

黑曲霉突变株葡萄糖淀粉酶的底物特异性

管汉成 严自正 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100085)

摘要 黑曲霉(*Aspergillus niger*)突变株 T-21 葡萄糖淀粉酶(GAI)仅能水解多种淀粉及麦芽低聚糖生成唯一产物 β -葡萄糖,其水解麦芽糖及麦芽三糖的速度分别为 200 和 570mg 葡萄糖 $\cdot$ h $^{-1}$ $\cdot$ mg $^{-1}$ 。GAI 水解 α -1,4 键的速度比水解 α -1,6 键快 100 多倍。除了马铃薯淀粉外,对其它淀粉及麦芽低聚糖几乎都能 100% 地水解,但不能水解环状糊精,其水解各麦芽低聚糖的最先产物都比原底物少一个葡萄糖单位,说明 GAI 为一外切型淀粉酶。GAI 对麦芽糖、麦芽三糖、可溶性淀粉、糯米淀粉、糊精及糖原的 K_m 值分别为 1.92mmol/L、0.38mmol/L、0.053%、0.045%、0.059%、及 0.076%, V_{max} 分别为 550、1370、1270、1520、1120 和 1220mg 葡萄糖 $\cdot$ h $^{-1}$ $\cdot$ mg $^{-1}$ 。D-葡萄糖酸- δ -内酯及麦芽糖醇对此酶分别具有反竞争性抑制和混合性抑制。

关键词 黑曲霉突变株,葡萄糖淀粉酶,糖苷酶,底物特异性

前文^[1]报道了由黑曲霉突变株 T-21 葡萄糖淀粉酶制剂纯化了一型葡萄糖淀粉酶 GAI,研究了其分解生淀粉的速率及其一般酶学性质。由于目前生产上还是较多使用葡萄糖淀粉酶来水解蒸煮后的淀粉即所谓糊化淀粉,因此本文进一步研究了 GAI 分解糊化淀粉及麦芽低聚糖的初速度、水解限度、 K_m 及 V_{max} 值等。

1 材料和方法

1.1 材料

黑曲霉突变株 T-21 葡萄糖淀粉酶 I(GAI),凝胶电泳均一^[1]。

1.2 主要化学试剂及仪器

麦芽低聚糖(G_3 - G_7), α -、 β -、 γ -环状糊精及玉米淀粉(Sigma),麦芽糖醇(Hayashibara),可溶性淀粉(北京红星化工厂分装),马铃薯淀粉(E. Merck),葡萄糖氧化酶(80U/ml,本所发酵工厂),糯米淀粉(本所杨寿钧先生赠送),721 分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.3 分析方法

1.3.1 酶活力测定:反应系统同文献^[1],还原糖除用 DNS 法^[1]测定外,还用葡萄糖氧化酶法^[2]。

1.3.2 总糖测定:采用张翼仲报道的蒽酮-硫酸法^[3]。

· 国家自然科学基金资助项目和中国科学院资助项目。

本文于 1992 年 3 月 3 日收到。

1.3.3 糖的薄层层析:展开剂为(1)正丁醇:乙醇: $H_2O=10:1:2$, (2)75%异丙醇:乙酸=9:1,显色剂、层析及显色反应同文献[1]。

2 结果和讨论

2.1 对不同底物的水解作用

用GAI对多种底物如由 α -1,4葡萄糖苷键连接的麦芽低聚糖,由 α -1,4及 α -1,6葡萄糖苷键连接的淀粉,由其它葡萄糖苷键连接的及由其它单糖组成的多糖,和没有末端的 α -、 β -、 γ -环状糊精进行水解。结果表明,GAI仅能催化水解麦芽低聚糖和淀粉,不能水解岩藻多糖、甘露聚糖、木聚糖、帕拉金糖、右旋糖酐、茁霉多糖、地衣多糖及 α -、 β -、 γ -环状糊精。说明GAI对多糖中糖的组成及糖苷键具有较强的专一性。GAI不能水解三种环状糊精,说明没有内切性质,必须从末端开始切断 α -1,4或 α -1,6葡萄糖苷键。

2.2 不同底物的水解初速度及水解限度

2.2.1 水解初速度:为了比较GAI水解 α -1,4及 α -1,6葡萄糖苷键的速度,以麦芽糖和异麦芽糖为底物,浓度为 2.0 mol/L 。加酶液后,前者于 50°C 水浴反应10分钟,后者则反应1小时,用葡萄糖氧化酶法测葡萄糖生成量。结果表明,GAI对 α -1,4及 α -1,6键都能水解,但水解前者的速度远远高于后者(100多倍)(表1),这和许多报道中的葡萄糖淀粉酶作用情况相同^[1-6]。

以 1.0 mmol/L 的麦芽低聚糖和0.1%的各种淀粉糊精为底物,加酶液后于 50°C 反应5分钟,用葡萄糖氧化酶法测酶活力,各种底物的酶解初速度见表1。一般水解淀粉的初速度在 $1000\text{ mg 葡萄糖}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ 左右。各种低聚糖底物中,随着所含葡萄糖数的增加,起始速度也相应增加,这种效应在二糖、三糖和四糖之间比较明显,基本上后者都是前者的两倍,四糖以上速度的增加却很小,并且起始速度与以淀粉为底物时相近,分别是麦芽糖和麦芽三糖的5倍和2倍,而这种差别,只是由于链长的不同引起的,这只能用底物与酶结合上的差别来加以解释。国外曾有报道GA活性中心能结合四个葡萄糖分子^[7],本文结果从某种程度上也表明了这一点。

2.2.2 不同底物的水解限度:淀粉浓度为0.1%,加酶液后于 50°C 反应,不同时间取样,用DNS法测糖含量;另以 2 mol/L 盐酸水解淀粉,同样方法测糖总量,以此为100%,求各底物水解限度,见表1。酶对不同底物的水解曲线见图1。

麦芽低聚糖浓度为 1.0 mol/L ,加入酶液后于 50°C 反应,不同时间取样,以葡萄糖氧化酶法测葡萄糖含量。另用蒽酮法测出各种底物的总糖,以此为100%,求水解限度,见表1,酶解曲线见图2。

表中所列各种麦芽低聚糖及可溶性淀粉、糊精、糖原、糯米淀粉和玉米淀粉等几种多糖都能被此酶100%或几乎100%地水解,马铃薯淀粉只能被水解56%左右,可能是由于此淀粉中每隔几个葡萄糖分子就有一个磷酸酯键,从而影响了GAI对它的酶解;另外糯米淀粉和玉米淀粉有较多的枝链,其水解速度要大些,糖原可能是由于它枝链多而短,这样相对来说就会碰到较多的 α -1,6糖苷键,从而降低了酶的水解速度。

2.2.3 水解终产物:上述各种淀粉及麦芽低聚糖分别经24和11小时酶解后的产物用薄层层析鉴定,见图3。表明GAI最终的唯一产物是葡萄糖。

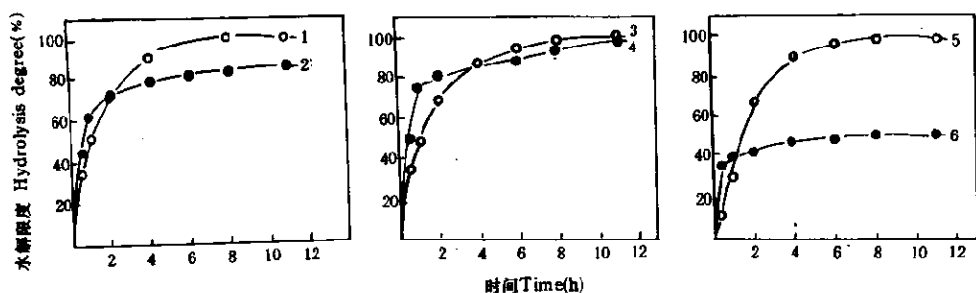


图 1 葡萄糖淀粉酶对多糖底物的水解曲线

Fig. 1 The hydrolysis curve of glucoamylase to different polysaccharide substrates

1. 糊精 Dextrin; 2. 可溶性淀粉 Soluble starch;
3. 糖原 Glycogen; 4. 糯米淀粉 Glutinous rice starch;
5. 玉米淀粉 Corn starch; 6. 马铃薯淀粉 Potato starch.

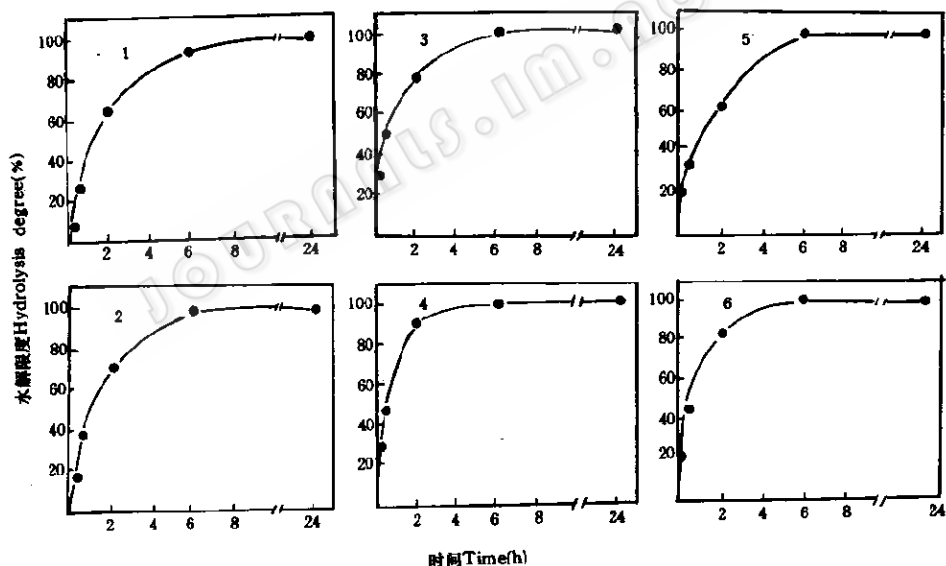


图 2 葡萄糖淀粉酶对寡糖底物的水解曲线

Fig. 2 The Hydrolysis curve of glucoamylase to different oligosaccharide substrates

1. 麦芽糖 Maltose; 2. 麦芽三糖 Maltotriose; 3. 麦芽四糖 Maltotetraose;
4. 麦芽五糖 Maltopentaose; 5. 麦芽六糖 Maltohexaose; 6. 麦芽七糖 Maltoheptaose.

2.3 酶解麦芽低聚糖中间产物的研究

将麦芽三糖(G_3)至麦芽七糖(G_7)五种寡糖用薄层层析鉴定其纯度(图 4),表明这五种寡糖皆为纯品。

表 1 酶解不同底物的初速度

Table 1 Initial velocity of enzymatic hydrolysis of different substrates

底物 Substrates	浓度 Concn.	糖苷键 Glycosidic bond linkage	初速度 Initial rates (mgGlc. h ⁻¹ . mg ⁻¹)	水解限度 Degree of hydrolysis(%)
可溶性淀粉 Soluble starch			1161.7	100
糊精 Dextrin			984.3	100
糯米淀粉 Glutinous rice starch		α-1,4	1136.7	96.7
马铃薯淀粉 Potato starch		0.1%	α-1,6	55.6
糖原 Glycogen			942.2	100
玉米淀粉 Corn starch			1157.6	100
异麦芽糖 Isomaltose	2mmol/L	α-1,6	1.74	
麦芽糖 Maltose	2mmol/L	α-1,4	203.6	100
麦芽三糖 Maltotriose			569.7	100
麦芽四糖 Maltotetraose			1018.4	100
麦芽五糖 Maltopentaose	1mmol/L	α-1,4	1111.0	100
麦芽六糖 Maltohexaose			1149.2	100
麦芽七糖 Maltoheptaose			1200.2	100

分别将G₃至G₇配成浓度为1.0mmol/L,加入酶液后于50℃反应,不同时间取样,用薄层层析对反应中间产物进行鉴定,见图5。各种低聚糖底物在较短反应时间内其产物皆为葡萄糖和比原底物少一个葡萄糖单位的低聚糖,随着反应时间的增加,逐渐出现了少二个、三个……葡萄糖单位的寡糖,直至最后生成唯一产物葡萄糖,证明此酶是外切酶,其酶解机制是从底物上逐个地切下葡萄糖单位的,这与有关报道相符^[4-6,8]。另外,从图上可以看到,随着反应时间的增加,麦芽糖有一累积效应,这是由于酶解麦芽糖的速度比其它低聚糖慢的缘故,这在食品工业上可以加β-葡萄糖苷酶予以克服。再则在本实验反应过程中没有见到转苷现象。

GA水解淀粉是由糖链的非还原端逐个切下葡萄糖的,过去一般均用示意图表示,没有报道过其模式图。本文在控制了底物浓度,酶量与反应时间,对五种寡糖的中间产物进行了薄层层析,得到了一个直观的外切型酶水解图。

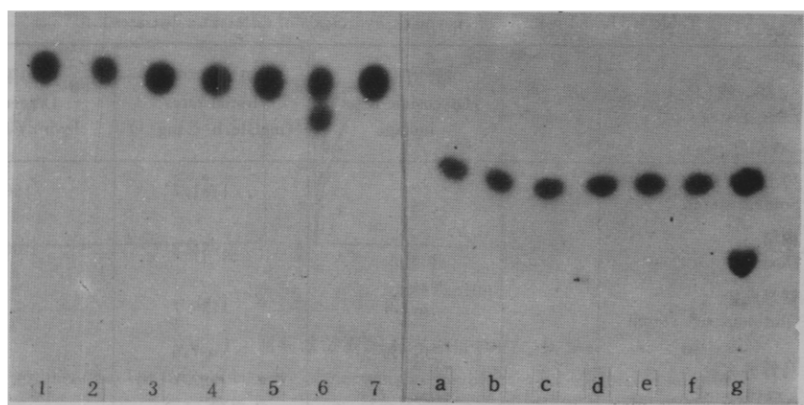


图3 各种底物的酶解终产物

Fig. 3 The final products of enzymatic hydrolysis of different substrates

- | | |
|--------------------------------|-------------------------------|
| 1. 马铃薯淀粉 Potato starch; | a. 麦芽糖 Maltose; |
| 2. 糊精 Dextrin; | b. 麦芽三糖 Maltotriose; |
| 3. 糯米淀粉 Glutinous rice starch; | c. 麦芽四糖 Maltotetraose; |
| 4. 糖原 Glycogen; | d. 麦芽五糖 Maltopentaose; |
| 5. 玉米淀粉 Corn starch; | e. 麦芽六糖 Maltohexaose; |
| 6. 葡萄糖和麦芽糖 Glucose + Maltose; | f. 麦芽七糖 Maltoseptaose; |
| 7. 标准葡萄糖 Standard glucose. | g. 葡萄糖和麦芽糖 Glucose + Maltose. |

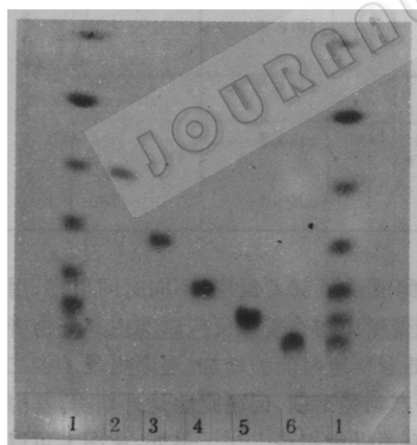


图4 麦芽低聚糖薄层层析图

Fig. 4 Thin-layer chromatography of oligosaccharides

1. 葡萄糖及麦芽低聚糖标准
Standard glucose and oligosaccharides;
2. G_3 ; 3. G_4 ; 4. G_5 ; 5. G_6 ; 6. G_7 .

2.4 K_m 及 V_{max} 值

配制各淀粉浓度为 0.1% 至 1.0%，各麦芽低聚糖浓度分别为 0.8、1.0、1.25、2.0 及 2.5 mmol/L。加酶液后于 50℃ 反应 5 分钟，分别用 DNS 法和葡萄糖氧化酶法测葡萄糖生成量，按 Lineweaver-Burk 双倒数法作图，见图 6 和图 7。

各种底物的 K_m 及 V_{max} 见表 2。各种淀粉中糯米淀粉的 K_m 最小而 V_{max} 最大，这是由于它含有较高的枝链度的原故。酶对麦芽三糖的亲合力及 V_{max} 都远远高于麦芽糖的，说明糖链长度影响着酶活力，即糖链长酶活力高。这和前面测定的初速度结果是一致的。

2.5 底物或产物类似物对酶活力的影响

将 D-葡萄糖酸- δ -内酯、肌醇、环状糊精等 9 种化合物配成溶液，与酶液混合，在 30℃ 保温 30 分钟，然后按常规方法测定酶活力，结果麦芽糖醇和 D-葡萄糖酸- δ -内酯对 GAI 有较强的

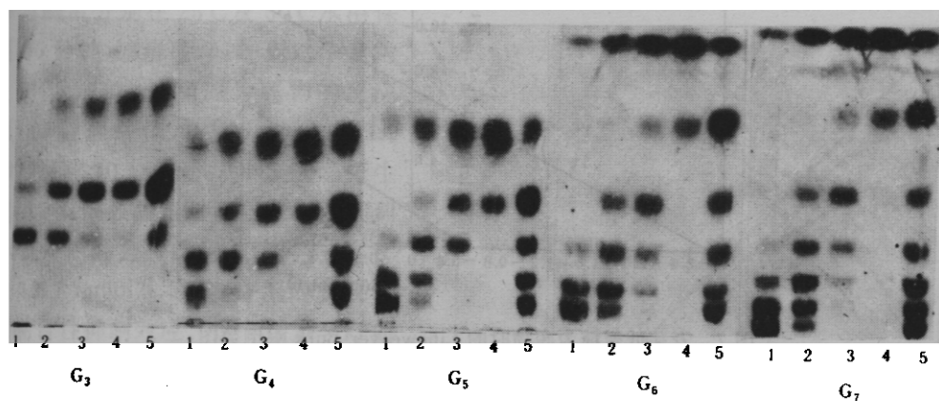


图5 麦芽低聚糖酶解中间产物

Fig. 5 The intermediate products of enzymatic hydrolysis of different oligosaccharides

1. 1 min; 2. 5 min; 3. 10 min; 4. 30 min; 5. 标准麦芽低聚糖 Standard oligosaccharides.

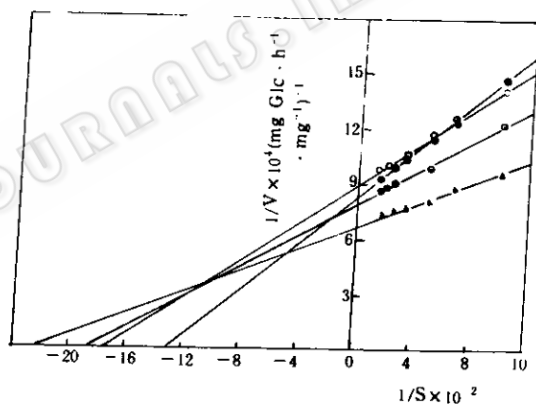


图6 多糖为底物时的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig. 6 Lineweaver-Burk plots for polysaccharide substrates

▲ 糯米淀粉 Glutinous rice starch;

· 可溶性淀粉 Soluble starch;

● 糖原 Glycogen; ○ 糊精 Dextrin.

抑制作用;肌醇、 α -和 β -环状糊精也有弱的抑制作用,其它化合物对酶活力无多大影响(表3)。

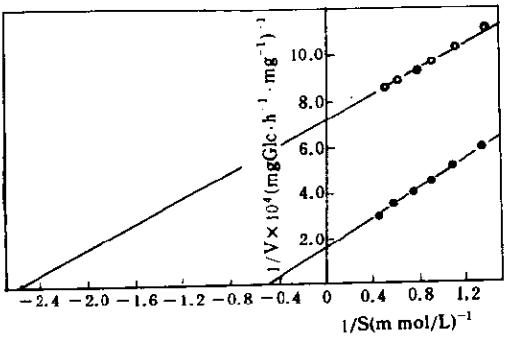


图 7 麦芽低聚糖为底物时的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig. 7 Lineweaver-Burk plots for oligosaccharide substrates

● - 麦芽糖 Maltose; ○ - 麦芽三糖 Maltotriose.

表 2 GAI 的米氏常数 K_m 和最大速度 V_{max}

Table 2 K_m and V_{max} of GAI

底 物 Substrates	米氏常数 K_m	最大速度 V_{max} (mg Glc. h ⁻¹ . mg ⁻¹)
糯米淀粉 Glutinous rice starch	0.045%	1520
可溶性淀粉 Soluble starch	0.053%	1270
糊精 Dextrin	0.059%	1120
糖原 Glycogen	0.076%	1220
麦芽糖 Maltose	1.92mmol/L	590
麦芽三糖 Maltotriose	0.38mmol/L	1370

表 3 碳水化合物对 GAI 活性的影响

Table 3 Effect of carbohydrates on GAI activity

碳水化合物 Carbohydrates	浓 度 Concn. (mmol/L)	相对活力 Relative activity (%)
空白对照 None	0.0	100
D-葡萄糖酸内酯 D-Gluconic acid lactone	10.0	41.4
肌 醇 Inositol		88.4
核糖醇 Ribitol		99.2
麦芽糖醇 Maltitol		36.2
α-环状糊精 α-Cyclodextrin	0.2%	79.0
β-环状糊精 β-Cyclodextrin		75.8
γ-环状糊精 γ-Cyclodextrin		97.9
茁霉多糖 Pullulan		105.0
昆布糖 Laminarin		103.3

将 D-葡萄糖酸- δ -内酯和麦芽糖醇与酶液分别在 25 C 及 30 C 水浴保温 30 分钟, 冰浴冷却, 加到以浓度为 0.1% 至 1.0% 的糖原为底物的反应液, 抑制剂终浓度为 5.0 mmol/L。50C 反应 10 分钟, 用 DNS 法测糖生成量。双倒数法作图, 见图 8。D-葡萄糖酸- δ -内酯为一反竞争性抑制剂, K_i 为 12.7 mmol/L, 而麦芽糖醇表现为一混合性抑制效应。这一结果与红曲霉的 GA 不同, 两者均表现为竞争性抑制剂^[9]。此种情况可能是由于所用底物不同, 在测定抑制效应时, 本文所用底物为糖原而非可溶性淀粉; 也可能不同来源的酶性质不同。

2.7 逆合成作用

以 40% 的葡萄糖为底物, 加酶液后于 50C 反应, 分别于 10 小时、24 小时和 48 小时取样, 用薄层层析法鉴定逆合成产物。反应 10 小时后, 有少量麦芽糖生成, 在反应 48 小时后, 又有微量的异麦芽糖生成(图 9)。

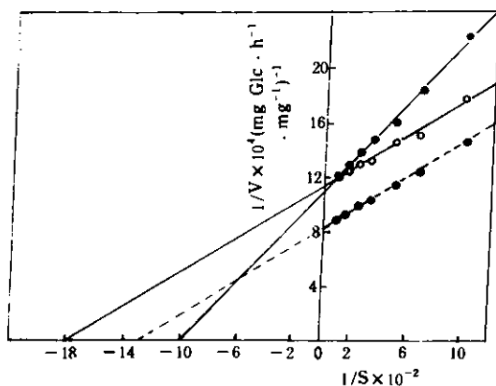


图 8 抑制剂对酶活力的影响

Fig. 8 Effect of inhibitors on the enzymatic activity

- 无抑制剂 No inhibitor;
- - - 葡萄糖酸内酯 D-gluconic acid lactone;
- - 麦芽糖醇 Maltitol.

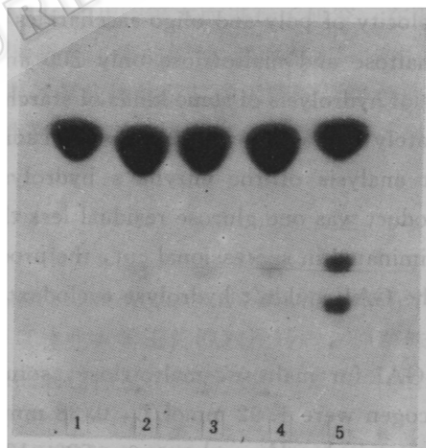


图 9 逆合成薄层层析图谱

Fig. 9 Thin-layer chromatography of retro-synthesizing products

1. 0 h; 2. 10 h; 3. 24 h; 4. 48 h; 5. 标准葡萄糖+麦芽糖+异麦芽糖 Standard marker: glucose + maltose + isomaltose

参 考 文 献

- [1] 管汉成,等.生物化学与生物物理学报,1993,25(5):453.
[2] 唐国敏.微生物学通报,1978,5(4):33.
[3] 张翼仲.复合多糖生化研究技术,张惟杰主编.上海:上海科学技术出版社,1987.18.
[4] Hattori Y *et al.* *Agric Biol Chem.* 1962,26: 316.
[5] Pazur J H *et al.* *J Biol Chem.* 1959,234(8): 1966.
[6] Linneback D R *et al.* *Arch Biochem Biophys.* 1969,134: 539.
[7] Hiromi, K *et al.* *Mol Cell Biochem.* 1983,51: 79.
[8] Takahashi Y *et al.* *J Biochem.* 1978,84: 1183.
[9] 戈苏园,等.微生物学报,1982,22(2): 126.

SUBSTRATE SPECIFICITY OF GLUCOAMYLASE FROM *ASPERGILLUS NIGER* MUTANT

Guan Hancheng Yan Zizheng Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Glucoamylase GAI from *Aspergillus niger* mutant T-21 hydrolysed only some kinds of starch and maltooligosaccharides and the sole product in each case was glucose. The initial rate of hydrolysis of maltose was 100 times more than that of the isomaltose. The initial hydrolysis velocity of poly-and oligo-saccharides were about 1000 mg Glc. h⁻¹. mg⁻¹, however, maltose and maltotriose only 200 and 570 mg Glc. h⁻¹. mg⁻¹ respectively. The degree of hydrolysis of some kinds of starch and maltooligosaccharides were 100% or approximately 100%, but the potato starch somewhat lower. The results of intermediate product analysis of the enzyme's hydrolysing maltooligosaccharides showed that the first product was one glucose residual less than the original substrate, and one more glucose eliminated in successional cut, the process went on untill glucose as the final product. The GAI couldn't hydrolyse cyclodextrins, which indicated GAI was an exo-amylase.

The K_m values of GAI for maltose, maltotriose, soluble starch, glutinous rice starch, dextrin and glycogen were 1.92 mmol/L, 0.38 mmol/L, 0.053%, 0.045%, 0.059% and 0.076% respectively; V_{max} values were 590, 1370, 1270, 1520, 1120 and 1220 mg Glc. h⁻¹. mg⁻¹ respectively. The D-gluconic acid lactone was an anticompetitive inhibitor of GAI and maltitol was a mixed inhibitor.

Key words *Aspergillus niger* mutant, Glucoamylase, Glycosidase, Substrate specificity