

根霉葡萄糖淀粉酶的简易纯化法及部分理化性质

袁静明 徐卫东 褚西宁

(山西大学生物系, 太原)

从汾酒大曲中分离到一株根霉, 经诱变处理后获得了具有高产葡萄糖淀粉酶的变异株。将此菌株用固体麸曲培养, 水抽提得原酶液。经 DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-100 和 CM-Cellulose C52 三步柱层析后, 得到了紫外光谱和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳皆为均一的葡萄糖淀粉酶。总活力回收达 70% 左右, 比活力提高 23.70 倍。该酶的 $A_{280nm}^{1\%1cm} = 14.70$, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和凝胶过滤层析表明其分子量约为 78400, 酶分子中赖氨酸含量较高, 属典型的根霉型葡萄糖淀粉酶。

关键词 根霉; 葡萄糖淀粉酶; 分离纯化

葡萄糖淀粉酶 (glucoamylase, EC 3.2.1.3) 常称糖化酶, 由于它在食品、轻工、制药等工业生产上的重要性而受到广泛重视。该酶底物专一性较低, 水解淀粉能力很强, 能从淀粉非还原末端水解 α -1, 4-葡萄糖苷键, 且能水解 α -1, 6-, 甚至 α -1, 3-葡萄糖苷键, 能将支链和直链淀粉完全水解为右旋糖。通常将来源不同的真菌糖化酶分为两种类型, 即德氏根霉型和黑曲霉型, 前者水解淀粉近 100%, 后者只能达 80%^[1,2]。有关糖化酶分离纯化的文献甚多^[3-16], 本文报导获得电泳均一的根霉糖化酶的简易提纯方法, 并对该酶的分子量、氨基酸组成等方面也进行了研究。

材料和方法

(一) 菌种

从汾酒大曲中分离的“汾根 1 号”经诱变处理后获得的变异株 B₁₈ (*Rhizopus* sp.), 系本室保藏。

(二) 培养基及培养条件

按文献[17]。

(三) 粗酶液制备

在培养好的 11g 麸曲中, 加入 60ml 蒸馏水, 捣碎曲块, 置沸水浴中, 使抽提液温度迅速上升至 40℃, 取出放在 40℃ 恒温箱抽提 1 小时, 用脱脂棉过滤, 4500r/min 离心, 得淡黄色透明原酶液, 备用。

(四) 主要试剂及仪器

DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-100 及电泳用低分子量标准蛋白均为瑞典 Pharmacia 公司产品; CM-Cellulose C52 为 Whatman 公司产品; PAGE 试剂均为美国 Bio-Rad 公司产品; 考马斯亮兰 G-250 为 Fluka 进口分装; 牛血清白蛋白为电泳纯; 细胞色素 C 为上海酵母厂产品; 胰蛋白酶抑制剂、乳酸脱氢酶为 Sigma 公司产品; 3,5-二硝基水杨酸为北京化工厂产品; 氨基酸自动分析用标准氨基酸混合液和邻苯二甲醛为日本和光工业株式会社产品; 其他试剂皆为分析纯。

UV-265 型紫外分光光度计为日本岛津制作所产品; 梯度混合器、PROTEANTM 电泳槽、500/300 型电泳仪电源为 Bio-

本文于 1989 年 1 月 9 日收到。

Rad 公司产品; 氨基酸分析仪为 Waters HPLC 氨基酸自动分析系统; HD-81-5A 型核酸蛋白检测仪为浙江温州鹿城生化仪器厂产品。

(五) 分析方法

1. 酶活力测定方法及酶活力单位: 酶活力测定按文献 [18] 的测定系统, 采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖^[19]。在最适条件下 (0.05 mol/L pH4.6 的醋酸缓冲液) 55℃ 保温 1 小时产 1mg 葡萄糖的酶量定为 1 个活力单位。

2. 蛋白含量测定: 采用 Lowry^[20] 法, 以牛血清白蛋白为标准。

3. 分子量测定: 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[21]及凝胶过滤法^[22]测定。

4. 氨基酸分析: 按 Moore and Stein 方法进行水解, 用 Waters HPLC 氨基酸自动分析系统、邻苯二甲醛柱后反应, 根据荧光强度自动计算氨基酸量。

结 果

(一) DEAE-Sephadex A-50 柱层析

1.5 × 20 cm DEAE-Sephadex A-50 柱用 0.005 mol/L, pH4.6 醋酸缓冲液平衡, 然后将同一缓冲液中透析过的 50ml 原酶抽提液上柱, 分部收集。流完后再用 50ml 相同缓冲液洗涤, 洗脱曲线没有明显的吸收峰, 经检测酶活性, 酶处于中间部分, 收率为 90% 左右。这步处理不但可使色素大大减少, 而且除去了部分杂蛋白, 使酶得到初步纯化。

(二) Sephadex G-100 凝胶过滤

将 DEAE-Sephadex A-50 层析所得的高活力糖化酶部分, 用超过滤器浓缩后离心, 取上清液 10—15ml 于 Sephadex G-100 柱过滤, 用 0.1 mol/L pH4.6 醋酸缓冲液洗脱, 得二个吸收峰, 第二个峰为糖化酶, 酶活力回收约 76.5%。峰形比较对称, 但经 UV-光谱扫描, 在红侧稍有拖尾, 由电泳鉴定为二条带, 结果见图 1。

(三) CM-Cellulose C52 再层析

将 Sephadex G-100 柱层析第二峰样品经超滤浓缩后, 于 0.005 mol/L pH4.6 醋酸缓冲液透析 24 小时以上, 按常规方法取 25ml 样品于 CM-Cellulose C52 柱中,

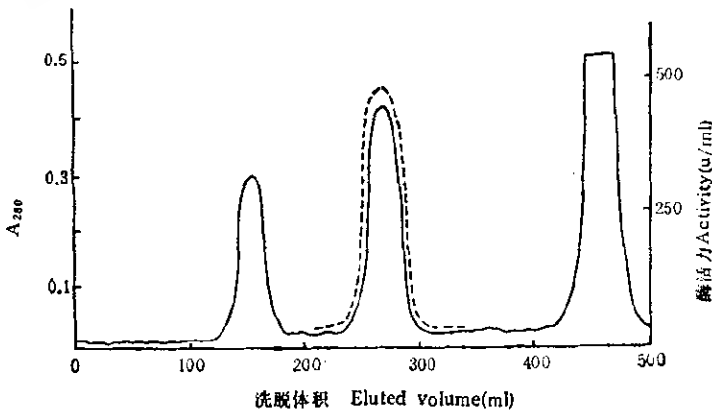


图 1 糖化酶经 Sephadex G-100 凝胶过滤

Fig. 1 Gel filtration of glucoamylase on Sephadex G-100

柱 Column: 2.5 × 120cm; 流速 Flow rate: 0.4ml/min; 分部 Fraction volume: 5ml;

—A₂₆₀; --- 酶活力 Enzyme activity

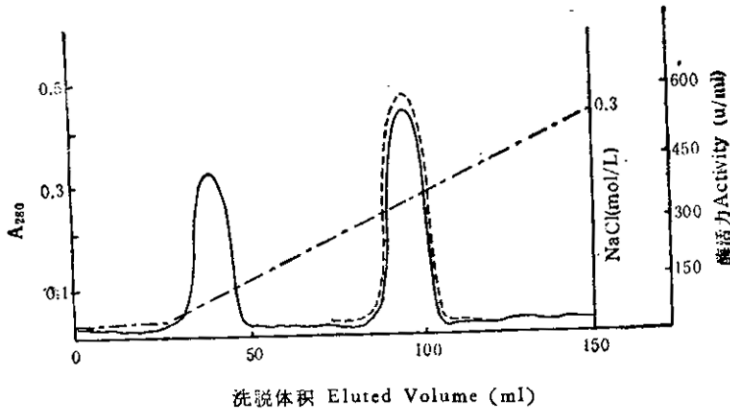


图2 糖化酶用 CM-Cellulose C52 再层析

Fig. 2 Rechromatography of glucoamylase on CM-Cellulose C52

样品 Sample volume: 25ml, 柱 Column: 2×20 cm; 分部 Fraction volume: 5ml; — A_{280} ; --- 酶活力 Enzymatic activity

表1 根霉葡萄糖淀粉酶的纯化结果*

Table 1 Summary of purification of glucoamylase from *Rhizopus* sp.

步骤 Steps	总体积 Total volumn (ml)	总活力 Total acitivity (u)	总蛋白 Total protein (mg)	比活力 Specific activity (u/mg)	产率 Yield (%)	提纯倍数 Purification factor/step
抽提液 Extract	50	17500	296	59	100	1
DEAE-Sephadex A-50	80	15750	75	210	90	3.56
Sephadex G-100		13390	12.5	1074	76.5	5.11
CM-cellulose C52		12250	8.75	1400	70	1.30

* 1. 葡萄糖淀粉酶单位见“材料与方法”一节。

The enzymatic unit of glucoamylase see “Material and Methods”.

2. 按原始抽提液的相对酶活力计算产率。

The yield is calculated from the amount of activity at each step relative to the amount in the initial sample solution.

3. 提纯倍数按每步比活增加计算。

The purification factor of a step is calculation on the basis of the increase in specific activity after that step.

以含 0—0.3mol/L 氯化钠的 0.01mol/L pH 4.6 醋酸缓冲液 150ml 梯度洗脱, 流速 0.4 ml/min, 分部收集检测(图 2)。第二峰为糖化酶活力部分, 活力回收达 70% 左右。

以上三步分离纯化结果如表 1 所示, 比活力提高 23.7 倍, 产率达 70%。

(四) 糖化酶的纯度鉴定

1. 紫外光谱: 将 Sephadex G-100 和 CM-Cellulose C52 层析所得的糖化酶部分透析后, 以 0.005 mol/L pH4.6 醋酸缓

冲液为对照, 于 UV-265 紫外分光光度计上扫描(图 3)。经 Sephadex G-100 层析的糖化酶在 280nm 波峰不十分对称, $A_{210}/A_{260} = 1.56$, 但经 CM-Cellulose C52 层析的糖化酶其 280nm 波峰对称, $A_{210nm}/A_{260nm} = 1.89$, 按 Lowry 的^[20] Folin-酚法, 以牛血清白蛋白为标准, 测得该糖化酶 $A_{280}^{1\%} = 14.70$

2. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 将 Sephadex G-100 和 CM-Cellulose C52 层

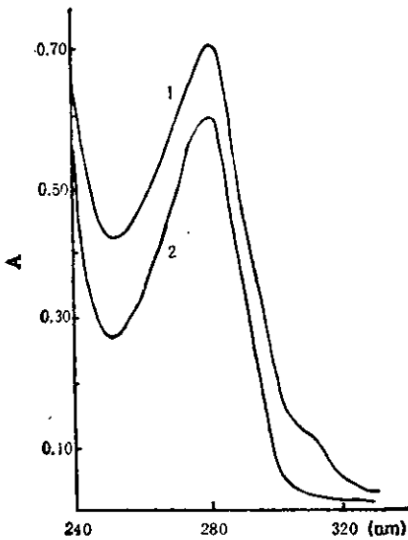


图3 糖化酶的紫外光谱

Fig. 3 The UV-spectra of glucoamylase

1. Sephadex G-100 凝胶过滤的样品 From Sephadex G-100 gel filtration
2. CM-Cellulose C52 再层析的样品 From CM-Cellulose C52 rechromatography

析的糖化酶部分,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。图4表明,经 Sephadex G-100 层析的糖化酶除一条主带外,还有一次带。而经 CM-Cellulose C52 重层析而得的糖化酶,只有一条带,达到了电泳均一纯度。

(五) 分子量测定

1. 按 Laemmli^[21] 方法,采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定。凝胶浓度为 7.5%, 将低分子量标准蛋白溶于含 2% SDS、5% 二硫苏糖醇的 0.01mol/L pH8.0 的 Tris-HCl 溶液中,样品作同样处理。电流控制在每孔 4mA, 电泳 4 小时,考马斯亮蓝 G-250 染色(图 4)。以相对迁移率为横坐标、分子量对数为纵坐标作图,计算该糖化酶的分子量约为 78400。

经 DTT 还原后的 PAGE 图谱还表明,该糖化酶是一个不具亚基结构的单链蛋白质。



图4 糖化酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 4 Electrophoretic plate of glucoamylase on SDS-PAGE

A和C行: 经 CM-Cellulose C52 柱的纯酶
Lane A and C: Pure glucoamylase from CM-Cellulose C52 rechromatography

B行: 标准蛋白质 Lane B: Standard protein
磷酸化酶 b Phosphorylase b (94000); 牛血清白蛋白 BSA(67000); 卵清蛋白 Ovalbumin (43000); 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase (30000); 胰酶抑制剂 Trypsin inhibitor (20100); α -乳清蛋白 α -lactalbumin(14400)

D行: 经 Sephadex G-100 柱的糖化酶

2. 按 Andrews 法^[22], 以乳酸脱氢酶、血清白蛋白、胰蛋白酶抑制剂和细胞色素 C 为标准, 进行 Sephadex G-150 分子筛过滤, 以洗脱体积为横坐标、分子量对数为纵坐标作图, 结果如图 5。糖化酶的分子量仍为 78400。

(六) 氨基酸组成分析

取约 0.5mg 冰冻干燥样品, 加入约 0.5ml 5.7mol/L 恒沸盐酸, 抽真空, 充氮气, 封管, 于 105℃ 水解 24 小时, 开管后除去盐酸, 加入 0.5ml 0.2mol/L 盐酸溶液, 取 10 μ l 进行氨基酸分析, 其结果列于表 2。

表2 汾酒大曲根霉葡萄糖淀粉酶的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of glucoamylase produced by *Rhizopus* sp. from Fen-Jiu Koji

氨基酸 Amino acid	平均残基数/100 残基 Average residues/100 residues	残基数/mol 酶 Residues/mole enzyme
Lys	5.47	28
His	0.98	5
Arg	3.13	16
Asp	11.52	59
Thr	8.79	45
Ser	9.18	47
Glu	6.05	31
Pro	4.10	21
Gly	8.79	45
Ala	11.52	59
Cys	/	/
Val	6.05	31
Met	1.17	6
Leu	7.42	38
Ile	5.27	27
Tyr	5.47	28
Phe	5.08	26
Total	100.00	512

注: 按水解24小时计算其组成, 未作任何修正, 半胱氨酸未计算, 色氨酸未进行测定。

Note: Composition was calculated from 24h hydrolysate and no correction was done. Cysteine was no calculated. Trptophan was no estimated.

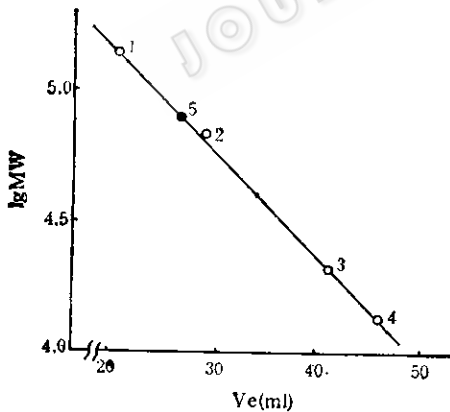


图5 凝胶过滤法测定糖化酶的分子量
Fig. 5 Determination of glucoamylase molecular weight on Sephadex G-150
标准蛋白如下: The standard proteins are as follows:

1. 乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase (136000);
2. 牛血清白蛋白 BSA (67000);
3. 胰酶抑制剂 Trypsin inhibitor (20100);
4. 细胞色素C Cytochrome C(133700);
5. 糖化酶 Glucoamylase (78400)

讨 论

微生物酶的分离纯化历来是酶学研究中最重要也是最为棘手的问题, 尤其对于分子量较大的酶更是如此。早期对真菌(如黑曲霉和德氏根霉)糖化酶的纯化均采用硫酸铵沉淀法, 然后用酸处理使少量的 α -淀粉酶失活^[3,4]。之后又发展了淀粉吸附、硫酸铵分级分离、凝胶过滤、离子交换层析等纯化方法, 其中较为成功的是黑曲霉^[7]和红曲霉^[6]。到目前为止, 绝大多数来源不同的真菌糖化酶的纯化工作仍十分繁琐, 活力回收较低, 尤其是根霉所产糖化酶^[8-10], 纯化步骤大多在六步以上。我们从汾酒大曲根霉 *Rhizopus* sp. 的诱变株出发, 经 DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-100、CM-Cellulose C52 三步柱层析,

得到了电泳均一的糖化酶, 活力回收达 70% 左右, 比活力提高约 23.70 倍。经紫外光谱、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检验皆证明是均一的。为进一步对其物理化学性质及反应机理的研究提供了方便。

根霉和曲霉所产糖化酶溶液在弱阴性和弱阳性离子交换剂上的层析行为有较大差异。对于根霉糖化酶的纯化, 第一步用阴离子交换层析 (DEAE-Sephadex 或 DEAE-cellulose), 第二步为阳离子交换层析 (CM-Sephadex 或 CM-Cellulose)^[6-10]; 而曲霉所产糖化酶的纯化, 不使用阳离子交换树脂, 而是重复使用(两次, 甚至三次)阴离子交换层析^[6,7], 说明根霉型与曲霉型在微观上确有一定差异。我们比较了根霉型与曲霉型糖化酶的氨基酸组成, 两者在赖氨酸和谷氨酸含量上的确差异较大, 因此二者等电点也截然不同^[5,9]。本文报导的这株根霉所产糖化酶属典型的根霉型。

参 考 文 献

[1] Tsujisaka, Y. et al.: *Nature*(London), **181**: 770, 1958.
 [2] Tsujisaka, Y.: *Bull. Osaka Munic. Techn. Res. Inst.*, **23**: 1, 1960.
 [3] Phillips, L. L. et al.: *J. Amer. Chem. Soci.*, **73**: 3565, 1951.
 [4] Weill, C. E. et al.: *Cereal Chem.*, **31**: 150,

1954.
 [5] Pazur, J. H. et al.: *Carbohydr. Res.*, **20**: 83, 1971.
 [6] Medda, S. et al.: *J. Fac. Agr., Kyushu Univer.*, **26**: 139, 1982.
 [7] Manjunath, P. et al.: *J. Biosci.*, **1**: 409, 1979
 [8] Ueda, S. et al.: *Die Starke*, **27**: 123, 1975.
 [9] Takahashi, T. et al.: *J. Biochem.*, **84**: 1183, 1978.
 [10] Abe, J. I. et al.: *J. Appl. Biochem.*, **7**: 235, 1985.
 [11] Pazur, J. H. et al.: *Carbohydr. Res.*, **4**: 371, 1967.
 [12] Ohga, M. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **30**: 967, 1966.
 [13] Bhell, R. S. et al.: *Anal. Biochem.*, **140**: 200, 1984.
 [14] Mahajan, P. B. et al.: *Anal. Biochem.*, **133**: 482, 1983.
 [15] Takahashi, T. et al.: *J. Biochem.*, **89**: 125, 1981.
 [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**: 200, 1976.
 [17] 褚西宁等: *山西大学学报(自然科学版)*, **3**: 81, 1984.
 [18] 袁静明等: *山西大学学报(自然科学版)*, **1**: 59, 1985.
 [19] 蔡武斌等, *生物物质常用化学分析法*, 科学出版社, 北京, p.9, 1982.
 [20] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
 [21] Laemmli, U. K.: *Nature*(London), **227**: 15, 1970.
 [22] Andrews, P.: *Biochem. J.*, **96**: 595, 1965.
 [23] Moore, S. et al.: *Methods in Enzymology*, (ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan.), Academic Press, New York, **6**: 819, 1963.

A SIMPLE PURIFIED METHOD AND SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF GLUCOAMYLASE PRODUCED BY *RHIZOPUS* SP.

Yuan Jingming Xu Weidong Chu Xining

(Department of Biology, Shanxi University, Taiyuan)

An electrophoretic homogeneous preparation of glucoamylase produced by *Rhizopus* sp. was obtained with only three steps column chromatography. The strain mutated was a high glucoamylase-producing one. After extracting the solid bran with water, the extract free from bran was supplied to DEAE-Sephadex A-50 column. Then the part containing glucoamylase activity was packed to Sephadex G-100 column and the fraction of glucoamylase was rechromatographed on CM-Cellulose C52 at last. through the three steps as mentioned above, a quite pure enzyme preparation was detected with both UV-spectra

and electrophoresis. The molecular weight of the enzyme was about 78400 determined by SDS-PAGE and gel filtration respectively. The amino acid analysis showed that the enzyme had more quantity of lysine residues. It is estimated that the enzyme belongs to the typical *Rhizopus*-type glucoamylase as reported in references.

Key words

Rhizopus sp.; Glucoamylase; Purification