

米曲霉 6-193 α -淀粉酶的纯化和性质的研究

孔显良 王俊英 崔雅洁* 姜丽萍

(中国科学院微生物研究所, 北京)

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 突变株 6-193 的麦麸固体培养物, 经水浸泡其中 α -淀粉酶活力为每克干曲 600 单位。用硫酸铵分段沉淀, Sephadex G-75 凝胶过滤和制备垂直平板电泳纯化, 经 PAGE 鉴定为一条带, SDS 凝胶电泳测定分子量为 52,000。酶作用最适 pH 为 5.0—6.0, 最适温度为 60℃。在 60℃ 处理 30 分钟酶活力保留 90%。加 Ca^{2+} 后, 酶的热稳定性有提高。 Ca^{2+} 、 Li^{+} 和 Mg^{2+} 对酶有一定的激活作用, 而 Ag^{+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 等对酶均有抑制作用。酶作用产物经薄层色谱分析, 扫描, 所产生的二糖和三糖之和为 69.4%。

关键词 α -淀粉酶; 米曲霉; 纯化; 性质

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) α -淀粉酶的研究和利用历史已久^[1,2]。近年来, 为适应食品、啤酒和麦芽糖浆生产中淀粉水解的需要, 真菌 α -淀粉酶受到人们的重视, 它的应用范围逐步扩展。目前, 国外米曲霉 α -淀粉酶的年产量大约为 10 吨酶蛋白^[3]。国内米曲霉 α -淀粉酶的研究和利用虽早已开始^[4,5], 但应用范围有限。研究工作的报道也很少, 关于酶的纯化和性质尚未见报道。近年来, 作者曾报道过产 α -淀粉酶的米曲霉菌株筛选及产酶条件^[6], 本文报道酶的纯化和性质。

材料和方法

(一) 菌种

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 8856 菌株系齐祖同先生提供, 经紫外线诱变后, 获得变异株 6-193 号。

(二) 培养基

试管斜面培养采用查氏 (Czapek) 琼脂培养基。麦麸培养基采用粗麦麸 5g, 加水 6ml (含 1% 尿素), 搅拌后, $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 灭

菌 30min, 冷却后备用。

(三) 仪器及化学试剂

721 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂); J₂-21 高速冷冻离心机 (Beckman); CS-930 扫描仪 (岛津)。

可溶性淀粉 (浙江省菱湖化工试剂厂), 当天使用时配制。丙烯酰胺 (上海试剂厂), 甲叉双丙烯酰胺 (Serva)。Sephadex G-75 (Pharmacia), 十二烷基硫酸钠 (SDS) (E. Merck)。

(四) 分析方法

1. 酶活力测定: (1) 部颁测定法^[7]: 1ml 酶液于 60℃, pH 4.8, 1 小时液化 1g 可溶性淀粉为 1 个酶活力单位。(2) 比色测定法^[8]: 在 60℃, pH 4.8, 1 分钟水解 0.1mg 可溶性淀粉为 1 个酶活力单位。酶活力测定方法除写明部颁测定法外, 均采用比色法测定。

2. 薄层色谱法: 此法鉴定酶反应产

本文于 1990 年 6 月 25 日收到。

* 北京大学分校食品生化学专业 1990 年应届毕业生。现在地址北京华冠乳品厂。

物,展开剂: 正丁醇:醋酸:水=2:1:1,显色剂: 1g 二苯胺溶于 25 ml 丙酮和 1 ml 苯胺溶于 25 ml 丙酮混合后,将 85% 的磷酸 5ml 混入其中,摇至透明。显色烘干,即显示斑点。

3. 蛋白含量的测定: 采用 Folin-酚试剂法^[9]。

4. 酶纯度鉴定: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 按 Davis 法^[10], 凝胶浓度 7%, 用考马斯亮蓝 R-250 染色。

5. 酶区带定位法: 采用淀粉酶鉴定方法^[11]。

6. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 按 Weber-Osborn 方法^[12]。

结果和讨论

(一) α -淀粉酶的纯化

1. 粗酶液制备: 麦麸培养物经水浸泡,过滤,冷冻离心,上清液为粗酶液,按部颁方法测定酶活力为每克干曲 600 单位。

2. 硫酸铵分段沉淀: 将粗酶液置于冰浴中,边搅拌边加硫酸铵,分别加到饱和度为 50%、60%、70%、80%、90%、100%,留取各饱和度的上清液及沉淀,沉淀用少量水溶解。用部颁法测定各饱和度上清液的酶活力及沉淀溶解液的酶活力及蛋白(表 1)。

由硫酸铵沉淀的结果看出,饱和度为

表 1 硫酸铵分段沉淀结果

Table 1 Results of ammonium sulfate fractionation

硫酸铵饱和度(%) (NH_4) ₂ SO ₄ saturation	上清液酶活力 (u/ml) Supernatant activity	沉淀酶活力 (u/ml) Precipitation activity	蛋白 (mg/ml) Protein	比活 (u/mg) Specific activity
50	170.4	32.7	4.94	6.62
60	169.4	67.0	4.81	13.93
70	117.1	2341.5	30.7	76.27
80	11.7	4235.3	52.1	81.29
90	0	436.4	13.7	31.85
100	0	17.1	3.7	4.62

70%、80%、90% 时,沉淀的比活值最高。

3. 凝胶过滤: 将以上三组比活值高的沉淀溶解液混合,取 10 ml 混合液上柱 Sephadex G-75,用 pH 4.8 的醋酸缓冲液洗脱,用三氯乙酸及茚氏试剂监测蛋白及 NH_4^+ ,收集洗脱液。

4. 电泳提纯: 用垂直板电泳制备纯酶。用酶区带定位法确定 α -淀粉酶区域,将确定的部位凝胶切下,用定量蒸馏水浸泡,以后各步及酶性质的研究均用此纯酶液。

5. 凝胶电泳鉴定酶的纯度: 用盘状 PAGE 进行鉴定,考马斯亮蓝染色,结果见图 1。

由图 1 看出,粗酶液及硫酸铵沉淀样品有六条带,凝胶过滤有六条带,PAGE 纯化后为一条带。

6. 酶的区带定位鉴定: PAGE 后,将胶条用淀粉酶法鉴定提纯样品,结果见图 2。由图 2-B 可见,纯化样品染色后只有一条透明带,图 2-A、B 色带与透明带位置相一致,证明此带是 α -淀粉酶。

7. 纯化结果: 分步测定样品的酶活力、蛋白含量,结果见表 2。 α -淀粉酶被纯化了 3.12 倍、蛋白收率 1.45%,酶活力收率 4.54%。

(二) 酶的一般性质

1. 最适作用温度: 反应最适温度为

表 2 米曲霉 6-193 α -淀粉酶的纯化

Table 2 Purification of α -Amylase from *Aspergillus oryzae*

步 骤 Step	总酶活力 (u) Total activity	总蛋白 (mg) Total Protein	比活 (u/mg) Specific activity	得率(%) Yield		提纯(倍数) Purification
				酶活力 Activity	蛋白 Protein	
粗酶液 Crude extract	9.63×10^5	3.28×10^3	2.94×10^1	100	100	1
硫酸铵分段 (NH_4) ₂ SO ₄ fractionation	6.80×10^5	9.26×10^2	7.43×10^3	70.6	28.2	2.53
凝胶过滤 Sephadex G-75 gel filtration	9.00×10^3	1.00×10^2	9.00×10^3	9.35	3.05	3.06
凝胶电泳提纯 Gel electrophoresis purification	4.37×10^3	47.2	9.18×10^1	4.54	1.45	3.12



图 1 各步纯化样品的 PAGE 图

Fig. 1 PAGE patterns of samples from different step of purification

1.粗酶液 Crude extract; 2.硫酸铵分段沉淀 (NH_4)₂SO₄ fractionation; 3. Sephadex G-75 凝胶过滤 Gel filtration; 4. PAGE 纯化 PAGE purification.

a. α -淀粉酶 α -Amylase; b. 溴酚蓝 Bromophenol blue.

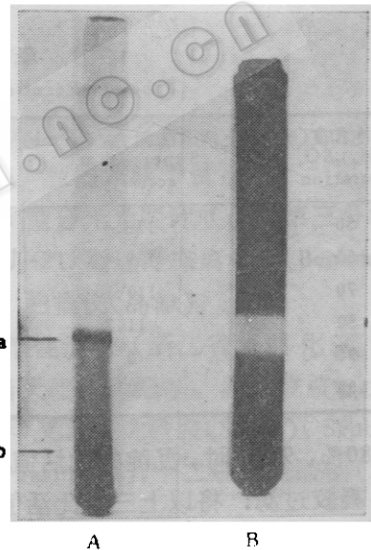


图 2 纯 α -淀粉酶 PAGE 图

Fig. 2 Disc gel electrophoresis patterns of the purified α -amylase

A. 考马斯亮蓝染色法 The protein was stained with Coomassie Brilliant Blue; B. 酶区带定位法 Starch hydrolysis pattern of polyacrylamide gel with the purified enzyme. The white zone represents area of enzyme hydrolyzed starch against the dark background of the starch-iodide complex. a. α -淀粉酶 α -Amylase; b. 溴酚蓝 Bromophenol blue.

60℃, 超过 65℃ 酶活迅速下降(图 3)。

2. 最适 pH: 用醋酸和磷酸缓冲液配制 0.02 mol/L pH 为 3.6、4.0、4.6、5.0、5.4、6.0、6.6、7.0、7.4、8.0, 在不同 pH 条件下

测定酶活力, 结果见图 4。酶的最适作用 pH 为 5.0。pH 高于 6.5 或低于 4.5 时, 酶活力迅速下降。

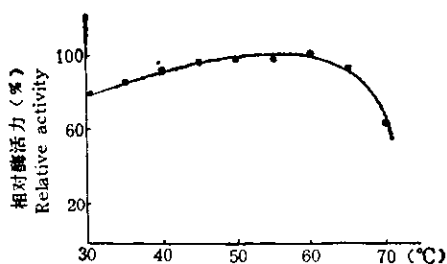


图3 反应温度对酶活性的影响

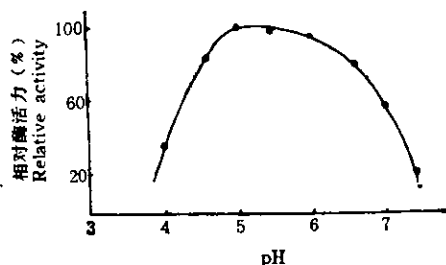
Fig. 3 Effect of temperature on the of activity of α -amylase from *Aspergillus oryzae* 6-193

图4 反应 pH 对酶活性的影响

Fig. 4 Effect of pH on the activity

3. 酶的 pH 稳定性: 酶液在不同 pH 条件下, 于 50°C 保温 30 分钟, 然后测定酶活力。结果(图 5)表明, 酶在 pH 值 5.0—7.0 的范围内稳定, 低于 5.0 或高于 7.0 时, 很快失活。

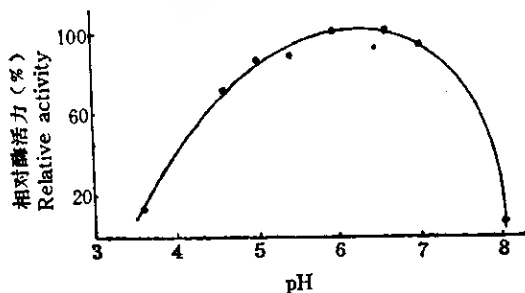


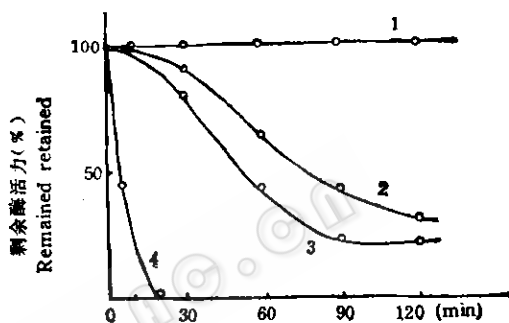
图5 酶的 pH 稳定性

Fig. 5 Effect of pH on the stability

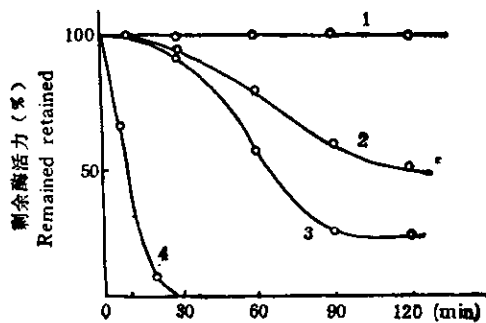
4. 热稳定性及 Ca^{2+} 的保护作用: 不加 CaCl_2 的酶液及加入 0.02 mol/L 溶液的酶液, 分别在 50、60、65°C 处理 10、30、60、90、120 分钟后, 测定其剩余活力。结

果(图 6)表明, 酶液在 50°C 处理, 其热稳定性很好, 酶活力不损失; 60°C 处理 30 分钟, 酶活力损失 10%, 120 分钟损失 70%; 65°C 处理 10 分钟, 酶活力不损失, 30 分钟损失 22%。

图 7 表明, 加入 Ca^{2+} 后, 酶的热稳定性有提高。60°C 处理 30 分钟, 酶活力损失 6%, 120 分钟损失 54%; 65°C 30 分钟损失 8%, 60 分钟损失 45%。

图6 酶的热稳定性(无 CaCl_2)Fig. 6 Heat stability of enzyme in absence of Ca^{2+}

1. 50°C; 2. 60°C; 3. 65°C; 4. 70°C.

图7 Ca^{2+} 对酶热稳定性的作用 (0.02 mol/L CaCl_2)Fig. 7 Effect of Ca^{2+} on heat stability of enzyme

1. 50°C; 2. 60°C; 3. 65°C; 4. 70°C.

5. 金属离子对酶活力的影响: 使酶液中各金属离子浓度分别为 5mmol/L, 50°C 保温 30 分钟, 再测定酶活力。结果(表 3)表明, Ca^{2+} 、 Li^+ 、 Mg^{2+} 对酶有一定的激

表 3 金属离子对酶活力的影响

Table 3 Effects of various metal ions on activity of α -amylase

金属离子 Metal ions	浓度 (mmol/L) Conc.	相对酶活力 (%) Relative activity
None	9	100.0
CaCl ₂	5.0	247.4
Li ₂ SO ₄	5.0	239.5
MgCl ₂	5.0	221.1
CoSO ₄	5.0	68.4
NiSO ₄	5.0	57.9
ZnCl ₂	5.0	42.1
MnCl ₂	5.0	21.1
FeCl ₂	5.0	15.3
ZnSO ₄	5.0	10.5
AgNO ₃	5.0	5.25
Hg(CH ₃ COOH) ₂	5.0	5.25
CrCl ₃	5.0	5.1
Fe ₂ O ₃	5.0	1.49
CuSO ₄	5.0	1.04
Al ₂ (SO ₄) ₃	5.0	0.64
Ag ₂ SO ₄	5.0	0.25

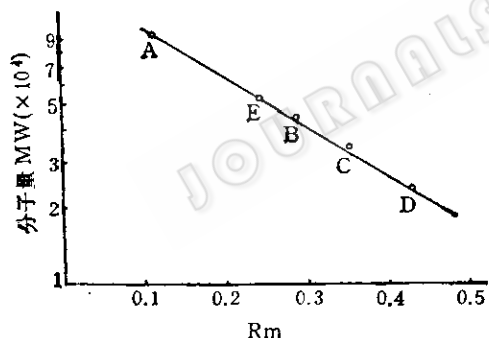
图 8 SDS 凝胶电泳中 α -淀粉酶的分子量

Fig. 8 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis
A. 磷酸化酶 Phosphorylase B (97,400); B. 卵清蛋白 Albumin egg (45,000); C. 胃蛋白酶 Pepsin (34,700); D. 胰蛋白酶原 Trypsinogen (24,000); E. 米曲霉 6-193 α -淀粉酶 *Asp. oryzae* 6-193 α -amylase.

活作用,而 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 等对酶有强烈抑制作用, Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 等则有抑制作用。

从以上酶的一般性质来看,基本上与前人报道的米曲霉和泡盛曲霉 (*Asp.*

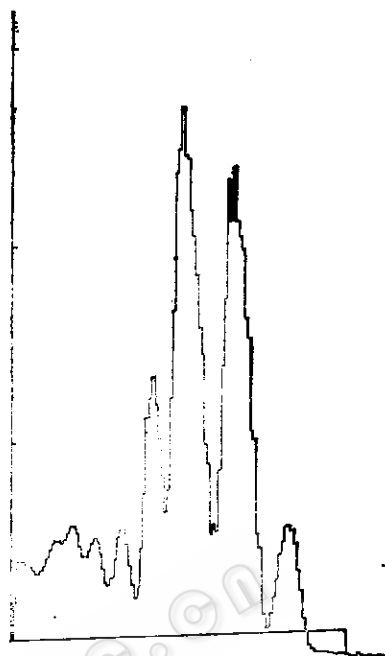
图 9 米曲霉 6-193 α -淀粉酶反应产物色谱扫描图

Fig. 9 Scanning chromatogram of reaction products of the α -amylase from *Asp. oryzae* 6-193

1. 葡萄糖 6.4% Glucose;
2. 麦芽糖 32.3% Maltose;
3. 麦芽三糖 37.1% Maltotriose;
4. 麦芽四糖 10.9% Maltotetraose.

awamori) 酶的性质相近^[13,14]。

6. 分子量的测定: 电泳前, 将样品及已知分子量的标准蛋白用含 1% SDS 5% 巯基乙醇液处理 100℃ 煮 5 分钟, 使其变性, 电泳后作标准曲线(图 8), 求出米曲霉 6-193 α -淀粉酶的分子量为 52,000。

该菌株产生的 α -淀粉酶的分子量与 McKelvy 等^[15]、Yakubi 等^[16]、Takagi^[17] 测定的米曲霉和 Resham^[18]、William^[19] 叙述的泡盛曲霉 (*Asp. awamori*) 的分子量基本相同。

(三) 酶作用产物的分析

将 pH 4.8 的 2% 可溶性淀粉溶液在 60℃ 保温 5 分钟然后加入一定量酶液, 进行酶解反应。1 小时后取出并迅速冷却, 点样, 用麦芽糖作对照, 经薄层色谱分析,

米曲霉 6—193 菌株产生的 α -淀粉酶作用产物葡萄糖含量很少。根据扫描结果(图 9), 葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖分别占 6.4、32.3、37.1、10.9%。麦芽糖和麦芽三糖二者之和占 69.4%, 与 Novo 公司 Norman^[19] 报道的相似, 属糖化型 α -淀粉酶, 可用于制糖、啤酒和面包食品工业, 并可以替代 β -淀粉酶生产麦芽糖浆。用米曲霉 α -淀粉酶生产的麦芽糖浆在粘度和熬煮温度方面都有很大程度的改善, 所以有人称此麦芽糖浆为改良麦芽糖浆。米曲霉 α -淀粉酶作为面包添加剂比细菌 α -淀粉酶耐热性低, 避免面包在制造过程中造成过度液化现象, 而使生产的面包发粘。因此, 此酶是目前较理想的面包食品类的添加剂^[20]。啤酒工业应用此酶可以提高啤酒酵母的发酵能力。

参 考 文 献

- [1] Takagi, T. et al.: In *The Enzymes* (Boyer, P. D. ed.) 3rd., Vol. 5, pp. 235—271, Academic Press, New York, 1971.
- [2] 胡学智等: 酶制剂工业(下册), 张树政主编, 科学出版社, 北京, 第 456 页, 1984。
- [3] Tkinson, B. et al.: *Bioch. Eng. and Biotech.* Handbook, The Nature Press, New York, p. 998, 1983.
- [4] 陈驹声: 化学世界, (10): 433—439, 1957。
- [5] 张树政等: 科学通报, (10): 304, 1957。
- [6] 孔显良等: 微生物学通报, 15(2): 2—54, 1988。
- [7] 轻工业部颁标准(试行), QB746—747—80, 1981。
- [8] Kazuo, Y.: *J. of General and Applied Microbiology*, 15(1): 97—107, 1969.
- [9] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- [10] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404, 1964.
- [11] 吴鹤龄等: 遗传学实验方法和技术, 高等教育出版社, 北京, 第 274 页, 1983。
- [12] Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, 244 (16): 4406—4412, 1969.
- [13] Walter, W. W. et al.: *Adv. Appl. Microb.*, 7: 293, 1965.
- [14] Resham, S. B. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 31: 149—153, 1984.
- [15] McKelvy, J. F. et al.: *Archives of Bioch. and Biophys.*, 132: 99, 1969.
- [16] Yakubi, M. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 34: 1—6, 1977.
- [17] Takagi, T.: *J. Biochem. (Tokyo)*, 89: 363—368, 1981.
- [18] William, M. F.: *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Applied Science Publishers, pp. 7—11, 1983.
- [19] Norman, B. E.: *Industrial Amylases, In Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*, pp. 344—349, 1979.
- [20] Beichelt, J. R.: *Baking, in Industrial Enzymology*, pp. 21—216, 1983.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF α -AMYLASE FROM *ASPERGILLUS ORYZAE* 6-193

Kong Xianliang Wang Zunyeng Cui Yajie Jiang Liping

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

An α -amylase was obtained from *Aspergillus oryzae* mutant 6-193 cultured in wheat bran medium. The enzyme activity was about 600 μ /g. The α -amylase was purified by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-75 gel filtration and polyacrylamide gel electrophoresis, and was shown a single band on disc gel electrophoresis. The specific activity of purified enzyme was 3.12 fold of the extract. The purified α -amylase is homogeneous as show by gel electrophoresis, and has a molecular weight of 52,000 by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis.

The pH range of the enzyme is from pH 4.5 to pH 6.5 with the optimal pH between 5.0 and 6.0. The optimal temperature for the

enzyme activity is about 60°C. The enzyme was fairly stable retaining more than 90% of its original activity after 30 min. at 60°C. Calcium ion enhanced the enzyme activity, Li^+ and Mg^{2+} showed similar effect, whereas Ag^+ , Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} inhibited the enzyme activity.

This enzyme hydrolyzed starch with maltose and maltotriose as main products i.e. 69.4% of the total products.

Key words

α -Amylase; *Aspergillus oryzae*; Purification; Properties