一九八三年 无锡轻工业学院学报
（第二期） JOURNAL OF THE WUXI INSTITUTE OF LIGHT INDUSTRY （总第三期）

液化型α-淀粉酶的精制及其性质的研究

张 星 元

摘 要

从能液化淀粉酶枯草杆菌 Bacillus amyloliquefaciens K 49 的发酵液出发，通过硫酸铵盐析、淀粉吸附、DEAE-葡聚糖凝胶的离交浓缩和交联葡聚糖凝胶过滤等步骤，获得了电泳纯的液化型α-淀粉酶制剂。以这种酶制剂为材料，采用分子筛（交联葡聚糖凝胶 G-100）估得该酶的分子量为 47,000。通过等电聚焦测得该酶的等电点为 pH 5.24。酶学性质的研究结果表明，该酶确系液化型α-淀粉酶，其作用最适 pH 为 5.8，最适温度为 70℃，在 pH 7-10 的范围内比较稳定（40℃，20 小时），但对热不够稳定。Ca^{++} 离子的存在能提高酶的热稳定性，氯化钠能使酶激活。

前 言

α-淀粉酶（EC 3.2.1.1. α-1,4-glucan 4-glueanohydrolase）是任意水解淀粉分子中α-1,4-葡萄糖苷键的酶，在纺织工业和食品工业上有广泛的用途。

枯草芽孢杆菌产生的α-淀粉酶因菌种不同大致可分为两种类型。一种是液化型α-淀粉酶（Bacterial Liquefying Amylase 简称 BLA），另一种是糖化型α-淀粉酶（Bacterial Saccharifying amylase 简称 BSA）。

本研究以枯草芽孢杆菌 K49 的培养液为材料，对其液化型α-淀粉酶进行纯化，并用纯化的酶研究该酶的性质，并对该酶的有关性质进行讨论。本研究所建立的研究方法可在研究属于枯草芽孢杆菌的其它菌种生产的液化型α-淀粉酶时作参考。

材 料 和 方 法

一、菌 种 Bacillus amyloliquefaciens K49[2]

二、培养基及培养条件

大豆粕5%（在0.5%NaOH中煮沸抽提一小时，过滤，用滤液），可溶性淀粉 3%，玉米浆 1%，$(NH_4)_2HPO_4$ 1%，消前 pH 7.0，500ml 坂口瓶装液 80ml，接种后在 120rpm 往复式摇床30℃培养24hr后接入20 l的Waldhof型发酵罐（培养基同上，装液10 l），搅拌转速 180rpm，

本文收到日期 1982 年 12 月 30 日

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

通气量1 vvm，35℃培养三天。

三、α-淀粉酶的分析方法

1%可溶性淀粉溶液5ml，样品酶液1ml 在0.1M pH6.0醋酸盐缓冲条件下于40℃水浴作用15min（精确计时）后，按改良的 Fehling-Lehmann Schoorl 法[3]测定酶反应混合物中的还原糖含量。在上述条件下，使反应混合物释放 1 毫克分子葡萄糖的酶的量被定义为一个酶单位。酶活力与酶液的蛋白质浓度(280nm 波长下的 OD 读数)之比即为比活力。

四、DEAE-葡聚糖凝胶柱析层[4]

将样品加入预先经0.01M 醋酸盐缓冲液(pH 5.8，含 0.01MCa-AC_2) 平衡了的 DEAE-葡聚糖凝胶柱(30×300mm)，然后用适量的NaCl 含量从 0 到0.5M的同样的醋酸盐缓冲液洗脱。收集洗脱液(每管15ml)，并顺次分别测定每管的OD_{280}和酶活力。

五、交联葡聚糖凝胶过滤

根据Andrews[5]的方法在交联葡聚糖凝胶Sephadex G-100 柱 (30×1330mm) 上进行。平衡和洗脱时用含有0.01M Ca-AC_2和0.1M NaCl的0.01M醋酸盐缓冲液(pH5.8)，洗脱速度为 22ml/hr。收集洗脱液(每管6.6ml)，顺次分别测定每管的OD_{280} 和 OD峰处的酶活力。

六、聚丙烯酰胺凝胶电泳

根据Darvis[6]的方法。丙烯酰胺浓度7.5%，柱规格5×70mm，缓冲系统 pH 8.3，电流 2-5mA/柱，在室温下电泳 40min，以1%酰胺黑 10B(溶于7%醋酸中)液染色1 hr后在 7%醋酸溶液中通电(5mA/柱)4hr脱色。

七、等电聚焦方法[7]

用LKB 8101等电聚焦柱 (110ml) 测定酶的等电点。由载体两性电解质 (Ampholyte pH 3.5-10)和蔗糖溶液按规定比例配制混合溶液24管(其中第13管含有被检酶液2.0ml)，将它们顺次装入柱中。在350v，4℃条件下通电聚焦42hr，按每管2ml收集柱中液体，并顺次分别测定酶活力pH及OD_{280}。

八、变旋光效应的检测[8]

往 6ml5%淀粉溶液中加入 0.5ml 酶溶液(约20u/ml)，在 25℃进行酶水解反应，于不同的时间间隔测旋光度。反应 60min 时，加入 3mg Na_2CO_3，过 10min 后再测旋光度，比较加 Na_2CO_3前后的旋光变化。

九、纸上层析

将淀粉的酶水解液点在东洋50号滤纸上，用正丁醇、吡啶和水(6:4:3，体积比)的溶剂系统在 50℃下一次上行展开(上行距离 30cm 以上)，用碱性硝酸银检测法显色[9]。

十、液化淀粉酶活性的快速检测法

取0.1ml酶液加入5ml以0.05M醋酸盐缓冲液配制的1%淀粉溶液，置40℃ 水浴反应在不

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

同的时间取出，加入 0.1N I_2-KI溶液(0.1N KI，0.002N I_2)显色，与标准的 0.1N I_2-KI 溶液的颜色作比较，计达到标准色度的反应时间，以反应时间长短度量酶活力的大小（时间越长酶活越低）。

十一、试　剂

DEAE-葡聚糖凝胶A-50，交联葡聚糖凝胶 G-100 为瑞典产品，Visking 透析膜为美国产品，酶作用的各种底物有些是日本有关公司或实验室提供的，其余为日本商品。

结　果　和　讨　论

一、α-淀粉酶的提纯

K49 是典型的液化型α-淀粉酶产生菌。该菌在 Waldhof 型发酵罐中培养 65hr 酶活达 437u/ml。以此发酵液为材料，提纯α-淀粉酶。提纯的方法和结果见图 1 。

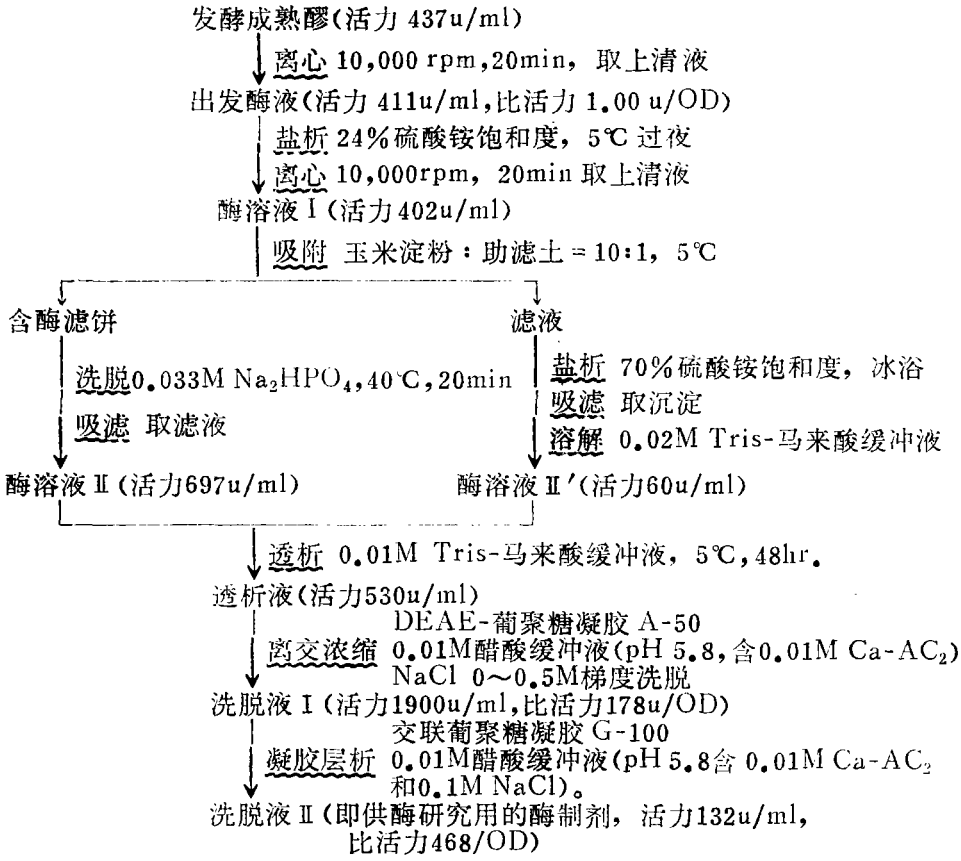

图 1　K49液化型α-淀粉酶的纯化过程

将发酵液冷冻离心，其清液作为出发酶液，其α-淀粉酶活力为411u/ml。

1．盐析和吸附：用24%的硫酸铵饱和度，将出发酶液在5℃冷室静置过夜，经冷冻离心除去沉淀(杂蛋白质)令其清液通过装有玉米淀粉吸附层的布氏漏斗。该吸附层由10份玉米淀

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

粉和1份助滤土(Super Cel)和24%饱和度的硫酸铵溶液拌和而成。每升酶液约用10g玉米淀粉。用材料与方法部分中所述酶活性快速检测法检查流出液的酶含量及控制吸附操作。用0.033M Na_2HPO_4溶液在40℃下将吸附在玉米淀粉上的酶洗脱下来，洗脱20min后抽滤得含α-淀粉酶的澄清的洗脱液。对在吸附过程中流过吸附层的溶液中残存的酶，进一步用70%的硫酸铵饱和度在冰浴中盐析(2hr以上)，将其沉淀溶于适量的0.02M Tris-马来酸缓冲液(pH 7.5)。将这含酶的缓冲液和上述含酶的洗脱液分别在0.01M的同种缓冲液(pH7.5)于5℃下透析48hr。透析液中含α-淀粉酶4.21×10^5单位，占出发酶总酶量的21.8%。

2. 离交浓缩：通过DEAE-葡聚糖凝胶A-50柱对透析所得酶液进行离交浓缩。浓缩结果是酶主要集中在第31—44号14个试管210ml洗脱液中，其中第39和40号管活力最高，均在1900u/ml以上。从21号到55号共35个试管中的酶的总量为4.07×10^5单位，占出发酶液中酶总量的21.1%，离交收率96.8%。

3. 交联葡聚糖凝胶柱层析分离酶蛋白：取上述第39号和40号管混合而得浓缩酶液各2ml，在同一根交联葡聚糖凝胶G-100柱先后进行层析。第一次操作所用的缓冲液含0.1M NaCl，第二次不含NaCl。洗脱曲线见图2。从图上可见，不论有没有NaCl存在，OD和酶活力高峰出现的时刻变化不大。但在有NaCl存在时，酶活力的高峰比无NaCl时更高些。洗脱曲线上其余的OD峰不显α-淀粉酶活性，为层析分离出来的杂蛋白峰。

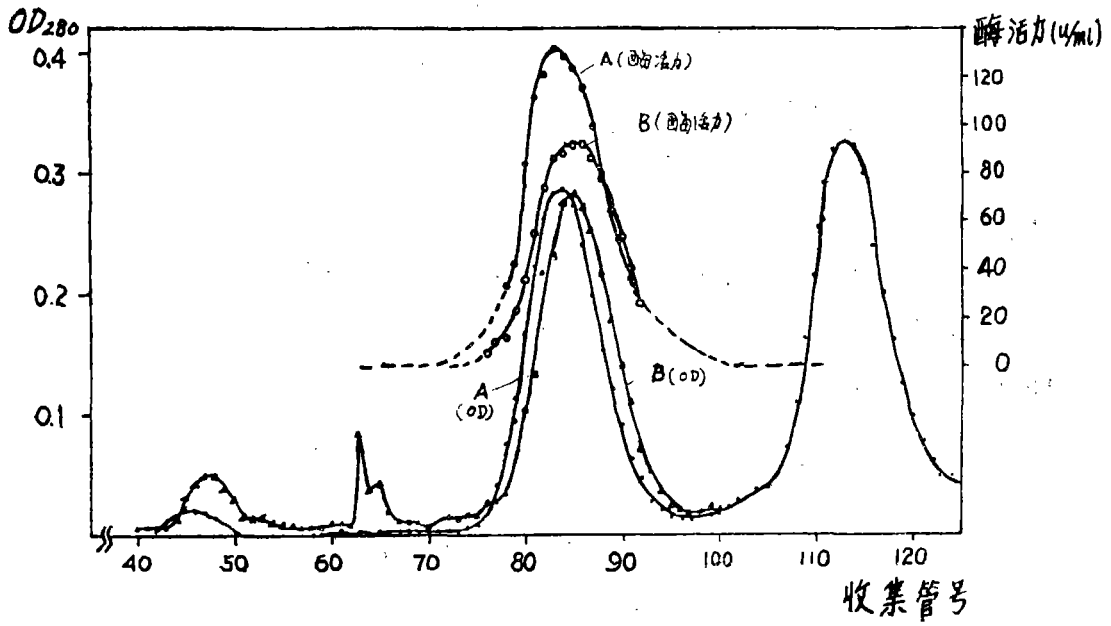

图 2 K49液化淀粉酶在交联葡聚糖凝胶G-100柱上的洗脱曲线
A. 缓冲液中含NaCl　　B. 缓冲液中不含NaCl

在第一次操作中，以第78号到91号管中所含的酶活力计，收率为104.9%；在第二次操作中，以第76号到95号管中所含酶活力计，收率为89.1%。由此推测NaCl对α-淀粉酶有激活作用。

交联葡聚糖凝胶层析使酶进一步纯化，酶液的比活力从离交浓缩后的178u/OD上升到468u/OD。此时所得纯化酶制剂的活力为132u/ml，供以下试验用。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

二、酶的纯度的鉴定

聚丙烯酰胺凝胶电泳：对纯化的酶制剂进行聚丙烯酰胺凝胶电泳其结果是只见到一条色带(图3)，可见此酶已被纯化。

三、分子量的估计[10]

交联葡聚糖凝胶过滤：以兰葡聚糖(Blue dextran)为大分子参照物，以牛血清蛋白(Bovine serum albumin)、卵清蛋白(Ovalbumin)、糜蛋白酶原(Chymotrypsinogen)、核糖核酸酶(Ribonuclease)为标定蛋白，利用交联葡聚糖凝胶 G-100柱 (16×950mm) 为分子筛，进行凝胶过滤，估得该α-淀粉酶的分子量为47,000(图4)。

四、等电点的测定

用已纯化的酶制剂按材料与方法部分所述等电聚焦法测得K49液化淀粉酶的等电点为pH 5.24(图5)。

五、变旋光现象

α-淀粉酶作用于淀粉溶液生成α-葡萄糖。α-葡萄糖在溶液中逐步地转变成β-葡萄糖，最后达到实验条件下的α-型和β-型葡萄糖的平衡。在溶液中加入碱，可以加速这种平衡的建立。由于α-葡萄糖的旋光度比β-葡萄糖的高，碱的加入使反应混合物中过量的α-葡萄糖迅速转变成β-葡萄糖，表现为旋光度下降。

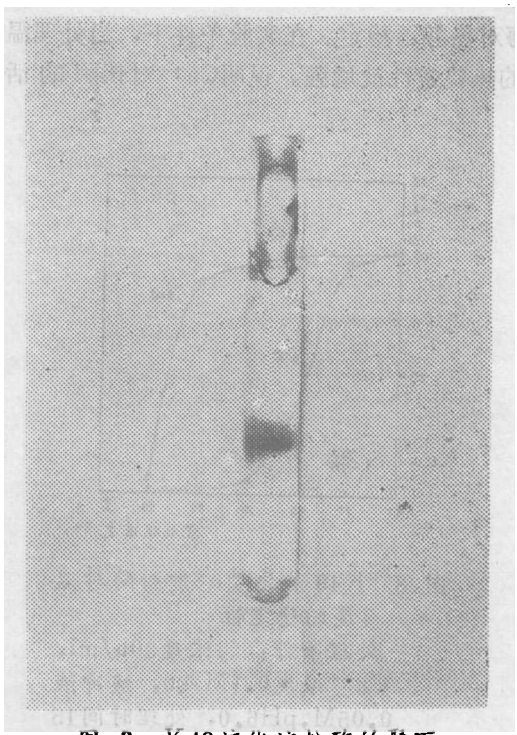

图 3　K49液化淀粉酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

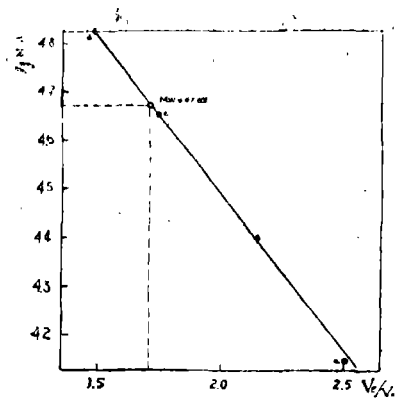

图 4　K49液化淀粉酶分子量的估计(交联葡聚糖凝胶过滤法)
图中：a为核糖核酸酶(分子量为14,000)；b为糜蛋白酶原(分子量为25,000)；c为卵清蛋白(分子量为45,000)；d为牛血清蛋白(分子量为67,000)。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

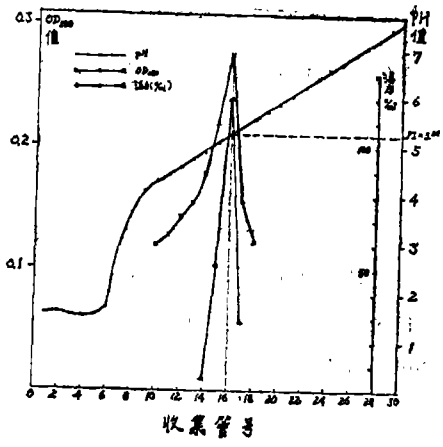

图 5 K49 液化淀粉酶等电点的测定(等电聚焦法)

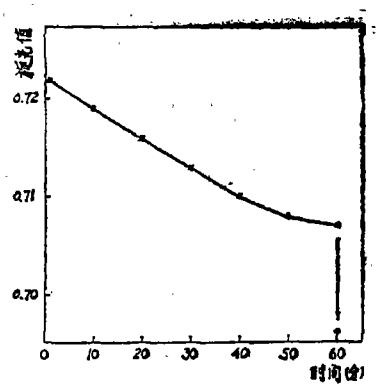

图 6 K49 液化淀粉酶的变旋光试验

采用材料和方法部分中检测变旋光效应的方法检查 K49 的酶。加碱后旋光度确实下降(图6),表现了α-淀粉酶的特性。

六、酶的热稳定性

1. 对pH的稳定性。如图(7)所示，当pH值低于5时稳定性差(于40℃温度下存放20hr后酶活几乎全部消失)，但在pH5—10范围内，即使在40℃环境下也比较稳定。

2. 对热的稳定性：如图8所示，这种α-淀粉酶对热并不稳定。在实验条件下，当处理温度上升时酶活力就下降；但当有Ca^{++}存在时，酶的热稳定性就增强。说明Ca^{++}对该酶的活性有保护作用。

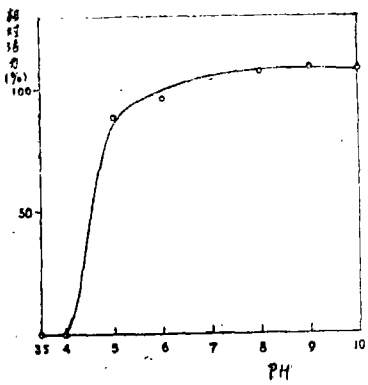

图 7 K49液化型淀粉酶对pH的稳定性
处理条件：酶浓度30u/ml，缓冲液浓度0.05M，处理温度40℃，处理时间20hr，在不同 pH下处理后，测残存酶活力

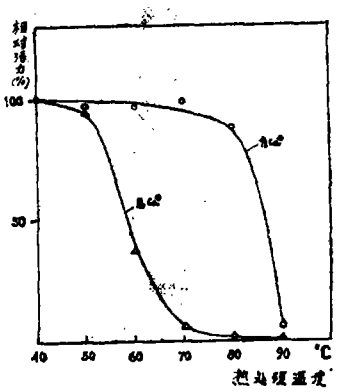

图 8 K49 液化型α-淀粉酶对温度的稳定性
处理条件：酶浓度30u/ml，Ca^{++}浓度0.1M或0，缓冲液0.05M,pH6.0，处理时间15分钟在不同温度下处理后测残存酶活力

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

七、酶作用的最适温度和最适pH

如图9所示，K49液化型α-淀粉酶的最适作用温度是70℃，当作用温度高于90℃酶活力迅速丧失；该酶的最适作用 pH是6(图10)，当pH高于8和低于4时，酶就不能充分发挥作用。

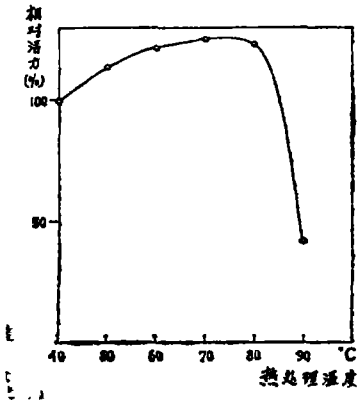

图 9　温度对 K49 液化型 α-淀粉酶活性的影响

酶作用的条件：底物浓度，1%可溶性淀粉溶液；缓冲液，0.05M 醋酸盐缓冲液，pH6.0；酶浓度1u/ml，在不同温度下作用15分钟。

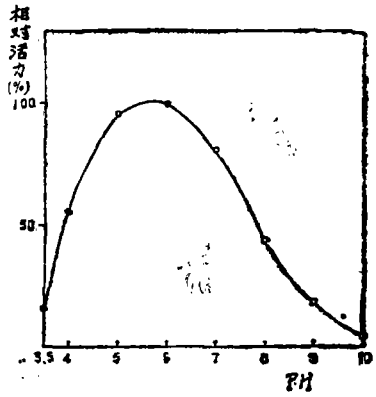

图 10　pH 对 K49液化型α-淀粉酶的活性的影响

酶作用条件：底物浓度1%可溶性淀粉酶浓度 1u/ml；缓冲液浓度0.05M；作用温度40℃。在不同pH下作用15分钟。

八、对各种基质的作用

如表一所示，在实验条件下，K49液化型α-淀粉酶制剂作用于可溶性淀粉、直链淀粉、支链淀粉和 β-界限糊精而产生葡萄糖，但几乎不能分解葡聚糖 10、α-环状糊精、β-环状糊

表一　　K49 液化型 α-淀粉酶对各种基质的作用*

编　号	基　质　名　称	还原糖(葡萄糖mg)	相对速率(%)
1	可溶性淀粉	2.18	100
2	直链淀粉 $\overline{DP_n}$100	2.73	125
3	支链淀粉G	2.76	126
4	动物淀粉	1.81	83
5	β-界限糊精	1.33	61
6	葡聚糖10(MW10,000)	—	—
7	α-环状糊精	—	—
8	β-环状糊精	—	—
9	普鲁兰 $\overline{M_n}$ 30×10^4	—	—
10	爱希南	—	—

* 反应体系基质浓度 2mg/ml，酶浓度 0.25u/ml，pH6.0 醋酸盐缓冲液的浓度0.002M，$CaCl_2$ 浓度 0.002M，NaCl 浓度 0.01M，作用温度 40℃，作用时间24hr。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

精、普鲁兰(Pullulan)和爱希南(Elsinan)。

九、酶对可溶性淀粉的水解

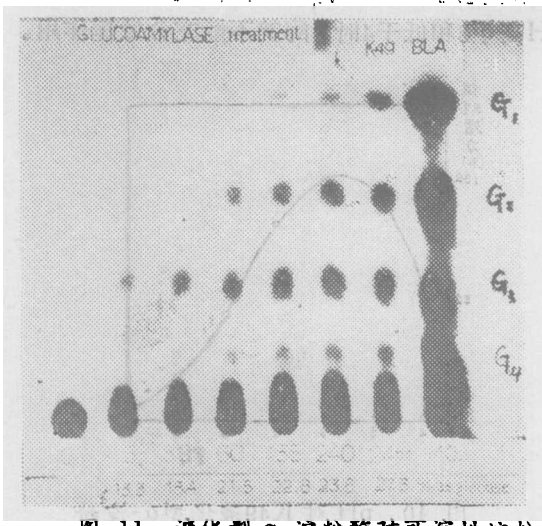

图 11 液化型 α-淀粉酶对可溶性淀粉的作用(Ⅰ) 用糖化酶处理滤纸后显色
图中 MO 是麦芽寡糖

在20ml 2%可溶性淀粉溶液和18ml0.02M磷酸盐缓冲液(pH6.0)中加入 2ml酶液(5u/ml或1u/ml)，于40℃水浴中作用，在规定的时刻取出在沸水浴中处理 15min后做纸层析、测总糖、还原糖(葡萄糖)和与碘的呈色度(取 0.5ml样品，用蒸馏水稀释 到16ml，以 4 ml 0.01N I_2-KI 溶液发色，测 660nm 波长下的光密度)。如图 11 和 12 所示酶作用于可溶性淀粉，产生葡萄糖(G_1)，麦芽糖 (G_2)，麦芽三糖 (G_3)……和低分子糊精。作用于淀粉分子能在很短的时间内把它切割成对碘不呈色的低分子糊精(图13)，但作用终点时水解液的还原糖含量仍不高。由此可见要想单独使用液化型α-淀粉酶来获得还原糖是有一定困难的。

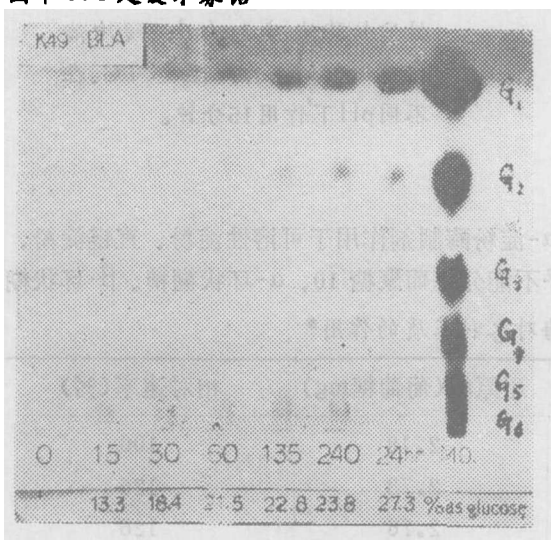

图 12 液化型 α-淀粉酶对可溶性淀粉酶的作用(Ⅱ) 未用糖化酶处理即显色
图中MO 是麦芽寡糖

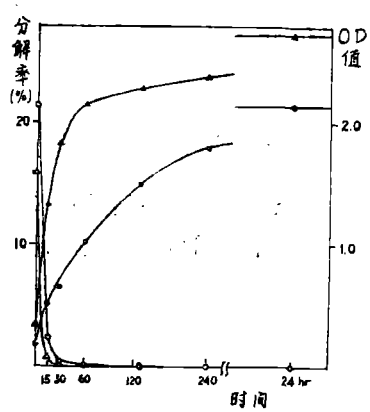

图 13 K49 液化型 α-淀粉酶对淀粉作用的研究结果
图中三角形的点指的是酶浓度为 5u/ml时的情况，圆点指的是酶浓度为 1u/ml 时的情况。空心点代表光密度，实心点代表分解率。

综合K49液化型α-淀粉酶对各种底物作用的结果，可以认为这种酶在适当的条件下能以很快的速度任意切割线状或树枝状的葡聚糖(包括淀粉)大分子中的 α-1.4-葡萄糖苷键，但作用速度随着大分子中以 α-1.4-葡萄糖苷键相连的部分的葡萄糖单位数的减少而降低。这种酶不能(或很难)切割环状葡聚糖分子中的 α-1.4-葡萄糖苷键。

致谢：本文撰写过程中，得到无锡轻工业学院发酵教研室主任檀耀辉副教授指导，特致谢意。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参 考 文 献

[1] J.Fukumoto, T.Yamamoto and K. Ichikawa, Proc. Japan Acad., **27**, 352 (1951).

[2] J. Fukumoto and S. Okada, J. Fermentation Technol., **41**, 427(1963).

[3] 福井作茂：生物化学实验法，还原糖の定量法，东京大学出版会(1969).

[4] 竹西繁行：科学と工业，**52**(4),139(1978).

[5] P.Andrews, Biochem.J., **96**, 595(1965).

[6] B.J.Davis, Ann. N.Y.Acad. Sci., **121**, 404(1969).

[7] The Instruction Sheet of LKB 8101 Electrofocusing Column.

[8] 不破英次、二国二郎：农芸化学会志，**26**, 154(1952).

[9] W.E. Trevelyan, D.P.Procter and J.S.Harison, Nature, **166**,444(1950)。

[10] 林胜哉：蛋白质的分子量・分子形，东京大学出版社(1971)。

Purification and Some Properties of Bacterial Liquefying α-Amylase

Zhang Xing-yuan

Abstract

Liquefying α-Amylase from a bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* K49, was purified to an electrophoretically homogeneous state by precitation with ammonium sulfate, adsorption with starch, column chromatography with DEAE-Sephadex and gel filtration with Sephadex G-100. Its molecular weight was estimated to be about 47,000 by gel filtration (Sephadex G-100), and its isoelectric point was at pH 5.24. The enzyme was most active at pH 5.8 and at 70℃, and was stable between pH 7 and 10 (40℃, 20 hr), but not stable over 70℃ (15min) in the absence of Ca^{++} ion.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net