

# 枯草芽孢杆菌糖化型 $\alpha$ -淀粉酶的研究(I)

## ——糖化型淀粉酶的发酵生产条件及纯化

陶文沂

(无锡轻工业学院发酵系)

桧山圭一郎

浜田信威

竹西繁行

冈田茂孝

(大阪市立工业研究所, 日本)

### 摘 要

枯草芽孢杆菌 KO2 在合适的碳源, 如糊精、可溶性淀粉及氮源, 如豆饼浸出液的培养液中三天能达产糖化型 $\alpha$ -淀粉酶高峰。使用硫酸铵分级盐析, 离子交换色谱, 凝胶过滤可获得纯净的酶。对此纯化的酶的研究表明: 该酶的等电点为 pH5.16, pH 稳定范围 5.0~8.5, 温度稳定范围 40~50°C 以下, 最适作用 pH 为 5.5, 最适作用温度 66°C, 分子量经凝胶过滤、高压液相色谱、SDS 电泳及超速离心分析测得为 42,000~45,000, 由 396 氨基酸残基构成并确定了各种氨基酸的百分比及数量, 对于可溶性淀粉的米氏常数为 0.057, 最大速度  $V_{max}=1.3$  微克分子/分钟·毫升·单位酶活。比较此酶与液化型 $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶对基质的作用表明, 此酶具有独特的作用机理。

### 引 言

$\alpha$ -淀粉酶是以随机方式作用于淀粉分子中  $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷键的一类酶, 其作用方式不同于其它类型的淀粉酶, 在酿造、啤酒、淀粉糖及纺织工业上已得到广泛应用。进一步研究发现不同来源的  $\alpha$ -淀粉酶根据糖化活性与糊精化活性比值、水解的最终程度和终产物可以分为两组<sup>[1]</sup>, 枯草芽孢杆菌生产的糖化型  $\alpha$ -淀粉酶 (Bacterial Saccharogenic  $\alpha$ -Amylase 简称 BSA) 在酶的物理、化学性质和对基质的作用方式等各方面均不同于液化型  $\alpha$ -淀粉酶 (Bacterial Liquefying  $\alpha$ -Amylase 简称 BLA), 在分解淀粉产生葡萄糖过程中的独特的性质使其在发酵工业中具有特殊的应用价值。本课题就此酶的产生、纯化、性质及作用特点作一初步探讨。本文讨论此酶的发酵生产条件及纯化方法。

### 材 料 与 方 法

#### 1. 菌 种

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) KO2

#### 2. 培养基和培养条件

斜面培养基组成为 1% 蛋白胨, 1% 牛肉膏, 0.5% 氯化钠, 1.5% 琼脂, pH7.0。

本文 1984 年 3 月 6 日收到。

发酵培养基包括碳源如葡萄糖、糊精、可溶性淀粉,氮源如蛋白胨、豆饼浸出汁、玉米浆,以及无机盐类如磷酸氢二铵、硫酸镁等。发酵试验在500ml坂口瓶中进行,摇瓶装液50ml,往复式摇床(摇床频率120次/分)30℃培养1~4天。

### 3. 酶活性分析方法

淀粉酶活性测定方法是建立于体系中由淀粉分解产生的还原糖的量来度量的。将5ml 0.6%可溶性淀粉溶液和1ml已作适当稀释的酶液(两者都处于0.05M pH5.6乙酸缓冲液环境中)混合于大试管中,置于40℃水浴保温10分钟(精确),立即加入索莫吉(Somogyi)溶液使酶促反应中止,利用索莫吉法<sup>[2]</sup>测定酶促分解产生还原糖的量。在此反应系统中每分钟能分解产生1微克分子还原糖的酶量定义为单位酶活。

### 4. 酶液蛋白质含量及比活

蛋白质含量根据紫外吸收值来计算,即利用紫外分光光度计测定波长280nm处光密度来表示。某一样品的酶活性与其蛋白质含量(光密度值)之比称为酶样品的比活。比活是酶纯度的度量。

### 5. 离交色谱柱的制备

称取DEAE-Sephadex(葡聚糖凝胶)A-50 15克,使之浸泡于500ml 0.5N NaOH溶液中,1小时后抽滤,去离子水洗至pH7.0,再浸于500ml 0.5NHCl溶液中,1小时后抽真空除去树脂浆中二氧化碳,蒸馏水洗至pH5.0,随后使用离交所用同样的缓冲液洗三遍后装入 $\phi 30 \times 300$ 色谱柱中,连接缓冲液贮槽,连续洗涤色谱柱一晚,备用。

### 6. 凝胶过滤柱的制备

称取葡聚糖凝胶G-100 70克于1000~1500ml去离子水中,缓慢搅拌使之均匀,将此烧杯置于沸水浴中5小时或在室温下放置72小时,使凝胶充分膨胀,抽滤,重新悬于含0.1M NaCl的pH7.0, 0.05M Tris-马来酸缓冲液中洗涤及抽滤两遍,在第二遍悬浮时抽真空除去凝胶中气体。柱壁外侧先作900及950ml标记,关闭出口阀后倾入约250ml缓冲液,然后谨慎地倾入凝胶浆至900ml标记,在柱顶安装一个漏斗,将剩余的凝胶浆倾入漏斗中,使凝胶颗粒能缓慢下沉形成均匀的柱,吸去多余的部分使柱表面位于两标记之间,连接进口管及缓冲液贮槽,使用柱体积2~3倍体积的同种缓冲液平衡柱后备用。

### 7. 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳

圆盘电泳根据Davis<sup>[3]</sup>的方法,所用柱直径5mm,分离层聚丙烯酰胺浓度7.5%,浓缩层及样品层聚丙烯酰胺2.5%,Tris-甘氨酸缓冲液pH9.4,电泳电流2~3mA/柱,室温下电泳1小时左右,溴酚蓝色层接近下端时结束,取出柱,1%酰胺黑染色1小时,7%乙酸溶液脱色。

### 8. 超速离心沉降法鉴定酶制剂纯度

超速离心沉降法可以区别分子量差异很小的各个组分。在日立282型分析超速离心机的样品池中加入0.7~0.75ml样品,样品浓度0.5~1%,即OD=8~15,分析条件60,000 rpm, 25℃,达转速后每隔6分钟拍摄照片1张,66分钟结束。

## 结果与讨论

### 1. 索莫吉法测定糖化型 $\alpha$ -淀粉酶活性的一些影响因素

1) 索莫吉法测定还原糖的准确性 准确配制葡萄糖标准溶液浓度为36.0mg/100ml,反

应试管中分别加入糖标准液 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 ml, 按分析方法记下所耗  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  体积, 以此体积及对应糖量作标准曲线图 1。曲线表明此法测定还原糖的线性状况及重复性均较好, 在滴定体积差小于 5 ml 左右的范围内结果的准确性是满意的。其斜率  $G/V = 0.8854$ , G 葡萄糖微克分子数, V 硫代硫酸钠毫升数, 可供酶活测定时应用。

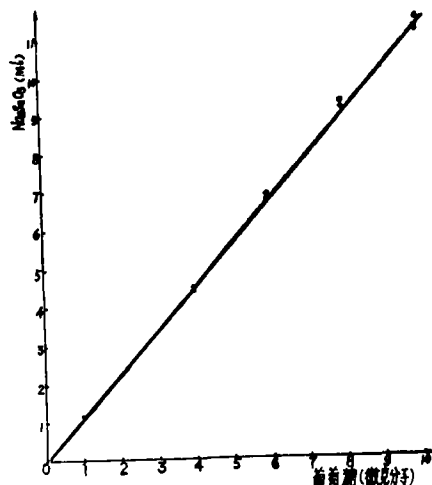


图 1 索莫吉法还原糖测定标准曲线

2) 酶浓度对测定方法的影响 酶浓度与分解产生还原糖的量不完全成线性关系, 利用同一酶样品稀释配制成不同浓度酶液, 依法进行测定分解产生的还原糖量, 结果如图 2。说明在用此法测定酶活时需控制酶活性在较低范围, 使产生的葡萄糖在 3 微克分子范围内, 能反映出酶的真正活性。

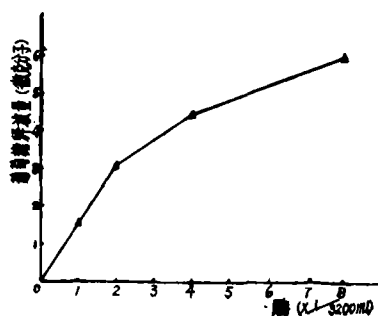


图 2 酶浓度与分解产物的关系

3) 底物浓度对测定方法的影响 底物浓度对于底物本身的酶促分解具有很大的影响, 在已确定的作用温度及时间的基础上, 必须确定能准确反映酶分解能力的底物浓度, 使用不同浓度的底物同一酶样品分解的测定结果如图 3。说明底物浓度低于 0.4% 时导致测定结果偏低, 0.4% 以上曲线趋于平坦。

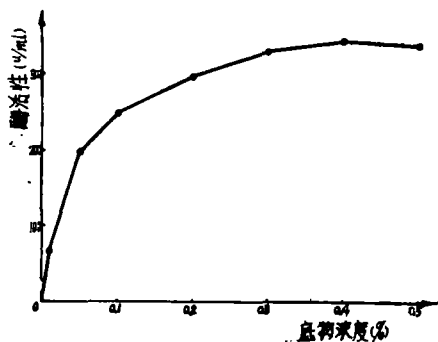


图 3 底物浓度及由此测得酶活性的关系, 实际使用酶活相同, 偏差为测定条件下的误差

由以上结果确定使用索莫吉法测定糖化型  $\alpha$ -淀粉酶时使用底物浓度及测定结果的正确范围。

## 2. 枯草芽孢杆菌 KO2 产酶适宜条件确定

1) 碳源及氮源的选择 供试碳源包括葡萄糖、糊精、可溶性淀粉, 供试氮源包括蛋白胨、豆饼浸出液、玉米浆、以及无机盐, 各种物质的浓度及结果如表 1。结果表明在使用豆饼浸出液及  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  时该菌产酶最高, 此时所用碳源糊精与淀粉相差不大, 故取两者同时作进一步试验。

表1 碳源及氮源的选择

试验号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
碳源	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>
氮源	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>
酶活性	10.73	32.46	24.59	7.33	39.70	32.64	13.23	37.11	32.01

C<sub>1</sub>: 3%葡萄糖; C<sub>2</sub>: 3%糊精; C<sub>3</sub>: 3%可溶性淀粉。N<sub>1</sub>: 1%蛋白胨, 1%鱼肉膏, 0.2%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02%MgSO<sub>4</sub>; N<sub>2</sub>: 5%豆饼浸出液\*, 1%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; N<sub>3</sub>: 5%玉米浆, 1%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

\*豆饼浸出液: 50克豆饼粉在500ml 0.02%NaOH溶液中煮沸30分钟, 棉花过滤, 调pH7.0, 滤液即10%豆饼浸出液。

2) 发酵周期的选择 酶作为微生物的一种特殊产物与发酵周期关系密切, 延长发酵时间会导致酶活下降, 而时间不足则积累量未达高峰。利用上面确定的两种培养基作酶活随时间变化的试验, 结果如图4。表明以糊精为碳源时发酵3天可达到明显高的酶产量。

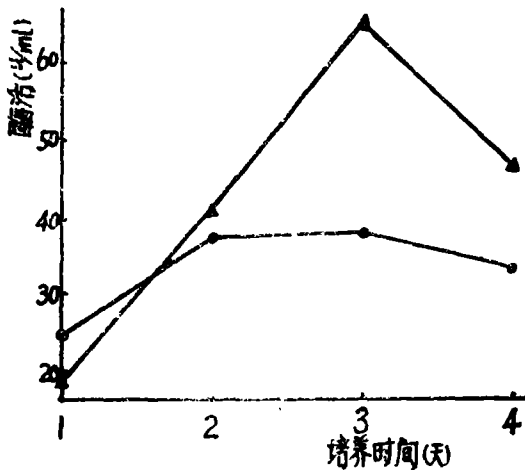


图4 发酵周期的选择

培养条件如方法上所述,  $\Delta$  为 C<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (糊精碳源),  $\circ$  为 C<sub>3</sub>N<sub>2</sub> (可溶性淀粉作碳源), 摇瓶种子培养基组成同发酵, 种龄42小时, 接种量1%。

过夜, 8,000 rpm 20分钟离心除去沉淀, 上清液中再加 2.364kg (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 使达75%饱和, 置于冷库过夜。收集沉淀, 用尽可能少的缓冲液溶解, 除去不溶物, 此酶液使用半透膜袋在冷库中去离子水里透析除盐及分子量小于8,000的蛋白质。除盐后酶液 1.72L, 酶活 255u/ml, OD 26.4, 比活 9.7。

以上结果确定发酵培养基及周期, 由此进行大规模培养以制取研究所需的酶, 用220个摇瓶获得发酵液, 经连续高速离心, 收集得上清液 9.125L, 酶活 67.63, OD<sub>260</sub> = 1.194, 比活 1.133。

### 3. 酶的纯化

1) 从发酵上清液中盐析提取酶 硫酸铵盐析提取酶是最常用的方法, 根据蛋白质分子量不同, 所需硫酸铵的饱和程度也不同, 利用低饱和度除去高分子杂蛋白质及适宜高饱和度以最高得率收集酶, 是盐析的关键。图5显示了在不同饱和度下盐析获得沉淀物的比活及得率。

由此可见使用40%饱和度可在损失很小的情况下除去杂蛋白, 75%饱和度可获得高收得率。在9.125L上清液中边搅拌边缓慢加入 2.223kg (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 静置冷库沉淀

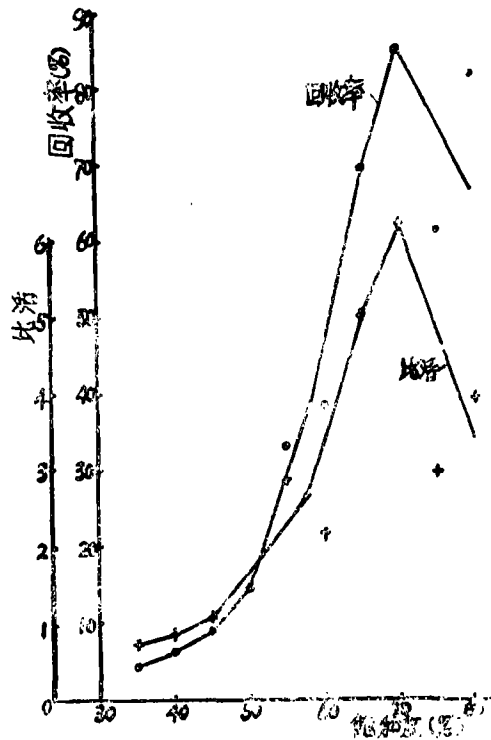


图 5 不同硫酸铵饱和度下盐析的结果

分别取 20ml 上清液逐步加入硫酸铵至所需饱和度。冷库保持 2 小时后,12,000rpm 离心 15 分钟,收集沉淀,用 pH7.0 20 毫克分子浓度三羟甲基氨基甲烷—马来酸缓冲液<sup>[4]</sup>溶解至 20ml,测定酶活及蛋白质含量。

2) 离子交换色谱法纯化酶 离子交换色谱法纯化酶的基础是酶蛋白的两性性质,对于未知等电点的酶,可用等电聚焦确定等电点后选择适宜的离子交换树脂。这里使用几根小柱采用不同树脂、不同离子浓度及不同 pH 缓冲液作试验,以摸索适宜条件,结果如表 2。

表明利用阴离子交换树脂 DEAE-葡聚糖凝胶 A-50, pH7.0 0.01 M 缓冲液对于此酶的

表 2 离子交换色谱分离条件试验

pH	离子浓度	树脂							
		DEAE-葡聚糖凝胶 A-50				SP-葡聚糖凝胶 C-50			
		流出液		洗脱液		流出液		洗脱液	
酶活	收率(%)	酶活	收率(%)	酶活	收率(%)	酶活	收率(%)		
7.0	0.005M	185	36.62	468	92.6	556.9	100	145.9	28.7
	0.01 M	26.52	5.25	550.2	100	444.2	87.93	106.1	20.8
	0.02 M	2.18	0.43	509.7	100	603.6	100	7.25	1.43
8.0	0.01 M			450.6	89.2	583.4	100	106.2	21
	0.02 M			530.4	100	689.5	100		

纯化是适宜的。利用此条件对经透析的粗酶纯化的结果如图6所示合并高流分得酶液比活49.65, 纯度比离交分离前高出5倍。

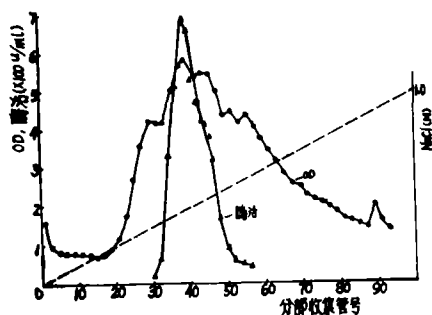


图6 离子交换色谱法纯化酶洗脱曲线

树脂柱 $\phi 30 \times 300\text{mm}$ , 340 ml 酶液补充以浓缓冲液使之达相同离子浓度后以20 ml/小时速度上柱, 用同种缓冲液洗柱一夜后, 用同种缓冲液及含1.0 M NaCl 的该液进行线性梯度浓度洗脱, 洗脱速度30 ml/小时, 分部收集器以每20分钟一支试管的速度收集, 共100支, 测定紫外吸收值及抽测酶活, 在酶活峰值附近区域测定每份样品的酶活。

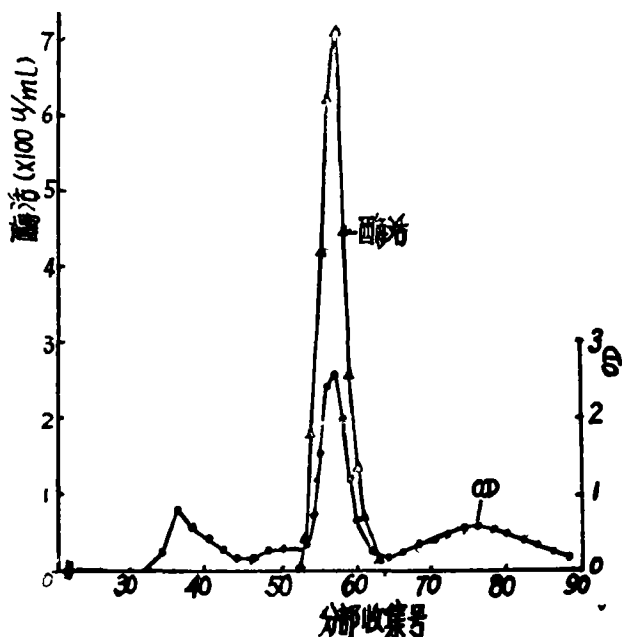


图7 凝胶过滤法纯化酶洗脱曲线

15ml 浓缩酶样用于分离, 控制流速每30分钟收集一管10ml, 含0.1 M NaCl 的 pH5.6 0.01M 醋酸钙缓冲液用作洗脱介质。

3) 凝胶过滤法纯化酶 凝胶过滤法分离物质的依据是分子的大小, 从而造成在凝胶柱内滞留时间的差异而分开。由上述离交分离获得的高流分合并后先移入半透膜袋中, 使用聚乙烯乙二醇(20,000)使之浓缩成20~30ml, 浓缩液上凝胶过滤柱, 结果见图7, 合并高流分获得酶液比活279.0。

总结以上几步纯化可以列于表3, 表中显示了每一步纯化的效果及酶的损失情况。凝胶过滤对纯化的效果特别显著。盐析及离子交换色谱法的收得率是满意的, 但透析过程造成22%

表3 糖化型 $\alpha$ -淀粉酶的纯化

步骤	体积 (ml)	酶活 (u/ml)	总酶活 (u)	光密度 OD(1/ml)	比活 (u)	分步回收率 (%)	总得率 (%)
培养液	9,125	67.63	617,100	59.7	1,133		100
盐析	1,000	561.8	561,800	75.0	7.49	91.04	91.04
透析	1,720	255.0	438,600	26.4	9.7	78.07	71.07
离子交换*	243	382.3	83,929	7.7	49.65	96.80	68.80
凝胶过滤	{ 101 79	{ 293.0 348.0	{ 29,593 27,492	{ 1.05 1.489	{ 279.0 233.0	{ 70.5 65.5	{ 46.30

\*离子交换色谱使用340ml透析后之酶液。

的损失。离交后浓缩及透析得到酶浓液未测定活力，所以不能说明凝胶过滤的得率偏低，很可能是在此两步中酶失活较严重。

#### 4. 纯化鉴定

使用圆盘电泳及超速离心沉降法来鉴定所制得酶的纯度，结果如图8、9。表明已获得电性及分子量均为单一的酶蛋白，可供进一步性质研究使用。

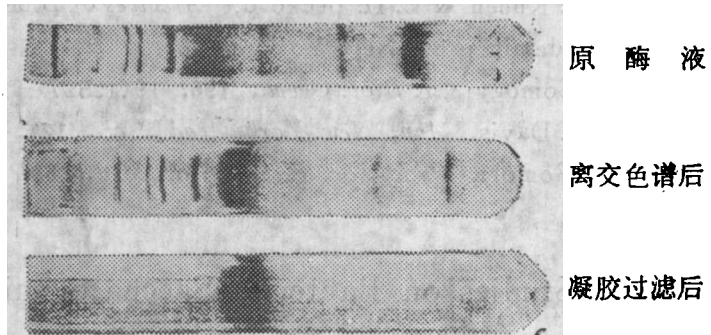


图8 糖化型  $\alpha$ -淀粉酶纯化的聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳  
条件: pH9.4, 7.5% 凝胶, 2~3mA/柱

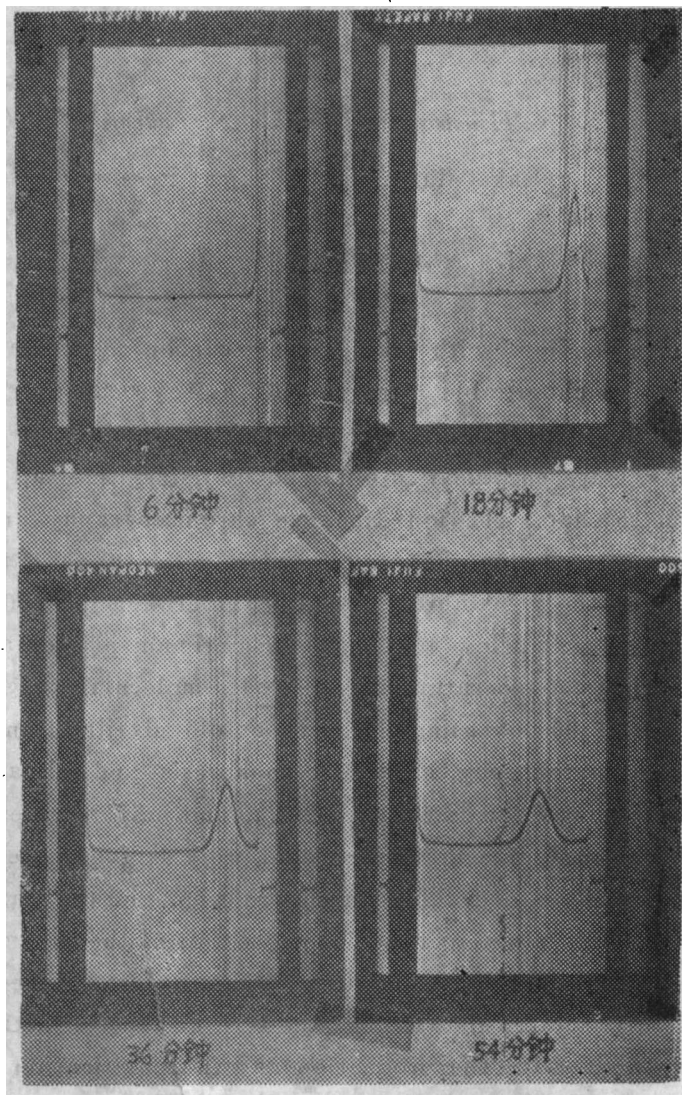


图9 酶制剂的超速离心沉降照片

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Eric Kneen & L. D. Beckord, "Archives of Biochemistry" Vol. 10, pp41~54.  
Academic press New York, 1946
- [ 2 ] M. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19(1952)
- [ 3 ] B. J. Davis, *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, Abstr. 2, 404(1964)
- [ 4 ] G. Gomori, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **68**, 354(1948)

## Studies on Bacterial Saccharogenic $\alpha$ -Amylase from *Bacillus Subtilis* (I)

Fermentation Condition and Purification of Bacterial  
Saccharogenic  $\alpha$ -Amylase

Tao Wenyi    K. Hiyama    S. Hamada    S. Takenishi    S. Okada

(Osaka Municipal Technical Research Institute, Japan)

## ABSTRACT

In the culture medium with such suitable carbon sources as dextrin and soluble starch and such suitable nitrogen ones as soy bean extract, the strain *Bacillus subtilis* KO2 can produce saccharogenic  $\alpha$ -amylase at the maximum on the third day. Pure enzyme was obtained by using the salt fractionation with ammonium sulphate, the ion-exchange chromatography and the gel filtration. A series of study on the pure enzyme indicate that the isoelectric point was pH 5.16, the pH stability range was between pH 5.0 and 8.5, the heat stability range was below 40—50°C, the optimum pH for action was pH 5.5, and the optimum temperature was 66°C. Its molecular weight was estimated to be 42,000~45,000 by using the methods of gel filtration, high performance liquid chromatography, SDS-electrophoresis and ultracentrifugation. The enzyme protein was composed with 396 amino acid residues and the percentage and the amount of every amino acid were assayed. The kinetic indices were that the  $K_m$  value for soluble starch was 0.057 and the maximum velocity was 1.3 micromole per minute per milliliter pre unit of the enzyme. Comparison of this enzyme with liquefying  $\alpha$ -amylase, glucoamylase in the action pattern on several substrates showed that the enzyme BSA has special action mechanism. The part I here deals with the production and the purification of the enzyme.