

色谱纯化后 α -淀粉酶活性和回收率的测定

李华儒 党鸿喜

(现代分离科学研究室)

摘要: 研究出用分光光度法测定色谱纯化后的 α -淀粉酶的活性和回收率, 详细地讨论了反应条件。与 3,5-二硝基水杨酸法相比, 该法比较简单、迅速、重现性高。对 6 次测量的平均偏差不超过 8.4%。这个方法也可以用来测定其他来源 α -淀粉酶的活性。

关键词: 色谱; 分光光度法; 生物活性; 回收率; 淀粉酶。

中图分类号: O657.7

0 引言

α -淀粉酶是一种催化淀粉水解酶, 主要存在于动物胰、唾液、血液、尿、细菌、霉菌和各种高等植物组织中。工业淀粉酶常用作食品添加剂, 高纯度 α -淀粉酶可作为标准试剂, 和研究酶的结构。由于 α -淀粉酶在生物新陈代谢过程中起着重要的作用, 因此, 测定 α -淀粉酶的生物活性对研究人体生命过程, 诊断疾病, 研制酶试剂等都有重要意义。

常见的测定 α -淀粉酶的方法有两种: 一种是用 3,5-二硝基水杨酸法⁽¹⁾ 测定 α -淀粉酶催化水解时释放出的还原糖; 另一种是用碘法测量水解后剩余的底物(淀粉)。前者空白值较高, 制备的淀粉试剂不易保存, 显色反应受溶液 pH 和 NH_4^+ 离子的影响较大。因此, 在大量铵盐存在下必须将酶液进行透析后, 才能直接测定, 此外, 由于空白值较高, 该法的灵敏度和重现性亦会受到一定限制。后者比较灵敏, 但主要用来测定血清中 α -淀粉酶⁽²⁾。而工业淀粉酶的测定仍多采用古老的点滴比色法, 此法不仅麻烦而且不准确, 为了拟定一个快速、灵敏、准确的测定 α -淀粉酶活性的分析方法, 我们采用了分光光度法代替古老的点滴比色法来测定工业 α -淀粉酶, 并用这一技术测定了亲合色谱分离和纯化后的 α -淀粉酶的活性和回收率。在与经典的 3,5-二硝基水杨酸法比较后, 结果相当满意, 该法的建立, 对于正确估价 α -淀粉酶亲合柱的性能具有重要意义, 同时也有可能用统一的单位来表示 α -淀粉酶的活性。

1 方法原理

此法基于淀粉分子中 α -1,4 糖苷链在一定条件下可以被 α -淀粉酶切断, 生成糊精、麦

本文1990年11月14日收到。

芽糖和葡萄糖而使碘-淀粉退色。在一定范围 I_2 -淀粉吸光度减弱的程度与 α -淀粉酶活性成比例, 因此通过测量催化水解后 I_2 -淀粉吸光度的减弱可以确定 α -淀粉酶活性。

2 实验方法

2.1 仪器和试剂

2.1.1 仪器

722 型光栅分光光度计。(上海第三分析仪器厂), PHS-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂), LC-6A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

2.1.2 试剂及配制

所有测定活性用的试剂均为分析纯, 水用两次蒸馏水, α -淀粉酶粗品和精品分别从杭州大学生化试剂厂和 Sigma 化学公司购进。磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、碘化钾、碘和 95% 乙醇均由西安化学试剂厂生产。淀粉从四川彭县军农化工厂购得。

(1) 0.02mol/l 磷酸缓冲液 (pH=7.0): 称取 1.8g 磷酸氢二钠和 1.0g 磷酸二氢钾, 用水溶解后稀释至 1 升。

(2) 0.1% 淀粉溶液: 称取 100mg 可溶性淀粉于 50ml 烧杯中, 加少量蒸馏水制成糊状, 然后转移到盛有 80ml 0.01mol/l NaOH 的 150ml 烧杯中煮沸。为转移完全, 用少量 95% 乙醇冲洗小烧杯两次, 洗液并入 150ml 烧杯中, 冷却后倾入 100ml 容量瓶中, 用 0.01mol/l NaOH 稀释至刻度。

(3) 0.005mol/l 碘液: 称取 3g 碘化钾和 1.3g 碘用水溶解后, 稀释至 100ml 以制成 0.05mol/l 碘液, 然后再稀释 10 倍。

(4) 标准酶液: 用微量天平准确称取 6.35mg 高纯度的 α -淀粉酶试剂(2124U/mg 固体, 2836U/mg 蛋白质)于小离心试管中, 用医用注射器加 1.0ml 水, 溶解后, 在 13 000r/min 的高速离心机上离心 5 分钟, 小心转移上部清液于另一离心试管中, 此液相当 13 487U/ml 活性。

(5) 粗酶液: 准确称取 50.0mg 工业 α -淀粉酶粗品, 按上述配制标准酶液的方法, 制成 50mg/ml 酶液。

2.2 操作步骤

2.2.1 柱后 α -淀粉酶活性测定

取两只 50.0ml 容量瓶, 用其中 1 支收集亲合色谱柱纯化后的 α -淀粉酶馏份(图 1, 馏份 2), 另 1 支注入 10 μ l 标准酶(6.35mg/ml), 用水稀释至刻度摇匀。再取 3 只 25.0ml 比色管, 往其中 1 支准确移入 10.0ml 稀释后的纯化酶液, 往另 1 支移入 0.8ml 稀释的标准酶液, 剩余 1 只供空白用。再往这 3 只比色管中分别加入 5.0ml 0.02mol/l 磷酸缓冲液, 用移液管准确加入 2.0ml 0.1% 淀粉标准液, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下温热 15 分钟, 取出后立即冷却。于每个比色管中各加 0.4ml 0.005mol/l 碘液, 用水稀释至刻度, 摇匀。以

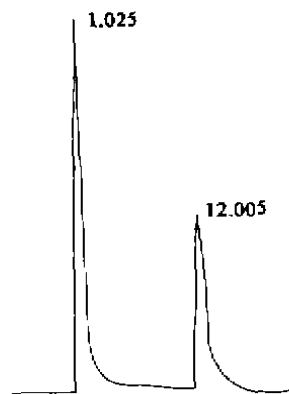


图 1 亲合柱分离 α -淀粉酶色谱图

蒸馏水为参比, 在波长为 580nm 条件下, 用分光光度计测量吸光度。在一定范围, 吸光度减弱的程度与活力大小成比例, 按下式计算纯化后 α -淀粉酶的活力。

$$U_2 = \frac{A_0 - A_2}{A_0 - A_{\text{标}}} \times U_{\text{标}} \times \frac{50.0}{10.0} \quad (1)$$

式中 $U_2, U_{\text{标}}$ 分别为纯化后 α -淀粉酶和0.8ml稀标准酶液的活力(2.2U);

$A_0, A_2, A_{\text{标}}$ 分别为空白、纯化酶和标准酶液以蒸馏水为参比测量的吸光度。

2.2.2 活性回收率的测定

用碘法测量工业酶经过亲合色谱柱前后活性的变化, 计算酶的活性回收率。

$$\text{酶活性回收率} = \frac{A_0 - A_x}{A_0 - A_{x0}} \times 100 \quad (2)$$

式中 A_0, A_x 和 A_{x0} 分别为空白, 经过柱和不经柱的酶测得的吸光度。

3 结果与讨论

3.1 反应条件的选择

3.1.1 最大吸收波长 λ_{max} 的选择:

按操作手续制取碘-淀粉空白溶液, 在不同波长下测定吸光度 A , 发现碘-淀粉溶液在 580nm 处有最大吸收。

3.1.2 pH 值的影响

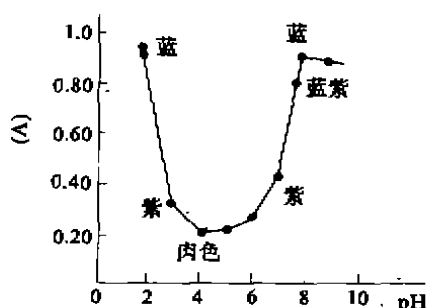


图2 pH对催化水解反应的影响

为了考察 pH 对碘-淀粉显色反应的影响, 用酸和碱调节磷酸缓冲液 pH 至 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 和 10.0, 不加 α -淀粉酶, 按操作手续进行光度测定, 在不同 pH 下测得值几乎相同, 说明 pH 的变化对碘-淀粉络合物的显色反应无明显影响。然而, 溶液 pH 的变化对酶的催化水解反应却有很大影响 (图 2), 在 pH 3.0 到 7.8 的范围内可发生催化水解反应, 而在此 pH 范围以外, 由于加入的酶丧失催化水解淀粉的能力, 此时如图 2 所示溶液呈碘-淀粉蓝色。上述 pH 范围都可以进行测定, 但由于考虑

到 α -淀粉酶在 pH=6~7 条件下最稳定, 因此在操作中我们取 pH=7.0。

3.1.3 淀粉用量的影响

由于此法是通过测定水解后淀粉余量确定 α -淀粉酶的活性, 因此, 测定时加入的淀粉量不仅满足水解需要, 而且还必须保证余量淀粉与吸光度之间的线性关系。为此我们固定 0.005mol/l 碘液 0.4ml, 在磷酸缓冲液中加入不同量 0.1% 淀粉 (Vml) 显色后测其吸光度 A , 发现当淀粉用量在 0~2ml 之间时, 淀粉量同吸光度保持良好的线性关系, 其线性相关系数 $\gamma=0.9993$ 。所以在本实验中, 加入 2.0ml 0.1% 淀粉不仅保证

显色完全, 而且水解后的余量淀粉也正好处于淀粉用量的线性范围。

3.1.4 时间对反应的影响

(1) 碘-淀粉络合物的稳定性

取一定量淀粉显色后, 每隔 1 小时测定一次吸光度, 发现碘-淀粉络合物是相当稳定的, 显色后放置 6 小时, 其吸光度无明显变化。为检查催化水解后显色物的稳定性, 将溶液放置过夜, 其吸光度变化仅为 $\pm 2.2\%$ 。

(2) 加热时间对酶催化水解反应的影响

固定酶量和其他条件, 在 37°C 下改变水解反应时间, 每隔 5 分钟测定一次吸光度, 随着加热时间的增长, 水解程度增大, 为了得到适于测定的蓝紫色溶液, 水解时间应准确控制在 15 分钟。

3.1.5 温度对水解反应的影响

固定酶量, 在不同温度下进行催化水解反应, 按操作手续测定吸光度作吸光度 A 对温度 T 曲线, 由图 3 看出, 在 37°C 水解反应最完全。

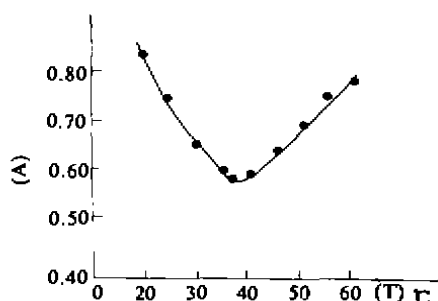


图 3 反应温度对水解程度的影响

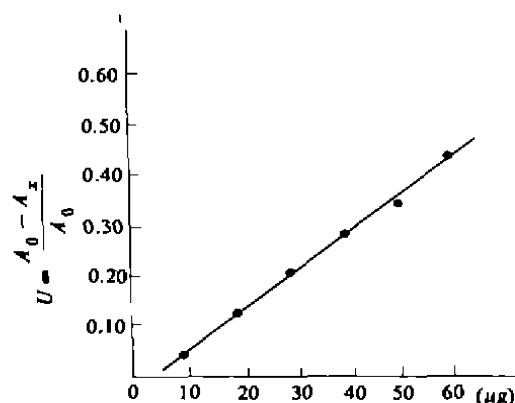


图 4 加入的酶量和测定的活力的关系

3.2 酶量与活性的关系

α -淀粉酶的活性可以用催化水解后碘-淀粉吸光度的减弱程度表示, 因此, 酶量与活性之间的关系, 实质可用加入酶量与吸光度相对减弱的程度来描述, 为考察它们之间的线性关系, 用微量注射器分别往 9 只比色管中加入 0.0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 μg α -淀粉酶 (粗酶液), 按上述操作步骤进行光度测定, 然后用测定的活性 (用光度减弱程度表示) 对加入酶量作图, 得到如图 4 所示的曲线。由图看出加入酶量在 $10 \sim 60 \mu\text{g}$ 之间, 具有良好的线性关系。如用最小二乘法处理, 活性与酶量的线性相关系数 $\lambda = 0.9997$ 。当加入酶量超过 $60 \mu\text{g}$ 时, 由于显色后溶液变为红紫色, 最大吸收波长发生变动, 因此测定的吸光度偏离直线。这就告诉我们, 用此法测定酶的活性时, 必须控制加入酶的量以保证比色溶液的颜色为蓝紫色。

3.3 方法的重现性

为了考察方法的重现性, 取不同量的工业 α -淀粉酶, 按操作手续重复测定, 得到表 1 的结果。从表中数据看出, 在给定的测量范围内重复测定 6 次, 其最大偏差不超

过 8.4%，表明方法具有较高的重现性，同时看出对同一种 α -淀粉酶，其活性随着加入酶量成比例的增加，即它们的比活性近似相等。

表 1 测定工业淀粉酶相对活性结果的重现性

加入酶量 (μg)	测 得 相 对 活 性 ($A_0 - A_x / A_0$)						平均	变 异 系 数 (%)
25	0.13,	0.14,	0.16,	0.14,	0.16,	0.14	0.14	8.4
50	0.30,	0.32,	0.28,	0.33,	0.28,	0.31	0.30	6.8

由于淀粉酶有几种不同的测定方法，各个作者从各自试验方法和测定条件出发定义 α -淀粉酶的活性单位，因此，很难用一个标准方法相互对照。为了检验方法的可靠性，我们按照拟定的方法测定了已知标准酶液的活性，并与理论值进行比较得到表 2 结果。由表看出对 0.5U 活力，最大测量误差为 22%。

表 2 已知标准酶液测定结果与理论值的比较

理论值 (U)	0.5	1.0	1.9	10.8
实测值 (U)	0.61	0.80	2.1	9.9
误差 (%) (以理论值为基准)	22.0	-20.0	10.0	-8.0

表 3 两种不同方法测定色谱柱后 α -淀粉酶活性回收率的比较

测定方法	活 性 回 收 率 (%)					平均值 (%)	变 异 系 数 (%)
3.5-二硝基水杨酸法	82.0,	91.0,	98.0,	82.5,	93.0	89.3	7.7
碘-淀粉分光光度法	90.6,	87.0,	92.0,	91.1,	93.6	90.9	2.7

如果将碘-淀粉光度法和 3.5-二硝基水杨酸法作比较，发现这两种方法测得 α -淀粉酶经亲合柱分离后的回收率非常接近（表 3），前者为 90.9%，后者为 89.3%，但碘-淀粉法重现性优于后者，且测定前收集液不必进行透析。

从上面叙述，可以看出用碘-淀粉分光光度法测定 α -淀粉酶简单快速、准确可靠；反应条件容易控制，配制试剂容易保存，此法可用于 α -淀粉酶制剂的成品和生产控制分析。

参 考 文 献

- 1 Bormfeld. P. Advan. Enzymol. 1951, 12: 379

2 STREET H V, Chose J R. Clin. Chim. ActA., 1956, 1: 256

The Determination of Biological Activity and Recovery for α -amylase Purified by HPAC

Li Huaru, Dang Hongxi

(Laboratory of Modern Separation Science)

Abstract: A spectrophotometric method for the determination of biological activity and recovery of α -amylase purified with chromatography has been proposed. The reaction conditions were discussed in detail. Compared with 3,5-dinitrosalicylate one, this method in this paper is simpler, more rapid and has higher reproducibility. The average deviation is less than 8.4% for six time determinations of α -amylase. This method was also used to determine the biological activity of α -amylase from other sources.

Key words: Chromatography; Spectrophotometry; Biological activity; Recovery coefficient; Amylase.

(上接第 102 页)

图 9-15. 幼根及其异常结构的发育。图 9. 根的正常次生结构。× 85。图 10. 示周皮和石细胞的发生。× 210。图 12. 次生木质部内的薄壁组织细胞开始分裂。× 170。图 13. 次生木质部裂分, 薄壁组织化。× 170。图 14. 导管周围的薄壁组织细胞转化为异常形成层, 向内分化薄壁组织细胞, 向外分化韧皮部。× 300。图 15. 薄壁组织中产生异常韧皮部束。× 300。

Anomalous Structure and Development in the Root Tuber of *Trichosanthes kirilowii*

Zhang Hong, Hu Zhenghai

(Department of Biology)

Abstract: The root tuber of *Trichosanthes kirilowii* was developed from the tap root or lateral root. The primary structure and early secondary structure were normal. However, the initial xylem became broken up by the dilation of parenchyma during the thickening of the root tuber. Then an anomalous cambium arose from the dilation tissue surrounded each trachea, producing parenchyma cells centripetally and phloem centrifugally. The anomalous vascular tissue was formed. Therefore, the root tuber was thickened mainly by the dilation of parenchyma and the formation of anomalous vascular tissues.

Key words: *Trichosanthes kirilowii*; Root tuber; Anomalous structure; Development.