

钙盐对米曲霉 α -淀粉酶活力的影响

杭州商学院食品系 陆得璋 陆森如 郭殿文 罗庆辉* 孙建国**

提要 本实验观察到加入氯化钙能极大地增加米曲霉 α -淀粉酶活力。 CaCl_2 最适浓度为 $1.70 \times 10^{-3} \text{M}$, 在这些实验结果基础上, 进行了生产性试验获得满意结果。

关键词 米曲霉 α -淀粉酶 氯化钙(CaCl_2)

α -淀粉酶(α -Amylase; E.C.3.2.1.1.)能任意使淀粉分子内部 α -1,4糖苷键水解的酶,它广泛应用于食品、制药、酿造等方面。 α -淀粉酶的生产以微生物发酵法为主,常用菌种是米曲霉和枯草杆菌。而用米曲霉生产的 α -淀粉酶则全部用作生化制药的原料药, α -淀粉酶是多酶片、乳酶生等生化药物中的重要原料药。制备 α -淀粉酶粗酶最常用的方法是硫酸铵盐析法和酒精沉淀法,按药品的特殊需要再进一步的精制和纯化。

α -淀粉酶是一种金属酶,每一克分子酶蛋白含一克原子 $\text{Ca}^{++[1]}$ 。而 Ca^{++} 使酶蛋白分子维持最佳的空间构象,从而达到最大的活性和热稳定性^[2]。酶和钙离子结合的亲和力,随不同种属来源而有所不同,并受温度的影响较大,酶的热稳定性也因不同来源而异。人们已熟知 Ca^{++} 离子对酶的热稳定性有保护作用^[3,4],也有少数资料认为 Ca^{++} 能提高酶的活力,起着一种活化剂(激活剂)的作用^[6,8]。

我们在纯化 α -淀粉酶时,特别是研究 Ca^{++} 对酶热稳定性的影响中发现,在盐析时,加氯化钙(试验组)不论酶活性和酶的回收率比不加氯化钙(对照组)提高得非常显

著。这现象在有机溶剂法(乙醇)沉淀时,则提高得不显著。这提示氯化钙可能在极性体系中发挥作用。

材 料

1. 发酵酶液 浙江省富阳县新登制酶厂生产的米曲霉发酵酶液。

2. 化学试剂 硫酸铵(分析纯),无水氯化钙(分析纯),无水乙醇(化学纯)。

3. 试液

碘原液:称取碘11g,碘化钾22g,加水溶解定容至500ml。

标准稀碘液:取碘原液15ml,加碘化钾8g定容至500ml。

比色稀碘液:取碘原液2ml,加碘化钾20g定容至500ml。

pH 6.0 缓冲液:称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)45.23g,柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)8.07g用水溶解并定容至1000ml。

标准糊精液:称0.3g化学纯糊精,少量水混合,倾入400ml微沸蒸馏水中,冷却后定容至500ml。

氯化钙溶液:取无水氯化钙2.5克定容到1000ml($2.27 \times 10^{-2} \text{M}$)

* 现在广东省商业厅食品公司。

** 现在郑州市卫生防疫站。

方法与结果

1. 盐析法^[7]

取7个广口瓶并编号,每瓶加入酶液50 ml再加氯化钙溶液2 ml(或不加氯化钙),最后均补足到100 ml。按瓶号分别加入10 g、20 g、30 g、40 g、50 g、60 g、70 g的硫酸铵量。充分搅拌到硫酸铵全部溶解,静置24小时,过滤,粗酶在40℃下干燥、称重,测其活性。

盐析法做加氯化钙(试验组)和不加氯化钙(对照组)两组试验的结果见表1与2。

2. 有机溶剂沉淀法^[7]

取6个广口瓶并编号,每瓶中加入100 ml酶液,按瓶号加入无水乙醇分别为25 ml、50 ml、75 ml、100 ml、125 ml、150 ml(无

水乙醇的体积与酶液体积分别为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0)充分搅拌均匀并盖紧瓶盖,静置24小时,离心沉淀,粗酶在40℃下干燥、称重,测其活性。

乙醇沉淀法做加氯化钙(试验组)和不加氯化钙(对照组)两组试验的结果见表3与表4。

α -淀粉酶活力测定方法^[8]

本方法以60℃、1小时内催化2%可溶性淀粉成为糊精的克数表示酶活性。

于25×200试管中,加入2%可溶性淀粉20 ml, pH 6.0缓冲溶液5 ml,于60℃水浴保温10分钟,加入配好的酶液0.5 ml,摇匀,即刻记时,定时取出一滴反应液盛于有比色稀碘液的小试管中,观察颜色由紫色变成为棕橙色,与标准比色管颜色相同时,即为反应终点记录时间(t)。

表1 盐析法中加氯化钙的酶活性和回收率

编 号	项 目	酶 液 ml	蒸 馏 水 ml	氯化钙溶液 ml	硫 酸 铵 g	酶 量 g	酶 活 力 (u/g)	酶回收率 %
1*		50	48	2	10	1.044	109.9	16.2
2*		50	48	2	20	1.102	146.8	22.8
3*		50	48	2	30	1.219	155.5	26.7
4*		50	48	2	40	1.419	186.1	37.2
5*		50	48	2	50	1.849	335.1	87.3
6*		50	48	2	60	2.479	287.0	100.2
7*		50	48	2	70	3.059	195.0	84.7

说明:1. 米曲霉是固体发酵,酶液活力最高在35~40单位/毫升冰箱贮藏酶活力下降,每次实验均测当时酶活力(14.2单位/毫升)。

2. 硫酸铵量指100毫升酶液中的加入量。

表2 盐析法中不加氯化钙的酶活性和回收率

编 号	项 目	酶 液 ml	蒸 馏 水 ml	氯化钙溶液 ml	硫 酸 铵 g	酶 量 g	酶 活 力 (u/g)	酶回收率 %
1*		50	50	0	10	0.889	88.5	11.1
2*		50	50	0	20	0.878	94.3	11.7
3*		50	50	0	30	1.219	96.9	16.6
4*		50	50	0	40	1.646	105.6	24.5
5*		50	50	0	50	1.673	109.8	25.9
6*		50	50	0	60	2.635	101.2	37.6
7*		50	50	0	70	2.254	78.9	25.0

(注:酶液活力14.2单位/毫升)

表3 有机溶剂法中加氯化钙的酶活性和回收率

项 目 编 号	酶 液 ml	氯化钙溶液 ml	硫 酸 铵 g	乙醇同酶液 体积之比 $\frac{V}{V}$	酶 量 g	酶 活 力 (u/g)	酶回收率 %
1*	50	1	25	0.5	0.201	167.8	5.9
2*	50	1	50	1.0	0.694	185.9	23.2
3*	50	1	75	1.5	1.039	400.4	73.6
4*	50	1	100	2.0	1.085	451.2	86.7
5*	50	1	125	2.5	1.257	466.7	103.8
6*	50	1	150	3.0	0.939	307.1	51.0

(注:当时酶液活力11.3单位/毫升)

表4 有机溶剂法中不加氯化钙的酶活性和回收率

项 目 编 号	酶 液 ml	氯化钙溶液 ml	无水乙醇 ml	乙醇同酶液 体积之比 $\frac{V}{V}$	酶 量 g	酶 活 力 (u/g)	酶回收率 %
1*	50	0	25	0.5	0.462	145.6	11.9
2*	50	0	50	1.0	0.827	180.7	26.6
3*	50	0	75	1.5	0.911	354.2	57.1
4*	50	0	100	2.0	0.950	400.4	67.9
5*	50	0	125	2.5	1.243	412.0	90.6
6*	50	0	150	3.0	1.117	401.2	79.3

(注:当时酶液活力11.3单位/毫升)

分析和讨论

1. 从表1和表2可以看出:在盐析法中加氯化钙组同不加氯化钙二组中,以5*为例二者比较,提高237.1%,而6*二者比较则提高166.4%,它们的酶回收率提高是非常显著的;但在有机溶剂法中加氯化钙组同不加氯化钙组相比,酶的回收率虽有一定的提高,但不显著,见表3、表4。

2. 后来的实验中指出:盐析法中,氯化钙的作用时间,在0~24小时内,以2~4小时为最适。而加入氯化钙酶液的最适浓度以 $1.70 \times 10^{-2}M$ 为最佳,这提示氯化钙有一个最适加入量。

3. 用氯化镁或氯化钠来替代氯化钙,均能促进 α -淀粉酶活力和回收率的显著提高。随后又做了这三种盐任意两种或三种混合作用,效果超过单独作用的结果。我们在小试的基础上到新登制酶厂进行三批中试,其

中一批用100公斤发酵酶液,其他二批都用1000公斤酶液,每批既有试验组,也有对照组。中试结果是:试验组比对照组酶回收率增加47.1~53.0%。

4. 氯化钙等金属盐如何引起酶活性的提高?一般认为金属离子首先与酶结合,此结合物又与底物形成“酶—金属—底物”的三元络合物。其形式为: E-M-S、M-E-S、E-M(E为酶、M为金属、S为底物)从而将酶

“激活”,提高和加快了酶促反应速度^[9,10]。正如Whifaker指出:Ca⁺⁺能维持酶蛋白最适而有利的空间构象,以增加其热稳定性和保持最大的活性^[2]。

5. 经对新登制酶厂多次实地调研,发现该厂生产米曲霉 α -淀粉酶时,在发酵培养过程中始终没有加氯化钙等金属盐,正如前面已讨论: α -淀粉酶是一种金属酶,每克

分子酶含一克原子 Ca^{++} ，虽然培养基和水中含有钙盐，但还没有达到适宜浓度，我们添加适宜量的氯化钙，以弥补发酵液中 Ca^{++} 浓度的不足。所以未添加氯化钙的酶粉活力明显偏低。在中试生产中获得的酶粉，曾进行 Ca^{++} 含量的测定(原子吸收法)。添加氯化钙的试验组，酶活力 1920 单位/克，含 Ca^{++} 的量为 0.071%。未加氯化钙的对照组酶活力 1371 单位/克，含 Ca^{++} 的量为 0.030%。这结果提示：试验组还可以再少量的添加氯化钙，因理论值是 0.080% (α -淀粉酶分子量约 5 万，一克原子钙是 40)^[1]。

参 考 文 献

- [1] Fischer, E. H., et al; α -Amylase. In the Enzymes, Vol.4. New York 1960
- [2] Whitaker, J. R; Principles of Enzymology for the Food Sciences, Food Science Series Vol.2. New York 1972
- [3] Manning, G. B, et al; J. Biol. Chém 236, 2953, 1961
- [4] 张树政主编：酶制剂工业(下册) 科学出版社 1984
- [5] Mukherjee, S. et al; Experientia 3, 1133, 1974
- [6] Dunn, C. G, et al; Appl. Microbiol 7, 212, 1959
- [7] Safwat, M. S. A, et al; 应用微生物(译文) 1984; 5:62
- [8] 中山大学生化教研室编 生化技术导论 人民教育出版社 1978;
- [9] 鲁宝重编著：酶学概论 科学出版社 1964;
- [10] 李文杰编著：分子酶学 人民卫生出版社 1983;

Effect of Calcium Chloride on the Activity of α -Amylase from *Aspergillus Oryzae*

Lu Dechang Lu Senru Guo Dianwen Ruo Qinghui Sun Jianguo

(Dept of Food Sci, Hangzhou Inst of Commerce)

Abstract

The addition of Calcium Chloride is generally recommended to achieve maximum heat stability of the Enzyme. We have observed that the CaCl_2 can be used to increase greatly the activity of α -Amylase from *Aspergillus Oryzae*. The Optimun Quantitative of the CaCl_2 follows as: $1.70 \times 10^{-3}\text{M}$.

Key words *Aspergillus Oryzae* α -Amylase Calcium Chloride