

产碱菌麦芽四糖淀粉酶的纯化及性质*

余晓红 严自正 李梅 潘其林 张树政

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

产碱菌(*Alcaligenes* sp.) 537.1 除去菌体的培养液经硫酸铵沉淀及 DEAE-纤维素离子交换柱层析,得到了凝胶电泳均一的麦芽四糖淀粉酶。纯化了 141 倍,酶活力回收 40.1%,比活力达 3308U/mg。用浓度梯度 PAGE 和 SDS-PAGE 测定酶分子量分别为 68000 和 66000,不具亚基。用 PAG-IEF 测定等电点为 4.45。酶反应最适 pH 和温度分别为 7.0 和 60℃。在 pH7-10 范围内稳定,该酶半衰期为 37℃ 12 小时,50℃ 1 小时和 62℃ 6 分钟。

麦芽四糖淀粉酶是糖蛋白,含有 4% 左右的糖,含有 27.10% 酸性氨基酸、11.08% 碱性氨基酸和 1.82% 色氨酸。

关键词 产碱菌;麦芽四糖淀粉酶;糖苷酶

麦芽四糖淀粉酶(1,4- α -D-glucan maltotetrahydrolase EC 3.2.1.60)从淀粉的非还原末端顺序切割第 4 个葡萄糖苷键,产物为麦芽四糖(G_4)。1971 年该酶首次由 Robyt 和 Ackerman 在斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)的培养液中发现,并进行了分离纯化及一般性质研究^[1]。作者在前文^[2]报道了由中国南方土壤中分离到的大批细菌中筛选到一株产碱菌,能大量产生该酶,本文对该酶进行了分离纯化、一般性质及氨基酸组成研究。

材料和方法

(一) 主要仪器与试剂

721 分光光度计(上海第三分析仪器厂),J2-21 高速冷冻离心机及 121MB 氨基酸自动分析仪(Beckman),5850pH 计(Cole-Parmer),两性电解质、已知分子量及等电点的蛋白质(Pharmacia),DEAE-纤维素 DE11(Whatman)和 G_4 (Sigma)。

(二) 菌种、培养基及培养条件^[2]

培养基(%):麦芽糖 1.5,蛋白胨 0.5,酵母膏 0.2, KH_2PO_4 0.2, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05,NaCl 0.1,pH7.0,250ml 三角瓶装 50ml,0.55kg/cm² 灭菌 30 分钟,接入牛肉汁斜面培养基上生长一代的产碱菌 537.1,28℃ 振荡培养 48 小时。

(三) 酶活力测定^[2]

本文于 1991 年 12 月 31 日收到。

* 中国科学院资助项目。

用可溶性淀粉为底物, 终浓度1%, 反应体积5ml, pH6.6, 50℃, 反应10分钟, 在100℃水浴中10分钟停止反应, 用DNS法测定反应液中还原糖。在上述反应条件下, 每分钟释放1 μ mol的还原糖(以葡萄糖作标准曲线)所需酶量, 定义为一个酶活力单位(U)。比活力为每毫克蛋白质所表现出的酶活力单位数。

(四) 蛋白质测定

按Lowry方法^[3], 或在波长280nm测定吸光度(A)。

(五) 电泳方法

蛋白质纯度测定用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 按Davis方法^[4], 分子量测定用浓度梯度PAGE^[5]及SDS-PAGE方法^[6]。等电点测定用聚丙烯酰胺凝胶薄层等电点聚焦(PAG-IEF)^[7,8]。

(六) 总糖及氨基酸组成测定

纯酶样品经过浓缩, 然后用硫酸-酚方法^[9]测定总糖, 用甘露糖作标准曲线。测定氨基酸组成的样品分别用5.7mol/L HCl或甲磺酸水解, 然后用氨基酸自动分析仪测定^[10]。

结 果

(一) 酶的分离纯化

1. 粗酶液制备: 培养液在8000r/min于4℃离心10分钟, 除去菌体, 上清液为粗酶液。
2. 硫酸铵沉淀及透析: 粗酶液在冰浴中加入硫酸铵至50%饱和度, 4℃下放置过夜, 离心弃去上清液, 沉淀用蒸馏水溶解, 并对pH8.0的0.2mol/L Tris-HCl缓冲液透析, 测定蛋白质含量及酶活力。

表1 产碱菌变芽四糖淀粉酶的纯化

Table 1 Purification of maltotetraose-forming amylase from *Alcaligenes* sp.

步骤 Step	体积 Volume (ml)	总活力 Total activity (U)	总蛋白质 Total protein (mg)	比活力 Sp Act (U/mg)	纯化倍数 Purification (fold)	得率 Recovery (%)	
						Activity	Protein
培养液 Culture supernatant	770	77600	3321.0	23.4	1	100	100
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate fractionation	40	74100	63.6	1165.0	49.8	95.5	1.9
透析 Dialysis	35	50900	39.7	1282.0	54.8	65.6	1.2
DEAE-纤维素层析 DEAE-cellulose chromatography	155	31100	9.4	3308.0	141.4	40.1	0.28

3. DEAE-纤维素离子交换柱层析：将上步酶液上柱(1×20cm)，先用 pH8.0 的 0.2mol/L Tris-HCl 缓冲液平衡，然后改用梯度洗脱，上限为 pH8.0 的 0.5mol/L Tris-HCl，下限为 pH8.0 的 0.2mol/L Tris-HCl 缓冲液，体积分别为 250ml，流速 10ml/h，分部收集，分别测定洗脱液酶活力及吸光度，将在 PAGE 呈一带的 15—57 管合并，共 155ml (图 1)。

4. 纯化结果：分别测定纯化过程中各步样品的酶活力、蛋白质含量及 PAGE (图 2)。纯化了 141 倍，酶活力回收 40.1%，比活力达 3308U/mg (表 1)。以下试验均用纯酶进行。

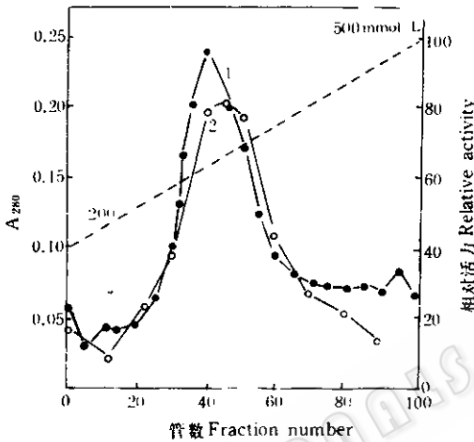


图1 麦芽四糖淀粉酶的 DEAE-纤维素柱层析图

Fig. 1 Chromatogram of maltotetraose-forming amylase on DEAE-cellulose column

- 1. 吸光度 Absorbance;
- 2. 酶活力 Enzyme activity

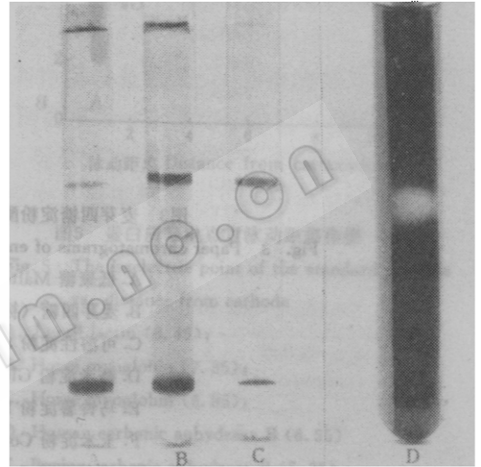


图2 各步纯化样品的 PAGE 图

Fig. 2 PACE patterns of samples from different steps of purification

- A. 培养液 Culture supernatant;
- B. 硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate fractionation;
- C. DEAE-纤维素层析 DEAE-cellulose chromatography;
- D. 酶谱 Zymogram

(二) 一般性质

1. 酶解产物分析：将酶液分别和可溶性淀粉、糯米淀粉、马铃薯淀粉、玉米淀粉和番薯淀粉作用，其产物用纸层析鉴定 (方法见前文)^[2]均为麦芽四糖，在层析纸上未见到其他糖的斑点，而在原点留有残余 (图 3)，这表明纯化后的酶不含其他淀粉酶，也说明该酶不能将淀粉全部分解。

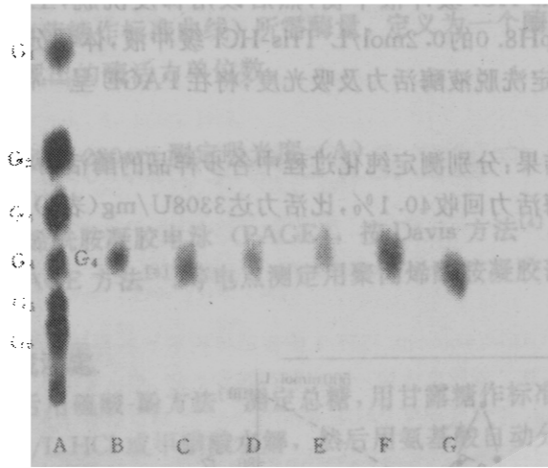


图3 麦芽四糖淀粉酶和各种淀粉反应产物的纸层析图

Fig. 3 Paper chromatograms of enzyme hydrolysates of starch from various sources

- A. 低聚糖 Maltooligosaccharides;
- B. 麦芽四糖 (标准) Maltotetraose (standard);
- C. 可溶性淀粉 Soluble starch;
- D. 糯米淀粉 Glutinous rice starch;
- E. 马铃薯淀粉 Potato starch;
- F. 玉米淀粉 Corn starch;
- G. 番薯淀粉 Sweet potato starch

2. 分子量测定: 用浓度梯度 (4—30%) PAGE 及 SDS-PAGE 测定, 用不同蛋白质分子量半对数坐标对 R_m 作图 (图4), 求出酶分子量分别为68000和66000, 没有亚基。

3. 等电点测定: 用 PAG-IEF 方法测定, 6% PAG, pH3—10两性电解质 (4—30%), 由不同蛋白质的等电点对其离阴极的距离作图 (图5), 根据酶样品的泳动距离, 从图中求出其等电点为4.45。

4. 温度对酶活力及稳定性影响: 按常规方法, 在不同温度下分别测定酶活力。在60℃酶活力最高, 65℃酶活力下降。将酶液分别在37℃、50℃及62℃保温不同时间, 然后按常规方法测定酶的残余活力, 以未保温的酶液的活力为100%。在37℃保温12小时、50℃1小时及62℃6分钟, 残余酶活力为50%。

5. pH 对酶活力及稳定性影响: 用 pH4.0—8.0磷酸氢二钠和柠檬酸缓冲液, pH8.5—10.0的甘氨酸和氢氧化钠缓冲液代替常规测活力时的缓冲液, 分别测定酶活力, 在 pH7.0时酶活力最高。用上述不同 pH 的缓冲液与酶液保温30分钟, 然后按常规方法测定保温后的酶的残余活力。结果表明, 酶在 pH7.0—10.0稳定性很好, 在此条件下酶活力仍能保持100%。

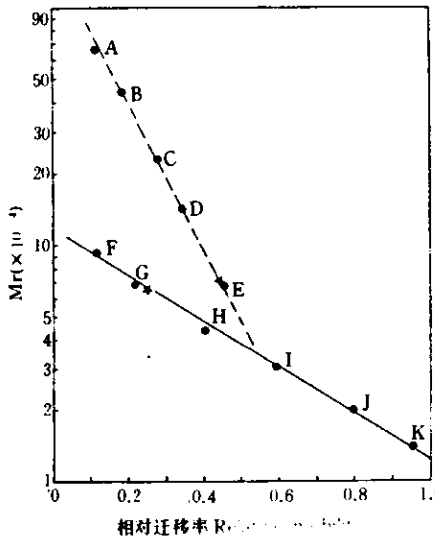


图4 蛋白质分子量对迁移率作图

Fig. 4 The Semi-log plot of standard proteins Mr vs. R_m

- A. Thyroglobulin (669,000);
 B. Ferritin (440,000);
 C. Catalase (232,000);
 D. Lactate dehydrogenase (140,000);
 E. Albumin (67,000);
 F. Phosphorylase b (94,000);
 G. Albumin (67,000);
 I. Carbonic anhydrase (30,000);
 H. Ovalbumin (43,000);
 J. Trypsin inhibitor (20,000);
 K. α -Lactalbumin (14,000).
 ● 已知分子量蛋白质 Standard protein;
 ★ 样品蛋白质 Sample protein (66000, 68000);
 — SDS-PAGE; --- Cono. gradient PACE

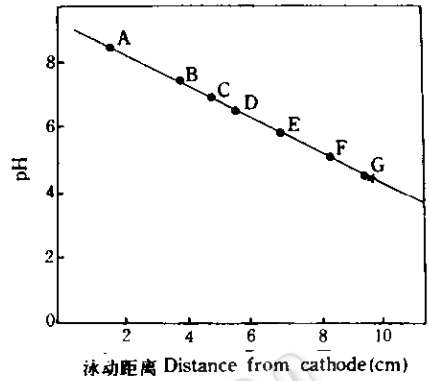


图5 蛋白质等电点对泳动距离作图

Fig. 5 The isoelectric point of the standard proteins vs. distance from cathode

- A. Lentil lectin (8.45);
 B. Horse myoglobin (7.35);
 C. Horse myoglobin (6.85);
 D. Human carbonic anhydrase B (6.55)
 E. Bovine carbonic anhydrase B (5.35);
 F. α -Lactoglobulin A (5.2);
 G. Soybean trypsin inhibitor (4.55);
 ● 已知等电点蛋白质 Standard protein;
 ★ 样品蛋白质 Sample protein (4.45)

6. 金属离子对酶活力影响：使终浓度为1.0mmol/L的14种金属化合物分别与酶液在20℃保持30分钟，然后按常规方法测定酶活力。 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 及 Ca^{2+} 对酶活力有促进作用，而 Hg^{2+} 、 Mn^{2+} 及 Ag^{+} 对酶活力有抑制作用，EDTA对酶活力也有影响(表2)。

7. 有机化合物对酶活力影响：测定终浓度为10mmol/L的麦芽糖醇、核糖醇、肌醇、水杨素、D-葡萄糖酸- δ -内酯、蔗糖及 β -环状糊精，终浓度为2%的茁霉多糖、木聚糖及海藻多糖(Laminarin)(酶对后四种化合物不能分解，数据未列出)对酶活力影响，结果大多数对酶活力没有影响，仅右旋糖酐稍有激活作用。

表2 金属离子对酶活力影响

Table 2 Effects of various metallic ions on activity

化合物 Compounds	相对活力 Relative activity(%)
对照 Control	100.0
Ba(Ac) ₂	134.2
MgSO ₄	134.2
Ca(Ac) ₂	123.2
Pb(Ac) ₂	113.2
Li ₂ SO ₄	92.1
AlCl ₃	87.0
Zn(Ac) ₂	84.6
KNO ₃	84.3
CuCl ₂	64.4
Fe ₂ SO ₄	53.1
AgNO ₃	28.4
MnCl ₂	23.2
HgCl ₂	5.0
EDTA	78.0

表3 麦芽四糖淀粉酶的氨基酸组成

Table 3 Amino acid composition of maltotetraose-forming amylase from *Alcaligenes* sp.

氨基酸 Amino acid	残基数 Residues/mol	No/100 residues
Asx	86	14.21
Thr	23	3.81
Ser	28	4.63
Glx	78	12.89
Pro	40	6.61
Gly	85	14.05
Ala	51	8.43
Cys/2	2	0.33
Val	37	6.14
Met	12	1.98
Ile	22	3.64
Leu	31	5.12
Tyr	14	2.31
Phe	18	2.98
His	11	1.82
Lys	35	5.79
Arg	21	3.47
Trp	11	1.82
Total	605	

(三) 总糖含量及氨基酸组成

1. 总糖量:按方法中所描述的进行测定,该酶含糖量为4%,说明酶为一糖蛋白。
2. 氨基酸组成:按方法中所述进行,结果约由600个氨基酸残基组成,其中含有

27.10%酸性氨基酸,11.08%碱性氨基酸,1.82%色氨酸(表3)。根据各种氨基酸残基数所计算出的该酶分子量为64787,与凝胶电泳所测出的分子量基本一致。

讨 论

1. 1971年 Robyt 和 Ackaman 首次由斯氏假单胞菌培养液中发现了麦芽四糖淀粉酶,并进行了分离纯化及性质研究。他们用硫酸铵沉淀及丙酮沉淀两个步骤分离纯化了该酶,纯化了1000倍左右,使比活力由培养液中2.5U/mg 提高至2590U/mg,在 PAGE 上呈两个分子型。1991年 Kobayashi 报道了另一种假单胞菌产生的麦芽四糖淀粉酶,用了较多的分离纯化步骤,得到了在 PAGE 上均一的酶,其比活力由培养液中3.05U/mg 提高至434U/mg。本文由产碱菌培养液中所纯化的麦芽四糖淀粉酶,不但比活力比上述两种菌的酶高,同时所用分离纯化步骤也较简单。

关于产碱菌麦芽四糖淀粉酶与上述两种菌酶的性质以及 Kubota 在他的日本专利中所描述的酶相比,部分性质如分子量、等电点、最适温度及 pH 等均有差别,相同之处为酶活力被 Hg^{2+} 所抑制(表4)。产碱菌酶的最大特点是最适温度为60℃,半衰期37℃12小时,这对该酶用于制糖非常有利,因为在糖化过程中,温度超过60℃即不容易酸败。

表4 不同来源的麦芽四糖淀粉酶的部分性质比较

Table 4 Comparisons of some properties of maltotetraose-forming amylase from different bacteria

	斯氏假单胞菌 ^[1] <i>Pseudomonas stutzeri</i>	斯氏假单胞菌突变株 ^[11] <i>P. stutzeri</i> mutant MO-19	嗜糖假单胞菌 ^[12] <i>P. saccharophila</i>	产碱菌 <i>Alcaligenes</i> sp.
Optimal Temp.	47℃	50℃	50—55℃	60℃
Half life	—	—	—	37℃ 12h
Optimal pH	8.0	7.0—7.5	6.7	7.0
pH range	—	6.5—9.5	5.5—10.5	7.0—10.0
Effect of Ca^{2+} on activity	—	—	—	Activation
Effect of Hg^{2+} on activity	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition
Mr	12500 (Subunit) (Gel filtration)	46000+1000 (SDS-PAGE) 47000+2000 (Ultracentrifuge)	62000 (SDS-PAGE)	66000 (SDS-PAGE) 68000 (Conc. gradient PAGE)
pI		4.8	4.7	4.45

Robyt^[1]和 Kobayashi^[12]等分别研究了斯氏假单胞菌和嗜糖假单胞菌的麦芽四糖淀粉酶对底物作用的外切机制及酶产物的构型,关于产碱菌酶的这方面研究,正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Robyt, J. F. and R. J. Ackerman: *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**: 105—141, 1971.
- [2] 严自正等: *生物工程学报*, **8**: 288—293, 1992年.
- [3] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- [4] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404, 1964.

- [5] 张龙翔等: 生化实验方法和技术, 第119-124页, 高等教育出版社, 北京, 1985年。
- [6] Laenmli, U. K. : *Nature*, **227**: 680, 1970.
- [7] Vesterberg, O. : *Methods in Enzymol.*, **22**: 389, 1971.
- [8] 张树政等编: 酶制剂工业 (上册), 第307-313页, 科学出版社, 北京, 1984年。
- [9] 张惟杰主编: 复合多糖生化研究技术, 第3-5页, 上海科技出版社, 上海, 1987年。
- [10] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 第71-74页, 科学出版社, 北京, 1973年。
- [11] Kubota, M. et al. : *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, Jp 88240784, 87/74878, 28, Mar., 1987.
- [12] Kobayashi, S. et al. : *Denpun Kagaku*, **38**: 27-36, 1991.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MALTOTETRAOSE-FORMING AMYLASE FROM *ALCALIGENES* SP.

She Xiaohong Yan Zizheng Li Mei Pan Qilin Zhang Shuzheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

A maltotetraose-forming amylase from the culture supernatant of *Alcaligenes* sp. 537.1 was purified to PAGE homogenous by ammonium sulfate precipitation followed by dialysis and DEAE-cellulose column chromatography with 141-fold purification and 40% recovery.

The Mr estimated with concentration gradient PAGE and SDS-PAGE were 68000 and 66000. The pI was 4.5 determined with PAG-IEF. The optimum conditions for activity were pH 7.0, temperature 60°C, stable in the range pH 7.0-10.0. The half life of enzyme was 12 h, 1 h and 6 min at 37°C, 50°C and 62°C, respectively.

The enzyme was a glycoprotein with sugar content of about 4%. Analyses of amino acids composition showed that the enzyme contained about 27.10% acidic amino acids, 11.08% basic amino acids and 1.82% Tryptophan.

Key words *Alcaligenes* sp. ; Maltotetraose-forming amylase ; Glycosidase