

## 固定化 $\beta$ -淀粉酶的制备及其性质

王诚一 杨丽珠 马明

(南开大学生物系, 天津)

对 $\beta$ -硫酸酯乙酰胺苯胺 (SESA) 与环氧氯丙烷交联琼脂糖反应, 制得对氨基苯磺乙基 (ABSE) 交联琼脂糖, 经重氮化后与 $\beta$ -淀粉酶偶联制成固定化酶。研究了载体的苯胺基含量、pH、巯基乙醇等因素对酶偶联反应的影响。尤其是巯基乙醇的存在, 可使固定化酶活力明显提高。固定化酶活力可达120u/ml, 活力回收为38%, 相对活力为45%。固定化 $\beta$ -淀粉酶的最适pH和最适温度与自然酶相似, 以可溶性淀粉为底物时, 固定化酶的米氏常数是自然酶 ( $K_m = 0.0057(\%)$ ) 的8倍。将固定化酶装柱, 连续水解可溶性淀粉, 在45℃下连续操作50天后, 酶活力未见下降, 在50℃下28天后, 还保留活力50%左右。

**关键词** 固定化 $\beta$ -淀粉酶; 对氨基苯磺乙基交联琼脂糖; 巯基乙醇; 稳定性

淀粉酶在淀粉工业和食品工业中具有很高应用价值。琼脂糖是制备固定化 $\beta$ -淀粉酶最常用的载体<sup>[1]</sup>。Vretblad等<sup>[2]</sup>通过4,4'-亚甲基二苯胺将 $\beta$ -淀粉酶共价连接于交联琼脂糖, 获得了操作稳定性良好的固定化酶。Caldwell等<sup>[3]</sup>以琼脂糖为载体, 通过键合的己烷或烯丙烷疏水吸附作用制成固定化 $\beta$ -淀粉酶。1970年上海生物化学研究所<sup>[4,5]</sup>首次使用双功能试剂SESA与葡聚糖凝胶进行醚化反应引入芳香氨基, 经重氮化后偶联酶得到固定化核酶 $P_1$ 。此后, 国内利用SESA与其他载体基质制备了固定化的葡萄糖淀粉酶<sup>[6]</sup>、多核苷酸磷酸化酶<sup>[7]</sup>、青霉素酰化酶<sup>[8]</sup>。本文报道用ABSE交联琼脂糖为载体制备固定化 $\beta$ -淀粉酶的方法并研究了固定化酶的性质。

### 材料和方法

#### (一) 材料

Sepharcose-4B 为 Phamacia Fine

Chemicals 产品。SESA 为天津染化厂的工业品。 $\beta$ -淀粉酶按Yasuhito Takeda<sup>[9]</sup>方法由鲜甘薯制备, 酶比活力约为700u/mg 蛋白。其他试剂为分析纯或化学纯。

#### (二) 方法

1. 蛋白质质量测定: 按Lowry法<sup>[10]</sup>, 以牛血清白蛋白为标准。

2. 酶活力测定: 参照 Bernfeld 法<sup>[11]</sup>, 以1%可溶性淀粉为底物 (pH 4.8, 16 mmol/L 乙酸缓冲液配制), 产物麦芽糖用3,5-二硝基水杨酸显色, 测定波长540nm的吸光度。酶活力单位定义: 在30℃下, 每分钟水解底物产生1微克分子麦芽糖的酶量为1单位。

3. 苯胺含量测定: 参照袁中一等<sup>[12]</sup>方法。

4. 纸层析: 新华1号滤纸, 溶剂为正丁醇: 乙酸: 水 = 40:10:50, 室温下上行展开, 显色剂为0.1mol/L硝酸银:5mol/L

本文于1987年7月20日收到。

生化专业八级毕业生朴允尚、王宇华、胡静参加部分工作。

L氨水 = 1:1(V/V)混合液。

5. 固定化 $\beta$ -淀粉酶制备<sup>[6,12]</sup>: 将Sephrose-4B 用环氧氯丙烷进行交联, 然后与 SESA 进行醚化反应生成 ABSE 交联琼脂糖, 再通过重氮化反应成为重氮衍生物, 投入预冷至4℃的等体积 $\beta$ -淀粉酶溶液中 (内含12mmol/L 巯基乙醇) 进行偶联反应, 在冰浴中搅拌半小时后置冰箱内 2 小时。抽干后用少量1mol/L氯化钠洗一次, 再用冷蒸馏水洗净未偶联的酶。抽干后浸入用饱和乙酸钠溶液配制的 $\alpha$ -萘酚悬浮液中以封闭过剩的重氨基。冰箱中过夜后洗净, 即得棕红色的固定化 $\beta$ -淀粉酶。

## 实验结果

### (一) 载体苯胺基含量与固定化酶活力关系

用上述方法制备固定化酶时, 随着 SESA 用量增加, 载体苯胺基含量也增高, 酶的偶联量也增加。但苯胺基含量过高时, 固定化酶活力和活力回收反而下降, 对 $\beta$ -淀粉酶而言, 每毫升载体苯胺基含量约24微克分子为宜 (见表1)。

表 1 载体苯胺基对固定化酶活力的影响

Table 1 Effect of amount of aromatic amine in support on the activity of immobilized enzyme

| 苯胺基量<br>Amount of<br>aromatic<br>amine<br>(mol/ml gel) | 偶联酶量<br>Coupled<br>enzyme<br>(%) | 固定化酶活力<br>Activity of<br>immobilized<br>enzyme<br>(u/ml gel) | 活力回收<br>Activity<br>recovery<br>(%) |
|--|----------------------------------|--|-------------------------------------|
| 5.5  | 25                               | 2  | 0.7                                 |
| 13.0   | 69                               | 13   | 4.7                                 |
| 24.3   | 90                               | 83   | 30                                  |
| 37.5   | 94                               | 55   | 20                                  |

加酶量为273u/ml gel

Amount of the added enzyme was 273u/ml g<sup>-1</sup>

### (二) pH对偶联酶的影响

将ABSE交联琼脂糖10ml 重氮化后分成5份, 各加入酶量相同 (约300单位) pH不同的酶液中进行偶联反应, 结果表明 (图1), 偶联时以 pH6.5 为好, 偶联量和固定化酶活力均较高。

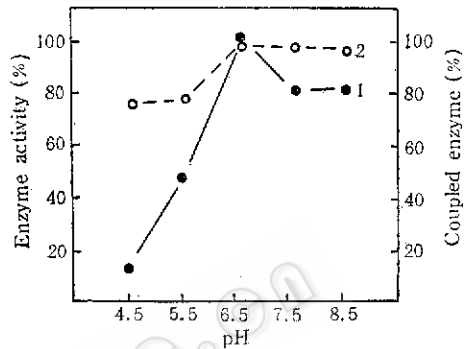


图 1 pH对 $\beta$ -淀粉酶固定化的影响

Fig.1 Effect of pH on the immobilization of  $\beta$ -amylase

1. 酶活力 Enzyme activity (%)

2. 偶联酶量 Coupled enzyme (%)

### (三) 巯基乙醇对偶联的影响

ABSE 交联琼脂糖重氮衍生物与 $\beta$ -淀粉酶进行偶联反应时, 巯基乙醇明显地影响固定化的效果。由表2可见, 无巯基乙醇时, 即使加酶量高达490u/ml 胶, 仍无助于提高固定化酶活力, 活力回收和相对活力。但当有一定量巯基乙醇存在时, 这些指标均获明显提高。当载体苯胺基含量为24.3 $\mu$ mol/l、偶联pH为6.5、每毫升载体给酶量为315单位时偶联效果最佳, 固定化酶活力达120u/ml, 活力回收为38%, 相对活力为45%。

### (四) 固定化 $\beta$ -淀粉酶的最适pH

将同一批固定化 $\beta$ -淀粉酶均分为若干份, 以不同 pH 缓冲液配制的底物溶液进行酶活力测定, 由图2可见, 固定化酶的最适pH为5, 与自然酶相似, 但在酸性pH时显示出较高活力。

### (五) 固定化 $\beta$ -淀粉酶的最适温度

表 2 巯基乙醇对β-淀粉酶固定化的影响  
Table 2 Effect of Mercaptoethanol on Immobilization of β-Amylase

| 巯基乙醇<br>Mercaptoethanol<br>(mmol/L) | 加 酶 量<br>Amount of<br>added<br>enzyme<br>(u/ml gel) | 固定化酶活力<br>Activity of<br>immobilized<br>enzyme<br>(u/ml gel) | 活力回收<br>Activity<br>recovery<br>(%) | 相对活力<br>Relative<br>activity<br>(%) |
|-------------------------------------|---|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| None                                | 150   | 8  | 5                                   | 5                                   |
|                                     | 260   | 10   | 4                                   | 5                                   |
|                                     | 490   | 9  | 2                                   | 2                                   |
| 12                                  | 210   | 65   | 31                                  | 32                                  |
|                                     | 315   | 120  | 38                                  | 45                                  |
|                                     | 330   | 108  | 33                                  | 36                                  |

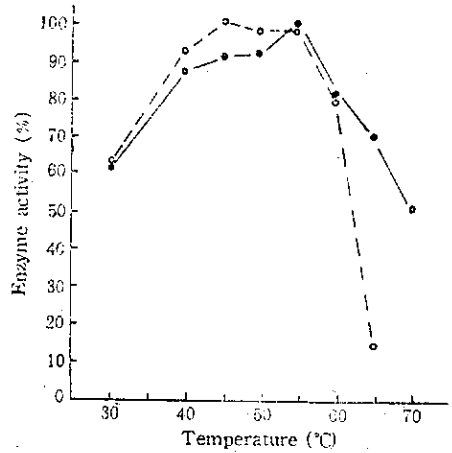


图 3 固定化β-淀粉酶 (---●) 和自然酶 (—○) 的温度活力曲线  
Fig.3 Temperature profile of immobilized (---●) and native (—○) β-amylase

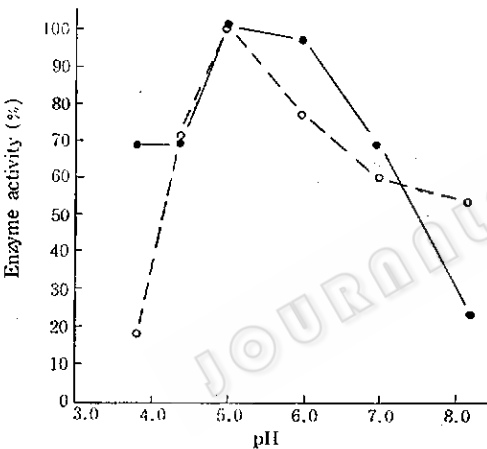


图 2 固定化β-淀粉酶 (---●) 和自然酶 (—○) 的pH活力曲线  
Fig.2 pH profile of immobilized (---●) and native (—○) β-amylase

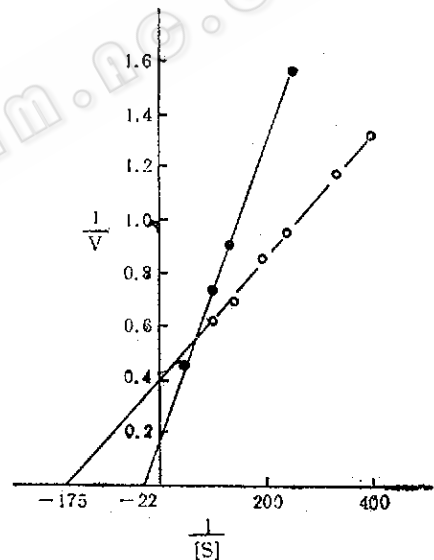


图 4 自然酶 (—○) 和固定化酶 (---●) 的Lineweaver-Burk作图  
Fig.4 Lineweaver-Burk Plots  
---● Immobilized enzyme  
—○ Native enzyme

将同一批固定化β-淀粉酶均分为若干份，分别在不同温度下测定酶活力。结果如图 3 所示，固定化酶的最适温度为 55℃，较自然酶高约 10℃，热稳定性也较自然酶好，在 70℃ 下尚保留 50% 活力。

#### (六) 固定化β-淀粉酶的米氏常数

用 Lineweaver 和 Burk 法测定了固定化β-淀粉酶对可溶性淀粉的米氏常数。结果见图 4。固定化酶的  $K_m$  值是自然酶的 8 倍。

#### (七) 固定化酶的稳定性

固定化β-淀粉酶浸泡在蒸馏水中，在 4℃ 处贮存，三天换水一次，30 天后保留原活力的 90%，50 天后尚保留 62%。

操作稳定性是评价固定化酶是否具备实用价值的重要指标。我们试验了“连续

流加”和“批式搅拌”两种操作方式。

参照Vretblad<sup>[2]</sup>操作条件, 将1ml固定化酶(65单位)装柱(内径10mm), 不断流加0.2%可溶性淀粉溶液(内含0.02%叠氮钠), 流速10ml/h, 间隔7—10天左右检查固定化酶活力下降情况。由图5可见, 固定化酶在45℃下, 连续水解淀粉50天后仍保留原活力, 在50℃下, 连续操作28天后尚保留原活力的50%。而自然酶在45℃下, 10天后活力已降低到原活力10%。说明本文报告的固定化 $\beta$ -淀粉酶的连续操作稳定性优于Vretblad的指标。

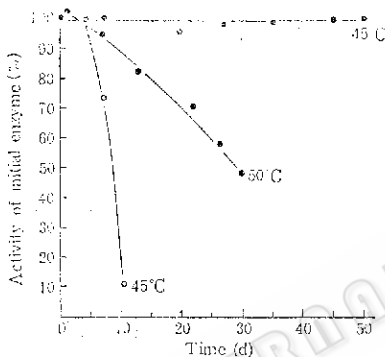


图5 固定化 $\beta$ -淀粉酶连续操作的稳定性  
Fig.5 Continuous operational stability of immobilized  $\beta$ -amylase

自然酶溶液(50 $\mu$ g/ml)系乙酸盐缓冲液配制, 于45℃保温

The native  $\beta$ -amylase solution (50 $\mu$ g/ml) was incubated in acetate buffer (pH4.8, 16m mol/L) at 45℃

—●— 固定化酶 Immobilized enzyme  
—○— 自然酶 Native enzyme

批式搅拌操作试验是在直径为33mm的玻璃容器中进行的, 每批用5%可溶性淀粉50ml, 固定化酶0.2ml(13单位), 在45℃下搅拌2h(160—240 r/min), 淀粉水解率达到极限, 经测定麦芽糖量为0.7g左右, 通过离心回收固定化酶投入下批操作。由表3可见, 经16批运转后, 固

表3 固定化 $\beta$ -淀粉酶批式操作的稳定性  
Table 3 Batch operational stability of immobilized  $\beta$ -amylase

| 批 次<br>Number of batch   | 1   | 2   | 4   | 8   | 16  |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| 每 ml 固定化酶每小时<br>产麦芽糖量 (g) *<br>Hourly maltose<br>production (g) per<br>ml immobilized<br>enzyme* | 6.0 | 5.2 | 4.9 | 4.6 | 4.8 |

\* 以初速度计。Based on initial velocities

定化酶保留原活力80%左右。批式操作稳定性似乎不如连续式操作, 其原因可能与固定化酶回收操作时遗漏丢失、搅拌时机械破损失活以及产物抑制有关。

经纸层析检定表明, 固定化酶的淀粉水解液中只含有麦芽糖。

## 讨 论

$\beta$ -淀粉酶的必需基团巯基在酶偶联反应中往往由于被氧化而导致固定化酶活力、活力回收、相对活力偏低, 稳定性亦较差。Barker等<sup>[13,14]</sup>将 $\beta$ -淀粉酶用重氮法和异硫氰酸法共价连接于丙烯聚合物时, 相对活力分别为1.5%、0.8%。用3-(对氨基苯氧)-2-羟丙醚纤维素重氮盐偶联时, 固定化酶活力回收为14%, 相对活力为16.6%, Martensson等<sup>[15]</sup>用水溶性羰二亚胺将大麦 $\beta$ -淀粉酶共价连接于聚丙烯酰胺时, 加入还原型谷胱甘肽作为巯基保护剂, 与对照组相比, 酶的偶联量和相对活力基本一样, 但操作稳定性有所提高, 他们认为这是谷胱甘肽抗氧化效应保护了酶的巯基, 因此不清楚谷胱甘肽是在偶联反应中通过自身氧化保护了酶或与酶一起连接到载体上发挥其保护作用。

## 参 考 文 献

[1] Solomon, B.: In Advances in Biochemical Engineering, Vol.10, (Ghose, T.K. et al. eds), Springer-

Verlag Berlin Heidelberg New York p.131, 1978.

- [2] Vrethblad, P. and Axen, R.: *Biotech. Bioeng.* 15; 783, 1973.
- [3] Caldwell, K.D, et al.: *Biotech. Bioeng.*, 18, 1605, 1976.
- [4] 中国科学院上海生物化学研究所, 上海啤酒厂: 微生物资料汇编, 第六集, 科学出版社, 1972.
- [5] 袁中一等: 生物化学与生物物理学报, 13 (3): 291, 1981.
- [6] 黎高翔等: 微生物学报, 13 (1): 31, 1973.
- [7] 杨开宇等: 生物化学与生物物理学报, 11(1):79, 1979.
- [8] 王庆诚: 第三次中国生物化学学术会议论文摘要汇编 (杭州1979年5月).
- [9] Yasuhito Takeda, et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 185; 469, 1969.
- [10] Lowry, O.H.: *J. Biol. Chem.*, 193; 265, 1951.
- [11] Bernfeld, P.: *Methods in Enzymol.* Vol.1, (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. eds), Academic Press, N.Y. p.149, 1955.
- [12] Porath, J. et al.: *J. Chromatog.*, 10: 167, 1971.
- [13] Barker, S.A. and Somers, P.J.: *Carbohydr. Res.*, 9:257, 1969.
- [14] Barker, S.A. et al.: *Carbohydr. Res.*, 14, 287, 1970.
- [15] Martensson, K.: *Biotech. Bioeng.*, 16; 567, 1974.

## PREPARATION AND PROPERTIES OF THE IMMOBILIZED $\beta$ -AMYLASE

Wang Chengyi Yang Lizhu Ma Ming

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin)

Aminobenzene sulphonyl ethyl (ABSE)-epichlorohydrin cross linked(EC)-agarose has been obtained by reaction of (EC)-agarose with p- $\beta$ -sulphate ethyl sulphonyl aniline (SESA). The immobilized enzyme is prepared by covalent bonding the sweet potato  $\beta$ -amylase (EC.3.2.1.2) to the diazotized ABSE-(EC)-agarose. The effect of some factors on the coupling reaction of  $\beta$ -amylase to ABSE-(EC)-agarose has also been investigated. The presence of mercaptoethanol in the medium could remarkably increase the activity of the immobilized  $\beta$ -amylase. The activity reached about 120 units per ml conjugate, activity recovery and relative activity were about 38% and 45% respectively. The optimum pH and temperature for the immobilized  $\beta$ -amylase were similar to those of the native enzyme, whereas Michaelis constant of the immobilized enzyme ( $K_m = 0.045$ ) was 8 times as high as that of the native one ( $K_m = 0.0057$ ) with soluble starch as a substrate. ABSE-(EC)-agarose  $\beta$ -amylase showed remarkable stability. The immobilized enzyme was packed in a small column, then continuous digestion of 0.2% starch was performed by passing the solution through the column at about 10ml/h. At 50°C half of the initial activity remained after 4 weeks, while at 45°C the column maintained about 100% of the initial activity after 50 days

### Key words

Immobilized  $\beta$ -amylase; aBSE-(EC)-agarose; mercaptoethanol; stability