

产碱菌麦芽四糖淀粉酶多型性的形成

朱 静 车凤琴 严自正 梁改芹 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 产碱菌培养液的酶谱呈一主带 G₄A-1 及两次带 G₄A-2 与 G₄A-3, 分别进行纯化并鉴定其水解产物, 均为麦芽四糖, 说明三者全是麦芽四糖淀粉酶, 它们以多型性形式存在于产碱菌培养液中。培养液中没有检出糖苷酶, 24, 72, 96h 培养液中不含蛋白酶(仅 48h 培养液中有微量蛋白酶), 说明多型性不是糖苷酶和蛋白酶造成的。改变培养条件不影响多型性产生, 仅影响到 G₄A-2 及 G₄A-3 生成量的多少。

关键词 产碱菌; 麦芽四糖淀粉酶; 糖苷酶; 多型性

麦芽四糖淀粉酶(1, 4- α -D-glucan maltotetraosehydrolase EC 3.2.1.60)顺序切割糖链的非还原性末端的第四个 α -1, 4-葡萄糖苷键, 产物为麦芽四糖。1971 年该酶由 Robyt 和 Ackerman^[1]在斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)的培养液中发现。本实验室首次报道了由产碱菌(*Alcaligenes* sp.)中得到麦芽四糖淀粉酶^[2], 并进行了分离纯化^[3]。本文则研究该酶多型性的存在与形成。

1 材料和方法

1.1 菌种、培养基及培养条件

1.1.1 菌种: 为 *Alcaligenes* sp., 菌号为 537.1, 由本实验室分离得到。

1.1.2 培养基及培养条件: 固体斜面培养基为牛肉汁培养基, 28~30℃, 培养 1d。发酵培养基为(%): 麦芽糖 3, 蛋白胨 1, 酵母粉 0.2, KH₂PO₄ 0.2, (NH₄)₂HPO₄ 0.6, NaCl 0.1, FeSO₄·7H₂O 0.01, MgSO₄·7H₂O 0.05, pH 7.5。250ml 三角瓶装 50ml, 0.55kg/cm² 灭菌 30min。

培养条件: 从冷冻保藏管中将菌种接入牛肉汁培养基, 用前活化一代, 然后接入发酵培养基, 28~30℃ 振荡培养。种子培养基除麦芽糖 1.5, 蛋白胨 0.5 外, 其它组分及培养条件均同发酵培养基。

1.2 主要试剂和仪器

麦芽四糖(sigma), 葡萄糖(北京市红星化工厂), 可溶性淀粉(中国医药公司), 干酪素(Sigma), 各种对硝基酚-糖苷(Sigma)。

721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂), J2-21 高速冷冻离心机(Beckman), 5850pH 计(Cole-Parmer)。

国家自然科学基金及中国科学院资助项目。

本文于 1995 年 9 月 22 日收到。

1.3 方法

1.3.1 酶活力测定:以 1.0% 可溶性淀粉为底物, pH6.6, 0.05mol/L 磷酸缓冲液, 50℃ 反应 10min, 详细方法及活力定义见文献[3]。

1.3.2 糖的薄层层析^[4]:展开剂为正丁醇:吡啶:水 = 6:4:3 (体积比); 显色剂为 2% 二苯胺丙酮溶液:2% 苯胺丙酮溶液:85% 磷酸 = 5:5:1, 80℃ 显色 10min。

1.3.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳:按 Davis 方法^[5]进行电泳, 胶浓度为 7%。

1.3.4 淀粉酶电泳区带检测^[6]:常规聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳结束后, 取出胶条, 置于用 pH6.6, 0.01mol/L 磷酸缓冲液配制的 2% 的淀粉溶液中, 冰水浴 18~30min, 蒸馏水稍洗后, 于稀碘液中显色, 淀粉带透明, 其余为蓝紫色背景。(原碘液:11g I₂, 22g KI, 水定容至 500ml。稀碘液:2ml 原碘液, 20g KI, 水定容至 500ml。)

1.3.5 各种糖苷酶活力的定性测定^[7]:将 3mg 各种对硝基酚-糖苷分别溶于 5ml 蒸馏水中, 在 50μl 底物溶液中加入 50μl 培养液, 分别于 37℃ 和 50℃ 保温 15min, 加入 100μl, 1mol/L 碳酸钠溶液中中止反应, 观察溶液颜色变化, 若出现黄色, 说明已将底物分解, 培养液具有糖苷酶活力。

1.3.6 中性蛋白酶和碱性蛋白酶活力的测定^[8]:分别用 0.02mol/L, pH7.5 磷酸缓冲液和 0.05mol/L, pH10.5 硼酸-氢氧化钠缓冲液配制 1% 干酪素溶液, 取 1ml 干酪素溶液, 加入 1ml 培养液, 40℃ 反应 10min, 加入 2ml 0.4mol/L 三氯乙酸溶液中中止反应, 沉淀 10min 后过滤, 取滤液 1ml, 加入 5ml 0.4mol/L 碳酸钠溶液及 1ml 稀释 3 倍后的 Folin 试剂, 40℃ 水浴保温 20min 后在 680nm 比色。以加热失活的酶作为对照。以每分钟水解干酪素产生 1μg 酪氨酸所需酶量定义为一个酶活力单位(u)。

2 结果

2.1 多型性的存在

2.1.1 生长曲线:将斜面菌种接入 50ml 发酵培养基中, 振荡培养不同时间, 分别测定菌体生长(A_{660nm} 吸光度)及除去菌体后的培养液酶活力, 结果产碱菌培养 48h 后即停止生长进入静止期, 酶活力在 72h 最高, 96h 下降。生长及酶活力曲线见图 1。

2.1.2 多型性存在:将培养不同时间的培养液两份同时进行凝胶电泳, 电泳结束后, 一份胶进行蛋白染色, 结果除主带外, 其它组份不太明显; 一份胶进行淀粉酶检测, 结果除主带外, 还明显有另两条次带存在, 一条距主带较近, 一条距主带较远(图版 I-A)。这种现象在培养早期已经存在, 且随着培养时间的延长, 两条次带也随之增加, 说明在产碱菌的培养液中有三种淀粉酶存在, 为方便起见, 命距正极最远端的主带为 G₄A-1, 依次为 G₄A-2, G₄A-3。

2.2 多型性的确证

2.2.1 各型的纯化:将除去菌体的培养液用硫酸铵沉淀, 透析去盐, DEAE-32 纤维素离子交换柱层析, 梯度洗脱, 在洗脱峰中部可得凝胶电泳均一的 G₄A-1, 详细方法已有报道^[3]。在此基础上, 增加纤维素离子交换柱上样量, 减少梯度洗脱上限洗脱液浓度, 可在洗脱峰后半部得到 G₄A-2。G₄A-3 的纯化:制成 10×10×0.5cm, 7.0% 的聚丙烯酰胺平板胶, 将 72h 的培养液进行凝胶电泳, 电泳结束后, 沿边线切下一小条凝胶, 与可溶性淀粉

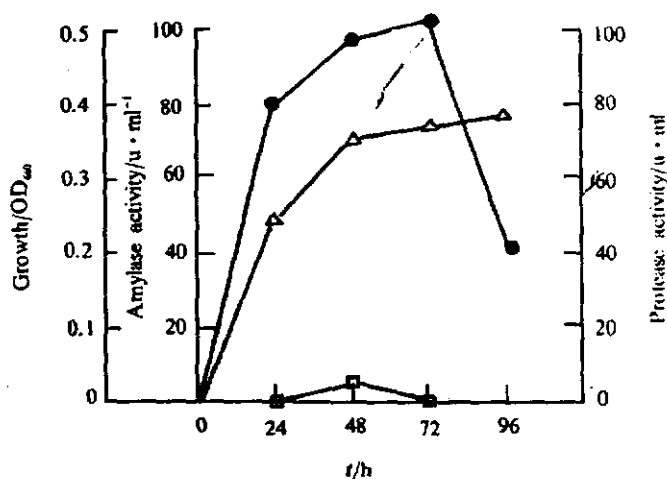


图1 产碱菌麦芽四糖淀粉酶的生成曲线

Fig.1 Production of Maltotetraose-forming Amylase by *Alcaligengs* sp.

—●—, Amylase activity; —△—, Cell growth; —□— Protease activity

在冰浴中反应,然后加碘液显色,可见有三个透明区带出现,然后,根据区带所处位置,将距正极最近的区带切下,置于少量蒸馏水中,反复冻化,使蛋白释放,可得到 G_4A-3 。

2.2.2 多型性的确证:用凝胶电泳鉴定上述分离纯化的 G_4A-1 , G_4A-2 及 G_4A-3 样品的纯度,结果均为均一带(图版 I-B),分别测定酶活力,用硅胶板薄层层析鉴定其水解可溶性淀粉的产物,由图版 I-C 可见,酶解产物均为 G_4 ,确证 G_4A-1 , G_4A-2 , G_4A-3 均为麦芽四糖淀粉酶。

2.3 糖苷酶和蛋白酶对多型性形成的影响

2.3.1 糖苷酶的影响:产碱菌麦芽四糖淀粉酶是糖蛋白^[3],考虑到产碱菌在形成麦芽四糖淀粉酶的同时,是否会产生其它的糖苷酶,由此而造成多型性,分别用 p-硝基酚- α -D-吡喃甘露糖苷, p-硝基酚- β -D-吡喃甘露糖苷, p-硝基酚-N-乙酰- α -D-葡萄糖胺, p-硝基酚-N-乙酰- β -D-葡萄糖胺, p-硝基酚- α -D-吡喃半乳糖苷, p-硝基酚- β -D-吡喃半乳糖苷, p-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷, p-硝基酚- β -D-吡喃葡萄糖苷, p-硝基酚- α -D-吡喃木糖苷, p-硝基酚- β -D-吡喃木糖苷, p-硝基酚- α -L-阿拉伯糖苷等底物与不同培养时间的培养液反应,结果全为阴性,说明培养液中无甘露糖苷酶, N-乙酰葡萄糖胺酶, 半乳糖苷酶, 葡萄糖苷酶, 木糖苷酶, 阿拉伯糖苷酶存在,多型性的形成不是由于糖苷酶切掉糖链造成的。

2.3.2 蛋白酶的影响:测定了不同培养时间培养液中蛋白酶的活力,各种培养液中均无中性蛋白酶活力,48h 培养液中有少量碱性蛋白酶活力(5u/ml),而 24, 72, 96h 培养液中则无,见图 1。由于在培养初期已出现多型性,故 48h 培养液中碱性蛋白酶的出现与多型性无关。

2.4 培养条件对多型性形成的影响

2.4.1 培养基初始 pH:分别在 pH8.5, pH7.5, pH6.5 下进行培养,测定 48h 培养液酶活力,其活力为 pH8.5(128) > pH7.5(100) > pH6.5(32)。用凝胶电泳后酶谱鉴定各培养

液,每种样品加酶量相同。由图版 I-D 可见,均有三条带出现。主带 G_4A-1 相差不大,两条次带则区别较大。 $pH8.5$ 与 $pH6.5$ 的培养液中的 G_4A-2 , G_4A-3 较 $pH7.5$ 的培养液中的生成量要多些,说明培养基初始 pH 的改变会影响到多型性之间的比例。

2.4.2 种子与发酵培养基:用种子培养基和发酵培养基同时进行培养。取 48h 培养液测定酶活力,种子培养液的酶活力为发酵培养液的 45%。用凝胶电泳酶谱鉴定,可见三条带均出现(图版 I-E)。与发酵培养液相比,种子培养液中的 G_4A-2 , G_4A-3 生成量要少些, G_4A-1 则区别不大。

2.4.3 添加葡萄糖:在发酵培养基中加入葡萄糖,使其终浓度为 0.3%,测定 48h 培养液的酶活力,为不加葡萄糖培养液的 113%。用凝胶电泳酶谱进行鉴定,也有三条带出现, G_4A-1 区别不大,但其 G_4A-2 , G_4A-3 的生成量明显多于不加葡萄糖的培养基中的生成量(图版 I-E),说明葡萄糖的加入会促进 G_4A-2 , G_4A-3 的生成。

2.4.4 菌种传代次数:将斜面菌种传代多次后进行培养,48h 后测定酶活,为正常菌种的 86.1%。用凝胶电泳酶谱鉴定其酶带,可见三条带均出现(图版 I-E),且 G_4A-2 , G_4A-3 的量较正常菌种的明显增多, G_4A-1 则区别不大,说明多次传代后,会促进 G_4A-2 , G_4A-3 的生成。

3 讨 论

麦芽四糖淀粉酶具有多型性,此现象较为普遍。早在 1971 年 Robyt 和 Ackerman^[1]就报道在斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)的培养基中至少存在两种活性形式的麦芽四糖淀粉酶;1982 年 Sakano 等^[9]发现在斯氏假单胞菌 NRRL B-3389 的培养液中该酶以两种活性形式存在, F_1 和 F_2 , 并分别将其纯化出来,发现 F_1 和 F_2 的性质相同但等电点不同;1990 年 Nakada 等^[10]报道斯氏假单胞菌 MO-19 也能产生两种活性形式的麦芽四糖淀粉酶, G_4-1 和 G_4-2 , 认为 G_4-2 的形成是由蛋白酶水解 G_4-1 造成的。产碱菌能够产生三种活性形式的麦芽四糖淀粉酶,分别为 G_4A-1 , G_4A-2 , G_4A-3 , 其中, G_4A-1 , G_4A-2 相距很近, G_4A-3 则相距很远。我们将各型酶分离纯化出来,并对其形成原因进行了初步探讨。由于产碱菌不能形成糖苷酶,因此,多型性的形成与糖苷酶无关。产碱菌培养 48h 有少量蛋白酶生成,但多型性在培养 24h 已经出现,说明多型性的形成与蛋白酶无关。这与 Nakada^[10]的结论不同。升高或降低培养基初始 pH , 在发酵培养基中添加葡萄糖,菌种传代多次,对 G_4A-1 影响不大,但会增加 G_4A-2 和 G_4A-3 的生成量;用种子培养基替换发酵培养基,会减少 G_4A-2 和 G_4A-3 的生成量。说明培养条件的改变不影响多型性的形成,但对各型酶生成的比例会产生影响。有关产碱菌麦芽四糖淀粉酶多型性形成的原因,仍是个未知数,我们推测,也许与各型酶糖基化程度不同有关,究其原因如何以及各型酶的结构、性质有何区别,还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1]Robyt J F, Ackerman R J. Arch Biochem Biophy, 1971, 145:105~141.

[2]严自正,余晓红,李 梅等.生物工程学报,1992,8:288~293.

[3]余晓红,严自正,李 梅等.微生物学报,1993,33(5):339~346.

- [4] 戈苏国, 中性糖的测定. 见: 张惟杰主编, 复合多糖生化研究技术, 上海: 上海科学技术出版社, 1987. p. 1~2.
- [5] Davis B J. *Ann N Y Acad Sci.* 1964, 121: 404.
- [6] Sakano Y, Kashiwagi E, Kobayashi T. *Agr Biol Chem*, 1982, 46(8): 639~646.
- [7] 朱 静, 严自正, 张树政. *微生物学报*, 1989, 29(5): 337~342.
- [8] 孙晋武, 王杨声, 徐桃献等. *微生物学报*, 1983, 23(1): 44~49.
- [9] Sakano Y, Kashiwagi E, Kobayashi T. *Agr Biol Chem*, 1983, 47(8): 1761~1768.
- [10] Nakada T, Kubota M, Sakai S. *Agr Biol Chem*, 1990, 54(3): 737~743.

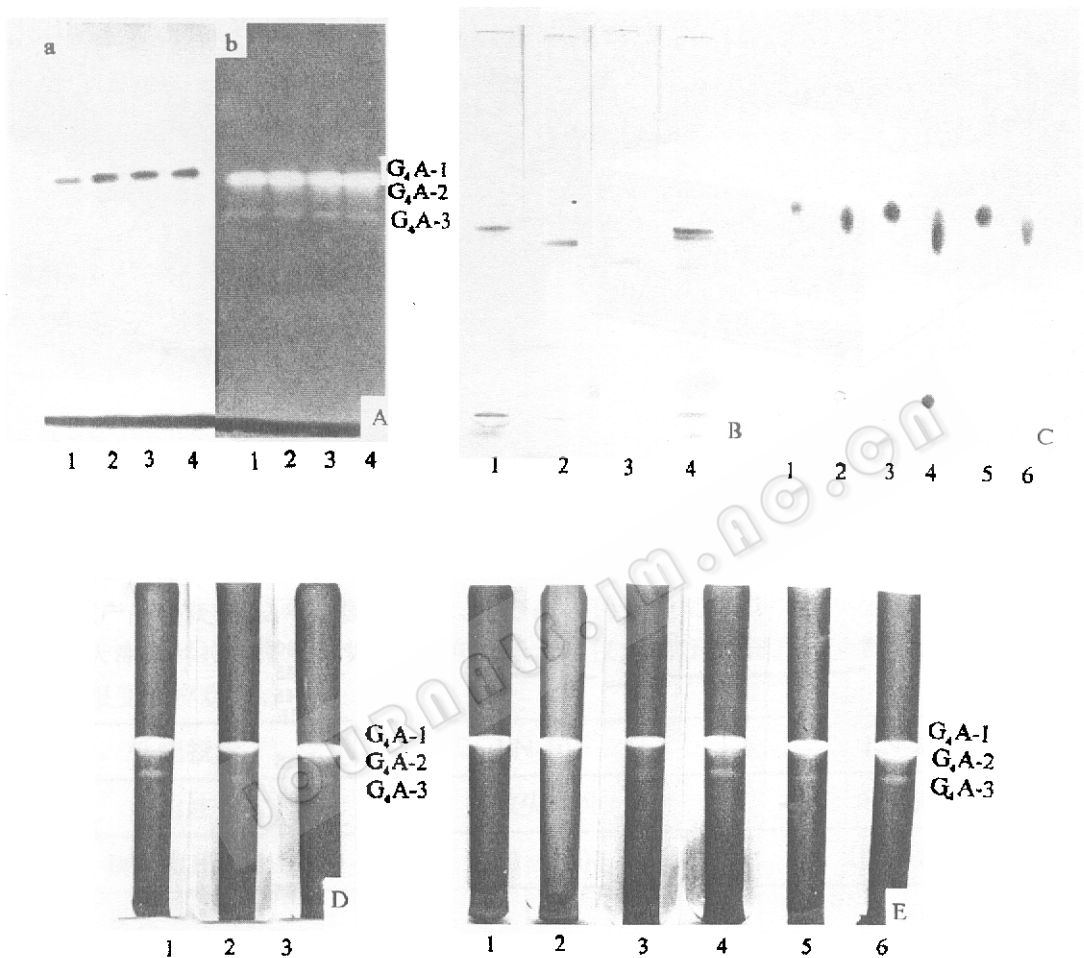
Studies on the Multiple-forms of Maltotetraose -forming Amylase from *Alcaligenes* sp.

Zhu Jing Chen Fengqin Yan Zizheng Liang Gaiqin Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Zymograms of the cultural supernatant of *Alcaligenes* sp. showed three bands, the major one G_4 A-1, the minor two, G_2 A-2 and G_4 A-3. Based on either the electrophoretic homogeneity of the purified three bands or the enzymatic activities identified by thin layer chromatogram of the soluble starch hydrolysates, all the three bands were confirmed to be maltotetraose-forming amylase but in multiple-forms. Neither glycosidase nor protease activities could be detected in culture (only a very weak protease activity were observed at 48 hrs after cultivation), which indicate that the amylase multiple-form formation is not involved in these two enzymes. Only the relative amount of the two minor bands but not the multiple-form pattern could be changed, if the cultivation conditions are prepared at the pH from 6.5~8.5, or with 0.3% glucose.

Key words *Alcaligenes* sp., maltotetraose-forming amylase, glycosidase, multiple-forms



A. Pattern changes in PAGE(a) and zymograms(b) for the maltotetraose-forming amylase in culture supernatant sampled after different cultivation time 1, 2, 3, 4, the culture supernatant at 24, 48, 72 and 96 h respectively after cultivation

B. PAGE patterns of G₄A-1, G₄A-2, G₄A-3

1, G₄A-1; 2, G₄A-2; 3, G₄A-3; 4, G₄A-1, G₄A-2, G₄A-3

C. Thin-layer chromatogram of hydrolysates of G₄A-1, G₄A-2, G₄A-3

1, 3, 5, G₄; 2, 4, 6, Lanes show the hydrolysate of G₄A-1, G₄A-2 and G₄A-3 respectively

D. Zymogram patterns of culture supernatants at different pH

1, pH8.5; 2, pH7.5; 3, pH6.5

E. Zymogram patterns of maltotetraose-forming amylase under different culture conditions

1, 3, 5, Normal condition; 2, Seed medium; 4, With glucose; 6, Serial passage