

技术与方法

五种 α -淀粉酶测活方法的比较研究

史永昶 姜涌明

(扬州大学农学院酶工程实验室, 扬州 225009)

摘要 对常用的五种 α -淀粉酶活力测定方法进行了比较。研究了酶的稀释倍数和反应时间等因素对 α -淀粉酶活力测定的影响, 确定了 α -淀粉酶活力测定的最佳条件。通过比较研究, 认为 Yoo 改良法是 α -淀粉酶活力测定的最佳方法, 并确定了各方法不同活力单位之间的相互换算关系。

关键词 α -淀粉酶, 酶活力, 测定方法

α -淀粉酶 (1, 4- α -D-Glucan glucanohydrolase; EC 3.2.1.1) 催化淀粉分子内部的 α -1, 4 糖苷键而生成糊精和还原糖。目前, 关于 α -淀粉酶的活力测定方法很多, 活力单位的定义也各不相同, 导致各酶活力之间无法进行比较。实验室常用的 α -淀粉酶活力测定方法是通过检测还原糖数量的增加、与碘液显色反应的下降或水解色原底物释放的发色基团所引起的光密度变化来进行的^[1]。另外还有通过测定淀粉粘度的降低、旋光度的变化等来反映 α -淀粉酶的活力。最近建立了一种利用高效液相色谱的快速测定方法^[2]。利用色原底物的测定方法目前主要应用于临床测定^[3,4]。本文对常用的利用还原糖数量的增加和与碘色反应下降为原理的五种测定方法进行了比较, 确定了 α -淀粉酶活力测定的最佳条件, 并得出各活力单位之间的简单换算关系, 以能相互进行比较。

1 材料和方法

1.1 试剂

α -淀粉酶来自于解淀粉芽孢杆菌 86315, 系连云港酶厂产品; 麦芽糖为日本武田化学药品株式会社产品; 可溶性淀粉为浙江菱湖化工试剂厂产品; 3, 5-二硝基水杨酸溶液按文献[5]配制; 其它所用试剂均为分析纯及生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质浓度测定: 采用 Folin-酚法^[6], 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.2.2 Bernfeld 法^[7,8]: 反应体系为 0.5ml 1% 淀粉+0.5ml α -淀粉酶, 在 pH6.9、20℃ 下反应 3min 后, 加 1ml 3, 5-二硝基水杨酸测定产生的麦芽糖, 1 个酶活力单位定义为在 3min 内从淀粉中释放 1mg 麦芽糖的酶量。

1.2.3 临床检验法^[5]: 反应体系为 1ml 0.25% 淀粉+0.1ml α -淀粉酶, 在 pH7.0、37℃ 下反应 15min, 测定体系中的麦芽糖, 以每 min 水解淀粉产生 1mg 麦芽糖的酶量为一个酶活力单位。

1.2.4 部颁标准法: 测定体系按文献[9]进行, 观察达终点色所需时间, 以 1h 液化 1g 可溶性淀粉为 1 个酶活力单位。

1.2.5 Fuwa 改良法^[10,11]: 反应体系为 2ml 0.5% 淀粉+1ml 酶, 在 pH7.0、37℃ 下反应 10min, 取 0.2ml 反应液+5ml 0.167mmol/L I_2 -KI 溶液显色, 以 700nm 下光密度下降 10% 的酶量为 1 个活力单位。

1.2.6 Yoo 改良法^[12]: 反应体系为 5ml 0.5% 淀粉+0.5ml 酶, 在 pH6.0、40℃ 下反应 5min 后, 加 0.1mol/L H_2SO_4 5ml 终止反应, 取 0.5ml 反应液+5ml 0.4mmol/L I_2 -KI 溶液

显色, 620nm 下测光密度。1 个活力单位定义为 5min 内水解 1mg 淀粉的酶量。

2 结果

2.1 稀释倍数对酶活力测定方法的影响

测定了各种稀释倍数对五种 α -淀粉酶活力测定的影响, 将各稀释倍数换算成酶浓度 (α -淀粉酶经 PAGE 鉴定为一条带)。实验结果表明, 五种活力测定方法所要求的酶稀释倍数是各不相同的。部颁标准法要求酶浓度在 0.6~1.2mg/ml 之间, 稀释倍数最小; Fuwa 改良法要求酶浓度在 1~2.5 μ g/ml 之间, 稀释倍数最大; Bernfeld 法和临床检验法要求 α -淀粉酶浓度在 5~10 μ g/ml 之间, 而 Yoo 改良法则要求 5~20 μ g/ml 之间 (图 1)。各活力测定方法只有在上述酶浓度范围内, 才与酶活力呈线性关系。从以上结果可看出, 五种测定方法中, Yoo 改良法是线性范围最宽的测定方法。

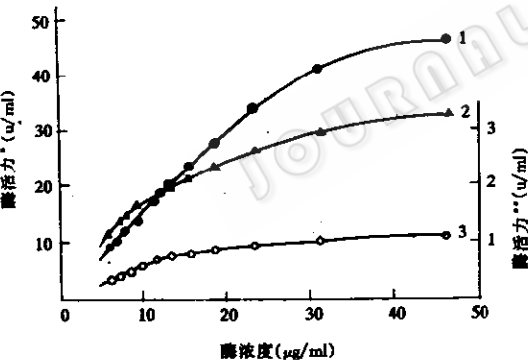


图 1 酶浓度对 α -淀粉酶活力测定的影响

1.Yoo 改良法, 2.Bernfeld 法, 3.临床法

* 方法 1, ** 方法 2,3

2.2 反应时间对酶活力测定的影响

在不同反应时间内测定了 α -淀粉酶的活力, 结果见图 2。Yoo 改良法测定 α -淀粉酶活力时, 酶活力在 10min 内随时间增加而成直线增大, 超过 10min, 酶活力的增大速度逐渐减慢; 而 Bernfeld 法测定时, 只在 3min 内酶活力的增加与时间呈直线关系, 超过 3min 增加速度减慢。因此, 用碘色法测定 α -淀粉酶活力

时, 应把时间控制在 10min 内; 用还原糖增加法测定时, 反应时间不要超过 3min。

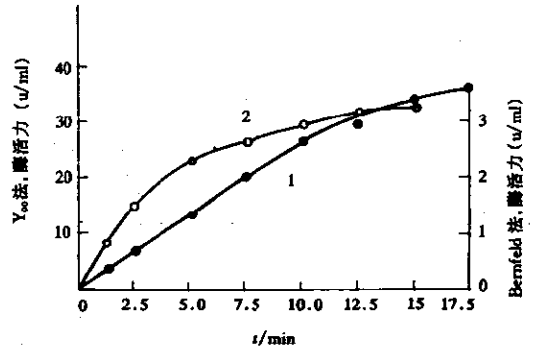


图 2 反应时间对酶活力测定的影响

1.Yoo 改良法, 酶浓度为 9.2 μ g/ml

2.Bernfeld 法, 酶浓度为 8.3 μ g/ml

2.3 各酶活力单位的相互换算关系

取 4 份不同的 α -淀粉酶样品, 分别用五种方法测定 α -淀粉酶的活力 (都在最佳稀释倍数内测定), 各测定三次, 取平均值, 结果见表 1。从表中可看出, 一个测定方法所测得的活力单位数乘以其换算系数, 相当于 Yoo 改良法所测得的活力单位数。

表 1 五种 α -淀粉酶活力单位之间的相互换算关系

测定方法	酶活力(u/ml)				换算系数
	1	2	3	4	
Yoo 改良法	1420	1680	1864	2400	1
部颁标准法	16.0	19.8	21.3	26.7	85~90
Fuwa 改良法	2370	2670	2930	3690	0.6~0.65
Bernfeld 法	185	224	235	300	7.5~8.0
临床检验法	54.0	620	67.5	85.7	26~28

2.4 五种测定方法的重复实验

对每一测定方法分别进行 10 次重复测定, 计算每一方法的测定误差, 结果如下: 部颁标准法由于用肉眼观察终点, 测定误差最大, 幅度为 $100 \pm 4\%$ 。其它四个方法误差都较小, Yoo 改良法为 $100 \pm 0.7\%$; Fuwa 改良法为 $100 \pm 0.8\%$; Bernfeld 法和临床检验法都为 $100 \pm 0.6\%$ 。

3 讨论

目前, α -淀粉酶活力测定最常用的方法是通过测定还原糖的增加或与碘液显色的下降来进行的。上述五种测定方法中, 部颁标准法由于靠肉眼观察终点, 测定误差很大; Bernfeld 法和临床检验法虽然测定结果比较可靠, 但要用 3, 5-二硝基水杨酸测定产生的麦芽糖, 步骤较繁, 且这两个方法只在较窄的酶浓度范围内, 酶活力才与酶浓度成线性关系; Fuwa 改良法和 Yoo 改良法都为碘色法, 测定较为简单, 但 Fuwa 法要求酶的稀释度很高, 且只在较窄的酶浓度范围内, 酶活力与酶浓度成线性关系, 而 Yoo 改良法在较宽的酶浓度范围内, 测得的酶活力都与酶浓度成正比, 且测定结果误差也很小。因此, 通过比较五种测定方法, Yoo 改良法不失为实验室测定 α -淀粉酶的最佳方法。

由于一般 α -淀粉酶的最适 pH 为 6.0~7.0, 最适温度, 微生物来源的为 60℃ 左右, 而动植物来源的为 37~40℃, 综合以上因素, 我们认为, α -淀粉酶活力测定的最佳条件应为:

温度 37~40℃, pH 6.0~7.0, 酶浓度为 10 μ g/ml 左右, 底物浓度为 0.25%~0.5%, 反应时间碘色法控制在 10min 内, 还原糖测定法应在 3min 内。

参考文献

- [1] Yoo Y J, Hong J, Hatch R T. *Biotechnol Bioengineer*, 1987, 30: 147~151.
- [2] Omichi K, Ikenaka T. *J Biochem*, 1983, 93: 1055~1060.
- [3] Satomura S, Sakata Y, Omichi k *et al*. *Clinica Chimica Acta*, 1988, 174: 315~324.
- [4] Dupuy G, Hilaire G, Aubry C. *Clin chem*, 1987, 33: 524~528.
- [5] 黄履成. *中华医学检验杂志*, 1985, 8(3): 166~167.
- [6] 朱俭, 曹凯鸣, 周润琦等. *生物化学实验*, 上海: 上海科技出版社, 1981, 64~66.
- [7] Bernfeld P. *Meth Enzymol*, Now York: Academic Press. Inc. 1955, 1: 149.
- [8] Simoes-Mendes B. *Can J Biochem*, 1984, 30: 1163~1169.
- [9] 胡学智, 朱庆裴. 见: *酶制剂工业* (张树政主编). 北京: 科学出版社, 1984, 484.
- [10] Fuwa H. *J Biochem*, 1954, 41: 583~603.
- [11] Onishi H, Hidaka O. *Can J Microbiol*, 1978, 24: 1017~1023.
- [12] 史永超, 姜涌明, 樊巍等. *微生物学通报*, 1995, 22(1): 23~24.

COMPARISON OF FIVE METHODS FOR THE ASSAYING OF α -AMYLASE ACTIVITY

Shi Yongchang Jiang Yongming

(Laboratory of Enzyme Engineering, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract Five α -amylase assay methods commonly used were compared, and the effect of the dilution and the incubation time on the measurement of α -amylase activity were investigated. The results showed a modification method of Yoo was the best method for assaying α -amylase. The experiments ascertained the best conditions for assaying α -amylase and indicated the conversion coefficient of five kinds of enzyme activity unit.

Key words α -Amylase, Enzyme activity, Assay method