

葡萄糖淀粉酶研究进展

杨依军 李多川 沈崇尧

(北京农业大学植物科技学院, 北京 100094)

葡萄糖淀粉酶 (Glucoamylase E. C3. 2. 1. 3), 又称淀粉葡萄糖苷酶 (Amyloglucosidase) 或 γ -淀粉酶 (γ -amylase), 简称糖化酶, 缩写 G 或 AG。糖化酶是一种具有外切活性的酶, 通过水解淀粉、淀粉糊精、糖原等碳链上的 1, 4 连接的非还原端, 而得到终产物 β -D-葡萄糖。也可水解 α -1, 6 和 α -1, 3 连接的碳链。糖化酶是淀粉转化为葡萄糖过程的主要酶类, 因此在淀粉糖、食品、医药等工业上得以广泛的应用。

目前, 糖化酶的研究主要集中在耐热高产菌株的筛选; 糖化酶的热稳定性机理; 利用 DNA 重组技术构建优良工程菌株等方面。

1 糖化酶在微生物中的分布及组分多型性

工业用糖化酶主要是从霉菌、酵母等真菌中提取的, 从细菌中也可得到热稳定的糖化酶, 已报道的糖化酶中真菌为 19 个属 35 个种 (含未确定种), 细菌为 3 属 3 种 (见表 1)。

真菌产糖化酶组分多型性是常见的, *Rhizopus nivenus* 和 *Chalara paradoxa* 可分别产生 5 种和 6 种活性组分^[2, 3]。Svensson 等^[4]从市售的糖化酶中分离出 GI 和 GII 两种组分, 这两种糖化酶均由单一的糖基化多肽链组成。氰化片段和 N-末端氨基酸序列证明它们具有相当的同源性。对生淀粉水解能力 GI 高于 GII, 对于可溶性淀粉的水解 GII 仅为 GI 活性的 75%, 但对 α -1, 4, α -1, 6 键邻接处碳链水解能力相同。One 等^[5]利用固相 Acarbose 柱从市售糖化酶 (*A. niger*) 中分离出 6 种活性组分, 每种活性组分均可从可溶性淀粉中释放出单一的 β -D-葡萄糖终产物。这 6 种组分的分子量、沉降系数、化学组成、等电点、酶的动力学及其它性质上各异。但 Yasuda^[6]

从 *Monascus* sp. No. 3403 中分离出两种组分, 电泳和超离结果证明有同质性, 分子量、碳氮含量、最适 pH、最适温度及 K_m 值都非常接近。糖化酶的组分多型性不依分类的种相一致, 同是 *A. niger* 不同菌株活性组分不同。

培养基的成分和生长条件对糖化酶组分多型性也有影响^[7]。天然的糖化酶在微生物的培养或酶的制备过程中可能受葡萄糖苷酶和蛋白酶的作用而变成多型性。*Aspergillus awamori* var. *kawachi* 的 GI 可被蛋白酶或葡萄糖苷酶水解成 GII^[8]。Takahash^[9]认为 *Rhizopus* 糖化酶转化成三种活性组分主要是蛋白酶的作用。*A. niger* 产生的四种组分糖化酶 GI、GII、GIII、GIV 在培养过程中对两种蛋白酶有不同的敏感性。

2 糖化酶的热稳定性和 pH 值稳定性

工业上应用的糖化酶都是利用它的热稳定性, 因为到目前为止还没有理想的常温水解生淀粉的糖化酶产品。筛选热稳定的糖化酶生产菌株是世界范围的研究课题。Fogarty^[10]曾报道 *Aspergillus niger* IMDCC No. 1203 糖化酶活性最高温度为 70℃。*A. niger* 糖化酶在 NaBH₃CN 存在下可以与高碘酸氧化葡萄糖 T70 结合, 形成一种复合体, 这种复合体比天然的酶更具热稳定性。70℃, 18% 麦芽糊精条件下, 复合体的酶活可达到天然酶活的二倍。Fogarty 认为肽链中的氨基基团通过改变氨基的功能, 然后与氧化多糖结合, 以增强它的热稳定性。 α -环状糊精 (100mmol/L) 在 60℃ 下, 可使糖化酶的稳定性提高。但在低温条件下 (30℃ 和 40℃) 作用不明显。 β -和 γ -环状糊精

表 1 已报道的产糖化酶菌株

种名	组分构成
真菌	
<i>Aspergillus awamori</i>	单型
<i>A. candidus</i>	多型
<i>A. hennebergi</i>	多型
<i>A. niger</i>	单型或多型
<i>A. oryzae</i>	单型或多型
<i>A. phoenicis</i>	多型
<i>A. saitoi</i>	单型
<i>A. shirosamii</i>	—
<i>Aureobasidium pullulans</i>	单型
<i>Candida antarctica</i>	单型
<i>C. famata</i>	—
<i>C. keyfr</i>	—
<i>C. pelliculosa</i>	多型
<i>C. tsukubaensis</i>	多型
<i>Cladosporium resinae</i>	多型
<i>Chalara paradoxa</i>	多型
<i>Cephalosporium charticola</i>	—
<i>Cryptococcus laurentii</i>	—
<i>Endomycopsis charticola</i>	单型
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	多型
<i>Monascus kaoliang</i>	多型
<i>Monascus sp.</i>	多型
<i>Mucor rouaianus</i>	多型
<i>Neurospora sitophila</i>	单型
<i>Paecilomyces varioti</i>	单型
<i>Penicillium oxalicum</i>	多型
<i>Rhizopus deleamar</i>	单型
<i>R. javanicus</i>	—
<i>R. nivenus</i>	多型
<i>R. oryzae</i>	—
<i>Rhizopus sp.</i>	多型
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	单型或多型
<i>Schwanniomyces alluvius</i>	单型
<i>S. castelli</i>	单型
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	单型
<i>Trichosporon adeninovorans</i>	单型
细菌	
<i>Arthrobacter globiformis</i>	—
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	—
<i>Flavobacterium sp.</i>	—

及其它糖类对糖化酶的稳定性影响较小。 α -环状糊精对酶的热稳定性影响的机理还有待进一步研究。

细菌产生的糖化酶耐高温的性能优于真菌, *Clostridium thermohydro-sulfuricum* 糖化酶是目前已报道的糖化酶中耐热温度最高的酶, 在 50% 淀粉溶液中 70℃ 下酶完全稳定。即使在 85℃ 下处理 1h 其酶活性仍能保持 50%^[11~13], 而且这种酶不受 Ca^{2+} 、EDTA 和 α -、 β -、 γ -环状糊精的影响。

一般糖化酶都具有较宽的 pH 适应范围, 但最适 pH 多为 4.5~6.0。Fogarty^[10]报道 *A. niger* IMDC No. 1203 产生的糖化酶 pH 稳定范围 2.0~11.0。 *Candida tsukubaensis* 糖化酶 pH 范围 2.4~4.8^[14]。

3 糖化酶的底物亲和性

糖化酶是将麦芽糖—糊精转化为 D-葡萄糖, 底物的水解速率主要受底物分子的大小及结构的影响, 同时也受水解碳链序列中下一个键的影响。 *A. niger* 糖化酶对淀粉、麦芽三糖和麦芽糖三种底物的相对亲和性分别为 100%、68% 和 31%。碳链越长亲和性越大, 它的最大反应速度是随着底物碳链的增长而增加的, 呈线性变化^[15]。Fogarty^[10]的研究表明糖化酶水解麦芽糖的能力是异麦芽糖的 100 倍。6- α -葡萄糖基麦芽糖的水解速率仅为麦芽糖的 45%, 这表明邻近 α -1, 4 链的 α -1, 6 糖苷键比独立的 α -1, 6 链更易被打开。

4 Acarbose—拟四糖对糖化酶的抑制

Acarbos 是放线菌产生的一种拟四糖, 是淀粉酶的强抑制剂, 特别是对糖化酶的抑制作用尤为显著。不同来源的糖化酶对 Acarbos 的敏感性不同, 抑制 *C. tsukubaensis* 糖化酶酶活 50% 时, 抑制剂浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 抑制 *A. niger* 糖化酶酶活 50% 时, 抑制浓度 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[16]。Clarke 等^[17]认为 *A. niger* 糖化酶上的两个色氨酸残基能够和 Acarbose 牢固地结合在一起, 而且这种结合是可逆的, 因此它的敏感性差一些。同一来源不同组分的糖化酶对 Acarbose 的敏感性略有差异, *Filobasidium*

capsuligemos 产生的 GI 和 GII 抑制酶活 50% 时抑制剂的浓度分别是 $71\mu\text{g/ml}$ 和 $79\mu\text{g/ml}$ ^[18]。

5 糖化酶中的糖和蛋白组成

糖化酶是一种糖蛋白,通常碳水化合物占 4%~18%,但 *S. diastaticus* 糖化酶碳水化合物高达 80%^[19,20]。这些碳水化合物主要是半乳糖、葡萄糖、葡糖胺和甘露糖。*A. niger* 糖化酶 I 中的碳水化合物以糖苷键与 L-苏氨酸和 L-丝氨酸相连接,其组分为 20 个甘露糖、11 个 2-O-D 甘露吡喃-D-甘露糖结构的双糖,8 个三糖和 5 个四糖,三糖和四糖是由 D-葡萄糖、D-甘露糖和 D-半乳糖以 1.3 或 1.6 糖苷键构成的。在糖化酶中这种糖残基的排列在其热和酸碱稳定性上有着特殊的意义^[21]。

大部分糖化酶的氨基酸组成都已确定。不同组分糖化酶的氨基酸组成不同,*A. niger* GII 的 616 个氨基酸序列中,1~512 残基与 GI 相一致^[22,23]。到目前为止已有多种糖化酶根据它的氨基酸序列推断出它的 DNA 序列,并在工程菌株的构建上得到广泛的应用。*A. niger* 糖化酶和 *A. saitoi* 糖化酶中色氨酸残基起着酶与底物结合的作用^[17,24,25]。不同来源的糖化酶最

适结合位点的氨基酸序列具有 5 个高度同源片段 (S_1-S_5),但 S_5 不具备催化活性^[26]。

6 糖化酶的分子生物学

Boel 等^[27]首先从 *A. niger* 的染色体文库中分离出糖化酶的基因(图 1),它含有 5 个内含子,而 *A. awamori* 中含有 4 个内含子^[28]。它们均含有第 5 个内含子,这个长 169bp 序列参与 GI、GII mRNA 的加工过程。在含淀粉培养基上编码 *A. awamori* 糖化酶的 2.3kb mRNA 成数百倍地增长,而在含木质素培养基上则无此片段。用 2.3kb 糖化酶特异性 mRNA 制备的 cDNA 探针,从 *A. awamori* 染色体文库中筛选出了 3.4kb 的糖化酶基因,序列分析后推断可能的氨基酸序列,结果证明与已知的 *A. awamori* 糖化酶和 *A. niger* 糖化酶的氨基酸序列一致。Toshihiko 等^[29]构建了水解生淀粉的 *Rhizopus oryzae* 糖化酶基因的物理图谱。

近年来国外已有把 *A. niger* 糖化酶、*A. shirosanii* 糖化酶和 *Rhizopus* 糖化酶基因引入酵母中,并成功地得到表达的报道^[30-32]。对糖化酶基因表达调控也有了初步研究^[39]。这些工程菌株的构建可以更便于在工业发酵中应用。

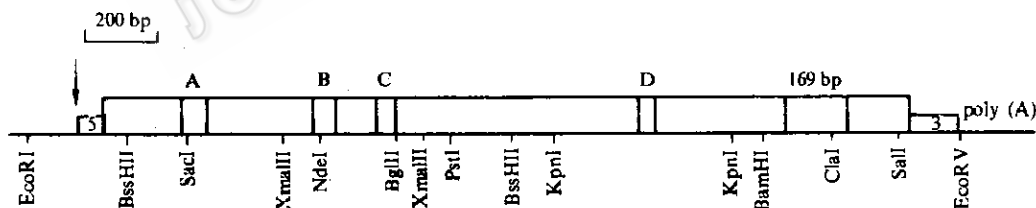


图 1 *A. niger* 葡萄糖淀粉酶基因结构

(↓) 转录起始位点; (■) 内含子; (□) 5'、3' 端的非翻译区; 剪切内含子 A-D 后产生 GI mRNA, 进一步剪切 169bp 的内含子产生 GII mRNA

7 糖化酶的国内研究现状

我国对糖化酶的研究已有很大进展,管汉成等^[34]从 *A. niger* 突变菌株中纯化了水解生淀粉的 GI 和即不为生淀粉吸附又不水解生淀粉的 GII,并对其性质进行了研究。方善康等^[35]也从 *A. niger* S₄ 中纯化了三种组分的糖化酶,它们均为酸性糖蛋白。我们实验室于 1993 年开展嗜热真菌的研究,并从 *Thermomyces*

lanuginosus 中纯化了 α -淀粉酶及糖化酶(全文另行发表),在热和酸碱稳定性上 *T. lanuginosus* 糖化酶均优于其它霉菌产生的糖化酶。以上研究对于深入了解糖化酶的作用机理,分析其结构与功能的关系是非常必要的。

近年来国内已开始借用分子生物学手段对糖化酶的基因克隆、转化、表达进行了系列研究。唐国敏等^[36]从 *A. niger* 糖化酶高产菌株中

克隆了全长的糖化酶 cDNA, 并进行了序列分析。随后又将合成的糖化酶 cDNA, 经 5'、3' 端改造, 克隆到酵母质粒 YFD₁₈ 上, 转化酿酒酵母, 并能有效地分泌有功能的糖化酶到胞外^[37]。罗进贤等^[38]以噬菌体 λ gt10DNA 为载体构建了黑曲霉 3758 的 cDNA 文库, 用编码黑曲霉葡萄糖淀粉酶 329~418 位氨基酸的 DNA 序列 (456bp) 作为探针从所建的文库中筛选出葡萄糖淀粉酶 cDNA。克隆的 2.1kb 片段含有 5' 端非编码区, 编码葡萄糖淀粉酶的结构基因及 3' 端的非编码区。克隆的 cDNA 片段在表达载体 λ gt11 中得到表达^[39]。另有将地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因及黑曲霉糖化酶 cDNA 共同重组于大肠杆菌-酵母穿梭质粒中, 然后转化酿酒酵母, 在酵母 MF-21 因子及磷酸甘油酸激酶基因的启动子和终止信号控制下, 糖化酶能获得高的表达, 并向胞外分泌, 重组质粒具有良好的稳定性^[40]。

总之, 随着对糖化酶研究的深入人们会更好地利用它造福于人类。

参 考 文 献

- [1] Fogarty W M, Kelly C T. Enzy and Biotech, Elsevier Applied Sci London and New York, 1990, 71~132.
- [2] Saha C, Ueda S. J Ferment Technol, 1983, 61: 67~72.
- [3] Ishigami H, Hashimoto H, Kainuma K. Starch Sci, 1985, 32: 197~205.
- [4] Svensson B, Larsen K, Gunnarsson A. Euro J Biotech, 1985, 154: 497~503.
- [5] One K, Shigeta S, Oka S. Agric Biol Chem, 1988, 52: 1689~1696.
- [6] Yasuda M, Kuwar M, Matsushita H. Agric Biol Chem, 1989, 53: 247~256.
- [7] Alazard D, Raimbault M. Euro J Appl Microbiol Biotech, 1981, 12: 113~118.
- [8] Yoshino E, Hayashida S. Rerment Technol, 1978, 56: 289~297.
- [9] Takahashi Y, Tsuchida Y, Irie M. J Bioche(Tokyo), 1982, 92: 1623~1631.
- [10] Hyun H H, Zeikus J G. Appl Environ Microbiol, 1985, 49: 1162~1167.
- [11] Hyun H H, Zeikus J G. J Bacteriol, 1985, 164: 1146~1154.
- [12] Hyun H H, Zeikus J G. J Bacteriol, 1985, 164: 1162~1170.
- [13] Hyun H H, Zeikus J G. Appl Environ Microbiol, 1985, 49: 1168~1173.
- [14] De Mot R, Verachter H. Appl Environ Microbiol, 1985, 50: 1474~1479.
- [15] Kusunoki K, Kawakami K, Sharashi F, et al. Biotech Bioengineer, 1982, 24: 347~352.
- [16] Truscheit E, Frommer W, Junge B, et al. Angewandte Chemie, 1981, 20: 774~778.
- [17] Clarke A J, Svensson B. Carlsberg Resea Commun, 1984, 49: 111~116.
- [18] Buttner R, Bode R, Birnbaum D. J Basic Microbiol, 1987, 27: 297~303.
- [19] Erratt J A, Nasim A. CRC Criti Rev Biotech, 1987, 5: 95~116.
- [20] Kleinamm M J, Wilkinson A E, Wright J, et al. Biotech J, 1988, 249: 163~171.
- [21] Pazur J H, Taminga Y, Forsberg L S, et al. Carbohydrate Eesee, 1980, 84: 103~107.
- [22] Boel E, Hjort I, Norris F, et al. EMBO J, 1984, 3: 1097~1104.
- [23] Svensson B, Larsen K, Svendsen I, et al. Euro J Bioche, 1985, 154: 497~503.
- [24] Inokuchi N, Takahashi T, Yoshimoto F, et al. J Bioche(Tokyo), 1982, 91: 1661~1668.
- [25] Clarke A J, Svensson B. Carlsberg Resea Commu, 1984, 49: 559~564.
- [26] Itoh T, Ohtsuki J, Yamashita I, et al. J Bacteriol, 1987, 169: 4171~4176.
- [27] Boel E, Hjort I, Norris F. EMBO J, 1984, 3: 1581~1589.
- [28] Nunberg J H, Meade J H, Cole G, et al. Cell Mol Biol, 1984, 4: 2306~2310.
- [29] Toshihiko A. Agric Biol Chem, 1986, 50: 657~661.
- [30] Cole G. Biol / Technol, 1988, 5: 417~713.
- [31] Ashikari T, Nakamura N, Tanaka Y, et al. Agric Biol Chem, 1986, 50: 957~964.
- [32] Shibuya I. Bios Biotech Biochem, 1992, 56: 884~890.
- [33] Fowler T. Curr Genet, 1990, 18: 537~544.
- [34] 管汉成, 严自正, 张树政. 生物化学与生物物理学报, 1993, 25: 1~8.
- [35] 方善康, 周凤臻. 微生物学报, 1993, 33: 108~116.
- [36] 唐国敏, 徐雁漪, 龚辉等. 生物工程学报, 1993, 9: 117~124.
- [37] 唐国敏, 龚辉, 钟丽婵等. 生物工程学报, 1994, 10: 213~218.
- [38] 罗进贤, 李文清, 张添元. 中山大学学报, 1990, 29(3): 154~161.
- [39] 李文清, 罗进贤, 张添元. 中山大学学报, 1992, 31(2): 67~72.
- [40] 罗进贤, 何鸣, 李文清. 生物工程学报, 1994, 10: 299~306.