

黑曲霉糖化酶的分离纯化及其性质

陈冠军* 罗贵民** 程玉华

(吉林大学酶工程实验室, 长春)

采用硫酸铵分级、DEAE-纤维素离子交换层析、Sephadex G-150 凝胶过滤等方法, 从黑曲霉 AS 3.4309 变异株 B-11 的发酵液中分离出三种电泳均一的糖化酶(GI、GIII、GII)。其收率分别为 0.8%、50% 和 18.6%。GI、GIII 和 GII 的分子量分别为 27000、67000 和 53000; 等电点分别为 3.38、3.52 和 3.59; 含糖量分别为 8.7%、13.6% 和 18.3%; 最适 pH 分别为 4.4、4.6 和 4.6; 对可溶性淀粉的 K_m 值分别为 2.0、0.77 和 1.18g/L; 二级结构中 α -螺旋含量分别为 18.4%、23.9% 和 28.9%; 最适温度均为 70℃。

生淀粉可吸附 GIII, 吸附率达 80%。此外还测定了三种同工酶的氨基酸组成及含量。GI、GII 和 GIII 均由一条多肽链组成。

关键词 黑曲霉; 糖化酶同工酶

糖化酶 (EC 3.2.1.3) 能从淀粉的非还原端顺次水解 α -1, 4 糖苷键, 生成葡萄糖^[1], 并象 β -淀粉酶一样, 使水解下来的葡萄糖发生构型改变, 形成 β -葡萄糖^[2]。从国外的研究结果看, 即使同一菌种(如黑曲霉)的糖化酶, 由于菌株的不同, 其糖化酶的组成、结构及性质亦各不相同^[3-5]。

黑曲霉是我国生产糖化酶制剂的主要菌种。为了更好地开发利用我国的糖化酶资源, 我们对黑曲霉糖化酶进行了分离提纯, 得到了电泳均一的糖化酶, 并对其性质进行了研究。

材料和方法

(一) 材料

1. 粗酶制剂由吉林省永吉县酶制剂厂提供, 产酶菌株为黑曲霉 AS 3.4309 变异株 B-11。

2. DEAE-纤维素 (DE-52) 购自 Whatman 公司; Sephadex G-150 (粒度 40—120 μ) 购自 Pharmacia 公司; 考马斯亮蓝

R 250 为 Fluka 产品; 牛血清白蛋白由中国科学院生物物理所生化试剂厂生产; 可溶性淀粉为中国医药公司北京采购供应站经销品; 玉米淀粉由长春市淀粉厂生产; 标准蛋白 (HMW 和 LMW) 系 Pharmacia 公司产品; 载体两性电解质 (pH 3—9 和 pH 2.5—4.2) 为 Pharmacia 产品; 甘露糖为英国 B. H. D 进口分装; 其它药品均为分析纯或化学纯试剂。

3. 主要仪器: 全套低温层析系统 (瑞典 LKB 产品); J2-21M 高速冷冻离心机 (美国贝克曼公司产品); 垂直型聚丙烯酰胺凝胶电泳系统 (瑞典 LKB 产品); UV-120 紫外可见分光光度计 (日本岛津产品); W-ZZ-1 型自动指示旋光仪 (上海物理光学仪器厂); 835 型氨基酸自动分析仪 (日本日立产品); J-500C 型圆二色谱仪 (日本分光产品)。

本文于 1989 年 7 月 5 日收到。

* 现地址: 山东大学微生物系。

** 联系人。

(二) 实验方法

1. 酶活力测定: 采用 Nelson-Somogyi 比色法^[6]。酶活力单位 (IU) 定义为在分析条件下, 每小时生成 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个活力单位。

2. 蛋白质浓度测定用改进的 Folin-酚法测定^[7], 以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

3. 酶纯度鉴定采用垂直板型聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳和梯度电泳法^[8]。圆盘电泳的浓缩胶为 4.6%, 分离胶为 7.7%, 交联度为 2.5%, 125V 电泳 10 小时。梯度电泳的胶浓度为 4—30%, 交联度 4%, 电泳 2500—3000 伏特·小时。电泳后均用考马斯亮蓝 R250 染色。

4. 反应产物的鉴定: 采用纸层析法^[9]和构型测定法^[9,10]。展层剂为正丁醇: 吡啶: 水=6:4:3 (V/V); 显色剂为 4% (W/V) 二苯胺丙酮溶液; 4% (V/V) 苯胺丙酮溶液; 85% 磷酸=5:5:1, 80℃ 显色 10 分钟。构型测定用旋光仪监测反应体系的旋光值变化来完成。在 20ml 反应体系中含 0.5% 可溶性淀粉和约 400 IU 的糖化酶。于 30℃ 开始反应, 同时测定旋光度变化。当旋光度趋于稳定时, 加入 0.4g Na₂CO₃ 使反应液 pH 上升至约 9—10, 然后观察旋光度的变化。

5. 酶的分子量及亚基组成测定: 用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳及 SDS-梯度凝胶电泳法^[11]。使用的标准蛋白质为高分子量试剂盒 (HMW) 含甲状腺球蛋白 (669000)、铁蛋白 (446000)、过氧化氢酶 (232000)、脱氢酶 (140000)、白蛋白 (67000); 低分子量试剂盒 (LMW) 含细胞色素 C (11700)、肌红蛋白 (17200)、γ-球蛋白 (23500)、碳酸酐酶 (29000)、白蛋白 (68000)、铁传递蛋白 (77000)。电泳条件与 (3) 相同。

6. 酶的等电点测定: 采用分析型薄层聚焦电泳法^[12]。

7. 蛋白质中糖含量测定按苯酚-硫酸法^[12]进行, 以甘露糖作标准。

8. 生淀粉对酶的吸附作用的测定参照 Hayashida 法进行^[13]。将 1.0g 玉米淀粉加入到 9.0mL 0.1 mol/L pH 4.6 的醋酸缓冲液中, 内含约 400IU 酶。于 4℃ 振摇 25 分钟后, 离心, 取上清液, 测定酶活力。按下式计算淀粉对酶的吸附率:

$$\text{酶吸附率}(\%) = \frac{\text{原酶液活力} - \text{上清液酶活力}}{\text{原酶液活力}} \times 100\%$$

9. 氨基酸分析用氨基酸自动分析仪进行。取 0.2mg 纯酶液, 加入等体积的分析纯盐酸和一滴巯基乙醇, 水解管封口后, 置于 105℃ 烘箱中水解 24 小时。将水解液蒸干后, 加入 1.0—1.5ml 水溶解备测。色氨酸含量测定另按文献 [14] 进行。

10. CD 谱用 J-500C 圆二色谱仪测定, 参照文献 [15] 所述的单值法公式计算 α-螺旋含量。

实验结果

(一) 酶的纯化

将工厂生产的酶发酵液离心 (4000r/min, 20min) 后, 将上清液置于布氏漏斗过滤, 滤液再离心 (15000r/min, 15min), 上清液作为粗酶液。

取粗酶液 50ml, 加固体硫酸铵到 50% 饱和度, 置冰箱过夜。然后于 4℃ 离心 (15000 r/min, 20 min), 取上清再加硫酸铵至 75% 饱和度, 置冰箱过夜后离心 (15000 r/min) 将沉淀溶于 20 ml 蒸馏水中。

将硫酸铵分级后的酶液置超滤器内 (内装 PM-10 滤膜), 用柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (0.05 mol/L, pH 7.6) 透滤, 然后进行 DEAE-纤维素柱层析。柱 (2.2 × 25cm) 用 0.05 mol/L, pH 7.6 柠檬酸-磷

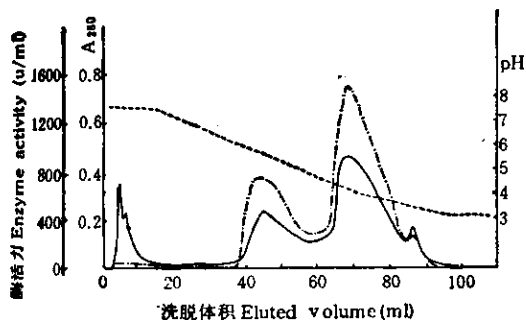


图1 黑曲霉糖化酶的 DEAE-52 柱层析
 --- 糖化酶活力 (u/ml); — 蛋白质浓度 (A_{280});
 ----- pH 梯度

Fig. 1 DEAE-52 cellulose column chromatographic purification of *A. niger* glucoamylases

--- glucoamylase activity (u/ml);
 — protein concentration; ----- pH gradient

酸氢二钠缓冲液平衡。上样后先用平衡缓冲液洗脱至流出液光密度值 (280 nm) 最低, 然后改为 pH 梯度洗脱 (pH 7.6—3.4 的 0.05 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液), 洗脱速度为 30ml/h, 7.5ml/管, 层析温度为 4℃。层析结果见图 1。共有三个活力蛋白峰, 酶活力主要分布在第一和第二洗脱峰中。收集各活力峰, 冻干。

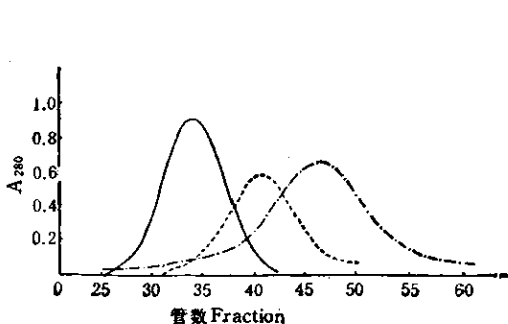


图2 三种黑曲霉糖化酶分别在 Sephadex G-150 柱上的凝胶过滤

— GII; --- GIII; ----- GI

Fig. 2 Gel-filtration of each of the 3 DEAE-purified samples of *A. niger* glucoamylases on Sephadex G-150

将上述提纯的三个酶组分冻干品分别溶于 4—5ml 蒸馏水中, 然后分别进行 Sephadex G-150 柱层析。柱 (2.1 × 110cm) 用 pH 5.8, 0.02 mol/L 醋酸缓冲液平衡。上样后, 用相同缓冲液洗脱, 流速为 14ml/h, 每管收集 4ml。层析结果如图 2 所示。

通过以上步骤, 从糖化酶粗酶液中分离得到三个活力组分。经垂直板型聚丙烯

表 1 黑曲霉糖化酶的分纯化

Table 1 Purification of the glucoamylases from *Aspergillus niger*

提纯步骤 Purification step	体 积 Volume (ml)	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity (u)	比活力 Specific activity (u/mg)	收 率 Yield (%)
粗酶液 Crude enzyme	50	1312	442000	336.8	100
硫酸分级 Ammonium sulfate fraction	20	661	395000	597.8	89.4
DEAE-纤维素 DEAE-52 Cellulose					
GI	68	15.6	10740	690	2.4
GIII	211	320.7	243880	760	55.2
GII	177	94.2	82300	874	18.6
凝胶过滤 Sephadex G-150					
GI	44	4.8	3485	732	0.8
GIII	116	285.8	212050	744	50
GII	60	84.2	82140	975	18.6

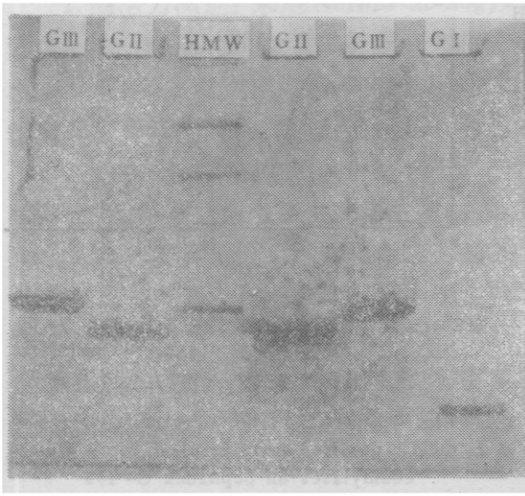


图3 三种黑曲霉糖化酶的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳图谱

HMW 为高分子量标准蛋白混合物(所含标准蛋白见正文),电泳 2500V · h, 用考马斯亮蓝 R250 染色。

Fig. 3 Polyacrylamide gel gradient electrophoresis diagram of 3 different glucoamylases from *A. niger*

HMW: Standard protein mixture (high molecular weight) for electrophoresis conditions see text

酰胺凝胶梯度电泳检验,这三个组分均为单一的蛋白带(见图3),说明三组分都是电泳均一的酶制剂。根据国际上关于多组分酶的命名规则^[6],按各组分电泳迁移率大小的顺序,分别称之为糖化酶 I、II 和 III (GI、GII 和 GIII)。黑曲霉糖化酶的分离纯化结果示于表 1。

(二) 酶催化反应产物的鉴定

黑曲霉在生长过程中,除了产生并分泌糖化酶外,还产生和分泌少量的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶。有些黑曲霉菌株产生的 α -淀粉酶也能完全降解可溶性淀粉,因此为了证实所得到的三个酶组分是糖化酶,对酶的水解淀粉后的产物进行了定性分析。

取酶解液点在新华一号滤纸上,于室

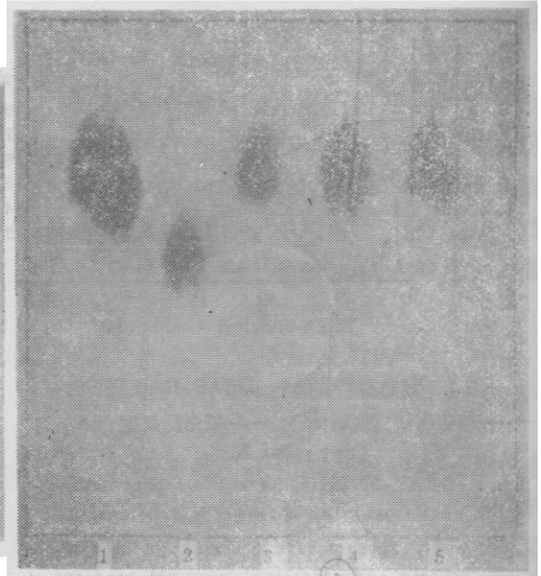


图4 三种糖化酶水解可溶性淀粉其产物的纸层析图谱

Fig. 4 Paper chromatogram of the products formed by hydrolysis of soluble starch with the three glucoamylases

1. 葡萄糖 Glucose; 2. 麦芽糖 Maltose;
3. GI; 4. GII; 5. GIII

温层析 10 小时后显色。由图 4 可见,提纯的三个酶组分水解淀粉的产物全部是葡萄糖。

用旋光仪监测三个酶反应体系旋光度随时间的变化结果如图 5。在加入 Na_2CO_3 后,三个反应体系的旋光度明显增加。这种变旋作用说明酶反应产物都是 β -葡萄糖^[7]。

(三) 分子量测定

GI、GII 和 GIII 在聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳上的图谱如图 3 和图 6 所示。由于在这两种梯度电泳中 GI、GII 和 GIII 的电泳行为一样,所以 GI、GII 和 GIII 均由单条多肽链组成。根据其电泳迁移率算得其分子量分别为 27000、53000 和 67000,说

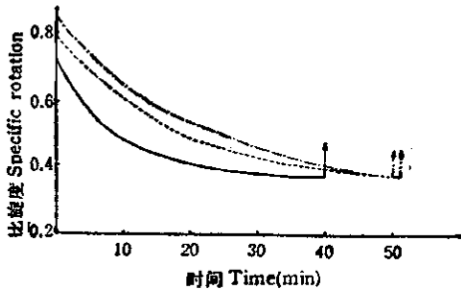


图5 黑曲霉糖化酶 (GI、GII、GIII) 对可溶性淀粉作用的旋光度变化

Fig. 5 Specific rotation changes during hydrolysis of soluble starch by the 3 glucoamylases

— GI; --- GII; - · - · - GIII

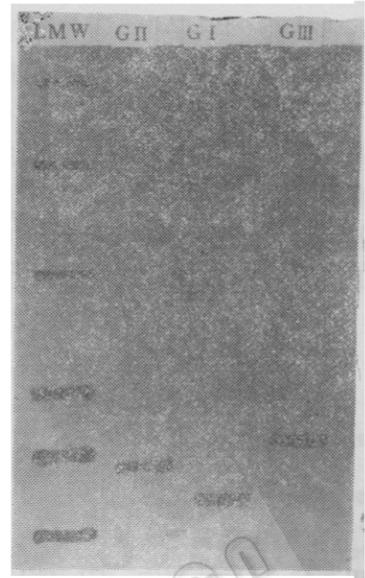


图6 三种黑曲霉糖化酶的 SDS 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳图谱

LMW: 低分子量标准蛋白混合物; 异丙醇脱色后, 用考马斯亮蓝染色

Fig. 6 SDS polyacrylamide gradient gel electrophoresis diagram of the 3 glucoamylases from *A. niger*

LMW: Standard protein mixture (low molecular weight)

明 GI、GII 和 GIII 为糖化酶同工酶。

(四) 等电点测定

先用 pH 3—9 的载体两性电解质作等电聚焦电泳, 测得 GI、GII 和 GIII 的等电点均在 pH 3—4 之间。改用 pH 2.5—4.2 的载体两性电解质, 精确测定其等电点。GI、GII 和 GIII 的等电点分别为 3.38、3.59 和 3.52。

表2 三种糖化酶同工酶的氨基酸组成

Table 2 Amino acid compositions of the 3 glucoamylase isoenzymes

同工酶 Isoenzyme	氨基酸 Amino acid								
	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys*	Val	Met
GI	26.83	19.66	24.87	16.04	18.35	22.61	2.05	13.07	1.00
GII	55.58	59.40	56.87	33.65	36.55	47.40	5.78	30.31	2.00
GIII	49.20	47.60	55.50	32.14	34.61	48.21	3.91	23.82	2.00
	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Prg	Try**
GI	7.29	15.81	8.68	7.61	4.26	1.59	7.94	11.50	4.14
GII	16.49	32.35	21.19	17.19	9.77	2.55	16.26	26.80	10.61
GIII	13.22	31.90	15.74	15.76	8.80	2.84	14.59	28.222	7.99

* Cys 含量未校正。

Values were not corrected for destruction.

** 由紫外吸收法测得值。

Values were determined by ultraviolet absorption method.

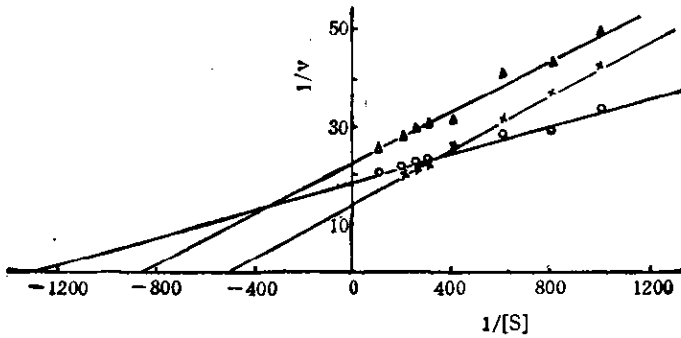


图7 糖化酶作用于可溶性淀粉的 Lineweaver-Burk 图
Fig. 7 Lineweaver-Burk plots of the glucoamylases acted on soluble starch

—x— GI; —o— GII; —▲— GIII

(五) 糖含量测定

用苯酚-硫酸法测定。GI、GII 和 GIII 的糖含量分别为 8.7%、18.3% 和 13.6%。

(六) 生淀粉对酶的吸附作用

试验结果表明,只有 GIII 能被生淀粉吸附,吸附率达 80%,而 GI 和 GII 则基本不被吸附。

(七) 氨基酸组成分析

以含量最少的 Met 为基数,求出各氨基酸的最小摩尔比,再根据各同工酶的分子量(扣除糖含量部分),求出各同工酶的氨基酸组成(表 2)。

三种同工酶中酸性氨基酸的含量为 18—20%,而碱性氨基酸约占 6%,因此,它们的等电点较低。

(八) 酶作用的最适 pH

用不同 pH 值(pH 2.0—7.0)柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(0.1 mol/L)代替活力测定中的 0.125 mol/L, pH 4.6 的缓冲液,并测定酶活力,以活力最大者为 100%。

GI、GII 和 GIII 的最适 pH 分别为 4.4、4.6 和 4.6。

(九) 酶作用的最适温度

在 pH 4.6, 30°C—85°C 条件下测定三种同工酶的活力。三种同工酶的最适温度

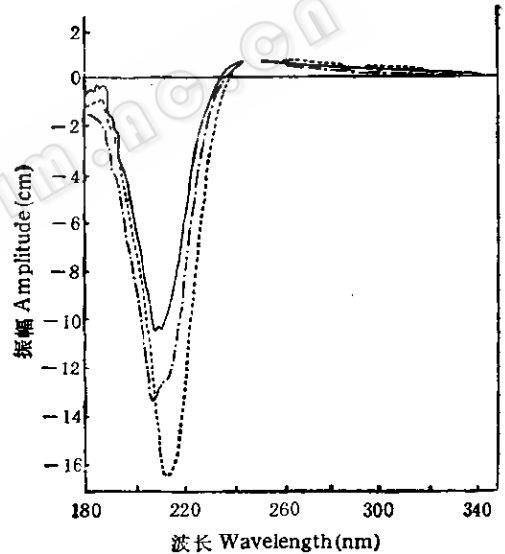


图8 三种糖化酶同工酶的 CD 光谱
Fig. 8 CD spectra of the 3 glucoamylase isoenzymes.

----- GI (0.597mg/ml); — GII (0.381 mg/ml); -·- GIII (0.422 mg/ml)

均为 70°C。这与黎高翔等人报道的半纯品糖化酶的最适温度一致^[4]。

(十) 酶作用于可溶性淀粉的米氏常数

固定酶量,在不同浓度可溶性淀粉存在下测定反应速度。由 Lineweaver-Burk

作图法求得 GI、GII 和 GIII 的 K_m 值分别为 2.0、1.18 和 0.77g/L (图 7)。三种同工酶对可溶性淀粉的亲合力不同, 其中 GIII 的亲合力最大。

(十一) 酶的圆二色性光谱

GI、GII 和 GIII 的 CD 光谱见图 8。GII 和 GIII 的谱图相似, 在 208nm 和 212 nm 处有 α -螺旋特征的双驼峰, 但比标准的 α -螺旋的双负峰范围 (208—212 nm) 窄。GI 的 CD 谱无双负峰, 只在 214nm 有一个负峰。相对 GII、GIII 峰位有所红移, 接近 β -折叠的负峰区 (215—218nm)。这可能是由于 GI 的 β -折叠含量较高。根据草皇法公式求出 GI、GII 和 GIII 的 α -螺旋含量分别为 18.4%、28.9% 和 23.9%。

讨 论

三种同工酶的分子量大小顺序是 GIII > GII > GI, 但三者 in Sephadex G-150 上的行为异常: 分子量最大的 GIII 比分子量最小的 GI 洗脱体积还要大, 并且 GIII 的洗脱峰带也相应较宽。我们认为, 这种异常现象可能是由于 GIII 对葡聚糖凝胶的吸附作用造成的。GIII 对淀粉的亲合力较强也间接说明 GIII 对葡聚糖的吸附能力高于 GII 和 GI。

三种同工酶的最适 pH 和最适温度相近和相同, 说明它们的催化部位结构相似或相同。但它们的理化性质和酶学性质各不相同。GI 分子量大约是 GII 和 GIII 的一半, 但氨基酸组成的比例相似。这暗示 GII、GIII 应由二个亚基组成, GI 是解聚的单体。然而实验结果却证明, 三种同工酶都由一条多肽链组成。小分子量的 GI 具有完整的催化部位结构, 而 GII 和 GIII 多于 GI 的那部分肽段则可能起着稳定活性部位和增强结合底物能力的作用。GIII 比 GII 多一个约含 100 个残基的肽段, 这

个肽段可能是 GIII 能被生淀粉吸附的原因所在。

糖化酶的多型性可能由下述三个原因引起: 一是基因调控、转录的方式不同; 二是蛋白质合成的修饰作用不同, 即结合糖量不同; 三是在发酵过程中受到自身蛋白水解酶和糖苷酶的作用, 由糖化酶的原始形式衍变成糖化酶的各种同工酶形式^[19,20]。

参 考 文 献

- [1] Kerr, R. W. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**: 3559, 1951.
- [2] Weill, C. E. et al.: *Cereal Chem.*, **31**: 151, 1957.
- [3] Pazur, J. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **234**: 1966, 1959.
- [4] Linerback, D. R. et al.: *Cereal Chem.*, **49**: 285, 1972.
- [5] Paszczyński, A. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**: 234, 1985.
- [6] Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**: 19, 1952.
- [7] 张龙翔等: 生化实验方法与技术, 第165页, 人民教育出版社, 北京, 1981年。
- [8] Pharmacia Laboratory Separation Division: Polyacrylamide Gel Electrophoresis Laboratory Techniques, E Printed in Sweden by Rahms i Lund, 1984.
- [9] 王扬声等: 微生物学报, **20**(4): 398, 1980.
- [10] Tamasaki, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**: 2149, 1977.
- [11] Anders, W. et al.: *Analytical Electrofocusing in Thin Layers of Polyacrylamide Gel*, LKB Application Note 250, 1980.
- [12] Dubois, M. et al.: *Anal. Chem.*, **28**: 350, 1965.
- [13] Hayashida, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**: 2093, 1977.
- [14] 郭尧君编著: 分光光度技术及其在生物化学中的应用, 第225页, 科学出版社, 北京, 1987年。
- [15] 鲁子贤等: 圆二色性和旋光色散在分子生物学中应用, 第79页 科学出版社, 北京, 1987年。
- [16] Venkataramu, K. et al.: *Indian J. Biochem. Biophys.*, **12**: 107, 1975.
- [17] Thomo, J. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **235**: 2511, 1960.
- [18] 黎高翔等: 微生物学报, **19**(2): 150, 1979.
- [19] Boel, E. et al.: *EMBO J.*, **3**: 1097, 1984.
- [20] Yashino, E. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **56**: 289, 1978.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE GLUCO-AMYLASES FROM *ASPERGILLUS NIGER*

Chen Guanjun Luo Guimin Cheng Yuhua

(Enzyme Engineering Laboratory, Jilin University, Changchun)

Three isoenzymes of glucoamylases, GI, GII, and GIII, were isolated from fermentation broth of the mutant *Aspergillus niger* AS 3.4309 by using ammonium sulfate fraction DEAE cellulose column chromatography and Sephadex G-150 gel filtration. The yields of GI, GIII and GII were 0.8%, 50%, and 18.6% respectively.

The molecular weights of GI, GIII, and GII were 27000, 67000 and 53000, respectively, and they all consist of single polypeptide chain; their isoelectric points were 3.38, 3.52 and 3.59; the K_m values for soluble starch

were 2.0, 0.77 and 1.18 g/L; the optimum pH were 4.4, 4.6 and 4.6, respectively; the optimum temperatures were all 70°C. GIII can be adsorbed by raw starch with adsorption yield of 80%.

In addition, amino acid compositions of the 3 isoenzymes and their CD spectra were determined.

Key words

Aspergillus niger; Glucoamylase isoenzymes