

## 利用离子交换色谱快速纯化 $\alpha$ -淀粉酶

李 汉 李华儒

(西北大学分离科学研究室 西安 710069)

**摘要** 本文开发了一个用强阴离子高效液相色谱分离纯化 $\alpha$ -淀粉酶的新方法。详细讨论了纯化的最佳条件。在给定的条件下纯化工业 $\alpha$ -淀粉酶,其活性回收率达96%,比活性为388u/mg 蛋白,纯化倍数提高30倍,经 SDS-PAGE 分析,得到分子量分别为58K 和33K 两条 $\alpha$ -淀粉酶谱带。此法纯化 $\alpha$ -淀粉酶简单,快速,效率高。不仅能纯化工业粗酶,也可纯化其它来源的 $\alpha$ -淀粉酶。

**关键词** 离子交换色谱,  $\alpha$ -淀粉酶, 纯化

### 1 前言

$\alpha$ -淀粉酶是一种催化淀粉水解酶,主要来源于动物胰、唾液、血液、尿、细菌、霉菌和各种高等植物,常用作食品添加剂。高纯度的 $\alpha$ -淀粉酶可作为酶试剂,研究生物作用的特性、酶反应机理,测定生化反应的平衡常数。为了获得高纯度的 $\alpha$ -淀粉酶,一些作者<sup>[1-4]</sup>利用软基质的离子交换色谱和亲和色谱分离纯化了 $\alpha$ -淀粉酶的粗酶提取液。但是,软基质色谱介质的机械强度小,受压易变形,分析速度慢,分离效率低,柱寿命短,固定相对 pH、离子强度和压力非常敏感,反复使用时配体碎片容易脱落。由于以上缺点,软基质色谱有逐渐被硬基质色谱取代的趋势。在硬基质色谱应用方面,李华儒等<sup>[5]</sup>首次合成一种对 $\alpha$ -淀粉酶具有特异亲和能力的色谱介质,并成功

地分离纯化了工业粗酶,获得了高纯度产品,其活性回收率 $>88\%$ ,Kato 等<sup>[6]</sup>也用高效疏水色谱纯化了 $\alpha$ -淀粉酶粗品,回收率为90%。但是,利用高效液相离子交换色谱纯化 $\alpha$ -淀粉酶国内外尚未见报道。本研究利用我们自己合成的强阴离子交换柱(L-SAEI)很好地分离了 $\alpha$ -淀粉酶粗品,其活性回收率高达96%,比活性达388u/mg 蛋白质,纯度提高30倍。此法的研究成功为大规模制备高纯度 $\alpha$ -淀粉酶提供了一个新工艺路线。

### 2 实验部分

#### 2.1 标准酶液配制

用微量天平准确称取5mg 高纯度的 $\alpha$ -淀粉酶

(接下页)

本文收稿日期:1993年1月8日,修回日期:1993年4月13日 \* 通讯联系人

(接上页)

## High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) Determination of Trace Patulin and Penicillic Acid by Precolumn Derivatization with 4-(2-Phthalimidyl) Benzoyl Chloride

Guo Yufeng and Fu Chengguang

(Centre of Physical and Chemical Analysis, Hebei University, Baoding, 071002)

A new and sensitive method was developed for the determination of trace patulin and penicillic acid by HPLC using ultraviolet detection. The method involves the esterification of patulin and penicillic acid by use of a derivative reagent, 4-(2-phthalimidyl) benzoyl chloride. The esterified toxins were simultaneously separated on an ODS column with acetonitrile-water (47:53, V/V) under acidic condition as the mobile phase and detected at UV 300nm. The detection limits of patulin and penicillic acid were 2.0 pmol and 10 pmol respectively.

**Key words** high performance liquid chromatography, patulin, penicillic acid

试剂(Sigma公司, 2124u/mg 固体, 2836u/mg 蛋白质), 于小离心试管中, 准确加入1.0mL水, 溶解后, 在1300r/min的高速离心机上离心5min, 小心转移上部清液于另一离心试管中, 此液相当于1062u/mL活力。

## 2.2 色谱柱装填和色谱条件

称取1.6g离子交换剂填料, 用异丙醇作溶剂在39198kPa压力下按匀浆法装填在4.6mm i. d. × 100mm的不锈钢柱中, 按图1操作条件在LC-6A型高效液相色谱仪(日本岛津公司)进行色谱分离。图1为 $\alpha$ -淀粉酶的色谱分离图, 经活性检验峰1无活性为杂蛋白, 峰2有强活性为 $\alpha$ -淀粉酶。

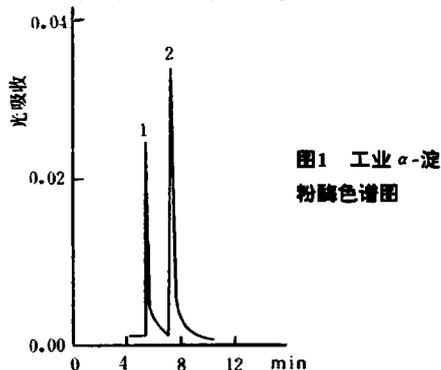


图1 工业 $\alpha$ -淀粉酶色谱图

色谱条件 柱: 强阴离子交换柱(L-SAE1, 4.6 mm i. d. × 100mm, 本室合成, 季铵型, 柱容量为9.6 mg  $\alpha$ -淀粉酶/g 硅胶; 流动相: A 0.020mol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris, pH 6.0), B 0.020mol/L Tris-2.0mol/L NaCl(pH=6.0); 总流速: 1mL/min; 吸收波长:  $\lambda=254\text{nm}$ 。洗脱程序: 0~3min, A=100%; 3~4min B=100%; >4min A=100%。进样量: 10 $\mu$ L (50mg 粗 $\alpha$ -淀粉酶/mL 样)。

## 2.3 $\alpha$ -淀粉酶活性测定

2.3.1 活性和活性回收率测定 按碘-分光光度法<sup>[7]</sup>。

2.3.2 比活性测定 用碘-分光光度法测定纯化后 $\alpha$ -淀粉酶总活性, 用紫外分光光度法( $\lambda=280\text{nm}$ )测定蛋白质总量, 按定义求出纯化后 $\alpha$ -淀粉酶的比活性。

## 3 结果与讨论

### 3.1 洗脱剂的选择

为了获得一个分离好、活性回收率高的洗脱剂, 我们在同一色谱条件下分别使用0.020mol/L 磷酸缓冲液-1mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (pH 7.0), 0.020mol/L 磷酸缓冲液-2mol/L NaCl(pH 7.0), 0.020mol/L 磷酸缓冲液-2.0mol/L NaCl(pH 5.0)和0.020mol/L

Tris-2mol/L NaCl(pH 6.0)。并测定纯化后 $\alpha$ -淀粉酶的活性回收率, 其中以0.020mol/L Tris-2mol/L NaCl(pH 6.0)洗脱体系的活性回收率最高为96%, 其它三个体系中前两个为90%, 后一个为72%。为获得高的洗脱效率, 本实验选用0.020mol/L Tris-2mol/L NaCl(pH 6.0)体系作为洗脱剂。

### 3.2 浓度对洗脱效率的影响

利用pH 6.0不同浓度NaCl的Tris溶液进行洗脱, 测定纯化后 $\alpha$ -淀粉酶的活性回收率来考察离子强度对洗脱效率的影响, 得到图2的结果。

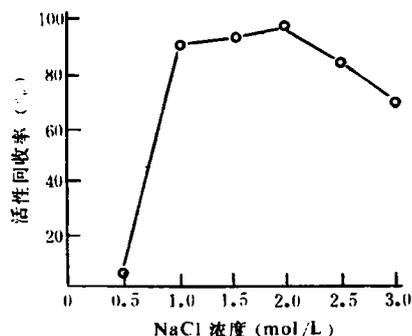


图2 离子强度对洗脱效率的影响

由图2可知, 在2.0mol/L以下, 随盐浓度的增加, 洗脱能力增大, 活性回收率提高。洗脱液中离子强度对洗脱效率的影响可归结为离子交换平衡的移动, 这种色谱行为表明该固定相具有典型的阴离子交换特性, 符合离子交换色谱的洗脱规律。但在2.0mol/L以上, 随盐浓度增加洗脱能力下降。这种反常现象, 可能是由于离子交换柱的多功能特性引起。实验证明, 离子交换柱不仅有离子交换的作用, 而且还表现一定的疏水作用<sup>[8]</sup>。并且这种疏水作用, 随溶液离子强度发生变化。当洗脱剂浓度大于2.0mol/L时, 由于溶液的表面张力过大, 离子交换剂的疏水作用变得明显, 对蛋白质疏水缔合作用增强, 故被吸附的蛋白质难以洗脱, 因而活性回收率下降。所以选择氯化钠浓度为2.0mol/L。

### 3.3 pH对活性回收率的影响

利用不同pH下0.020mol/L Tris-2.0mol/L NaCl缓冲溶液进行洗脱, 研究pH对洗脱效率的影响, 测得结果见图3。

由图3可知, 在pH 6.0时 $\alpha$ -淀粉酶的活性回收率最大为96%, 在pH 3.0时, 活性回收率为0, 表明 $\alpha$ -淀粉酶发生变性。这一结果与李华儒等<sup>[7]</sup>给出的 $\alpha$ -淀粉酶在pH 2.0酸性溶液中不稳定的结果相一致。又因 $\alpha$ -淀粉酶在pH 6.0溶液中具有较高的活性, 因此, 我们选择该pH值下含2.0mol/L NaCl的

0.02mol/L Tris 溶液作为流动相是比较适宜的。

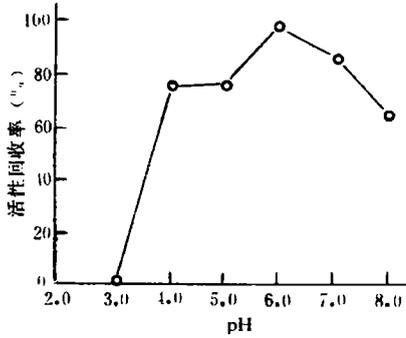


图3 pH 对活性回收率的影响

### 3.4 对分离方法的评价

为了考察方法的重现性,在同一条件下,平行测定6次结果列表1。

由表1看出,六次测定结果活性回收率落在92~99%,其平均结果为96%,表明该法具有较高的重现性。此外,该表还给出纯化前后测得的 $\alpha$ -淀粉酶的比活性,说明 $\alpha$ -淀粉酶纯度提高了30倍。

表1 纯化后 $\alpha$ -淀粉酶的活性

No	1	2	3	4	5	6
活性回收率%	97	92	96	99	99	94
平均活性回收率%	96					
纯化后比活性(u/mg)	388					
纯化前比活性(u/mg)	13					
纯化倍数	30					

为了测定被纯化 $\alpha$ -淀粉酶的分子量,我们将收集的 $\alpha$ -淀粉酶液浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳分析,得到分子量分别为58K 和33K 两条谱带。前者为 $\alpha$ -淀粉酶,后者可能为其同功酶。这个结果同 Weber<sup>[4]</sup>实验结果一致。

## 4 结语

新建立的离子交换色谱法是一个高效、快速纯化 $\alpha$ -淀粉酶的新方法。利用此法分离纯化工业 $\alpha$ -淀粉酶可获得较高的重复性和活性回收率。六次测定,平均活性回收率为96%,比纯化前 $\alpha$ -淀粉酶纯度提高30倍。此法不仅可用于工业 $\alpha$ -淀粉酶的纯化,也可分离其它来源的 $\alpha$ -淀粉酶。

## 参考文献

- 1 Kruger J E *et al.* Cereal Chem, 1969;46:219
- 2 Macgregor A W *et al.* Cereal Chem., 1971;48:490
- 3 Silvanovich M P *et al.* Analytical Biochemistry, 1976; 73:430
- 4 Weber M *et al.* J Chromatogr, 1986;355:456
- 5 Li H R *et al.* J Liq Chromatogr, 1992;15(4):707
- 6 Kato Y *et al.* J Chromatogr, 1986;360:260
- 7 李华儒等. 西北大学学报(博士学科专辑), 1991;21(2): 93
- 8 Louis W Yu. J Chromatogr Sci, 1989;27:176

## Rapid Purification of $\alpha$ -Amylase by Ion Exchange Chromatography (IEC)

Li Han and Li Huaru

(Laboratory of Modern Separation Science, Northwest University, Xi'an, 710069)

A new method used to separate and purify  $\alpha$ -amylase by high performance liquid anion EC is proposed. The optimization of purification conditions for  $\alpha$ -amylase is also discussed in detail. At given conditions technical grade  $\alpha$ -amylase was purified. Its recovery of bioactivity was more than 96% and the specific activity was 388u/mg protein. Compared with unpurified enzyme, its purity was raised 30 times. The results from SDS-PAGE showed two bands of  $\alpha$ -amylase on the electrophoretogram with molecular weight of 58K and 33K respectively. This is a simple, rapid and effective separation method for  $\alpha$ -amylase. This chromatographic procedure can be used to purify not only technical grade  $\alpha$ -amylase, but also those from other sources.

**Key words** ion exchange chromatography,  $\alpha$ -amylase, purification