

黑曲霉 S4 生淀粉糖化酶的分离纯化及其特性*

方善康 周凤臻

(山东大学微生物学系, 济南 250100)

用酒精沉淀、Sephadex G-100 凝胶过滤和离子交换柱层析等步骤对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) S4 的生淀粉糖化酶进行了分离, 纯化出三个电泳纯组分 (GI、GII 和 GIII), 纯化倍数分别为 5.4、6.0 和 1.9; 酶活收率分别为 10.2%、10.7% 和 1.9%。三个组分均为酸性糖蛋白, 其糖含量分别为 11.68%、8.6% 和 3.6%; pI 值分别为 4.0、3.9 和 3.6; 分子量分别为 138000、62000 和 57500。通过对这三个组分的性质和它们对生淀粉作用的 V_{max}/K_m 值的测定, 探讨了生淀粉糖化酶的作用机理。

关键词 黑曲霉; 生淀粉糖化酶

葡萄糖糖化酶 (EC3.2.1.3, 1,4- α -D 葡聚糖水解酶) 是一胞外酶, 它可以连续不断地从淀粉和糖元的非还原末端除去葡萄糖单元^[1]。该酶的主要产生菌为霉菌, 工业中常用的是黑曲霉。很多菌都可水解蒸煮糊化淀粉产生葡萄糖, 但不一定能水解生淀粉。葡萄糖糖化酶可水解生淀粉, 简称为生淀粉糖化酶。它已被用于生淀粉质原料的无蒸煮酒精发酵, 可节约总能耗的 30—40%^[2], 因而对生淀粉糖化酶的研究日益得到重视。但由于它的较大的分子量及其组分的复杂性等原因, 有关黑曲霉生淀粉糖化酶的结构与功能之间的关系, 至今尚未研究清楚。为此我们对黑曲霉 S4 的生淀粉糖化酶进行了分离纯化, 研究它的理化性质, 并探讨其结构与功能的关系。

材料和 方法

(一) 材料

1. 菌种: 黑曲霉 S4 (*Aspergillus niger* S4) 由本实验室分离、保存。
2. 培养基: 麸皮: 水 = 1:1, 1kg/cm² 灭菌 20 分钟。
3. 主要试剂: 玉米淀粉、马铃薯淀粉、可溶性淀粉 (浙江菱湖淀粉厂出品); 葡萄糖、DEAE-Sephadex A-25、Sephadex G-100 (Pharmacia 出品); pH3.5—10.0 和 pH 2.6—4.0 的两性载体 (LKB 出品); 考马斯亮兰 G-250、十二烷基硫酸钠、No. 4 透析袋 (Fluka 进口); 其它试剂均为 A.R 级。

(二) 方法

1. 生淀粉糖化酶活性测定: 以生玉米淀粉、甘薯淀粉和马铃薯淀粉为底物, 参照 DNS 法^[3-4]测定; 以可溶性淀粉为底物, 按 Bringer 法^[5]处理后, 用 Somogyi-Nelson 法^[4]测定。

本文于 1991 年 4 月 9 日收到。

* 国家“七五”攻关课题。

在 pH4.5、40°C 反应 10 分钟, 每分钟释放 1mg 还原糖(以葡萄糖计)所需的酶量定义为一个活性单位。

2. 纤维素酶、木聚糖酶和果胶酶活性的测定: 把原酶液分别与这三种酶的底物(纤维素、木聚糖和果胶)按 Bringer 法^[5]处理后, 用 Somogyi-Nelson^[6]法测定。在 pH4.5、40°C 反应 1 小时, 每分钟产生 1mg 葡萄糖(纤维素酶)、木糖(木聚糖酶)和半乳糖醛酸(果胶酶)所需的酶量分别定为一个活性单位。

3. 蛋白酶活性的测定: 按 Hayashida 方法^[6], 每分钟分解干酪素产生 1mg 的酪氨酸所需的酶量, 定为一个活性单位。

4. α -淀粉酶活性的测定: 参照文献 [3], 以每 10 分钟释放 1 μ mol 还原糖所需酶量定为 1 个活性单位。

5. 纯化酶组分总糖含量的测定: 采用苯酚-硫酸法^[7]。

6. 纯化酶组作用产物的纸层析: 将 2% 可溶性淀粉的酶解液, 以葡萄糖为标准, 按文献 [7] 进行纸层析。

7. 纯化酶组分纯度的鉴定: 参照文献 [8], 选用 7% 的凝胶, 以 pH8.3 的 Tris-甘氨酸为缓冲液。

8. 旋光度的测定: 参照 Yamasaki 方法^[9], 测定酶与底物的混合物的旋光度变化。

9. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测分子量^[6]: 采用 7.5% 胶浓度, 以肌球蛋白 (MW = 205000)、 β -半乳糖苷酶 (MW = 116000)、磷酸化酶 (MW = 97400)、小牛血清清蛋白 (MW = 66000) 和卵清蛋白 (MW = 45000) 为标准蛋白。

10. 等电点的测定: 先用 pH3.5—10.0 的两性载体测出样品的等电点的大体数值, 再用 pH2.6—4.0 的两性载体细测。

11. 生淀粉糖化酶粗酶的制取: 按常规的酒精、丙酮沉淀方法, 从黑曲霉 S4 的麸曲浸出液中制取生淀粉糖化酶粗酶。

12. K_m 和 V_{max} 的测定: 按 Takahashi 方法^[10]测定。

13. 蛋白浓度的测定: Folin-酚法; 测 280nm 处的光吸收法。

结 果

(一) 黑曲霉 S4 的酶系活性

该菌的各种酶活性的测定结果如表 I (活性单位见材料与方法 (二))。

表 I 原酶液中各种酶的活性

Table I Enzymes activities of crude extract

酶种类 Enzyme	糖化酶 Glucosylase	蛋白酶 Proteinase			果胶酶 Pectinase	纤维素酶 Cellulase	木聚糖酶 Xylanase	α -淀粉酶 α -amylase
		酸性 Acidic	中性 Neutral	碱性 Alkaline				
活性单位 Activity units	7.6	3.4	0	0	1.7	0.5	1.2	0.9

从表 1 可看出,该菌的 α -淀粉酶活性不高。由于麸曲抽提液的 pH 为 4.0 左右,所以测得的酸性蛋白酶活性较高。

(二) 原酶液对各种生淀粉的作用

结果如图 1、图 2 和图 3 所示。

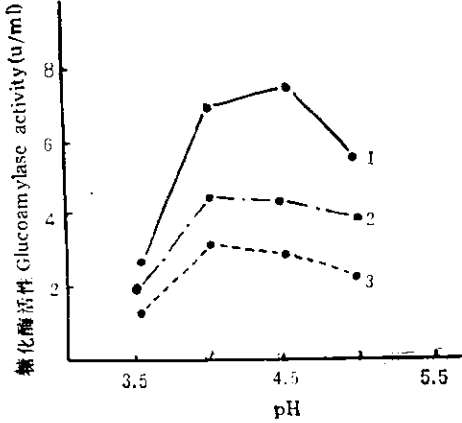


图 1 pH 对原酶作用的影响 (50°C)

1. 玉米淀粉; 2. 甘薯淀粉; 3. 马铃薯淀粉

Fig. 1 Effects of pH on the activities of crude extract to substrates at 50°C

1. Corn starch; 2. Potato starch;
3. Sweet potato starch

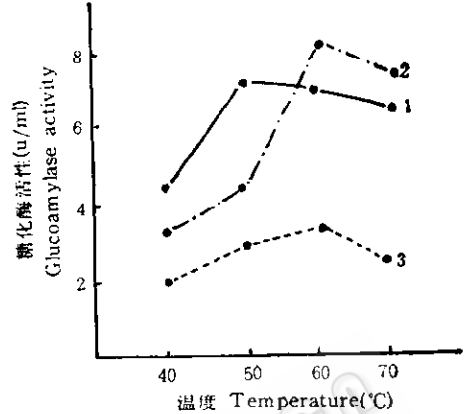


图 2 不同 pH 值时,温度对原酶作用的影响

1. pH 4.5, 玉米淀粉; 2. pH 4.0, 甘薯淀粉;
3. pH 4.0, 马铃薯淀粉

Fig. 2 Effect of temperature on the activities of crude extract to substrates at varied pH

1. pH 4.5, corn starch; 2. pH 4.0, sweet potato starch; 3. pH 4.0, potato starch

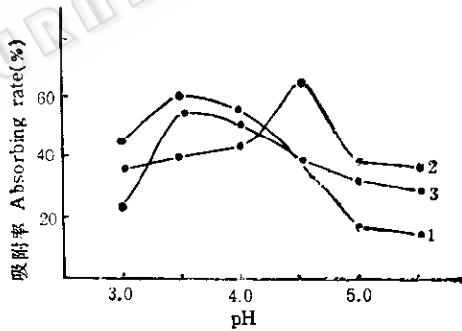


图 3 不同 pH 时,原酶液对不同生淀粉的吸附率

1. 甘薯淀粉; 2. 玉米淀粉; 3. 马铃薯淀粉

Fig. 3 Absorbing rates of crude extract on raw starches at varied pH values

1. Sweet potato starch; 2. Corn starch; 3. Potato starch

(三) 糖化酶组分的分离纯化

1 Sephadex G-100 凝胶过滤: 将粗酶溶于少量的 pH 6.8 的巴比妥钠缓冲液中,离心,将上清液上柱,用同种缓冲液洗脱,自动部分收集器收集,结果见图 4。

原酶液经凝胶过滤后,得到 A、B、C 三个蛋白峰。经测定发现这三个蛋白峰对应于两个糖化酶活性峰。将这二个活性峰收集处理后进行电泳,证明均含有多个蛋白组分。

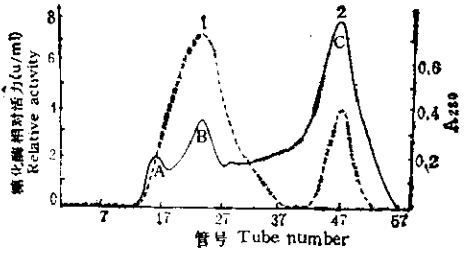


图4 Sephadex G-100 (2.6×60cm) 凝胶过滤
(流速 20ml/h, 每 20 分钟一管)
1. 糖化酶活性; 2. A₂₈₀

Fig. 4 Gel filtration on sephadex G-100
(2.6×60cm)
(The flow rate is 20ml/h, Fraction volume:
7ml)

1. Glucoamylase activity; 2. A₂₈₀

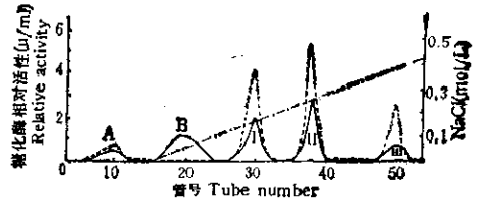


图5 DEAE-SEPHADEX A-25 (2.6×60cm)
离子交换层析

0.0—1.0mol/L NaCl 盐梯度洗脱, 流速 18ml/h
—280nm 光吸收; ---糖化酶活性 --- NaCl 浓度

Fig. 5 Chromatography on DEAE-Sephadex A-25
(2.6×60cm) Enzymes are eluted at a flow rate of
18ml/h by gradient from 0.0—1.0mol/L NaCl
Fraction volume: 7ml

—A₂₈₀; --- Glucoamylase activity;
---- NaCl concentration

选峰 B 进一步分离纯化。

2. DEAE-Sephadex A-25 离子交换: 将峰 B 收集后, 加到已用 pH6.8 的 0.04mol/L 的巴比妥钠缓冲液平衡好的 DEAE-Sephadex A-25 阴离子交换柱上, 待酶液中不被吸附的部分洗下后, 再用 0.0—1.0mol/L 的 NaCl 溶液梯度洗脱, 结果如图 5。

共得到五个蛋白峰: A、B、I、II 和 III。其中峰 A 是本实验条件下不被吸附的组分, 峰 B 无糖化酶活性。将峰 A、I、II、III 分别收集处理后, 电泳鉴定其纯度。峰 I、II 和 III 为单一条带。

上述实验结果列于表 2。

表 2 糖化酶组分的分离纯化结果

Table 2 Purification of glucoamylases from *Asp. niger* S4

操 作 步 聚 Steps	蛋白含量 Total protein (mg)	总活性 Total activity (u)	比活 Specific activity (u/mg)	收率 Recovery (%)	纯化倍数 Purification	
原酶液 Crude enzyme	3456	2765	0.8	100		
95% 酒精沉淀 Ethanol fractionation	1312	1836	1.4	66.4		
凝胶过滤 Sephadex G-100	332.8	1125	3.38	40.0		
离子交换 Ion exchange	GI	65.33	283	4.33	10.2	5.4
	GII	62.21	279	4.77	10.7	6.0
	GIII	34.33	53	1.53	1.9	1.9

(四) 组分 I、II、III 的性质

1. I、II、III 的糖化酶性质: 把组分 I、II、III 水解可溶性淀粉所得的酶解液进行纸层析(图略)。

这三个组分作用于可溶性淀粉后,均以葡萄糖为唯一产物。

把这三个组分分别与可溶性淀粉混合后,在 40°C 用旋光仪测定混合液的旋光度。结果如图 6 所示。

随反应时间的延长,混合液的旋光度降低并达一定值;当加入碳酸钠后,旋光度又升高,说明反应产物为 β -构型。

从上述结果看出:这三个组分作用于可溶性淀粉均以 β -葡萄糖为唯一产物,说明它们均为糖化酶,简称为 GI、GII、GIII。

2.GI、GII、和 GIII 的性质如表 3。蛋白质分子量测定结果如图 7。

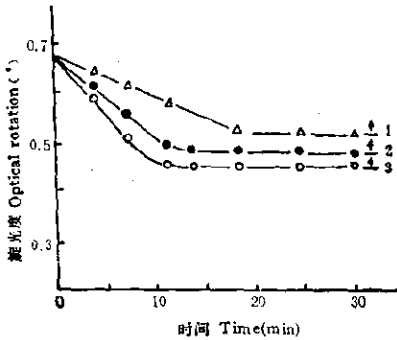


图 6 酶与底物的混合物的旋光度
1. 组分 III; 2. I; 3. II
↑ 表示加碱后旋光度升高

Fig. 6 The optical rotations of glucoamylases and soluble starch's mixture
1. III; 2. I; 3. II

The arrow indicates the optical rotation after the addition of alkali to the digests

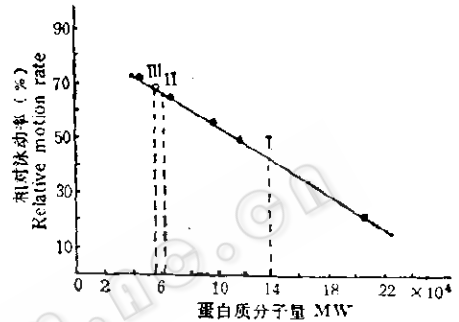


图 7 GI、GII、GIII 的分子量的测定图谱
Fig. 7 Pattern of molecular weights of GI, GII, GIII

表 3 GI、GII、和 GIII 的理化性质

Table 3 The physicochemical properties of glucoamylases

性 质 Character	GI	GII	GIII	原酶 Crude enzyme
分子量 Molecular weight	13.8×10^4	6.2×10^4	5.75×10^4	
等电点 pI Isoelectric point	4.0	3.9	3.6	
总糖含量 Total carbohydrate (%)	11.68	8.6	3.6	
最适 pH Optimum pH	4.0	5.0	4.0	4.0
最适温度 Optimum temperature (°C)	60	60	60	60

(五) GI、GII 和 GIII 的相对水解能力(表 4)

讨 论

本实验分得的三个糖化酶组分均为酸性糖蛋白,类似于文献报道的各种曲霉的生淀

表 4 GI、GII 和 GIII 的相对水解能力

Table 4 Relative rate of hydrolysis of GI, GII and GIII

底物 Substrate	酶组分 Enzyme	pH4.0, 60°C V_{max}/K_m Relative rate of hydrolysis	pH4.5, 50°C V_{max}/K_m Relative rate of hydrolysis
马铃薯淀粉 Potato starch	I	7.2	2.2
	II	5.6	10.8
	III	3.3	3.0
玉米淀粉 Corn starch	I	2.9	9.4
	II	6.2	20.0
	III	6.4	7.3
甘薯淀粉 White potato starch	I	20.0	13.2
	II	3.4	10.0
	III	16.3	5.6

K_m 以 mg/ml 表示; V_{max} 以每分钟每毫升反应液中产生的葡萄糖的毫克数表示。

K_m : mg/ml; V_{max} : mg glucose/ml solution per minute.

粉糖化酶。其中 GI 的分子量略大于文献值 112000, 这是因为其糖含量高于 10%^[5,12]。从 GI、GII 和 GIII 对生淀粉作用的 V_{max}/K_m 来看, 其值各不相同, 而同一组分在不同条件下对同一种淀粉作用的 V_{max}/K_m 也有差别, 这就导致了原酶液对不同生淀粉作用能力和作用条件的不同。生淀粉糖化酶对生淀粉的吸附和水解所需的最适条件不同, 这可能是因该酶对生淀粉的吸附和水解作用不在同一位点所致。GI 对底物的吸附能力远高于 GII 和 GIII, 而前者的分子量也远大于后二者, 酶对底物的吸附是有效地降解底物的基础。Tsujiisaka 等^[11]认为, 霉菌的多个大小不同、性质相似又相异的糖化酶组分, 是由于菌本身产生的酸性蛋白酶和葡萄糖苷酶作用于大分子糖化酶所致。如果采取适当的措施, 抑制菌本身的酸性蛋白酶和葡萄糖苷酶的作用, 使生淀粉糖化酶以较大的分子状态存在, 从而提高酶对底物的作用能力, 使其在生产实践中得到更有效的应用。

参 考 文 献

- [1] Ueda, S.: Hand Book of AMYLASES and Enzymes, p. 116, (ed. The Amylase Research Society of Japan), 1988.
- [2] 方善康等: 食品与发酵工业, 2: 13—20, 1988.
- [3] 福井作藏: 遷原糖の定量法, 第 10—12 頁, 学会出版センター, 東京都, 1969年.
- [4] Matsuoka, H. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 50(6): 599—602, 1982.
- [5] Bringer, S. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 315, 1984
- [6] Hayashida, S. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 45(12): 2675—2681, 1981.
- [7] 张维杰主编: 复合多糖生化研究技术, 第 6 页, 科学出版社, 北京, 1987年.
- [8] Shapiro, A. L. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28: 815—822, 1967.
- [9] Yamasaki, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 41(11): 2149—2161, 1977.
- [10] Takahashi, T. et al.: *J. Biochem.*, 89: 125—134, 1981.
- [11] Tsujiisaka, Y. et al.: Proceedings of the symposium on Amylase (In Japanese) p. 61—70, 1975.
- [12] Hayashida, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 39: 2693—2699, 1975.

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF THREE FORMS OF RAW-STARCH-DIGESTING GLUCOAMYLASE FROM *ASPERGILLUS NIGER* S4

Fang Shankang Zhou Fengzhen

(Department of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

The enzymes from *Aspergillus niger* S4 were studied and found that glucoamylase's digesting and absorbing activities to raw starches were varied.

Three fractions, GI, GII and GIII were purified by ethanol precipitation, gel filtration and ion exchange chromatography from crude extract of *Asp. niger* S4. All the purified fractions were glucoamylase and homogeneous in polyacrylamide gel electrophoresis. To each fraction, the purifications achieved were 5.4, 6.0 and 1.9; the yields of them were 10.2%, 10.7% and 1.9% respectively. All of them were acidic glycoproteins. Their carbohydrate contents were 11.68%, 8.6% and 3.6%, respectively. The molecular weights of GI, GII and GIII were estimated to be 138000, 62000 and 57500, respectively, by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Their pI values were 4.0, 3.9 and 3.6, respectively. Their active optimum conditions were at pH 4.0—5.0 and 60°C. All these results could roughly explain the different digesting and absorbing activities of crude extract to raw starches.

Key words *Aspergillus niger*; Raw-starch-digesting glucoamylase