromatography. The sugar compositions in residues/mole were: in E_3 : mannose, 16; galactose, 2; Xylose, 2; arabinose, 2; glucose, 1 (total: 23); and in E_4 : mannose, 19; galactose, 3; xylose, 3; arabinose, 3; and glucose, 1 (total: 29).

When E_3 and E_4 were treated with dilute alkali, β -elimination reaction led to the loss of serine and threonine, and showed increase of absorption at 240 nm. When sodium borohydride was added into the above reaction system, alanine and α -amino-n-butyric acid were increased. It is suggested that the sugars are linked to serine and threonine of the peptide chain through O-glycosidic linkage.