

重组超耐热酸性 α -淀粉酶的分纯化及其性质研究

李 辉^{1,2} 郭建强³ 岳丽丽⁴ 李运敏⁴ 矫庆华^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所 北京 100080) (² 中国科学院研究生院 北京 100049)

(³ 三元基因有限公司 北京 100083)

(⁴ VA Medical Centre 111C5, Department of Medicine University of California at San Francisco 4150 Clement Street San Francisco, CA 94121, USA)

摘 要 基因工程菌所产生的重组超耐热酸性 α -淀粉酶,通过超滤浓缩、脱盐和聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳进行纯化,得到电泳纯的超耐热酸性 α -淀粉酶,纯化倍数为 11.7,活力回收率为 29.8%。用 SDS-PAGE 测得该酶的分子量为 55kD,酶的等电点 pI(室温)为 5.0,以可溶性淀粉为底物的 K_m 值为 1.12g/L,用硫酸-酚法测得其含糖量为 15.4%。该酶的最适反应温度为 95℃,最适反应 pH 值为 4.5。在 pH4.0~7.0 室温放置 48h 酶活没有变化,110℃保温 1h 残留 60% 活力。 Cr^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 抑制酶的活性, Ca^{2+} 对酶活无影响。EDTA 和 DTT 对酶的活性无影响。

关键词 超耐热酸性 α -淀粉酶 纯化 性质

中图分类号:Q554 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)04-0547-04

淀粉的工业水解常常包括以下两个步骤:液化和糖化。液化过程是在高温下进行的,由于两个过程中所使用的酶最适 pH 不同,目前淀粉加工过程需要将淀粉浆或玉米浆的 pH 值由自然的 pH 4.5 调到 pH 5.8~6.2 来进行液化,然后再将它降为 pH 4.2~4.5 进行糖化。这两步 pH 值的调整大大增加了化学试剂的消耗,调整不当会产生大量的副产物^[1]。所以如果使用相关的低 pH 耐热酶将大大改进淀粉工业的状况。

超耐热酸性 α -淀粉酶不同于中温 α -淀粉酶和普通高温 α -淀粉酶(α -amylase, EC3.2.1.1),主要特点是具有优越的耐热性能,活性完全不依赖于金属离子,能将淀粉在温度 105℃~120℃,pH4.5~5.5 条件下液化,这种特殊的性质使得该酶将在酒精发酵、抗菌素发酵、氨基酸发酵、淀粉糖的生产、有机酸发酵等以淀粉为原料的发酵工业中发挥巨大作用,在生产中降低成本、提高转化率、减少环境污染,因此具有极高的工业应用价值。国外研究者将其在原核生物大肠杆菌中和枯草芽孢杆菌中表达并进行了纯化及性质研究^[2~4]。

本实验室已构建了重组毕赤酵母(*Pichia pastoris*)Mut^s 基因工程菌(文章未发表),可以胞外分泌表达超耐热酸性 α -淀粉酶,并对它进行纯化,并对纯酶的一些理化性质、生物学性质进行了研究,为今

后的基础研究和工业应用提供有价值的参考数据。

1 材料和方法

1.1 材料样品采集

1.1.1 菌种:毕赤酵母菌转化子 GS115/pPIC9K-Amy-228 为本实验室构建(文章待发表),所整合的超耐热酸性 α -淀粉酶基因由法国巴黎第五大学托马斯教授惠赠。

1.1.2 主要试剂:等电点标准蛋白购自 Pharmacia 公司;丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺购自 Sigma 公司;其它生化试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基:基础盐培养基^[5]。

1.2 淀粉酶活力的测定

参考文献[6]测定酶的活力。

1.3 蛋白质含量测定

按 Folin-酚法^[7]测定,以酪蛋白作标准。

1.4 电泳

参考文献[8]进行 SDS-PAGE,参考文献[9]进行 PAGE。分离胶浓度分别为 15% 和 10%。SDS-PAGE 用考马斯亮蓝 R-250 摇床染色 2h;PAGE 活性染色参考文献[10]进行,但略加修改。将凝胶在 4℃ 下于 1% 可溶性淀粉溶液中浸泡,1h 后取出,90℃ 温育 15min,将胶条放入 0.01mol/L 碘液中出现淀粉酶活性区域。

基金项目 国家科技攻关计划(2001BA708B03-03)

* 通讯作者。Tel:86-10-62628482 E-mail:jqh1234@yahoo.com.cn

作者简介 李 辉(1978-)女,山西新绛人,硕士研究生,主要从事酶学研究。E-mail:holly-yee@sohu.com

收稿日期 2004-11-05,修回日期 2005-02-16

1.5 酶的分离和纯化

1.5.1 超滤浓缩发酵液:用对分子量 30kD 排阻的滤膜超滤,超滤压力为 0.5MPa^[11]。

1.5.2 聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳提纯:凝胶浓度 10%。电泳结束后,分别从凝胶两边切下一条 0.5cm 宽的胶条,活性染色,对照染色后的两边胶条上的显色带,切下相应位置的凝胶,用 5mL 蒸馏水 4℃ 浸泡过夜,将浸泡液离心取上清液透析,用聚乙二醇 10000 浓缩至所需的浓度。

1.6 酶学性质

1.6.1 表观分子量测定:用 SDS-PAGE 法测酶的亚基分子量,根据已知分子量的标准蛋白在 SDS-PAGE 中的相对迁移率 R_f ,作 R_f -LogMr 图,求得其分子量。

1.6.2 最适反应温度及热稳定性:在不同温度下按照标准方法测定酶活,以酶活最高者为 100%。将酶液在 90℃、100℃(水浴)、110℃、120℃、130℃(甘油浴)分别保温 10min、30min、1h、2h 和 3h,放置冰上迅速冷却至室温,按标准方法,测残余酶相对活力,以未保温的酶液的酶活为 100%。

1.6.3 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性:将酶液分别用 pH2.0~8.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液稀释,按标准方法测酶活力,以酶活最高者为 100%。用相同的缓冲液稀释,25℃ 保温 1h、16h、48h 后,测残

余酶活力,以未保温的酶液的酶活为 100%。

1.6.4 等电点测定:参考文献[12]进行,以 Pharmacia 公司的等电点标准蛋白为标准。

1.6.5 动力学常数测定:在不同底物(可溶性淀粉)浓度的反应体系中,95℃ 反应 5min,测定 OD_{600} 以计算酶反应的初速度,作 Lineweaver-Burk 双倒数图。

1.6.6 糖含量测定(硫酸-酚法):参考文献[13]进行,以葡萄糖为标准。

1.6.7 金属离子对酶活力影响:在反应体系中加入不同浓度金属离子,使其终浓度 2.0mmol/L,以不含金属离子的酶液为对照。

1.6.8 抑制剂对酶活力的影响:在反应体系中加入不同浓度 DTT 和 EDTA,并使其终浓度为 0.1~2.0mmol/L,以不含抑制剂的酶液为对照。

2 结果

2.1 淀粉酶的分离和纯化

表 1 为淀粉酶的分离与纯化结果。粗酶液经超滤、聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳后所得样品经 SDS-PAGE 检测只显示一条蛋白带(图 1),活性染色也显示出单一的区带,表明纯化后的淀粉酶为单一组分,已达到电泳纯。

表 1 淀粉酶的纯化总表

Table 1 A summary of amylase purification

Purification step	Total activity/U	Total protein/mg	Specific activity/(U/mg)	Purification/fold	Yield/%
Crude enzyme	8400	1110.0	7.6	1.0	100.0
Ultra filtration	7936	751.2	10.6	1.4	94.5
Preparative slab PAGE	3174	35.7	89.0	11.7	29.8

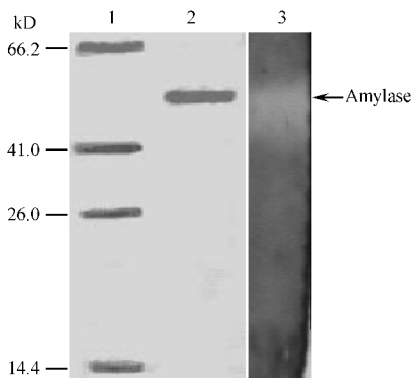


图 1 纯化后的超耐热酸性 α -淀粉酶的 SDS-PAGE 图谱及活性染色

Fig.1 SDS-PAGE pattern of purified amylase and the gel stained for amylase activity

1. Molecular weight markers; 2. Purified amylase; 3. Gel stained for amylase activity.

2.2 酶学性质

2.2.1 分子量:SDS-PAGE 法测得,超耐热酸性的 α -淀粉酶分子量为 55kD。

2.2.2 最适反应温度及热稳定性:实验结果表明,基因工程菌所产超耐热酸性 α -淀粉酶在 40~130℃ 的温度范围内都有活力,最适反应温度为 95℃。超耐热酸性 α -淀粉酶具有很好的热稳定性,酶在 100℃ 保温 2h 残留 80% 活力,110℃ 保温 1h 残留 60% 活力,120℃ 保温 1h 残留 40% 活力。

2.2.3 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性:超耐热酸性 α -淀粉酶的最适 pH 为 4.5,该酶在 pH4.0~7.0 室温条件下 48h 酶活力无变化,pH3.0 残存活力 50%,pH8.0 残存 20% 活力,说明该酶在 pH4.0~7.0 之间比较稳定。

2.2.4 等电点测定:淀粉酶的等电点 pI 为 5.0(室

温)。

2.2.5 动力学常数测定: 该酶在 95℃ 以可溶性淀粉为底物的 K_m 为 1.12g/l(图 2)。

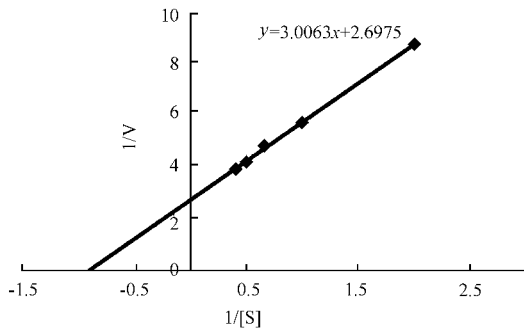


图 2 超耐热酸性 α -淀粉酶作用于可溶性淀粉的 Lineweaver-Burk 图

Fig.2 Lineweaver-Burk plot of amylase for soluble starch

2.2.6 含糖量测定: 经测定该酶的含糖量为 15.4%。

2.2.7 金属离子对淀粉酶活性的影响: 钙离子对酶活无影响,铁离子、铬离子、和铜离子强烈抑制淀粉酶的活性。

表 2 不同金属离子对酶活力的影响

Table 2 Effect of metal ions on the activity of amylase

Metal ion	Relative activity/%	Metal ion	Relative activity/%
None	100	CuSO ₄	30
CaSO ₄	100	FeSO ₄	23
MgSO ₄	80	CrCl ₃	11
MnSO ₄	93		

2.2.8 抑制剂对淀粉酶活力的影响: 所试浓度下 DTT 和 EDTA 对淀粉酶活性没有影响。

3 讨论

通过使用超滤技术,可以有效地对发酵液进行浓缩、去除杂蛋白和脱盐处理,活性回收率达到 94% 以上。曾用硫酸铵沉淀酶蛋白回收率只有 72.5%,而使用乙醇沉淀,酶失活现象比较严重,活性回收率仅为 31.2%。

酵母表达系统的一个特点是能够对表达产物进行加工修饰^[4],实验中测得该酶含糖量为 15.4%,说明重组超耐热酸性 α -淀粉酶已经被毕赤酵母表达系统进行了糖基化修饰。

编码超耐热酸性 α -淀粉酶的基因在毕赤酵母中表达的酶与来源于原始菌株的酶的性质有所不同(数据未列出),在毕赤酵母中表达的酶的最适 pH

为 4.5,来源于原始菌株的酶的最适 pH 为 5.0^[15],可能是酶基因在表达过程中有所突变(文章未发表)以及酶蛋白的糖基化修饰的结果。

重组超耐热酸性 α -淀粉酶最适 pH 为 4.5,最适温度达到了 95℃,且具有很好的稳定性,这些特点都使得该酶能够在淀粉加工工业过程中的酸性高温环境中发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Crab W, Mitchinson C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends Biotechnol*, 1997, **15**: 349 - 352.
- [2] Dong G, Vieille C, Savchenko A, et al. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular alpha-amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl Environ Microbio*, 1997, **63**: 3569 - 3576.
- [3] Jorgensen S, Vorgias C E, Antranikian G. Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 16335 - 16342.
- [4] Richardson T H, Tan X, Frey G, et al. A novel high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH thermostable alpha-amylase. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 26501 - 26507.
- [5] 马善康,李强,顾小勇.双碳源交替刺激毕赤酵母高效表达人尿激酶原.过程工程学报, 2002, **2**(5): 448 - 452.
- [6] Taguchi Y. DNA encoding a hyperthermostable alpha-amylase. EP No.0 648 843 A1
- [7] 北京大学生物化学教研室.生物化学实验指导.第一版.北京:人民教育出版社,1979,73 - 74.
- [8] 夏其昌.蛋白质化学研究技术与进展.北京:科学出版社,1997,102 - 107.
- [9] 张树政,孟广震,何忠效,等.酶学研究技术(上册).北京:科学出版社,1987,86 - 98,277 - 280.
- [10] 矫庆华,张启先,王祯祥.大肠杆菌青霉素酰化酶的提纯及其性质的研究.微生物学报,1986, **26**(3): 254 - 259.
- [11] 刘又年,古映莹,舒万良,等. α -淀粉酶的超滤研究.中南工业大学学报,1997, **28**(5): 501 - 503.
- [12] 张龙翔,张庭芳,李令媛,等.生物化学实验方法和技术.第二版.北京:高等教育出版社,1997,111 - 116.
- [13] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956, **28**(3): 350 - 356.
- [14] 杜中军,朱水芳,黄文胜,等.毕赤酵母外源基因表达系统研究进展.生物技术通报,2002, **4**: 7 - 11.
- [15] Koch R, Zabłowski P, Spreinat A, et al. Extremely thermostable amylolytic enzyme from the archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *FEMS Microbiology Letters*, 1990, **71**: 21 - 26.

Purification and properties of recombinant extremely thermostable and acid-stable amylase

LI Hui^{1,2} GUO Jian-qiang³ YUE Li-li⁴ LI Yun-min⁴ JIAO Qing-hua^{1*}

(¹ Institute of Microbiology, Beijing 100080, China) (² Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(³ Sanyuan Gene Limited Company, Beijing 100083, China)

(⁴ VA Medical Centre 111 C5, Department of Medicine University of California at San Francisco 4150 Clement Street, San Francisco, CA 94121, USA)

Abstract : Extremely thermostable and acid-stable α -amylase produced by *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-Amy-228 was purified to electrophoretic homogeneity by the steps of ultrafiltration and PAGE. Purification of about 11.7 fold was achieved with an overall yield of 29.8%. Its molecular weight was estimated to be about 55kD by SDS-PAGE. The isoelectric point was 5.0 (room temperature). Michaelis constant of the enzyme for soluble starch was 1.12g/L. The carbohydrate content was 15.4% by the phenol-sulfuric acid method. The optimum temperature and pH of the enzyme activity were 95°C and 4.5 respectively. The enzyme activity was stable under room temperature in the pH range of 4.0 ~ 7.0 for 48 hours. About 60% of the initial enzyme activity was measured after 1h of incubation at 110°C. The activity was strongly inhibited by Fe^{2+} , Cr^{2+} and Cu^{2+} , while Ca^{2+} had no effect on it. DTT and EDTA had no effect on the activity.

Key words : Extremely thermostable and acid-stable α -amylase, Purification, Properties

Foundation item : Chinese National Programs for Science and Technology Development (2001BA708B03-03)

* Corresponding author. Tel : 86-10-62628482 ; E-mail : jqh1234@yahoo.com.cn

Received date : 11-05-2004

The Eighth Editorial Board of *Acta Microbiologica Sinica*

EDITOR-IN-CHIEF

LI Ji-lun Academician

(College of Biology, Chinese Agricultural University, Beijing 100094, China)

VICE-EDITOR-IN-CHIEF

TAN Hua-rong Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

LU De-ru Professor

(Institute of Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

WANG Ao-quan Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

QU Yin-bo Professor

(School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

XU Jian-guo Professor

(National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

MEMBERS OF THE BOARD

CAI Yong-feng

CHEN Yong-qing

CHENG Chi

DONG Xiu-zhu

FAN Yun-liu

GUO Jun

HU Fu-quan

HU Yuan-yang

HUANG Li

LU Cheng-ping

MIN Hang

QIAN Shi-jun

SHAO Yi-ming

SHENG Jun

TANG Hong

TIEN Po

WANG Ping

WANG Hua-ming (USA)

XIE Hong

YANG Su-sheng

ZHAI Zhong-he

ZHANG Yao-ping (USA)

ZHENG Tian-ling

ZHU Bao-quan

ZHUGE Jian

MANAGING EDITORS

WANG Jin-fang

WANG Min