

研究工作

茁霉多糖酶与 β -淀粉酶的联合作用及其糖-肽链的连结方式*

戈苏国 杨寿钧 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

产气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) 10016 的茁霉多糖酶 (*pullulanase* E. C. 3. 2. 1. 41) 能专一地水解支链淀粉分支点的 α -1,6-葡萄糖苷键, 但它不作用于糖原而能专一地水解茁霉多糖为麦芽三糖。我们曾报道过此酶的提纯、性质^[1]以及各种不同化学试剂对酶活力的影响^[2], 本文主要报道茁霉多糖酶与 β -淀粉酶的联合作用、酶结构中糖组份分析以及糖与蛋白质肽链的连结方式。

一、材料和方法

1. 材料: 粗酶制剂由江西食品发酵所提供, 生产菌种为产气杆菌 10016, 酶活力为 43,000 单位/克。将粗酶制剂用蒸馏水浸泡, 放 30℃ 水浴中保温一小时, 过滤, 滤液经 Sephadex G-100 凝胶过滤及垂直板型凝胶制备电泳纯化, 得到聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的纯酶, 用水充分透析, 冷冻干燥成干粉备用。

2. 主要的化学试剂及仪器

麦芽 β -淀粉酶纯度为 100U/克, 马铃薯淀粉(德国 E. Merck 产品), D-甘露糖、阿拉伯糖、鼠李糖、 α -氨基丁酸(英国 Light 公司产品), 半乳糖、葡萄糖(美国 Packard-Becker 公司产品), 硼氢化钠(日本米山药品工业株式会社产品), 其余为国产试剂。103 型气相色谱仪(上海分析仪器厂产)、氨基酸自动分析仪(日立 835 型)、紫外分光光度计(unicam Sp-700 型)、双波长双光束紫外分光光度计(日立 557 型)。

3. 测定方法

聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Davis 方法^[3]。还原糖测定用 3,5-二硝基水杨酸法^[4], 单糖测定用气相色谱法^[5], 总糖测定用地衣酚-硫酸试剂^[6]。

二、结果和讨论

1. 茁霉多糖酶与 β -淀粉酶的联合作用

1) 水解生马铃薯淀粉颗粒 反应混合液中含 2ml 生马铃薯淀粉 (100mg/ml), 0.2ml 酶溶液 (其中含 β -淀粉酶 22U, 茁霉多糖酶 13.6U), 0.6ml 0.5M pH5.8 醋酸缓冲液, 用水补充到 3ml, 使缓冲液离子强度为 0.1M, 装入带塞试管中, 37℃ 摇床振荡, 每 24 小时取样 1ml, 离心除沉淀, 测定上清液中的还原糖。单独的 β -淀粉酶(22U) 以及单独的茁霉多糖酶 (13.6U) 也作

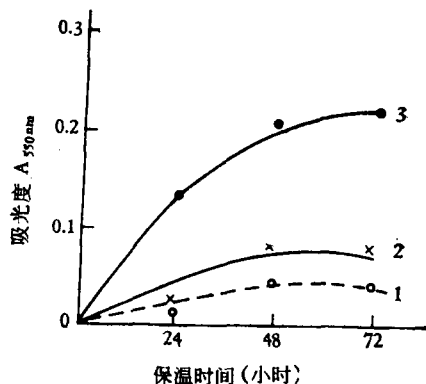


图 1 生马铃薯淀粉粒的消化与时间的关系
1, 单独 β -淀粉酶 2, 单独茁霉多糖酶 3, 两酶联合作用

* 本文主要内容曾于 1982 年 11 月在青岛举行的“糖的生化学会议”上宣读。

同样反应,比较三种情况下生成的还原糖量,结果见图 1。

从还原糖测定结果看出,单一酶对生马铃薯颗粒的水解作用很小,而两酶同时作用生成的还原糖量约等于每种酶单独作用之和的一倍多。说明茁霉多糖酶与 β -淀粉酶联合作用确实能促进生淀粉颗粒的水解。

有人报道^[7],植物 β -淀粉酶对生淀粉颗粒的水解作用很小,添加茁霉多糖酶能提高麦芽糖生成达六倍之多,细菌 β -淀粉酶与茁霉多糖酶联合作用能提高 4 倍。作者认为这是两种酶协同效应的结果。也有人报道^[8],在木薯生淀粉的酒精发酵过程中,添加异淀粉酶能促进木薯生淀粉的糖化,从而提高乙醇产量。

2) 对糖原的水解作用 茁霉多糖酶能水解支链淀粉而不能降解天然糖原^[1]。我们将 β -淀粉酶(1U)和茁霉多糖酶(0.8U)同时作用于糖原,40℃保温 10 分钟,测定生成的还原糖,结果表明,唯有茁霉多糖酶时,不产生还原糖,当两酶同时存在,产生的还原糖比单独 β -淀粉酶多一倍左右(表 1)。这可能是因为糖原的分支结构比支链淀粉的紧密,使酶很难达到分支的作用点;如果先用 β -淀粉酶修剪了部分短枝,将 α -1,6-分枝点暴露出来,茁霉多糖酶就能水解这种降解后的糖原。

从以上结果看出,当茁霉多糖酶与 β -淀粉酶联合作用时能加速生淀粉颗粒的消化,改善对天然糖原的降解。江西食品发酵所曾报道此酶与 β -淀粉酶联合作用促进糯米淀粉的水解^[9]。

表 1 对天然糖原的水解作用

酶	吸光度 A
茁霉多糖酶	0
β -淀粉酶	0.09
茁霉多糖酶+ β -淀粉酶	0.18

2. 产气杆菌茁霉多糖酶中总糖量的测定

我们曾报道此酶的总糖含量偏高^[1],可能是由于样品对水透析不够,电泳过程中混入一些杂质造成的。后改用板电泳提纯的酶对蒸馏水充分透析,冷干后用地衣酚-硫酸试剂多次重

复测定,平均值为 6%,稍低于过去报道的 6.5—7%。

3. 茁霉多糖酶中糖组分的测定

将 3mg 酶样品加入 1ml 2N HCl,在氮气保护下封管,100℃水解 4—6 小时,然后在温水浴中用高纯氮气流赶走盐酸和水分,再加入 0.2mg 肌醇水溶液做内标。抽干,加入 3mg 硼氢化钠,1ml 氨水,1.5—2ml 蒸馏水,室温放置 4 小时,加入冰醋酸 6—10 滴终止反应(不冒泡为止),吹干,加甲醇 1ml,吹干,反复五次以上。加入 1ml 乙酸酐,通氮封管,在沸水浴中煮 6 小时进行乙酰化反应。最后在氮气流中吹干,用 1ml 二氯甲烷萃取,浓缩到 0.1ml,离心取上清液上色谱柱。

气相色谱条件:长 2 米、内径 2 毫米的不锈钢柱,内装填担体 Chromosorb W. AW DMCS 60—80 目,上面涂渍 3% ECNSS-M,柱温 200℃汽化室温度 320℃,用氢火焰离子化检测器检测,温度为 240℃,载气为氮气,柱前压 3Kg/cm²,空气流速 400ml/min,氢气流速 82ml/min,放大器高阻为 10⁹ 欧姆,量程 1,纸速 4 毫米/分钟,进样量 1 μ l,分离结果见图 2。共分离出五种单糖:半乳糖、葡萄糖、甘露糖、鼠李糖

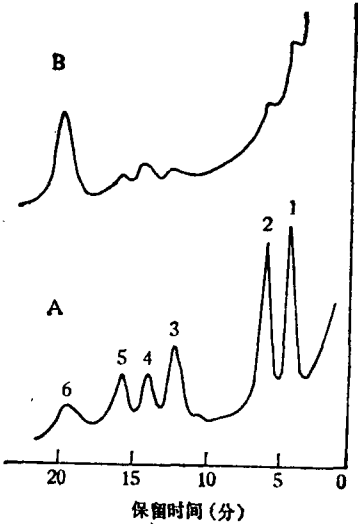


图 2 糖的气相色谱图

1,鼠李糖 2,阿拉伯糖 3,甘露糖 4,半乳糖 5,葡萄糖
6,肌醇 A. 标准样品 B. 水解后的酶样品

和阿拉伯糖，它们的残基比为 14:10:3:3:1，根据茁霉多糖酶的分子量为 52,000^[1]，总糖含量为 6%，即可计算出每克分子酶中各单糖的残基数（表 2）。同时用纸层析法进行糖组分分离，结果与气相色谱相同。

表 2 各单糖残基数

糖	半乳糖	葡萄糖	甘露糖	鼠李糖	阿拉伯糖
残基数	8	6	2	2	1

4. 碱性 β -消去反应

至今发现的糖蛋白中，糖链都是通过几种糖基连接到肽链的某些氨基酸侧链上。连结方式可分为 N-糖苷键和 O-糖苷键两大类。近来， β -消去反应已广泛用于阐明糖蛋白的结构。当蛋白受到温和的碱处理时，由于糖与蛋白质中的丝氨酸和苏氨酸 β -位羟基形成的 O-糖苷键对碱不稳定，糖部分可以通过碱处理而除去，因此，测定碱处理前后紫外吸光度的变化及糖蛋白中丝氨酸、苏氨酸残基数的变化，可以确定 O-糖苷键是否存在。

(1) 用稀碱处理后酶的紫外吸收光谱 由于 O-糖苷键对碱不稳定，所以用稀碱处理糖蛋白时，连结在 O-糖苷键上的丝氨酸和苏氨酸残基分别转变成不饱和的氨基酸，即由丝氨酸生成 α -氨基丙烯酸，由苏氨酸转变成 α -氨基丁烯酸^[10]。它们可以借助在 240nm 处紫外吸光度的增加被证实^[11]。

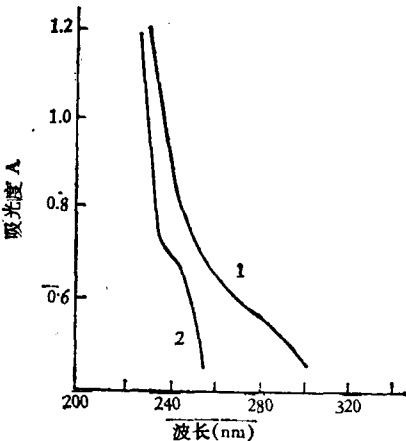


图 3 碱处理前后紫外吸收光谱的变化
1: - NaOH 2: + NaOH

在浓度为 0.4mg/ml 的茁霉多糖酶溶液中加入等体积的 0.4MNaOH 水溶液，45℃保温半小时，立刻测定不同波长下紫外吸收光谱，同时与未用碱处理的酶液做比较。从图3看出，用稀碱处理后的酶在 240nm 附近吸光度明显增加。

(2) β -消去反应中吸光度 A 随时间的变化

将 0.3mg 酶溶解在 0.3ml 1M0℃ 的氢氧化钠水溶液中，测定前取 0.1ml，用水 (32℃) 稀释到 1ml，立刻测定 240nm 的吸光度，间隔 5 分钟测定一次，结果见图 4。

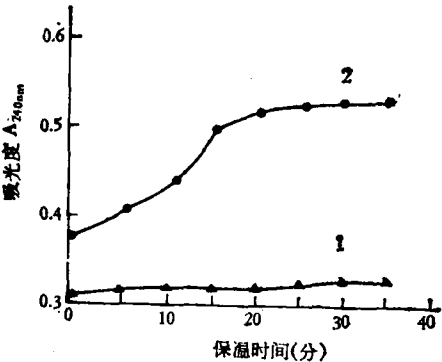


图 4 240nm 吸光度随时间的变化
1: - NaOH 2: + NaOH

从图中看出，在测定的最初15分钟内，吸光度增加较快，以后减慢并趋于平缓。

(3) β -消去反应中丝氨酸、苏氨酸残基数的变化 为了进一步研究 β -消去反应中的定量关系，从而考查酶中糖与肽链的连结点，我们在碱处理的反应体系 (1) 中，加入 1M 硼氢化钠，在氮气保护下 45℃ 避光保温 24 小时，然后加等体积的浓盐酸，通氮封管，110℃ 水解 22 小时，真空干燥后进行氨基酸分析。结果见表

表 3 β -消去反应前后每克分子酶中氨基酸残基数的变化

氨基酸	反应前	反应后	差数
丝氨酸	35	31	-4
苏氨酸	29	26	-3
甘氨酸	36	38	+2
丙氨酸	48	52	+4
α -氨基丁酸	0	?	?

3. 因为反应体系中有还原剂硼氢化钠，由 β -消去反应中产生的 α -氨基丙烯酸被还原成丙

氨酸, α -氨基丁烯酸被还原成 α -氨基丁酸或降解成甘氨酸, 即在反应前后丝氨酸, 苏氨酸的减少以及丙氨酸, 甘氨酸和 α -氨基丁酸的增加之间应保持一定程度的平衡。

从测定结果看, 反应后丝氨酸、苏氨酸共减少 7 个, 甘氨酸增加 2 个, 丙氨酸增加 4 个, 在氨基酸分析图上相当于 α -氨基丁酸的位置有一小峰, 但未能给出计算数据。从测定结果分析, 虽然反应前后氨基酸不像红曲霉葡萄糖淀粉酶^[12]和黑曲霉葡萄糖淀粉酶^[13]变化明显, 但在 240nm 处吸光度增加能够判断茁霉多糖酶中糖链是通过 O-糖苷键与肽链连结的。根据每克分子酶中大约有 19 个糖残基, 连结点有 6—7 个, 按照 Pazur^[13] 等人的计算方法, 茁霉多糖酶中碳水化合物的平均链长应为 2.7—3 个糖残基, 当然, 这只是粗略的估计。

参 考 文 献

[1] 戈苏国等:《微生物学报》, 20(4), 415, 1980。

- [2] 杨寿钧等:《微生物学报》, 21(1), 68, 1981。
[3] Davis, B. J.: *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404, 1964。
[4] Reese, E. T. et al.: *Methods in carbohydrate Chemistry* (ed. by Whistler, R. L.), Academic Press, p. 129, 1963。
[5] Albershem, P. et al.: *Carbohydr. Res.*, 5: 340, 1967。
[6] Marshall, R. D. et al.: in "Glycoproteins" (ed. by Gottschalk, A.), Elsevier Publishing Company, Amsterdam, p. 283, 1972。
[7] Ueda, S. et al.: *Carbohydr. Res.*, 84: 196, 1980。
[8] Ueda, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 58 (3), 243, 1980。
[9] 江西食品发酵所:《微生物学报》, 16(4), 282, 1976。
[10] Spiro, R. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, 249: 5704, 1974。
[11] Greenstein, J. et al.: *Chemistry of Amino acids*, Wiley, New York. p. 856, 1961。
[12] 戈苏国等:《微生物学报》, 23(3), 265, 1983。
[13] Pazur, J. H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40: 110, 1970。

[本文于1983年5月20日收到]

维生素 C 在不同条件下的稳定性和 γ 辐射效应

赵克俭 路敦柱 徐珊梅 朱绍南

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

近来很多国家开展了辐射保藏食品的研究与应用工作。已经知道, 维生素 C 不耐辐射, 而人体自身不能合成维生素 C, 它所需的维生素 C 主要由水果和蔬菜提供, 因此果蔬中的维生素 C 被辐照后的情况很值得研究。水果和蔬菜含有很多糖类、有机酸及醇类, 研究它们对维生素 C 的稳定作用及其辐射效应, 对食物的辐射保藏工作起指导作用。本工作就维生素 C 在不同条件下的稳定性及其辐照后的变化情况进行了实验和讨论。

一、材料和方法

试剂是分析纯, 辐照的溶液用三蒸水配置。溶液中维生素 C 的含量是用分光光度计测定。

土豆、洋葱、苹果中维生素 C 及脱氢维生素 C 测定按文献[1,2]的方法。

二、结果和讨论

1. 维生素 C 水溶液的稳定性

维生素 C 是一种较强的有机酸和还原剂, 氧化后变成脱氢维生素 C, 但在一定条件下又可以接受两个氢原子而被还原。两种类型的维生素 C 具有同样的生理作用, 但氧化型的效力是还原型的二分之一。

维生素 C 的稳定性与外界条件有很大关系。我们实验了在各种条件下维生素 C 的稳定情况(图 1)。由图可以看出, 维生素 C 除了在苹果酸及偏磷酸溶液中较为稳定外, 在其他溶