

芽孢杆菌 WS-3L 淀粉酶的纯化和特性的研究

龙 燕^{1,2} 吴 襟^{1*} 刘 毅² 张树政¹

(1. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

(2. 湖南农业大学 长沙 410128)

摘 要: 芽孢杆菌 WS-3L 产生的 α -淀粉酶 AmyL 经过多步纯化, 酶的回收率为 15.5%, 比活提高了 345 倍。该淀粉酶能够有效水解淀粉生成麦芽寡糖。酶的最适反应温度为 45℃, 最适反应 pH 为 6.5, 在 pH 7.0~8.0, 40℃以下酶活较稳定; 离子 Cu^{2+} 、 NH_4^+ 、 Ag^+ 、 Hg^+ 和 EDTA、SDS 对酶活力有显著抑制作用, 而其他一些常见金属离子如 Na^+ 、 K^+ 则对酶活影响不大。AmyL 对可溶性淀粉、直链淀粉、支链淀粉的 K_m 值和 V_{\max} 分别为 2.81 mg/mL、8.37 mg/mL、1.80 mg/mL 和 11.67 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 、10.00 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 、13.33 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$, 表明支链淀粉是该酶的理想水解底物。玉米淀粉对 AmyL 有很高的吸附率, 预示这可以作为酶快速固定的一个简易方法应用到实际生产中。

关键词: 芽孢杆菌, 淀粉酶, 水解, 性质

Purification and Properties of the α -amylase from a *Bacillus* sp. WS-3L

LONG Yan^{1,2} WU Jin^{1*} LIU Yi² ZHANG Shu-Zheng¹

(1. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

(2. Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract: An extracellular α -amylase (AmyL) from a *Bacillus* sp WS-3L was purified 345 fold and had a recovery of 15.5%. The amylase was capable of hydrolyzing starch to yield a series of malto-oligosaccharides. It was optimally active at 45 °C and pH values around 6.5 and showed stability at the temperature below 40 °C and pH 7.0–8.0. The amylase was inhibited by Cu^{2+} 、 NH_4^+ 、 Ag^+ 、 Hg^+ and EDTA、SDS. Michaelis constants (K_m) of the AmyL for were 2.81 mg/mL、8.37 mg/mL、1.80 mg/mL, and maximum velocity (V_{\max}) of the enzyme for soluble starch, amylose, amylopectin were 11.67 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 、10.00 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 、13.33 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ respectively. It was suggested that amylopectin is the better hydrolysis substrate for the enzyme. It was observed that the adsorption and digestion of the enzyme on different raw starches was remarkably different. Raw corn starch exhibited high adsorption of the enzyme. It was suggested that the highly stable enzyme was able to be obtained and applied very fast by corn starch chromatography.

Keywords: *Bacillus*, Amylase, Hydrolysis, Properties

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX2-SW-323)

* 通讯作者: Tel: 010-64807377; E-mail: wujinw5@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-04-20; 接受日期: 2007-05-14

淀粉酶(Amylase)是能够分解淀粉糖苷键的一类酶,在生物体的糖类代谢过程中起着非常重要的作用,主要包括 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、糖化酶和异淀粉酶等。 α -淀粉酶(1, 4- α -D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1)能水解淀粉大分子内部的 α -1, 4-葡萄糖苷键,依照水解程度的不同,产物常有糊精、麦芽寡糖、麦芽糖和葡萄糖等^[1]。 α -淀粉酶在自然界广泛存在,微生物、植物、动物中都有;常用产酶菌主要有芽孢杆菌、黑曲霉、米曲霉和根霉等。 α -淀粉酶是目前世界上最早生产、产量最大的工业酶制剂品种之一,在食品、纺织、医药和饲料等工业中都有非常重要的应用。

产淀粉酶的芽孢杆菌 WS-3L 来源于土壤中,能够利用淀粉快速生长。本文对该酶的纯化和性质作了详细研究,并通过各种来源的淀粉对酶吸附效果的比较,进行一些酶快速固定和实际应用的探讨和研究,希望其能更好地应用于生产实践中。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养

本实验室保存的产 α -淀粉酶的高活力芽孢杆菌菌株 WS-3L,接入摇瓶发酵,培养基组成为:1%可溶淀粉,1.5%蛋白胨,0.5%牛肉膏,0.5% NaCl, pH 7.0, 250 mL 摇瓶装 50 mL 上述培养基,2%接种量,于 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min 摇床振荡培养 48h,离心收集发酵上清液作为粗酶液。

1.2 酶的快速纯化

将粗酶液加入硫酸铵至 20%饱和度,4 $^{\circ}$ C 静置 4 h, 11000 r/min 离心去沉淀。向上清液中加入 5% (W/V)玉米淀粉充分搅匀后进行吸附,4 $^{\circ}$ C 静置 1h, 4000 r/min 离心并保留沉淀。将沉淀用含 1%硫酸铵和 5 mmol/L CaCl₂ 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH7.0)洗涤,40 $^{\circ}$ C 恒温水浴中保温 1h,离心取上清(洗脱液 1)。然后将沉淀用含 1%麦芽糊精和 1%硫酸铵的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH7.0)进行再次洗涤,在 4 $^{\circ}$ C

静置 20min 后离心取上清(洗脱液 2)。合并两次洗脱液,在 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液中(pH 7.0)进行充分透析并浓缩。将浓缩酶液再上 CM-Sepharose C-50 离子层析柱(1.5 cm \times 10 cm)进行洗脱,洗脱梯度:0-1 mol/L NaCl,洗脱速度 1.0 mL/min;收集合并酶活峰后,将所得酶液进行透析并浓缩后上 Sephadex G-100 层析柱(2.6 cm \times 100 cm),洗脱速度 0.5 mL/min,收集合并酶活峰后进行浓缩。

1.3 主要试剂

GF₂₅₄ 硅胶板(青岛海洋化工厂),麦芽寡糖购自 Sigma 公司,其它试剂均为分析纯。

1.4 酶活力测定

用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)配制浓度为 0.55%(W/V)的淀粉溶液,取 0.9 mL 40 $^{\circ}$ C 预热 5 min,加入 0.1 mL 稀释酶液后 40 $^{\circ}$ C 保温反应 10 min,用 DNS 法测定产生的还原糖量^[2]。一个酶活力单位定义为在上述反应条件下每分钟水解淀粉产生等价于 1 μ mol 还原糖所需的酶量。

1.5 蛋白质测定

按 Bradford 方法^[3]和测定 A₂₈₀,以牛血清白蛋白绘制标准曲线。

1.6 酶水解产物的硅胶板薄层色谱分析法

按 Powning 的方法^[4],展开剂为:正丁醇:乙酸:水 = 2:1:1,上行展开 3 次。

2 结果

2.1 酶的纯化

芽孢杆菌 WS-3L 的发酵上清液经过四步纯化,最终获得电泳纯的 α -淀粉酶样品 AmyL;如表 1 所示,AmyL 酶活总回收率为 15.5%,比活提高了 345 倍。

2.2 酶的基本性质

2.2.1 pH 和温度对酶活力和稳定性的影响: pH 7.0 时,不同温度条件下测定 AmyL 的活力,获得温度-活力曲线;酶的最适反应温度为 45 $^{\circ}$ C。45 $^{\circ}$ C 时,在不同 pH 条件下测定 AmyL 的酶活力,获得 pH-活力

表 1 芽孢杆菌 WS-3L α -淀粉酶的纯化
Table 1 Purification of α -amylase of *Bacillus* sp. WS-3L

Purification step	Total activity (U)	Specific activity (U/g)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	6580	42.2	100	1
Supernatant of 20%(NH ₄) ₂ SO ₄	5379	235.6	81.7	5.5
Eluant of enzyme on starch	4446	2280	67.6	54
CM-Sepharose C-50	2126	7180	47.8	170
Sephadex G-100	1018	14560	15.5	345

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

曲线; 酶的最适反应 pH 为 6.5。将酶液在不同温度中分别保温 30 min 和 60 min 后, 各自测定残余酶活力, 获得温度-稳定性曲线; 结果表明, 酶活力在不超过 40 时较为稳定。将酶液在不同 pH 条件下分别在 40 保温 60 min, 各自测定残余酶活力, 以未处理的原酶液活力为 100%, 获得 pH-稳定性曲线; 结果显示, AmyL 能在 pH 7~8 的范围内保持稳定。

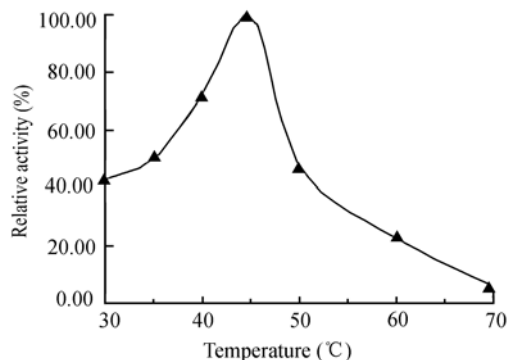


图 1 温度-活力曲线图

Fig.1 Effects of temperature on activities of AmyL

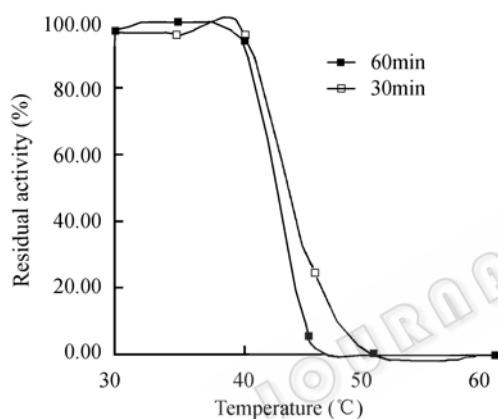


图 2 温度-稳定性曲线图

Fig.2 Effects of temperature on stabilities of AmyL

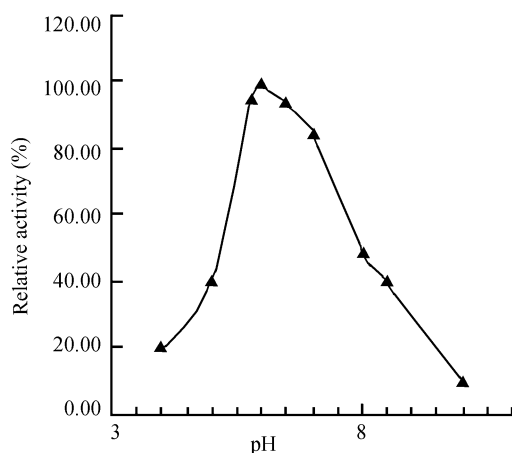


图 3 pH-活力曲线图

Fig.3 Effects of pH on activities of AmyL

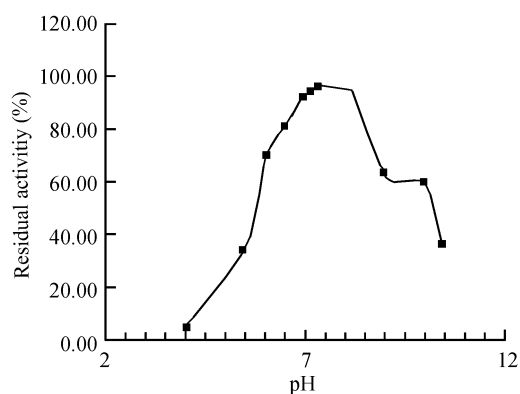


图 4 pH-稳定性曲线图

Fig.4 Effects of pH on stabilities of AmyL

2.2.2 化学试剂对酶活力的影响: 10 mmol/L 的各种金属盐离子、EDTA、SDS 溶液分别与 AmyL 酶液等体积混合, 30 保温 60 min 后测定酶液残余活力。从表 1 结果可以看出, 离子 Cu^{2+} 、 NH_4^+ 、 Ag^+ 、 Hg^+ 和 EDTA、SDS 对酶活有显著抑制作用, 而其他一些常见离子如 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 则对酶活影响不大。

表 2 化学试剂对酶活力的影响			
Table 2 Effects of chemical reagents on amylase activity			
Reagents	Relative activity (%)	Reagents	Relative activity (%)
None	100	NH_4^+	10.7
Na^+	98.7	Ag^+	33.6
Mg^{2+}	100.9	Hg^+	0
Ca^{2+}	86.8	Cu^{2+}	23.4
K^+	95.2	SDS	64.5
Zn^{2+}	113.2	EDTA	5.4

2.3 酶的水解性质

向 0.5%(W/V)可溶性淀粉中加入适量酶液, 40 保温反应, 在不同时间后分别取样, 分析测定其水解产物的变化组成。

由图 5 可以看出, 起初淀粉的水解产物是一系列分子量大小各异的麦芽寡糖, 随着反应的进行, 大分子寡糖逐渐减少, 小分子寡糖逐渐增加, 表明 AmyL 对淀粉的水解是一个渐变的内切过程; 工业上常根据淀粉酶水解终产物的不同, 将 -淀粉酶分为糖化型和液化型两种^[5], 糖化型的水解主产物是葡萄糖、麦芽糖等小分子糖, 而液化型的主产物是包括麦芽糖、麦芽三糖等在内的一系列麦芽寡糖。从图 5 中可以看出, AmyL 水解淀粉的主要产物为麦芽糖、麦芽三糖和四糖, 有少量的麦芽五糖、六糖, 微量的葡萄糖和麦芽七糖、八糖等。这些都表明该酶是一个明显的液化型淀粉水解内切酶。

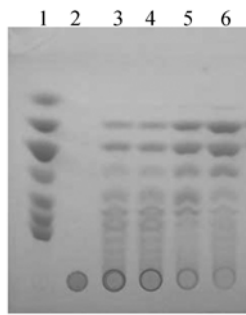


图 5 不同时间 AmyL 水解淀粉产物的薄层图谱

Fig.5 Thin Layer Chromatogram of the enzymatic hydrolysate of soluble starch

1: 标准糖 (Standard maltotriose mixture); 2: 0 min; 3: 1 min; 4: 2 min; 5: 5 min; 6: 120 min

2.4 酶的动力学常数

如图 6 所示, 按 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求得 AmyL 对可溶性淀粉、直链淀粉、支链淀粉的 K_m 值分别为 2.81、8.37 和 1.80 mg/mL, V_{max} 值分别为 11.67、10.00 和 13.33 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。比较结果, AmyL 对支链淀粉的 K_m 值最小, V_{max} 值最大, 表明酶对支链淀粉有着很好的亲和作用力, 是降解支链淀粉生产寡糖的理想选择。

2.5 不同淀粉对酶的吸附率

向五等份的 AmyL 酶液中分别加入 5% (W/V) 玉米淀粉、马铃薯淀粉、糯米淀粉、绿豆淀粉和可溶性淀粉, 充分搅匀后进行吸附, 4 静置 1h, 4000 r/min 离心取上清浸泡液。然后用适量 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 对沉淀进行搅拌再洗涤, 在 4 静置 20 min 后离心取上清洗液。各自测定其中淀粉酶活力。以加入的起始酶液活力为 100%, 计算吸附率, 结果如表 3 所示。对比发现玉米淀粉对淀粉酶的吸附率最高, 而直链淀粉含量较高的绿豆淀粉的酶吸附率最低。

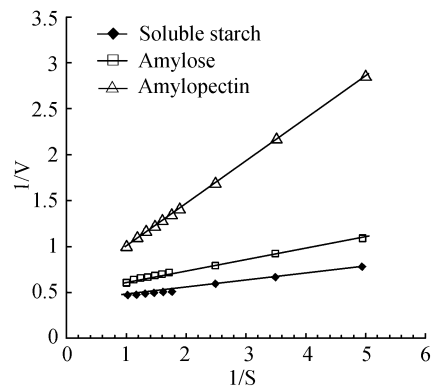


图 6 AmyL 水解不同淀粉的 Lineweaver-Burk 图

Fig.6 Lineweaver-Burk plot of the enzymatic hydrolysate reaction towards various starch with AmyL

3 讨论

酶制剂在饲料工业中的应用日益广泛, 品种主要包括淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、脂肪酶和植酸酶等。我国饲料主要以玉米-豆粕型日粮为主^[6], 因此饲料用酶也都以淀粉酶和蛋白酶为主。其中预先加入的淀粉酶可以帮助降解饲料中的玉米淀粉, 迅速降低饲料粘度, 有效促进年幼动物的消化和吸收, 明显提高饲料的转化利用率; 但目前常见的几个饲料淀粉酶品种和玉米淀粉结合力弱, 常以酶制剂的固体颗粒状形式添加, 在实际应用时不易混匀, 酶活损失大, 制备成本还高。而芽孢杆菌 WS-3L 产生的 α -淀粉酶 AmyL 能很好地吸附在玉米淀粉上, 这预示未来可以通过向发酵液中直接添加一定量玉米淀粉吸附淀粉酶 AmyL, 然后只要对这些淀粉固体颗粒进行简单过滤分离干燥后, 就可作为淀粉酶添加剂直接应用。这不仅大大降低了淀粉酶的生产成本, 也提高了其保存的稳定性和应用的灵活性。

表 3 不同淀粉对酶的吸附率

Table 3 Relative affinity of enzyme to various starch

Relative amylase activity (%)	Corn starch	Potato starch	Rice starch	Green bean starch	Soluble starch
Incubation solution	4.4	9.3	17.2	23.5	16.3
Elution solution	4.4	4.4	4.4	12.3	7.4
Starch adsorption	91.2	86.3	78.4	64.2	76.3

参 考 文 献

- [1] Nielsen JE, Borchert TV. Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **543**(2): 53-74.
- [2] 张惟杰编. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1994, pp.13-15.
- [3] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem*, 1976, **72**(5): 248-254.
- [4] Powning RF, Irzykiewicz H. Separation of chitin oligosaccharides by thin-layer chromatography. *J Chromatogr*, 1967, **29**(1): 115-119.
- [5] Yamamoto T. Handbook of amylases and related enzymes. Oxford: Pergamon Press, 1988, pp.40-45.
- [6] 卢焕玉, 李 杰, 徐逸男. 复合酶制剂的质量评定及合理选择. *饲料工业*, 2005, **26**(8): 24-26.

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>