

黑曲霉突变株葡萄糖淀粉酶的 化学组成及其光谱学性质

管汉成 严自正 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 黑曲霉突变株葡萄糖淀粉酶中一型 GAI 含糖量为 17.6%。氨基酸分析表明, 天门冬氨酸和谷氨酸(包括酰胺)占 20.3%, 苏氨酸和丝氨酸占 25.1%, 三种碱性氨基酸占 6%。紫外光谱在 278nm 和 250nm 处分别有最大和最小吸收; 其荧光光谱的最大激发波长和发射波长分别为 284nm 与 342nm; 远紫外 CD 谱表现为一双负峰; 在溶液中的构象是 α -螺旋 10.6%, β -折叠 16.3% 和无规卷曲 73.1%。

关键词 黑曲霉突变株; 葡萄糖淀粉酶; 糖苷酶; 光谱; 溶液构象

由黑曲霉突变株 T-21 酶制剂中分离纯化了一型既能被生淀粉吸附又能水解生淀粉的葡萄糖淀粉酶(GAI), 并对其性质及底物特异性进行了较为详尽报道^[1,2], 本文报道 GAI 的部分化学组成及光谱学特性。

材料与方法

(一) 酶溶液

巴彦酶制剂厂生产的黑曲霉突变株 T-21 酶制剂经分离纯化后得到的凝胶电泳均一的 GAI^[1]。

(二) 主要仪器

DU-7 紫外可见分光光度计(Beckman), 850 荧光分光光度计(Hitachi), J-500A 圆二色仪(Jasco), 121 MB 氨基酸自动分析仪(Beckman)。

(三) 分析方法

1. 总糖测定^[3]: 1.0ml 酶蛋白溶液加 8.5ml 地衣酚试剂, 于沸水浴中煮 45 分钟, 冷却后在 505nm 测吸光度。以甘露糖为参照作标准曲线。

2. 氨基酸组成测定: GAI 加 5.7mol/L 盐酸于水解管中抽真空封口, 105℃ 水解 24、48、72 小时, 取出后抽干盐酸; 测定 Trp 时, 样品改用 4mol/L 甲基磺酸(含 0.2% 色胺)水解 24 小

时, 用等体积 4mol/L NaOH 中和; 水解液用上柱缓冲液稀释, 用氨基酸自动分析仪测定。

结果与讨论

(一) 化学组成

1. GAI 的总糖含量: 酶溶液蛋白浓度为 238 μ g/ml, 用地衣酚-硫酸法测总糖, 得糖含量为 42.0 μ g/ml, 占总蛋白量的 17.6%。

2. 氨基酸组成: 按方法所述测定 GAI 在水解 24、48 及 72 小时后各氨基酸含量, Ser 和 Thr 外推到零时, 其他氨基酸用三个水解时间的平均数, 最后求出一个酶分子实际所含的各氨基酸残基数及百分含量(表 1), 总残基数约 580 多。

GAI 富含羟基氨基酸 Ser 和 Thr (25.1%), Asx 和 Glx 含量也较多(20.3%), 这种现象在糖蛋白中非常普遍^[4], 因为糖与蛋白质的结合就是靠糖与 Ser 和 Thr 的羟基相连或与 Asn 和 Gln 的氨基相连, 所以这几种氨基酸的含量高与 GAI 含糖量高是相应的。

(二) 光谱学性质

1. 紫外光谱: 在 pH4.5 的 0.05mol/L 醋酸缓冲液中对 GAI 进行紫外扫描, 扫描范围为

国家自然科学基金资助项目及中国科学院资助项目。

表1 GAI的氨基酸组成

氨基酸	残基数	含量(%)
Asx	65	11.2
Thr	67	11.5
Ser	79	13.6
Glx	53	9.1
Pro	23	4.0
Gly	46	7.9
Ala	61	10.5
Cys	3	0.5
Val	33	5.7
Met	5	0.9
Ile	15	2.6
Leu	40	6.9
Tyr	25	4.3
Phe	20	3.4
Lys	13	2.2
His	5	0.9
Trp	11	1.9
Arg	17	2.9

220nm-300nm,在波长250nm及278nm处分别有最小和最大吸收,为一典型蛋白吸收峰(图1)。

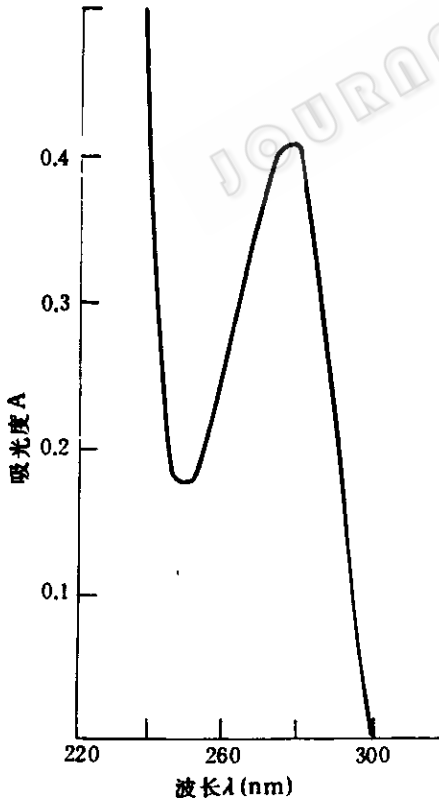


图1 GAI的紫外吸收光谱

2. 荧光光谱,在 pH4.5 的 0.05mol/L 醋酸缓冲液中,测 GAI 的荧光波谱,得最大激发波长 $E_x=284\text{nm}$;在这一激发波长下测发射波谱,从 300nm 至 400nm 进行扫描,得最大发射波长 $E_m=342\text{nm}$ (图2)。

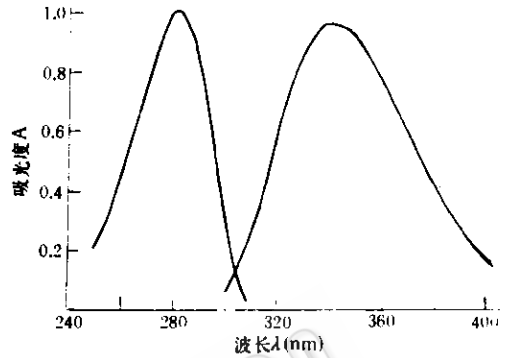


图2 GAI的荧光光谱
左:激发光谱; 右:发射光谱

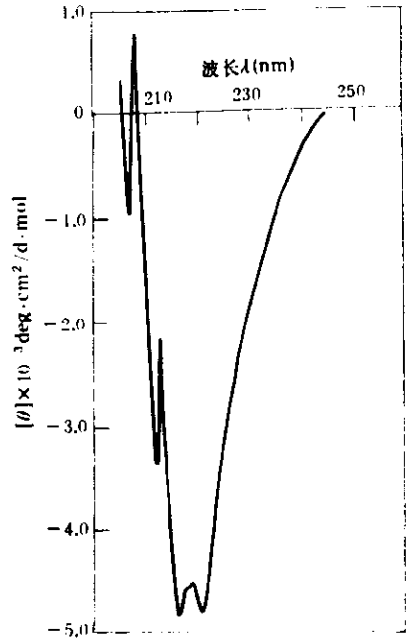


图3 GAI的圆二色谱

3. 远紫外圆二色(CD)谱:酶浓度为 0.238mg/ml,采用 pH4.5,0.05mol/L 的醋酸

缓冲液,比色杯光径 0.5cm,扫描波长为 200nm 至 250nm,测定时室温为 18℃。每一数据为两次实验平均值,扫描结果见图 3。 $[\theta]$ 以平均克分子氨基酸残基椭圆值表示,单位为:deg·cm²/d·mol,平均氨基酸残基分子量取 115。

依据 CD 谱结果,以最小二乘法^[5]计算 α -螺旋(f_{α}), β -折叠(f_{β}),及无规卷曲(f_R)的相对含量,结果为:

$$f_{\alpha}=10.6\%; f_{\beta}=16.3\%; f_R=73.1\%。$$

其构象单元中 α -螺旋最少,大部分以无规卷曲形式存在,这可能是由于此酶含糖量较高,而蛋白分子上的糖分子对蛋白的主链构象起着很重要的作用,影响了蛋白质主链的空间伸展,所以 GAI 在溶液中以 α -螺旋这种紧密状态形式存在很少,而主要呈现出 β -折叠和无规卷曲。曾有报道^[6]红曲霉葡萄糖淀粉酶的两个组份

E_3 和 E_4 的 α -螺旋分别占 22.8%和 15.3%,略高于 GAI,但 E_3 和 E_4 含糖量(7—9%)低于 GAI。一般来说,糖蛋白在溶液中的构象都表现出这种效应^[7]。

参 考 资 料

1. 管汉成等:生物化学与生物物理学报,25(5):453—460,1993。
2. 管汉成等:微生物学报,33(6):1993。
3. Francois C et al.:Biochem. J.,88:335,1962。
4. 胡朝彬等:生物化学与生物物理学报,17:16,1985。
5. Chen Y H et al.:Biochem.,13:3350,1974。
6. 杨寿钧等:中国科学 B 辑,11:1000,1983。
7. Pazur J H et al.:Carbohydrate Research,20:83,1971。

(1992-12-10 收稿)

THE CHEMICAL COMPOSITION AND SPECTRUM CHARACTERISTICS OF GLUCOAMYLASE FROM AN *ASPERGILLUS NIGER* MUTANT

Guan Hancheng Yan Zizheng Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Purified GAI, one form of glucoamylase obtained from *Aspergillus niger* mutant T21 contained 17.6% total carbohydrate. Analyses of amino acid composition showed that GAI contained about 25% Ser and Thr, 20.3% Asx and Glx and 6% basic amino acids. The UV absorption and fluorescence spectra of GAI were determined. The maximum absorption wavelength was at 278nm and minimum at 250nm. For fluorescent analyses the excitation and maximum emission spectra were at 284nm and 342nm respectively. The CD-spectrum determined showed two negative peaks. Its dispersion of secondary structure in solution showed 10.6% α -helix, 16.3% β -form and 73.1% unordered.

Key words *Aspergillus niger* mutant; Glucoamylase; Glycosidase; Spectrum; Solution conformation