

细菌 α -淀粉酶深层培养的研究(I)

—细菌 α -淀粉酶活性的测定方法

邬显章 * 蓑田泰治

摘 要

1. 不同源的 α -淀粉酶样品, 用 4 种 α -淀粉酶的测定方法作了比较, 得出了各种方法测定值之间的比值, 可以用来统一估算在工业生产和科学实验中的 α -淀粉酶活性水平。

2. 由于 α -淀粉酶的特性、作用条件以及淀粉来源不同所表现的活性全然不同, 要以一种简单的统一的测定方法测定 α -淀粉酶活性是不可能的。

3. 细菌 α -淀粉酶用液化力的(JIS-K-7001)测定法, 测定过程与实际应用较为接近; 该法的测定温度高, 能与其他酶品种相区别; 该法的测定值能与比色法一致, 它是一个值得推广的方法。

一、 引 言

细菌 α -淀粉酶是一种淀粉水解酶, 能任意切断淀粉结构中的 α -D-(1—4)葡萄糖苷键。因此, α -淀粉酶的活性测定方法有二类: 一类是根据淀粉的粘度降低的程度来测定的, 常叫液化力法; 另一类是根据淀粉的直链部分的减少程度, 再与碘反应, 逐步由紫、红、黄、无色的色调变化来测定的, 常叫糊精化力法。

α -淀粉酶的来源很多, 不同来源的酶, 其化学性质差异很大, 就细菌产的 α -淀粉酶来说也不是单一的酶, 常是多种类淀粉酶的混合酶类, 所以, 用某一特定的测定方法来测定各种类的 α -淀粉酶的活性是有困难的, 加上各产业界为了充分发挥酶的作用, 采用多种类的淀粉分解工艺。因此, 目前产生了许多 α -淀粉酶的实用测定方法, 但其结果都用“单位/毫克(毫升)”来表示酶活性值, 显得非常混乱。这不但对各国 α -淀粉酶的研究成果及生产水平的分析带来不少麻烦与误解, 而且对酶的进一步应用与发展十分不利。

本文通过细菌 α -淀粉酶的不同样品和不同测定方法作比较指出, 同来源的酶样的方法比值是一个十分有意义的数值。

* 蓑田泰治, 日本东京大学农艺化学系应用微生物教室教授。

本文收到日期 1983 年 5 月 15 日

二、试验方法和材料

(一) 试验方法

我们在细菌 α -淀粉酶的深层培养研究中采用过几种 α -淀粉酶活性的测定方法：如在遗传学方法育种中采用的微量法，发酵工艺试验中采用的比色法和液化力法，以及我国的部颁法。这些实用的 α -淀粉酶测定方法都已在原文献报导的基础上作了某些修改。本文所采用的方法的操作要点简述如下：

1. 中华人民共和国轻工业部颁标准法(以下简称中国部颁法)。^{[1][2]}

取 2% 可溶性淀粉 20 毫升和 0.2M pH 6.0 磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液 5 毫升，放入 $\phi 25 \times 200$ 毫米大试管中，在 60℃ 恒温水浴中预热 4—5 分钟，然后加入预先稀释好的酶液 0.5 毫升，即用秒表记录时间，充分摇匀，定时用滴管取出反应液 0.5 毫升，滴加于预先充满比色稀碘液(碘 0.088 克和碘化钾 40 克于 1 升水中)约 1.5 毫升的白磁穴内，当穴内呈色度由紫色逐渐变为红棕色，与标准色泽相同时，即为反应终点。计算时间 T(分)。

上述条件下一个酶单位表示 1 毫升酶液 1 小时糊精化可溶性淀粉的克数。

$$1 \text{ 酶单位} = (60/T \times 20 \times 2\% \times n) \div 0.5 = \frac{48}{T} n$$

n—酶的稀释倍数

T—糊精化的时间(分)

2. 日本工业规格液化力法^[3](以下简称液化力法或 JIS-K-7001 法)。

在药用马铃薯淀粉(无水物计) 100 克中，加入 M/10 醋酸—醋酸钠缓冲液(pH6.0) 100 毫升，以蒸馏水定容 1000 毫升，用电磁不断搅拌。

吸取上述淀粉乳浊液 10 毫升于直径 18 毫米的试验管中，加入稀释酶液 1 毫升，强烈振动，同时在沸水浴中加热，使淀粉糊化成固体状，立即移入 65℃ 恒温水槽中，用秒表记录时间。在反应过程中，时时将试验管倾斜，观察液化状态。达到与基本液(Silicone 300 cp)的同一粘度，即为反应终点，计算时间 t(秒)。

上述条件下，一个酶单位表示 1 毫升酶液在 15 分钟内使 1 克淀粉粘度下降到与基本液一致的能力。

$$1 \text{ 酶单位} = \frac{15 \times 60}{t} \times n$$

n—稀释倍数

t—液化时间 t(秒)

3. 糊精化力的比色测定法^[4](以下简称比色法)。

于大试管中加入 1% 可溶性淀粉溶液(pH6.0 醋酸缓冲液) 10 毫升，在 40℃ 恒温水槽中预热 4—5 分钟，加入稀释酶液 1 毫升，摇匀，正确反应 10 分钟后，吸取此反应液 1 毫升，加入含 0.1 N HCl 10 毫升试管中停止酶反应。

取上述终止液 1 毫升，加入含 0.005% 碘和 0.05% 碘化钾溶液 10 毫升的试管中显色，在波长 660nm 杯厚 10 毫米下比色，求得透光度 D，同时以蒸馏水代替酶液，同样操作，测得对照透光度 D°。

上述条件下，一个糊精化力单位表示，1 毫升酶液将淀粉—碘液复合体的青色呈色度减

少 10% 的能力。

$$D.P. (\text{Dextrinizing power}) \text{ 单位} = \frac{D^{\circ} - D}{D^{\circ}} \times \frac{100}{10} \times n$$

n — 酶液的稀释倍数

1/10 — 青色呈色度减少 10%

4. 东京大学丸尾教授的微量法^[5,6](以下简称微量法)。

称取可溶性淀粉 0.5 克(以无水计)于 100 毫升三角瓶中, 加入 0.5M pH6.0 磷酸缓冲液 100 毫升, 瓶口用铝纸包扎, 在磁性搅拌加热器上溶解后, 移入 40℃ 恒温槽中作基质淀粉之用。

吸取稀释酶液(以 pH6.0 磷酸缓冲液稀释) 1 毫升, 在 40℃ 恒温槽中预热 1 分钟后, 加入 0.5% 基质淀粉液 2 毫升, 充分混合, 以秒表记录时间, 正确 30 秒钟, 吸取此反应液 0.2 毫升, 加入含 N/3000 碘液 5 毫升的试管中, 充分搅拌后, 在波长 700nm 下测定 O、D 值, 此后每隔 1 分钟左右同样测定, 待测得 O、D 值同对照 O、D 标准近似时即为反应终点。

对照 O、D 标准, 以 0.5M pH6.0 磷酸缓冲液 1 毫升代替酶液, 同法操作与时间无关, 随便取样做 3—5 个数据, 计算平均 O、D 值, 再以平均 O、D 值 × 7/9 作为对照 O、D 标准。

上述条件下, 1 单位酶活表示 1 毫升酶液在 1 分钟内水解 100 微克可溶性淀粉的量。

$$1 \text{ 单位值} = \frac{O, D_{0.5} - OD_t}{O, D_{0.5}} \times 100 \div (t - 0.5) \times n$$

O、D_{0.5} — 30 秒钟的 O、D 值。

O、D_t — 与对照 O、D 标准近似即终点 O、D 值。

t — 到终点 O、D 值的时间(分)。

0.5 — 30 秒钟换成以分为单位。

n — 稀释倍数。

(二) 材料

1. 和光淀粉酶: (日本和光纯药工业株式会社) Lot no. LTF 5850, 活性不少于 20 单位/毫克) 用 (Bernfeld) 法^[7]。

2. Sigma (U.S.A.): 细菌淀粉酶 Type × 1-A, 活性 73 单位/毫克, 一单位表示在 3 分钟 pH6.9, 温度 20℃ 下水解淀粉产生 1 毫克麦芽糖。

3. B.S.2633 发酵液^[8]: 以 B.S.2633 变种在 2 升玻璃罐中的发酵液(由日本大学农兽医学部丸尾教授供给)。

4. S.A.C. 发酵液: B. Subtilis Var. amylo Sacchariticus 摇瓶发酵液。

5. CLAESEASE 商品酶: 是耐温 α- 淀粉酶的浓缩酶液(由大阪市立工业研究所供给)。

三、结 果 讨 论

今将本文所提供的测定方法的要点对比列于表一。

表一的 α- 淀粉酶活性的测定方法是一些经典法的修改法或是再修改法, 但 α- 淀粉酶的活性的测定值根据某种酶的化学结构、操作条件及基质淀粉来源有很大不同, 加上测定方法

表一 α -淀粉酶活性测定要点

方法 序号	方法简称	反 应 条 件						反应终点指标	测量范围 单位/毫升	1 单位酶活 值表示每分 钟水解淀粉 毫克量
		基 质	最终 浓度 %	体积 毫升	pH	温度 ℃	时间 分			
(1)	我国部颁法	可溶性 淀粉	1.6	25.5	6.0	60	2-5	反应色调与 $K_2Cr_2O_7 + CoCl_2$ 一致	10-20	17
(2)	液化力法	马铃薯 淀粉	9.09	11.0	6.0	65	15	粘度与Silicone 油一致	3-10	/
(3)	比 色 法	可溶性 淀粉	0.9	11.0	6.0	40	10	色泽在660nm 下减少10%	5-10	1
(4)	微 量 法	可溶性 淀粉	0.3	3.0	6.0	40	2-5	反应液的O、D 值在660nm下 与对照O、D值 一致	5-10	0.1

的修改常带来很大差值，而文献资料报导及各产业界的习惯，最终结果仍以“单位/毫克(毫升)”表示酶的活性值，这不但没有可比性，而且常常引起误解，难以分析。例如表一的最后一项所列单位酶活性值就无甚意义可言。

表一的测定方法序号(1)、(3)、(4)都可称为 Wohlgemuth 式的糊精化力法；我国部颁法(1)系属富金原孝的再修改法；比色法(3)属 Wohlgemuth 的再修改法；微量法(4)属 Fuwa 的改良法，但这些方法中最大的问题是基质淀粉种类对测定值有显著的影响，有试验表明正负错误值可达 20% 左右，其次问题是反应终点的指标。如对细菌 α -淀粉酶而言，以淀粉的碘液的紫色到红色的激变是属反应的终点；如方法(1)中用特定的标准终点液： $K_2Cr_2O_7 + CoCl_2$ 液，但个人因素影响较大。为了避免测定者的个人误差，在方法(3)(4)中以比色代替人目测定。

方法(2)是属液化力法，特别适宜耐热性高的细菌 α -淀粉酶的活性测定以及一些具有使淀粉粘度急降的 α -淀粉酶的活性测定。由于该法的操作温度高，要经糊化处理，不适用于 *ASP. oryzae*、麦芽类的 α -淀粉酶活性值的测定。

下面将几种 α -淀粉酶样品，用上述测定方法所得结果列表二、三。

表二 几种 α -淀粉酶样品的测定酶活性的比较

样 品	测 定 方 法 简 称			
	微 量 法	液化力法	比 色 法	我国部颁法
Sigma(U.S.A.)	810.9u/mg	60u/mg	51u/mg	6.6u/mg
和光(Japan)	3,005.0u/mg	145u/mg	120u/mg	21.0u/mg
B.S.2633发酵液	47,907.0u/ml	/	/	200.0u/ml
S.A.C.发酵液	3,860.0u/ml	89.2u/ml	71.5u/ml	15.0u/ml
CLAESTASE浓缩液	102,269.0u/ml	3,800.0u/ml	3,150.0u/ml	548.5u/ml

表三 α -淀粉酶测定方法之间的比值

样 品	微 量 法	液 化 力 法	微 量 法	液 化 力 法
	我国部颁法	我国部颁法	液 化 力 法	比 色 法
Sigma(U.S.A.)	133	9	13.5	1.18
和光(Japan)	143	7	20.7	1.20
B.S.2633	240	/	/	/
S.A.C.	267	5.9	42.8	1.25
CLAESTASE	186	6.93	26.9	1.20

从表二中看出,同一样品但用不同的 α -淀粉酶的测定方法,所得酶活数值“单位/毫升)”的差值极大。显然,简单地酶活性单位值是无意义的。

表三是指出这些测定方法之间的比值,一些有趣的数值如下:

在一些耐热性差的细菌糖化型 α -淀粉酶样品,如B.S.2633和S.A.C.发酵液样品中,

$$\frac{\text{微量法}}{\text{部颁法}} = 250 \text{ 倍}, \quad \frac{\text{液化力法}}{\text{部颁法}} = 5.9 \text{ 倍}$$

在一些较耐热的细菌液化型 α -淀粉酶样品,如Sigma(U.S.A.),日本和光酶和CLAESTASE样品中:

$$\frac{\text{微量法}}{\text{部颁法}} = 140 \text{ 倍}, \quad \frac{\text{液化力法}}{\text{部颁法}} = 7-9 \text{ 倍}$$

另外,在任一样品中,液化力法/比色法之间的比约1.2。

四、 结 论

1. 细菌 α -淀粉酶的“单位值”,由于分析方法的不同有很大差值,如果加上不同来源的酶样品,分析的差值就更大。目前这些实用的测定方法各有其优缺点,统一使用一种方法看来有很大困难。但是同一来源的酶样品采用较为统一的测定方法表示酶的活性看来很有必要,不但可以用来统一表示和比较酶生产的活性水平,而且将对酶的应用和正常发展带来效益。

2. 从四个测定方法中看出,细菌液化型 α -淀粉酶采用液化力法测定有很多特点:如与实用工艺相接近,可与其他酶品种区别开来;同时和比色法作比较来看,测定一致、误差小。是一个可以推广的测定方法。

3. 从表三所得到的测定方法比值,可以了解和估算文献报导的有关 α -淀粉酶的研究及生产水平。例如:1982年在日本农艺化学年会(东京)丸尾文治教授(日本大学)发表产 α -淀粉酶的B.Subtilis 2633培养液单位为40,000~50,000单位/毫升的报导,如用我国部颁法表示,则该培养液中单位值为:

$$\frac{50,000 \text{ 单位/毫升}}{250} = 200 \text{ 单位/毫升}$$

致 谢

作者对大阪市立工业研究所岗田茂孝、东原昌孝提供样品及测定方法致以谢意,对日本大学农兽医学部农艺化学科有用菌学研究室丸尾文治、东条敬提供样品及实验条件致以谢意。本研究得到日本国际协力事业团的资助。

主 要 参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国轻工业部部颁标准, QB747—80 (1981)。
- [2] 富金原孝, 发酵协会志, 13, 50 (1955)。
- [3] JIS-K-7001(1972)。
- [4] Wohlgemuth, Biochem, 2, 9, 1(1908)。
- [5] H.Fuwa; J. Biochem, 41, 583-603(1954)。
- [6] B. Maruo et al; Proc. Japan Acad, 54, ser B, 435(1978)。
- [7] P. Bernfeld, "Methods in Enzymology" Vol, 1 Ed, by S.P. Colowick & N.O. Kaplan, Academic press Inc, New Yark, 149(1955)。
- [8] 东条敬、丸尾文治, 日本农艺化学会昭和 57 年度大会 (东京), 要旨集, P.173 (1982)。

Studies on the production of Bacteria α -Amylase by submerged Culture (I)

Assay Method of Bacteria α -Amylase Activity

Wu Xian-zhang Yasuji Minoda

Abstract

Four methods used to assay α -Amylase activity from various original samples were investigated and compared with each other. The investigation was carried out mainly on the data value comparison, which is useful to estimate, as a whole, the α -Amylase activity both in commercial production and scientific research.

There is no simple or standard method to assay α -Amylase activity, however; and it is most likely that whenever the origin of starch, the enzyme system, or the procedure of reaction process is different, the resulting experimental datum is quite different.

Obviously, the liquefying method(JIS-K-7001) fairly agrees with the practical work, the temperature in the reaction is higher than Others. The datum Obtained is in agreement with Dextrinzing method, so that, the liquefying method is commendable for assaying bacteria α -Amylase activity.