

枯草芽孢杆菌糖化型 α -淀粉酶的研究(Ⅱ)

——酶的 性 质

陶文沂

(无锡轻工业学院发酵系)

奥村晋 杉原耿雄 冈田茂之

(大阪市立工业研究所, 日本)

摘 要

糖化型 α -淀粉酶等电点为 pH5.16, 分子量为 42,000~45,000, 紫外吸收值 $E_{280}/E_{260} = 1.80$, 由 396 个氨基酸残基所组成, pH 稳定范围 5.0—8.5, 温度稳定范围 40—50℃ 以下, 最适作用 pH 为 5.5, 最适作用温度 66℃, 对可溶性淀粉的米氏常数为 0.057, 最大反应速度为 1.3 微克分子/分钟·毫升·单位酶活, 钠、钾、钙、钡等离子有活化作用, 铅、汞、铁离子及巯基试剂有抑制作用。

引 言

α -淀粉酶分成液化型和糖化型两组。本文在前报^[1]制得纯净糖化型 α -淀粉酶的基础上, 讨论酶的蛋白质化学和酶学方面的性质。

材 料 与 方 法

1. 酶制剂

糖化型 α -淀粉酶由枯草芽孢杆菌 KO2 产生并纯化获得、电性及分子量均为均一的^[1]。

2. 等电聚焦法

根据 Vesterberg^[2]的方法在瑞典 LKB 公司制造的等电聚焦柱(110ml 容积)上进行酶蛋白等电点的测定。密度梯度由甘油溶液构成, 其中所含 pH3—10 范围的载体两性电解质形成均匀的 pH 梯度, 样品 1 ml 处于柱的中部。阳极溶液使用 50%甘油 20ml + 磷酸 0.2ml, 阴极溶液使用去离子水 20ml + 单乙醇胺 0.2ml。通过夹层循环冰水维持柱温 4℃, 300V 电压下电泳 40 小时, 结束后按每 2ml 一管收集柱中液体, 共计收集 60 管, 测定各收集样品的 pH、OD 及酶活性。

3. 凝胶过滤法测定蛋白质分子量

按照 Andrews^{[3][4]}的方法, 使用葡聚糖凝胶 G-100 作为分子筛。凝胶柱大小为 $\phi 15 \times 100$ cm, 上柱样品为①标准蛋白质 + 兰葡聚糖 2,000, ②样品酶液 + 兰葡聚糖 2,000, 使用胰凝乳蛋白酶原 A (chymotrypsinogen A, 分子量 25,000), 卵清蛋白 (Ovalbumin, 分子量 43,000), 牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, 分子量 67,000) 作为已知分子量标准蛋白

质,分别称取该三标准 1,3,2 毫克溶于 0.5ml 0.1MNa₂HPO₄ 溶液中。兰葡聚糖 2,000 分子量为 2,000,000,称取 10mg 溶于 0.5mlH₂O。以 0.01M pH5.6 醋酸钠缓冲液加 0.1M NaCl 作为凝胶过滤流动相,连接收集器进行过滤。测定各管收集物紫外吸收值,蛋白质峰值位置(流出液体积 V_e)与兰葡聚糖峰值位置(V_o)之比称为相对滞留时间,以此值与分子量作图可得线性关系,以此测定未知蛋白质的分子量。

4. 高压液相色谱法测定蛋白质分子量

TSK-GEL SW型凝胶是多孔、球形、坚硬且具高的孔积率,高亲水性表面及对溶质特别是蛋白质和酶的低吸附性,可用于蛋白质分析及分子量测定^[5]。使用 G3000 SW×2 柱与高压液相色谱仪 Hitachi 635A 配合,鉴别器 UVIDEC100(280nm) 流速 1.0 毫升/分,使用 1/30MpH6.8 磷酸缓冲液+0.2MNaCl 作流动相进行层析。使用参照物为 pharmacia 精制试剂标准蛋白质,包括卵清蛋白、牛血清蛋白、核糖核酸酶 A (分子量 13,700) 及兰葡聚糖 2,000,根据层析相对滞留时间作图计算。

5. 超速离心沉降平衡法测定分子量

在 Hitachi 282 型分析离心机上进行,样品酶液先经 0.1MpH5.6 乙酸缓冲液透析平衡,透析外液作为对照空白置溶剂池,25℃,10,000 rpm 离心 20—24 小时,由记录曲线按照

Fujita 的计算公式: $M.W. = \frac{2RT}{(1-U\rho)\omega^2} \cdot \frac{d \ln c}{dr^2}$ 可求得分子量。式中 R 气体常数, T 绝对温度, U 部分比容, ρ 溶液密度, ω 角速度, C 浓度, r 距离。

6. 氨基酸组成分析

根据 Moore^[6] 等人的方法,取酶液 0.1ml 于小硬质玻管中,加重蒸盐酸(约 5.7N) 0.5ml,冰—乙醇中冷却,真空封口,110℃烘箱中水解 18 小时,然后在旋转蒸发器上除去 HCl。由于盐酸水解造成色氨酸、半胱氨酸和胱氨酸的破坏,色氨酸的分析按照 Goodwin^[7] 等人的方法,由紫外吸收光谱计算色氨酸与酪氨酸的残基数的比值来决定,半胱氨酸和胱氨酸的分析可经过甲酸氧化转变为磺基丙氨酸后定量检出^[8],过甲酸氧化造成其它酸测定值降低,所以必须分别进行。经以上方法制得水解液可按 Kang S.Lee^[9] 等人的方法使用邻苯二甲醛荧光分析法测定。

7. pH 稳定性试验

Britton-Robinsen 缓冲液^[10]具有从 pH1.8 至 12 的 pH 调节范围,可用于此试验。分别取不同 pH 的缓冲液 1.8ml,加入酶液 0.2ml,混合后检查 pH 变化情况,28℃温箱放置 18 小时后测定 pH 及酶活。

8. 热稳定性试验

酶液使用 0.05M pH5.6 乙酸缓冲液稀释 1000 倍,在细试管中各放 2ml 该稀释液,在 40—90℃水浴中分别准确处理 15 分钟,立即置冰浴冷却,5 分钟后测定酶活。

9. 动力学研究

测定某一酶对特定底物的 K_m 和 V_{max} 值可分为两步。首先以相同底物浓度,不同酶浓度进行作用,在一定时间间隔取样中止反应,测定产物量,作出产物与时间、酶浓度的关系曲线,由此选择产物与酶浓度呈线性较好的酶浓度。然后以此酶浓度作用于不同浓度的底物,间歇取样测定产物量,由不同浓度的底物造成初速度不同,可按 $\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$ ^[11] 作出 $\frac{1}{V} \sim \frac{1}{S}$

关系直线,并由图上求出 K_m 及 V_{max} 值。

10. 各种物质对酶反应的影响

先将酶液在无离子水中透析除去缓冲界质中的离子,取此透析后酶液 0.1ml 加入 2ml 被试物质溶液中,30℃维持 30 分钟后常法测定酶活。

结 果 与 讨 论

1. 糖化型 α -淀粉酶的蛋白质化学性质

1) 等电点 利用前报所得的纯糖化型 α -淀粉酶 1ml 按方法中所述,用等电聚焦法测定等电点,收集电泳柱中样品测定的结果如图 1,表明此酶的等电点为 5.16。

2) 分子量的测定

① 凝胶过滤法测定 按照方法中所述,使用葡聚糖凝胶 G-100 作为分子筛进行分子量测定。上柱酶液先经火棉胶袋真空浓缩。分别测定两次过滤收集样品的紫外吸收值,计算相对滞留时间,作图如图 2,由此确定 BSA 分子量 45,000。

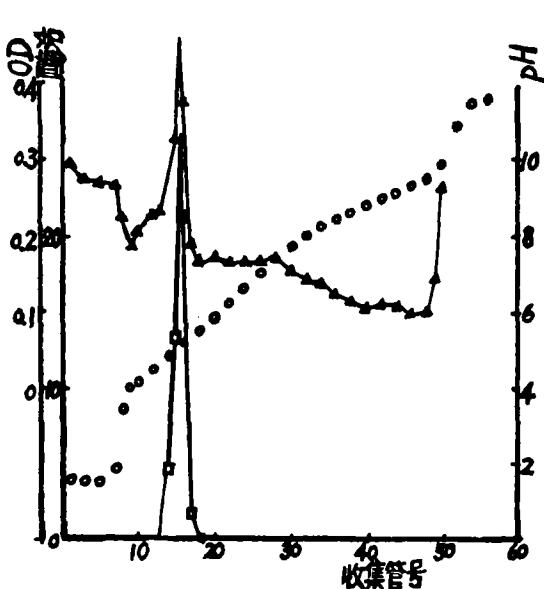


图1 等电聚焦法测定 BSA 的等电点
○pH, △OD 值, □淀粉酶活性

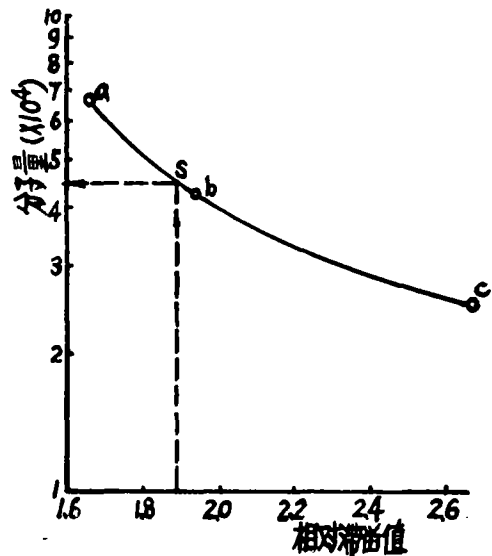


图2 凝胶过滤法测定分子量

a. 牛血清蛋白, b. 卵清蛋白,
c. 胰凝乳蛋白酶原 A, S. 样品

② 十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定 (SDS-PAGE) 按照 Weber^[12] 的方法,使用胰蛋白酶抑制剂(分子量 21,500),牛血清蛋白(68,000),核糖核酸多聚酶 α (39,000)、 β (155,000)、和 β' (165,000) 作为标准分子量蛋白质对照物。在凝胶浓度 5% 及每根柱电流强度 8mA 条件下电泳三小时,结果如图 3。由此确定 BSA 分子量为 47,000。

③ 高压液相色谱法测定 (HPLC) 按照方法中四,使用蛋白质标准 2mg/0.6ml,得图谱及计算曲线如图 4。由此确定 BSA 分子量为 39,000。

④ 超速离心沉降平衡法测定

按方法五,吸 1ml 酶液经透析后在 Hitachi 282 型分析离心机上进行,25℃10,000rpm

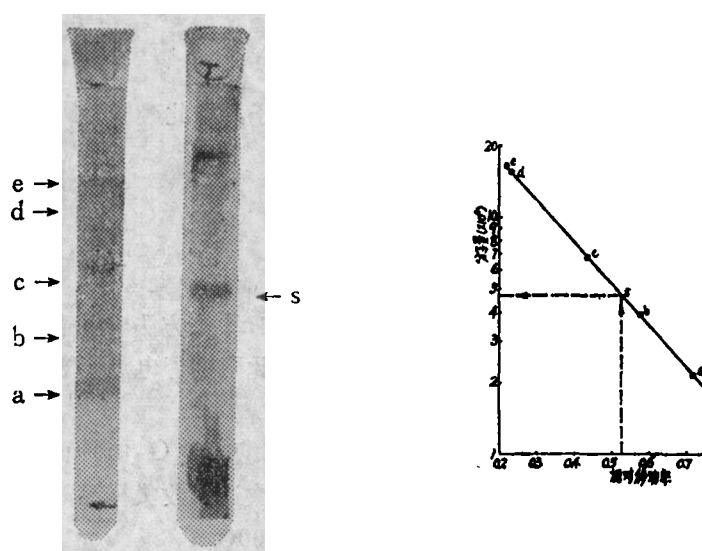


图3 SDS-PAGE法测定分子量

左、电泳图谱：a. 胰蛋白酶抑制剂，b. 牛血清蛋白，c. 核糖核酸多聚酶 α ，d. β ，e. β' 以及，s. 样品，右、计算曲线

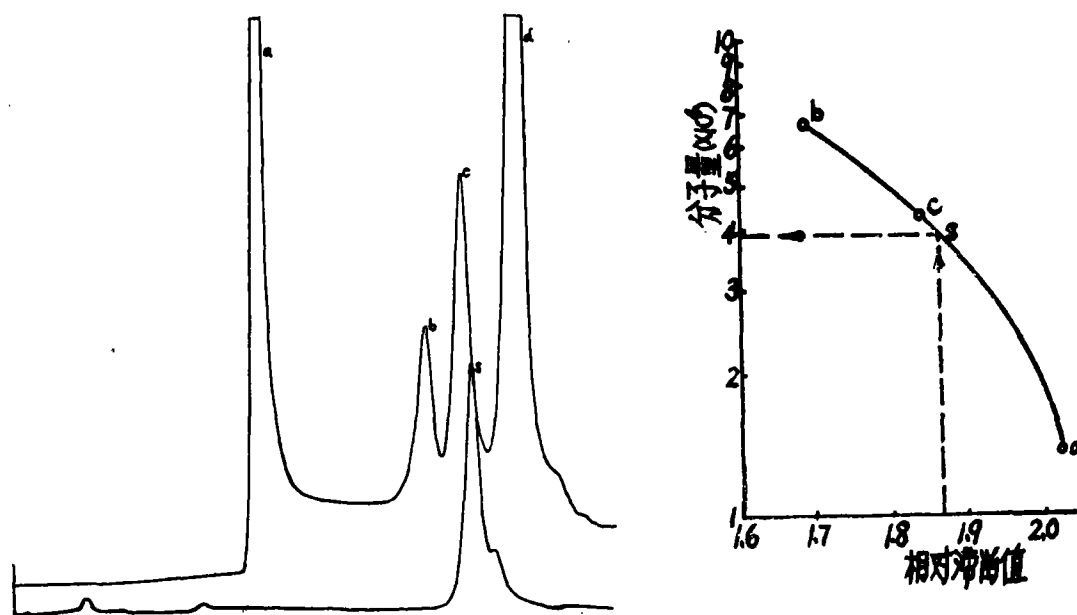


图4 高压液相色谱法测定分子量

左、层析图谱 a. 兰葡聚糖 2,000，b. 牛血清蛋白，c. 卵清蛋白，d. 核糖核酸酶 A，s. 样品，右、计算曲线

离心 20 小时 25 分钟，计算中取值 $U = 0.73$ ， $\rho = 1.001$ ，并据实验条件知 $T = 298^\circ\text{K}$ ， ω^2

$= 1.097 \times 10^6$, 计算得分子量为 42,200。

综合以上结果可以认为 BSA 分子量为 42,000—45,000。

3) 紫外吸收光谱 糖化型 α -淀粉酶的紫外吸收光谱如图 5 所示。样品酶液先经 $0.5\mu\text{m}$ 孔径微孔过滤片过滤, 使用 UV210A 双光路分光光度计, 扫描速度 0.5, 记录纸速 4, 灵敏度 $\times 2$ 。由此可知该酶 E_{280}/E_{260} 值为 1.80。

4) 氨基酸组成 如方法中六所述, 测定色氨酸含量所得紫外吸收光谱见图 5 谱线 2, 由此计算得色氨酸与酪氨酸残基数之比为 0.704。氨基酸分析在高压液相色谱仪上进行, 使用流动相为 pH3.25, 4.25, 9.00 三种缓冲液, 显色剂为次氯酸钠及邻苯二甲醛, 荧光监测器监测, 记录结果如图 6。用浓度均为 0.6 微克分子/毫升的各种氨基酸混合液以同样条件进入色谱仪, 获得图谱为对照。比较酶组分中各氨基酸峰面积与相对应标准氨基酸峰面积, 由此比值可计算各组分的克分子百分比, 结合酶的分子量可计算此酶分子中各种氨基酸残基的个数, 如表 1 所示, 糖化型 α -淀粉酶分子由 396 个氨基酸残基所组成。

5) 糖的存在 按照酚—硫酸法^[13]确定该酶是否为糖肽类复合酶, 结果为含糖 0.598%, 远小于该方法的误差范围 2%, 可认为在此酶中无糖存在。

6) 稳定性 酶的 pH 稳定性及热稳定性试验按方法中七、八进行, 结果如图 7。表明糖化型 α -淀粉酶在 pH 5 至 8.5 的范围内

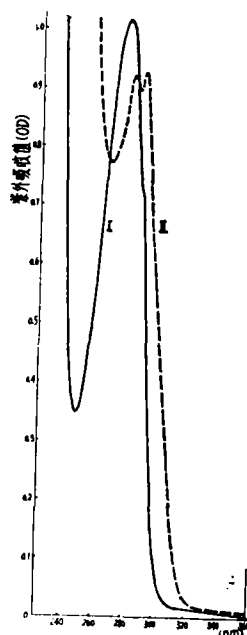


图 5 糖化型 α -淀粉酶的紫外吸收光谱

I 线样品 0.9ml, 水 0.9ml 作对照, II 线加 0.1ml 1N NaOH。

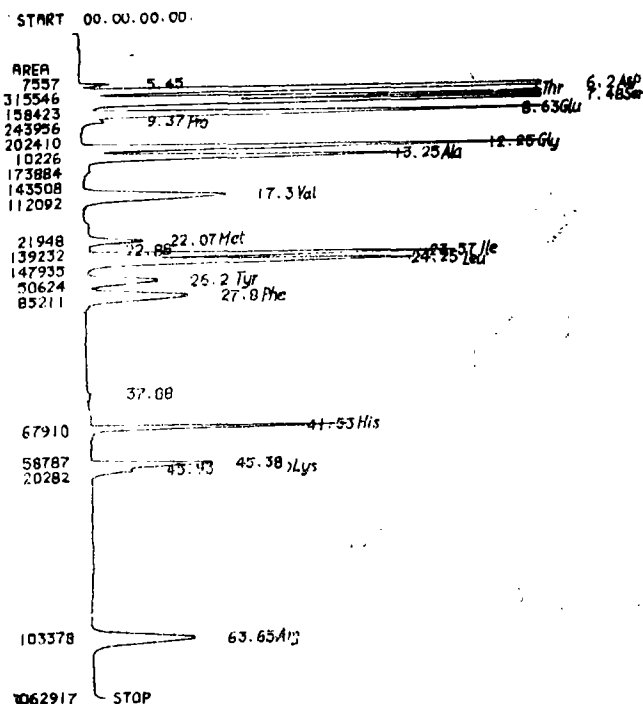


图 6 氨基酸组成分析高压液相色谱图(甲)

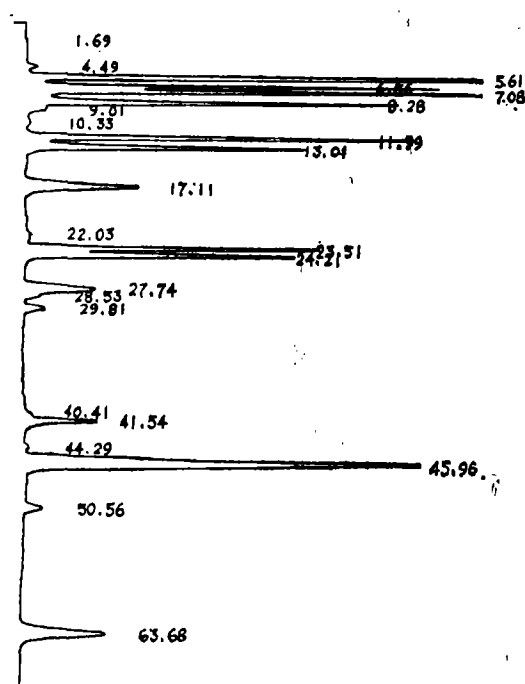


图6 氨基酸组成分析高压液相色谱图(乙)

甲、盐酸水解样，乙：过甲酸氧化后盐酸水解样，其中磺基丙氨酸位置无峰，无法测量面积，但有一明显台阶，并结合巯基试剂的作用(见后)表示存在半胱氨酸。

表1 糖化型 α -淀粉酶氨基酸组成

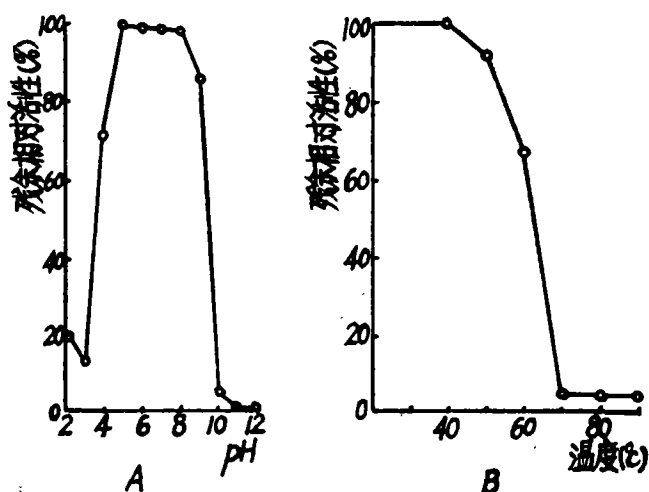
名 称	百 分 数	个 数	名 称	百 分 数	个 数
Asx	14.99	59	Ile	5.17	20
Thr	6.56	26	Leu	5.74	23
Ser	9.72	38	Tyr	4.13	16
Glx	9.18	36	Phe	3.31	13
Pro	1.01	16	His	2.38	9
Gly	8.22	32	Lys	5.81	23
Ala	8.06	32	Arg	3.91	16
Val	4.55	18	Trp	2.91	12
Met	1.38	6	$\frac{1}{2}$ Cys		1

是稳定的，过酸及过碱环境都能使酶严重失活；另一方面，此酶在40~50℃及以下稳定的，60℃时失活约 $\frac{1}{3}$ ，70℃时则基本上完全失活。

2. 糖化型 α -淀粉酶的酶学性质

1) 酶反应的动力学性质 Michaelis 和 Menten 二氏提出的酶与底物反应的基本方程式

为：
$$E + S \xrightleftharpoons[K_2]{K_1} [ES] \xrightarrow{K_3} E + P$$
，形成络合物[ES]的平衡常数 K_m (米氏常数)反映了酶与某

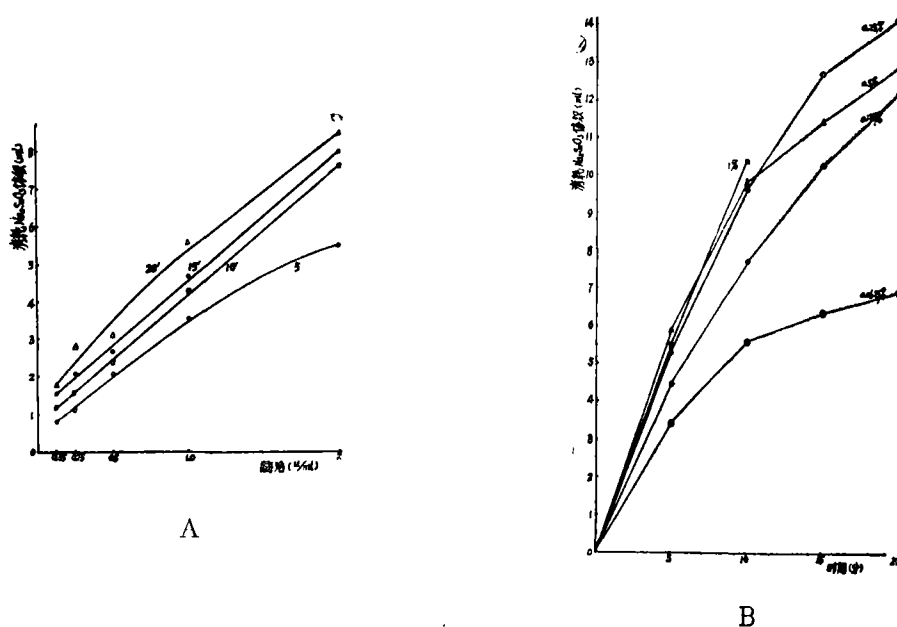
图7 糖化型 α -淀粉酶的稳定性试验

A. pH 稳定性, 缓冲液使用 Britton-Robinson 系统。

B. 热稳定性, 处理时间 15 分钟。

种底物的亲合能力。按照方法中九所述可得图 8, 按 Lineweaver-Burk 图解法可知此酶对于可溶性淀粉的米氏常数为 0.057%, 最大反应速度为 1.3 微克分子/分钟·毫升·酶活单位。

2) 酶反应的热力学性质 酶反应的速度与温度的关系是酶的热力学特性。为了测定温度对酶反应速度的影响, 将底物试管在不同温度水浴中预热五分钟, 然后加入酶液作用, 结果见图 9。表明该酶作用的最佳温度约为 66°C, 虽然在这温度下维持 15 分钟会使酶失活 50% 以上, 但温度对反应速度的促进与对酶蛋白性失活的综合作用产生的最佳温度高出了耐热温度范围。由以上试验结果和热力学有关公式可计算得该酶的某些热力学性质^[4]: 活化能 $E = 8.37$



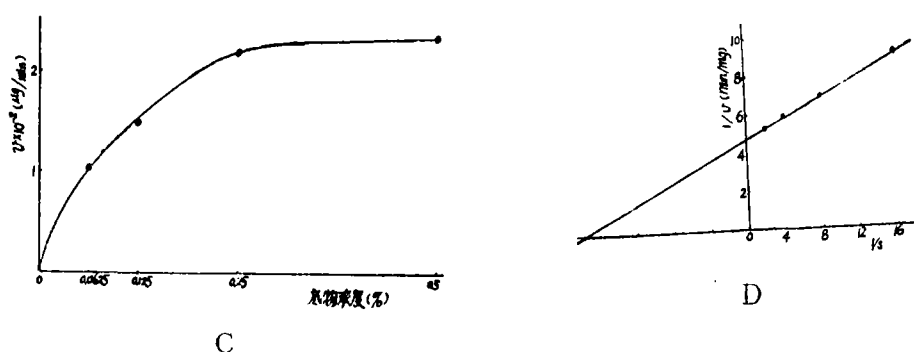


图8 酶反应动力学研究

A. 不同酶浓度作用于同一底物时产物与酶浓度的关系; B. $1\text{u}/\text{ml}$ 酶液作用于不同浓度底物时产物与时间的关系; C. 由B 计算获得反应初速度与底物浓度的关系; D. Lineweaver-Burk 双倒数图, 由直线与座标轴交点计算米氏常数及最大反应速度。

千卡/克分子, 自由能变化 $\Delta G^\ddagger = 15.1$ 千卡/克分子, 焓变 $\Delta H^\ddagger = 7.75$ 千卡/分子, 熵变 $\Delta S^\ddagger = -23.5$ 熵单位。

3) pH 对酶反应的影响 pH 除了对酶稳定性有影响外, 对酶的电性状态的影响亦直接关系到酶反应的最大速度及与底物的亲合能力。利用上述 Britton-Robinsen 缓冲液进行 pH 对酶反应影响的试验, 结果见图 10。表明在试验条件下酶作用的最佳 pH 处于 5 和 6 之间。

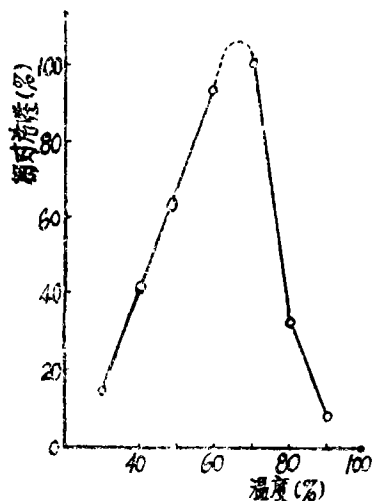


图9 温度对酶反应速度的影响

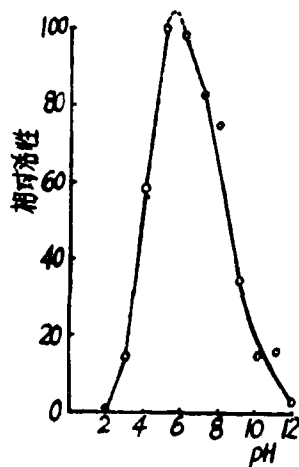


图10 pH 对酶反应速度的影响

4) 酶反应的激活剂和抑制剂 盐类对于酶反应的影响或是使形成活化络合物的平衡常数发生改变, 或是与反应物发生结合。为避免酶制剂中缓冲盐类的干扰, 样品需先经透析处理; 使用同一种酸的盐类以避免不同酸根离子的不同影响, 结果见表 2。表明钠、钾、钙、钡对此酶有激活作用, 而铅、汞、铁则起抑制作用。对于三种有机物对酶反应影响的试验 (见表 2) 可看到① 能受 EDTA 络合除去的金属离子对此酶并非特需的, 因此 EDTA 没有导致酶活下降; ② 酶的活性中心存在半胱氨酸, 但该巯基并非处于活性中心的关键部位上, 由 PCMB 结合巯基造成的抑制酶活作用并不十分强烈, 同样说明组氨酸或酪氨酸在酶分子

活性中心占有一定地位但也不是必需的。

表 2 某些试剂对酶活的活和抑制

试 剂	浓 度 (M)	相对活性 (%)	试 剂	浓 度 (M)	相对活性 (%)
对 照		100	KCl	0.001	133.1
NaCl	0.001	143.3	CaCl ₂	0.001	123.6
MgCl ₂	0.001	103.8	BaCl ₂	0.001	121.0
NiCl ₂	0.001	109.6	ZnCl ₂	0.001	81.5
SnCl ₂	0.001	69.3	HgCl ₂	0.001	62.0
CuCl ₂	0.001	82.9	PbCl ₂	0.001	62.0
SrCl ₂	0.001	83.4	CoCl ₂	0.001	103.9
FeCl ₃	0.001	0	EDTA	0.001	112.7
P-CMB	0.001	86.6	MIAC	0.001	84.7
(ClHg-C ₆ H ₄ COOH)			(ICH ₂ COOH)		

参 考 文 献

- [1] 陶文沂等,《无锡轻工业学院学报》,1984, No.2, 9—16
- [2] O. Vesterberg, in "Methods in Microbiology" (J. R. Norris & D. W. Ribbons, eds.) Academic Press, New York(1970)
- [3] P. Andrews, *Biochem. J.*, **91**, 222(1964)
- [4] *idem. ibid.*, **96**, 595(1965)
- [5] TKS-GEL Ordering Information. Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd.
- [6] Moore, S., & Stein, W. M., in "Methods in Enzymology" Vol 6 (S. P. Colowick & N. O. Kaplan) Academic Press, Inc., New York(1963)
- [7] Goodwin & Morton, *Biochem. J.*, **40**, 628(1946)
- [8] Stanford Moore, *J. Biol. Chem.*, **238**, 235-7(1963)
- [9] Kang S. Lee & Dennis G. Drescher, *Am. J. Biochem.*, **9**, 457(1978)
- [10] Britton & Robinsen, *J. Chem. Soc.*, 1456(1931)
- [11] H. Lineweaver & D. J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658(1934)
- [12] K. Weber & M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406(1969)
- [13] M. Dubois et al, *Anal. Chem.*, **28**, 350(1956)
- [14] Y. Shimada et al, *J. Biochem.*, **93**, 1655(1983)

Studies on Bacterial Saccharogenic α -Amylase from *Bacillus subtilis* (II)

The Properties of the Enzyme BSA

Tao Wenyi S. Okumura A. Sugihara S. Okada

(Osaka Municipal Technical Research Institute, Japan)

ABSTRACT

Saccharogenic α -amylase had an isoelectric point pH 5.16, molecular weight 42,000~45,000, and the ultraviolet absorbance $E_{280}/E_{260} = 1.80$. The enzyme protein was composed of 396 amino acid residues. The pH stability range was between pH 5.0 and 8.5. The heat stability range was below 40—50°C. The optimum pH for action was pH 5.5 and the optimum temperature, 66°C. The Michaelis constant for soluble starch was 0.057 and the maximum reacting velocity was 1.3 micromoles per minute per milliliter per unit of the enzyme. Some metal ions, such as Na^+ , K^+ , Ca^{++} and Ba^{++} had activating action to the enzyme, but the ions of pb^{++} , Hg^{++} , Fe^{+++} and some reagents had inhibiting action to it.