

麦芽中 β -淀粉酶的纯化及其性质

刘岩 王璋 许时婴

(无锡轻工大学食品学院, 无锡 214036)

摘要 采用疏水色谱(Phenyl Sepharose CL-4B)和凝胶过滤色谱(Sephacryl S-200)将麦芽中的 α -淀粉酶和 β -淀粉酶分离,用高效液相色谱(HPLC)测定酶水解蜡状玉米淀粉的产物,从而验证所得 β -淀粉酶样品的纯度。还研究了麦芽中 β -淀粉酶的最适反应温度。

关键词 β -淀粉酶;纯化;性质;疏水色谱;凝胶过滤色谱

中图分类号 TS201.25

0 前言

β -淀粉酶主要存在于高等植物和谷物中,由于 α -淀粉酶的共存使得 β -淀粉酶的测定受到影响,因此难以准确测定其中任何一种酶的纯活力。以前大多数纯化 α -淀粉酶的方法是将含有这两种酶的粗提取物加热到70℃,使热敏感性的 β -淀粉酶先失活^[1]。如想除去 α -淀粉酶以得到 β -淀粉酶就将粗提物在pH3.6和低温条件下保持几小时, α -淀粉酶因酸敏感而先失活^[2]。

这些选择性失活的技术不能完全令人满意。有证据证明在大量 α -淀粉酶存在时,低pH处理对它无效^[3]。此外,这种强烈的处理方法对淀粉酶的性质影响还没有进一步研究。近几年来,以对硝基苯酚麦芽七糖(PNPG7)和对硝基苯酚麦芽五糖(PNPG5)分别作为 α -淀粉酶、 β -淀粉酶的专一底物,可以测定这两种酶的单纯活力^[4-6]。但这些合成底物非常昂贵(PNPG5 5mg 19.20\$, PNPG7 5mg 24.70\$),作者没有采用。另外,也有报道用 β -限制糊精作为 α -淀粉酶的专一底物^[7]。最初也曾试验用这种方法来测定 α -淀粉酶的活力,但因高纯度的 β -限制糊精的制备非常困难,仍未能分别测定出这两种酶的单纯活力。因此需要一种更为先进的技术,从含有 α -淀粉酶和 β -淀粉酶的粗提取物中分离出具有活力的 β -淀粉酶。有文献报道可以用疏水色谱分离 α -淀粉酶和 β -淀粉酶^[6],实践证明疏水色谱只是把这两种酶与其它亲水性蛋白质分开,并没有把这两种酶分开。又有文献报道 α -淀粉酶的相对分子质量为50 000^[8,9], β -淀粉酶的相对分子质量为197 000^[10],所以可以按相对分子质量的大小分离这两种酶^[11]。

作者应用疏水色谱从麦芽中分离出具有活力的 α -淀粉酶和 β -淀粉酶,用超滤浓缩洗脱液,再用交联丙烯基葡聚糖 Sephacryl S-200,按分子量大小将 α -淀粉酶和 β -淀粉酶分开。采

用高效液相色谱(HPLC)分析酶水解蜡状玉米淀粉的产物,从而鉴定所得 β -淀粉酶样品的纯度。文中还研究了 β -淀粉酶的最适反应温度。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

大麦麦芽 无锡东亭麦芽厂产品; 维生素 B₁₂标准样 上海生化试剂公司产品; phenyl sepharose CL-4B 瑞典Phamacia 产品; Sephacryl S-200 瑞典Phamacia 产品; 蜡状玉米淀粉 本校粮油系提供; 可溶性淀粉 浙江菱湖淀粉厂产品

1.2 方法

1.2.1 β -淀粉酶的提纯 称取麦芽粉500 g,用10倍体积的0.1 mol/L NaAC 缓冲液在0℃搅拌提取6 h,在0℃冷冻离心15 min(转速为6000 r/min),将上清液保持在0℃冰浴中,在搅拌情况下缓缓加入(NH₄)₂SO₄使其饱和度达到100%。冷冻离心,倾出离心杯中的上清液,加少量的水使沉淀溶解,然后装入透析袋并置于20 mmol/L 的 NaAC 缓冲液(pH5)中,在0℃透析过夜,然后冷冻离心,上清液经冷冻干燥制得酶粉。称取1 g 酶粉经溶解后上疏水色谱柱,经梯度(0.6~0 mol/L (NH₄)₂SO₄)洗脱后,回收含 β -淀粉酶活力的洗脱液,再经过超滤处理,所得浓缩液,全部上 Sephacryl S-200柱。

1.2.2 β -淀粉酶的鉴定

1) 称取1 g 蜡状玉米淀粉,加少量0.02 mol/L, pH5.0的 NaAC 缓冲液,煮沸,冷却后用同一缓冲液定容到100 ml。在试管中加入上述淀粉溶液2 ml,再加入相应于洗脱图谱上各出峰位置(见图1和图2)的洗脱液1 ml,于50℃水浴中反应,每隔5 min 取1滴反应液,在白瓷板上用碘试剂检验淀粉的水解情况,根据碘反应的颜色变化来定性判断 α -淀粉酶和 β -淀粉酶被洗脱出来的部位。

2) 以 HPLC 测定蜡状玉米淀粉的水解产物。所用仪器: Waters 209 系列,配有 R401 示差折光器和 M 740 数据处理器。填料: LiChrosorb NH₂; 填料粒度: 5 μ m。流动相: 乙晴/水 = 3/1(体积分数); 流速: 1 ml/min; 温度: 25℃。

用0.02 mol/L, pH5.0的 NaAC 缓冲液配制1.0%蜡状玉米淀粉溶液。取上述溶液48 ml,加入含 β -淀粉酶活力的洗脱液2 ml(对照用2 ml 缓冲液),在60℃反应2 h,加热使酶失活,加150 ml 无水乙醇,使乙醇体积分数达到75%,快速搅动并保温一段时间,过滤,用75%的乙醇洗涤滤纸,合并滤液,用真空旋转蒸发仪除去乙醇,加水溶解浓缩物,并定容到50 ml,微孔膜过滤,取滤液作 HPLC。

1.2.3 疏水色谱材料 Phenyl Sepharose CL-4B 的再生^[12] 室温下依次用5%的 SDS 溶液、水、乙醇、丁醇、乙醇和水轻轻搅拌洗涤 phenyl sepharose CL-4B,然后加0.02%的 NaN₃ 在0℃保存。

1.2.4 β -淀粉酶的最适温度的测定 试剂: 0.02 mol/L NaAC 缓冲液, pH 为5.0; 1.0%的淀粉溶液: 称取1 g 可溶性淀粉,加少量上述缓冲液润湿,煮沸,冷却后加缓冲液定容到100 ml。

测定: 1) 在不同温度(30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃)的酶反应器中分别加入淀粉溶液15.6 ml 和从 Sephacryl S-200分离出的 β -淀粉酶0.4 ml,立刻计时; 2) 分别于5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50和60 min 从各反应器中迅速吸取1 ml 反应液,放入装有1.5 ml 3,5-二硝基水

杨酸(DNS)溶液的比色管中,沸水浴显色5 min,迅速冷却,定容到25 ml,用722型分光光度计测定540 nm 波长下的消光值。

以消光值为纵坐标,反应时间为横坐标,作出消光值-时间曲线,根据曲线最初的直线部分的斜率计算不同温度的 β -淀粉酶活力。每分钟增加消光值1被定义为一个酶活力单位。

以酶的活力作为纵坐标,反应温度作为横坐标作出酶活力-温度关系曲线,从曲线确定 β -淀粉酶的最适反应温度。

2 结果与讨论

2.1 疏水色谱纯化 β -淀粉酶

根据 β -淀粉酶和 α -淀粉酶不同的作用方式来判定图1各洗脱峰中含有的酶品种。 β -淀粉酶是端解酶,它作用于蜡状玉米淀粉时,从淀粉的非还原性末端切下麦芽糖单位,使体系中还原糖含量迅速增加,但粘度下降很慢,反应最后产生麦芽糖和 β -限制糊精, β -限制糊精与碘反应显红色^[13]。而 α -淀粉酶为内切酶,它作用于蜡状玉米淀粉,任意切割 α -1,4糖苷键,使体系粘度下降很快,与碘反应的颜色由兰色很快变为黄色或无色,根据这两种酶作用于淀粉时的不同方式可以定性地判断出 α -淀粉酶和 β -淀粉酶的出峰位置。用此方法判断图1中 A, B, C 三个峰位置的洗脱液作用于蜡状玉米淀粉溶液,溶液与碘反应都显蓝色。用3,5-二硝基水杨酸法测得该反应液中不含还原糖,说明这三个峰位置的洗脱液不含 α -淀粉酶和 β -淀粉酶。D 和 E 两峰位置的洗脱液作用于蜡状玉米淀粉溶液后,溶液与碘反应迅速变为黄色,说明在这两个峰中包含 α -淀粉酶。再用3,5-二硝基水杨酸法测得该反应液中含有大量的还原糖,说明在这两个峰中还可能包含 β -淀粉酶。以上结果说明疏水色谱只能把 α -淀粉酶和 β -淀粉酶与其它疏水性弱的蛋白质分开,而不能把这两种酶完全分开。

2.2 凝胶过滤色谱纯化 β -淀粉酶

将疏水色谱的梯度洗脱液用超滤方法浓缩后,浓缩液用凝胶过滤色谱(Sephacrayl s-200)柱按分子量大小分离 α -淀粉酶和 β -淀粉酶,结果见图2中的 a 图。

图2中的 b 图是5种标准蛋白质在 Sepharyl S-200柱上的洗脱曲线。a 图中的第一个峰洗脱体积为120ml,与b图洗脱曲线比较,此峰包含的组分的相对分子质量应略高于158 000,这与文献报道的 β -淀粉酶的相对分子质量为197 000相近,因此可初步断定在此洗脱峰中包含着 β -淀粉酶。a 图中的第二个峰出峰位置为180 ml 左右,与 b 图洗脱曲线比较,此峰含有的组分的相对分子质量应略大于45 000,这与文献中报道的 α -淀粉酶相对分子质量为50 000相近,因此可以断定在此洗脱峰中含有 α -淀粉酶。与 b 图比较可知,a 图最后一个峰中含有的组分的相对分子质量小于12 500,可以断定此组分与 α -淀粉酶和 β -淀粉酶无关。

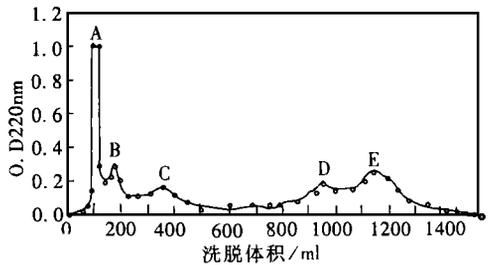
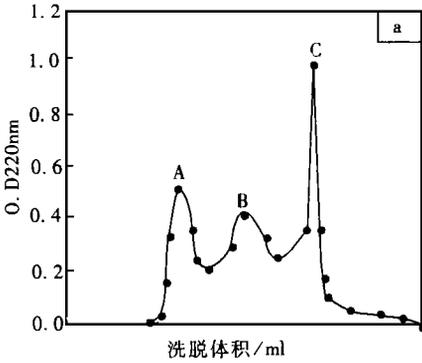


图1 粗酶的疏水色谱洗脱曲线

柱: 2.6×20 cm; 流速: $12.2 \text{ ml/cm}^2 \cdot \text{h}$;

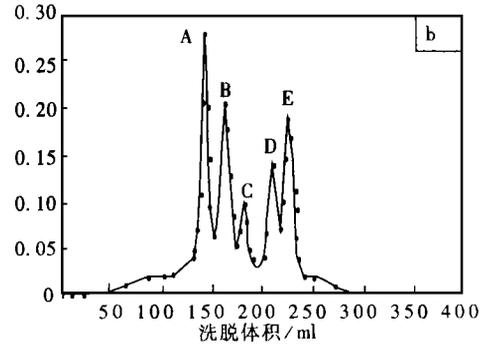
洗脱剂: 0.02 mol/L NaAC 缓冲液(pH5.0), 含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 线性梯度 $(0.6 \sim 0 \text{ mol/L})$

为了进一步确定第一个洗脱峰的酶液为 β -淀粉酶, 再利用 HPLC 分析该酶液作用于蜡状玉米溶液的产物。图3是酶水解产物的 HPLC 图谱, 由图3知水解产物中只有麦芽糖, 说明此酶是 β -淀粉酶。



a 酶混合物洗脱图谱

- A- β -淀粉酶,
B- α -淀粉酶,
C- 其他蛋白质



b 标准蛋白质洗脱图谱

- A- aldolase, MW: 158000; B- albumin, MW: 68000 (bovine serum);
C- albumin, MW: 45000 (hen egg);
D- chymotrypsinogen A, MW: 25000; E- cytochrom C, MW: 12 500

图2 混合酶液和标准蛋白质的凝胶过滤洗脱曲线

凝胶: Sephacryl S-200; 柱: 1.6×150 cm; 流速: $10 \text{ ml/cm}^2\text{h}$; 洗脱剂: 0.02 mol/L NaAc 缓冲液 (pH5.0)

2.3 β -淀粉酶的最适反应温度

由图4可知, 用本方法分离所得的 β -淀粉酶以纯淀粉溶液为底物时的最适反应温度为 $40 \sim 60$, 这与文献中的报道一致^[13]。

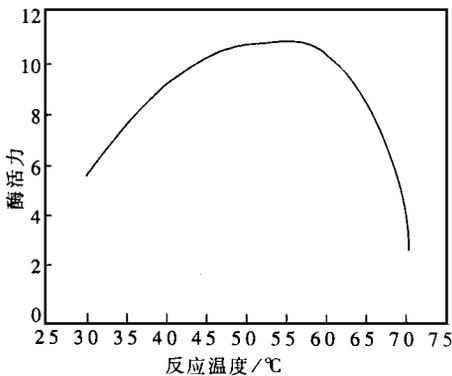


图4 β -淀粉酶的最适反应温度

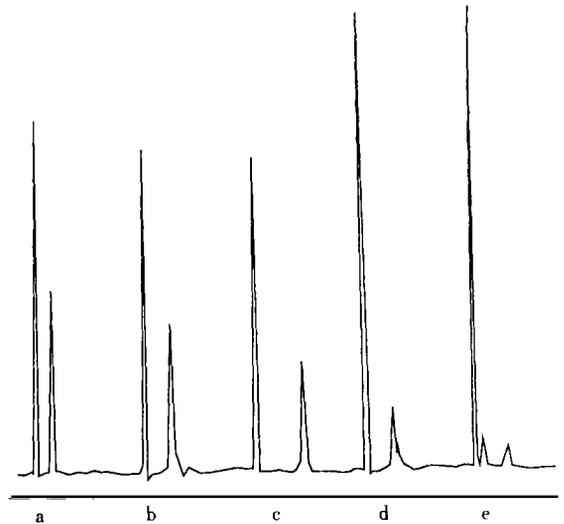


图3 样品的 HPLC 图谱

- a- 葡萄糖标样; b- 麦芽糖标样; c- 麦芽三糖标样;
d- β -淀粉酶作用于蜡状玉米淀粉的产物; e- 对照样

3 结 论

由上述实验结果可以得出结论..

- 1) β -淀粉酶和 α -淀粉酶可以用疏水色谱 (Phenyl Sepharose CL-4B) 和交联丙烯基葡

聚糖凝胶过滤色谱(Sephacryl S-200)进行分离,解决了分别测定这两种酶活力的难题。

- 2) α -淀粉酶的相对分子质量为50 000左右, β -淀粉酶的相对分子质量为197 000左右。
- 3) β -淀粉酶在淀粉溶液中的最适反应温度为40~60。

参 考 文 献

- 1 Schwitter S, Balls A K. J Biol Chem, 1949, 179: 1063
- 2 Meyer K H, Fischer E H, Piguet A. Helv chim Acta, 1951, 34: 316
- 3 Greenwood C T, Macgregor A W. J Inst Brew, 1965, 71: 405
- 4 Mathewson P R, Seabourn B W. J Agric Food Chem, 1983, 31: 1322
- 5 McCleary B V, Sheehan H. J Cereal Sci, 1987, 6: 237
- 6 McCleary B V, Rachel C. J Cereal Sci, 1989, 9: 17
- 7 Briggs D E. J Inst Brew, 1961, 67: 427~431
- 8 Reeves R E. J Amer Chem Soc, 1954, 76: 4595
- 9 Bentley J. Amer Chem Soc, 1959, 81: 1952
- 10 Hashimoto S, Kanaeda I. Jpn Kokai, 1975, 75(52): 278
- 11 Laberge D E, Meredith W O S. J Inst Brew, 1968, 75: 19
- 12 Ross S, Douglas W. J Biol Chem, 1979, 254(22): 11301
- 13 纳尔蔡斯著. 啤酒厂麦芽汁制备工艺技术. 李明波译. 北京: 中国轻工业出版社, 1991. 194

Study on Purification and Property of β -Amylase from Malt

Liu Yan Wang Zhang Xu Shiyang

(The School of Food Science & Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract This paper describes a new way to separate α -amylase and β -amylase from barley-malt by using hydrophobic chromatography (phenyl sepharose CL-4B) and gel filtration chromatography (Sephacryl S-200) consecutively. The identity of β -amylase was confirmed by analyzing the enzymatic hydrolysis products of waxy corn starch with HPLC. The optimum temperature of the separated β -amylase in starch solution is also presented.

Key words β -amylase; purification; abstraction; hydrophobic chromatography; gel filtration chromatography

(责任编辑: 秦和平)