第5卷 第2期 无锡轻工业学院学报 JOURNAL OF THE WUXI INSTITUTE OF LIGHT INDUSTRY Vol. 5 1986 No. 2

枯草芽孢杆菌糖化型α-淀粉酶的研究(Ⅲ)

——酶的催化作用

陶文沂　　北畑寿美雄　冈田茂孝

(无锡轻工业学院发酵系)　　(大阪市立工业研究所，日本)

一、引　言

α-淀粉酶分为液化型和糖化型两组。本文利用前报[1]所制得纯净糖化型α-淀粉酶，以及液化型α-淀粉酶，葡萄糖淀粉酶，对于不同底物进行各种催化反应。由反应的不同结果分析这几种酶催化反应的型式、反应程度等的区别，讨论糖化型α-淀粉酶的催化作用的性质。

二、材料与方法

1．酶制剂和试验用酶液

糖化型α-淀粉酶(BSA)由前报获得，根据其酶学性质[2]，试验时用pH5.6 0.05 M乙酸缓冲液稀释至所需浓度。液化型α-淀粉酶(BLA)及葡萄糖淀粉酶(Glucoamylase, GAm)由北畑寿美雄博士提供，试验时BLA用pH6.0 10mM乙酸缓冲液—10mM乙酸钙溶液稀释，GAm用pH4.7 10mM乙酸缓冲液稀释。

2．蓝值和还原值的测定

作为BSA、BLA、及GAm作用的底物均为1%可溶性淀粉溶液，其溶媒分别对应为pH5.6 0.05M乙酸缓冲液、pH6.0 10mM乙酸缓冲液—10mM乙酸钙及pH4.7 10mM乙酸缓冲液。分别取各底物淀粉溶液20ml，一一对应加入酶溶液2ml，使用酶溶液的活性分别为BSA、BLA 1u/ml，GAm 3u/ml，40℃水浴保温，于15、30、60分钟、2小时及保温过夜(20小时)分别取样3ml，样品取出后即在沸水中10分钟灭酶，备用。测定蓝值时取样品0.5 ml加10mM KI—I_2溶液4ml，摇匀后加水至总体积20ml，在UV120—02分光光度计上测定660nm处光密度。以0.4 5ml底物同样加I_2溶液及水作为0小时光密度，以I_2溶液4ml补水至20ml作为参照零点。测定还原值时按前报索莫吉法测还原糖，取样量应根据该反应时间可能的糖浓度、底物浓度及分析方法线性范围来确定。

3．水解程度的测定

用水解过程中所取样品的还原糖含量与该水解系统完全水解应该产生还原糖量的比值作为这一样品的水解程度(%)。

对可溶性淀粉的试验使用1%可溶性淀粉溶液10ml，加入酶液(3u/ml) 1ml，40℃水浴保温，于15，30，90，270分钟及24小时取样测定，取样量依据取样时刻体系中还原糖

本文1985年9月26日收到。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的可能浓度而定，样品取出后立即放入索莫吉试剂中以终止反应。取此底物 1ml 加 2N HCl 1ml混匀后于 100℃ 水浴中加热 1 小时，加入约 10ml H_2O，用 1N NaOH 调 pH7(约 2ml)，补水至总体积 20ml，取 2ml 用索莫吉法测定，即淀粉完全水解应产生还原糖的量。

对直链淀粉的试验使用 0.1% 直链淀粉溶液 50ml，加入酶液(1u/ml)5ml，40℃ 保温于 15，30，60，90，270 分钟取样测定。完全水解可用 5ml 0.1% 直链淀粉与 5ml 2N HCl 混合后 100℃ 水解 1 小时，中和后定容 25ml，取 3ml 测定。

直链淀粉溶液的制备为：称取一定量直链淀粉，加入 10 倍量的乙醇，100 倍水和 60 倍 1N NaOH 溶液保持过夜，使之溶解，然后分别加入上述不同的缓冲液，至缓冲液浓度 0.05M，加水至接近直链淀粉浓度 0.1%，在 PH 计控制和磁力搅拌器连续搅拌下滴加 1N HCl 使达到各酶所需 pH 条件，注意控制加酸速率，避免局部过酸，引起沉淀。

4．寡糖图谱法

以 2% 可溶性淀粉溶液 200μl 作底物，分别加入浓度为 BSA 2u/ml，BLA 2u/ml，GAm 0.5u/ml 的酶液 50μl 混合，40℃ 水浴保温，在 0.5，1，2，5，20 小时取样，20μl 样品点于层析纸上。以糖原作底物时使用 2% 糖原溶液 100μl，加酶液 25μl，酶液浓度为 BSA，BLA 8u/ml，GAm 1u/ml，其余同可溶性淀粉。

层析条件：东洋滤纸 50 号 20×18 厘米。40～50℃ 烘箱中上升法层析 4 次，每次时间 2 小时，或在室温下每次层析过夜。每次层析结束在同一烘箱中通风吹干。

展开剂系统：正丁醇——吡啶——水 = 6：4：3(体积比)。

显色方法：碱性硝酸银法[3]。溶液 *a* 为饱和硝酸银溶液 1 份，水 6 份，丙酮 200 份的混合物，层析滤纸先在此液中完全浸湿，然后整张滤纸均匀地放入溶液 *b* 中，溶液 *b* 组成为 1%NaOH 1 份加乙醇 5 份，再在溶液 *c* (20mM $Na_2S_2O_3$ 溶液) 中清除背景，最后用清水洗 30 分钟。

5．高压液相色谱法

柱：称取 Polygosil 60－10NH_2 4.25g 悬浮于甘油 35%，甲醇 65% 的溶液中，装入 4×300mm 柱中备用。

流动相：乙腈—水(65：35)，流速 1.5ml/min，

进样量：50μl。

样品制备：2% 麦芽四糖 200μl 和 BSA(10u/ml)20μl 混合，水浴 40℃ 保温，在 30，60，120 分钟分别取样 50μl 加入已有 20μl 0.1N HCl 的试管中，使之立即停止作用，此即测定用样品。

6．糖基转移作用的测定

底物为 5% 蔗糖和可溶性淀粉溶液，即 150mg 可溶性淀粉溶于 3ml 0.05M pH5.6 乙酸缓冲液中，再加入 150mg 蔗糖使之溶解。取此底物 200μl，加入活性为 4u/ml 的 BSA 溶液 50μl，混合，40℃保温，0.5，1，2，5 小时分别取样 20μl，层析滤纸点样 10μl。以偶联糖(Coupling sugar) 5 倍稀释液作为标准点样 10μl。偶联糖为果糖(F)、蔗糖(GF)、麦芽糖苷果糖(G2F)、麦芽三糖苷果糖(G3F)等等的混合物。层析系统及条件如方法 4 。

显色方法：为验证产物中果糖残基的存在，使用间苯三酚试剂系统显色。试剂系统由 0.7% 间苯三酚丙酮溶液 9 份与 40% 三氯乙酸水溶液 1 份组成，经层析后的滤纸浸于此显色剂中，然后在空气中干燥，再在烘箱中 100～110℃ 加热 5 分钟，红棕色斑点出现。使用

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

荧光灯照射，在红棕色斑点中呈现含果糖残基的低聚糖的特征性荧光，从而确证糖基转移作用的发生。

三、结果与讨论

1．由淀粉水解过程中蓝值与还原性产物产生量的关系分析降解作用

淀粉遇碘产生的蓝色与淀粉多糖分子的聚合程度有关，随着水解过程淀粉链的切断，碘反应颜色由蓝逐渐变为紫、红棕至棕色，用分光光度计测定反应物蓝值可以说明反应体系中残存多糖的最高聚合程度。另一方面，淀粉水解的同时产生还原性产物，不同的酶由于水解方式不同，产生还原性产物的速度也不同。因此，使用不同的酶分别对可溶性淀粉溶液进行水解作用，按方法 2 中所述间隔取样测定蓝值和还原值，作出曲线，就可初步推测不同的酶水解的不同方式。图 1 使用 BSA、BLA 和 GAm 作试验，所用酶溶液浓度分别为 1、1、3 u/ml。曲线表明，GAm 作用于淀粉时多糖分子的聚合程度下降很慢，而还原性产物的产生相对较快。反之，BLA 的作用使淀粉很快降解成低聚分子，但其还原性产生则较慢。BSA 的作用既区别于 GAm 又区别 BLA。

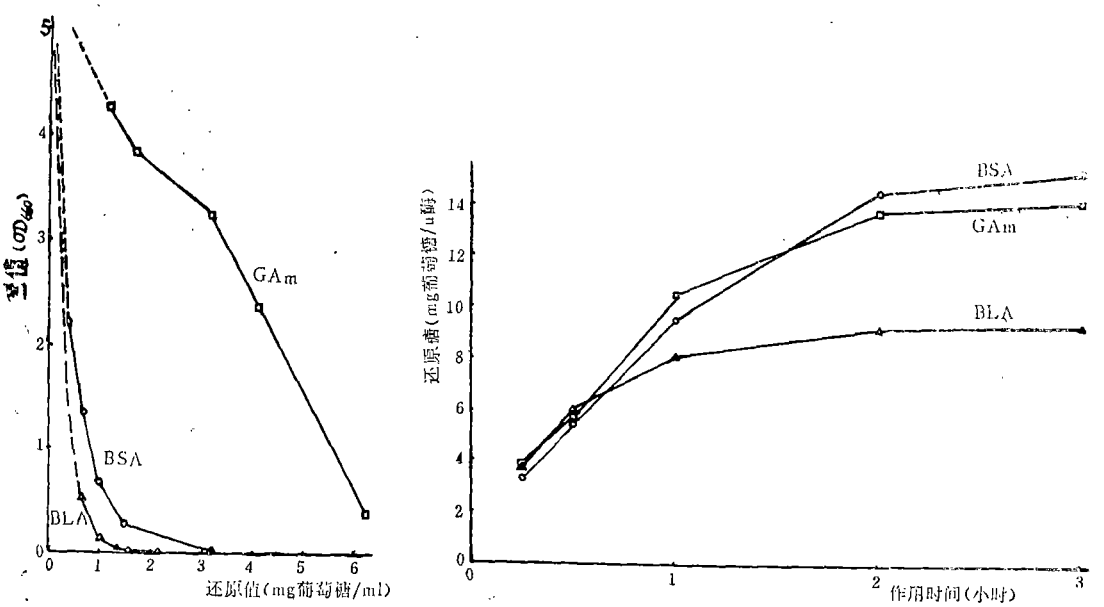


图 1　淀粉水解过程中蓝值与还原值变化的关系

左，还原值～蓝值　右，作用时间～产生的还原糖量。○ BSA、△ BLA、□ GAm

2．由不同底物水解最终程度分析

与上述水解方式的实验同时，也可以从不同的酶对于不同底物进行水解的最终程度来分析酶作用的位点和产物区别。按方法 3 中所述间隔取样测定还原糖产生量并计算水解百分率，作出曲线图 2 。由图可以看出以接近相同的酶活性的酶液作用于同一底物时，开始时的水解速率是接近。但随着作用时间的推移，三种酶的分解底物速率有了差别。GAm 水解产生还原性产物的速率最高，而 BLA 则最慢，这与前一试验的结果是一致的，并且分解速率都逐步下降，直至趋于平坦。各种酶均有不同的水解最终程度，这一过程表明酶最易发生切割作用的位点已逐步切开，按易难顺序逐步完成水解作用，直至残留下该酶无法水解的界限

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

糊精或一些极难水解的寡糖，为保证水解作用的充分，这里使用的酶量比较大。

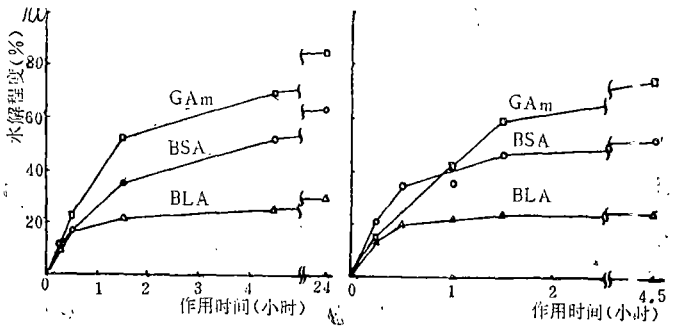
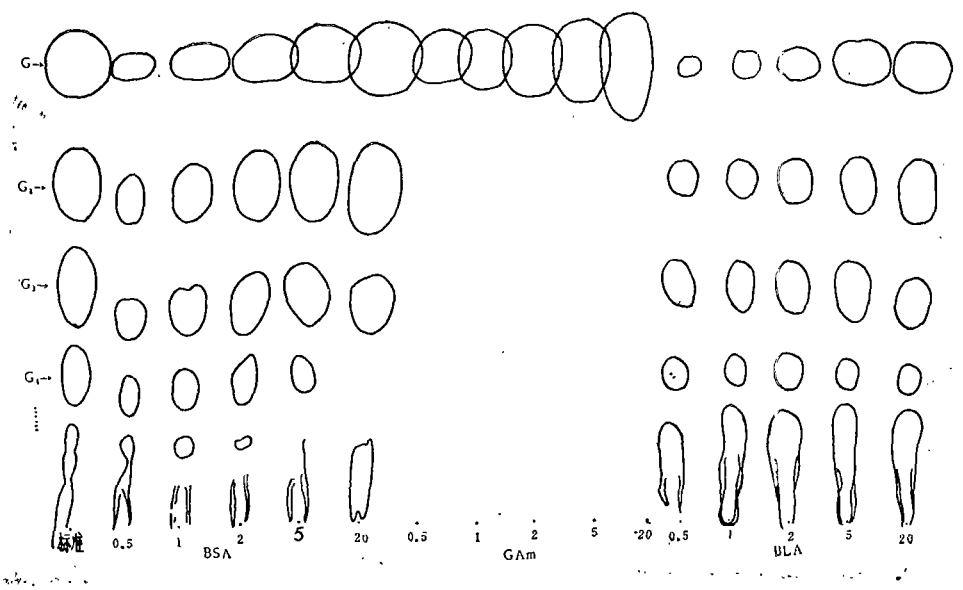


图 2 不同酶对于底物作用的最终水解程度

左为可溶性淀粉作底物 右为直链淀粉作底物

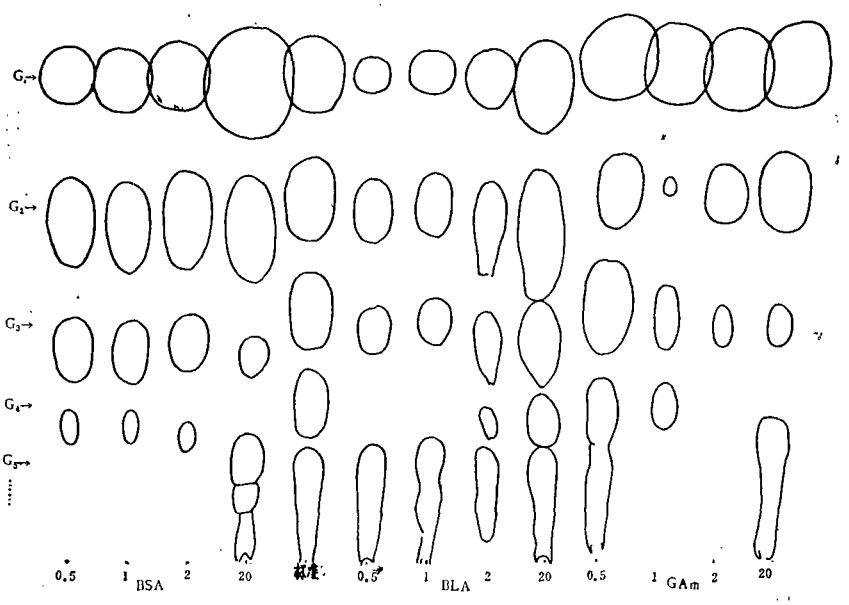
3．寡糖图谱法分析水解方式

由以上可知这三种不同的酶对于同一底物的水解最终程度及水解方式均有不同。为分析其水解方式可采用寡糖图谱法[4]。如方法 4 所述此三种酶对于可溶性淀粉作用所产生的低聚部分产物可在层析后区分。用图 3 可以看出 GAm 作用于淀粉时是逐个切下葡萄糖单元，不能检出低聚糖的存在；BLA 的水解产物中 G1—G4 共同存在，即使水解时间延长至过夜，G2—G4 仍然存在，G2 与 G1 的量基本上平行增加；而 BSA 的水解产物随水解时间的推移 G4 及以上的低聚糖趋于不可检出，G1 与 G2 几乎平行增加，产生的量比 BLA 多。从 G4 以上低聚糖的产生也可看出此三酶的不同，GAm 不产生此类寡糖，BLA 在反应一开始即产生各种低聚糖，从而蓝碘反应迅速消失，BSA 只有在延长作用时间后才逐步可见少量 G4 以上低聚糖，实际上这已经接近于切割的界限产物，而 BLA 产生的低聚糖是随机产生的。同样，对于糖原的作用呈现出类似的结果，此时 GAm 分解产物中出现 G2 为分支点 1,6 键结二糖，BSA 中 G3 渐减少而与 BLA 的产物有明显区别，BSA 中 G4 产物的增加是残留的



(甲)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



(乙)

图 3　寡 糖 图 谱 法

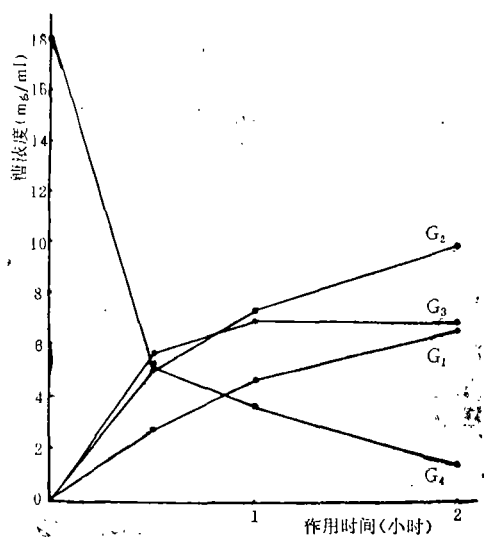
(甲)为底物可溶性淀粉

(乙)为 底 物 糖 原

不被 BSA 分解的支链低聚糖 $\begin{matrix} G \\ | \\ G-G-G \end{matrix}$[5]。

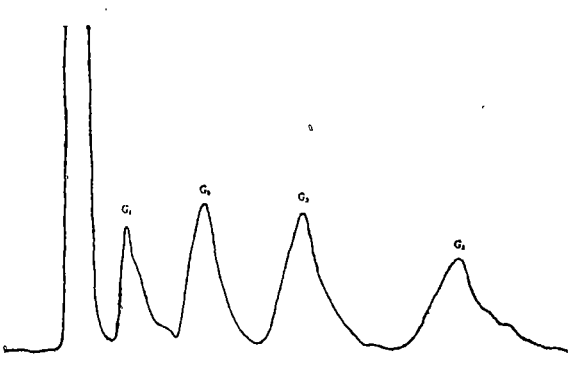
4．高压液相色谱法分析水解方式

使用高压液相色谱法可进行低聚糖的分离测定[6]，为进一步确定各阶段各种产物的定量关系，采用高压液相色谱法进行试验。由于淀粉高聚分子对于色谱柱是不利的，这里以麦芽四糖(G4)作为底物。BSA 作用于 G4 后按方法 5 测定产物可得图 4 。可见，麦芽四糖在 BSA 作用下的切割位点可以在 3—4，2—3 键上，产生 G1、G2 与 G3 是同时的，但G3

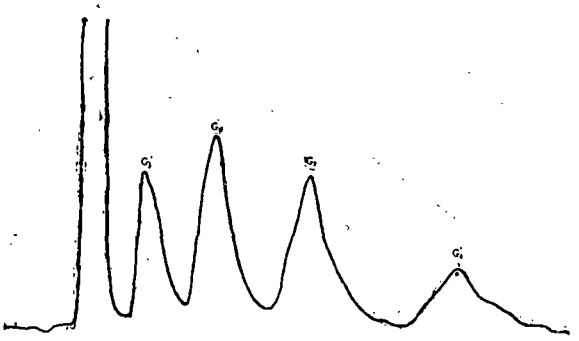


(甲)

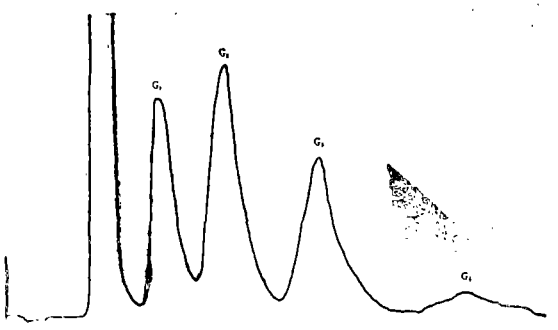
?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



(乙a)



(乙b)



(乙c)

图 4 BSA 对麦芽四糖的水解作用

甲为各种低聚糖浓度的变化曲线
乙为高压液相色谱图 a—30分钟后
b—60分钟后 c—120分钟，

与 G1 的和在 30 分钟样中大于 G2，说明在 3—4 位上的切割更有效一些。随后 G3 可进一步被切割产生 G2 与 G1。因此随着 G4 的水解，G3 的增加与水解减少在一段时间内形成平衡，G3 的变化很小，而 G1、G2 同时增加。

5. BSA 分子间糖基转移作用

环状糊精糖基转移酶 (Cyclodextrin Glycosyltransferase) 具有将淀粉转变为环状糊精的分子内转糖基作用，同时存在将淀粉等的糖基转移到合适的受体（如葡萄糖、蔗糖或木糖）上去的分子间转糖基作用[7][8]。以蔗糖为受体生产的偶联糖 (Coupling Sugar) 成为既能保持蔗糖甜味，又能防止糖类对牙齿的腐蚀作用的有价值的糖质而受到重视和应用[9]。考察 BSA是否具有转移作用，按方法 6 使BSA

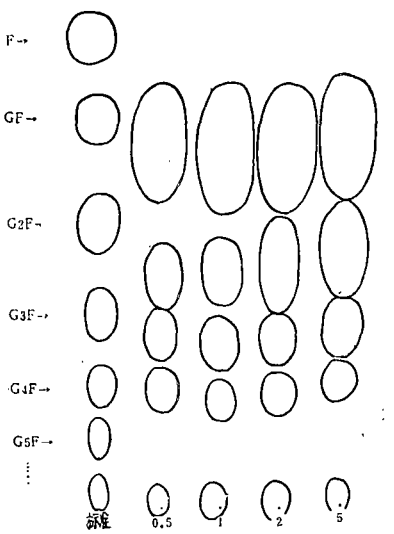


图 5 BSA的分子间糖基转移作用
标准为偶联糖，含F、GF、G2F、G3F等。

作用于蔗糖和可溶性淀粉溶液体系，结果的层析图如图 5 所示，表明BSA具有一定的催化糖基转移的能力。

由以上实验结果可分析 BSA 催化作用的一些特点。当 BSA 作用于直链淀粉、支链淀粉或糖原时，其切割作用是随机的，切割对象是 α-1,4 葡萄糖苷键。由于随机切割作用使底物的聚合度下降比 GAm 快得多。但 BSA 对中等聚合程度的分子切割以 G3—G4 位之间的切割优先，切点比 BLA 的多 (BLA 优先切割 G6—G7 之间)，相对讲最高聚合度的中间物被

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

切割得比 BLA 慢。BSA 对 α-1,6- 葡萄糖苷键无催化裂解作用，作用于支链淀粉或糖原时最终残留以异麦芽糖苷麦芽糖(G 为主的分支点不可切割物。BSA 对于 G6以下

G—G—G)

低聚糖有切割能力，对于 G3 尚有较弱的切割力，水解最终以 G、G2 为主，而 BLA 对 G6 及以下寡糖均不能作用，造成 G～G6 一系列产物，因此 BSA 的最终水解程度要比BLA 高。由于 BSA 具有特征性的 α-淀粉酶活力，且水解产物以 G、G2 为主，再加上具有一定的糖基转移能力，所以可在工业上发挥特殊的作用。

(全文完)

参 考 文 献

[1] 陶文沂等，《无锡轻工业学院学报》，**3**(2)，9～16(1984)

[2] 陶文沂等，《无锡轻工业学院学报》，**3**(2)，17～26(1984)

[3] N.E.Welker and L.L.Campbell, *J.Bacteriol.*, **86**,681(1963)

[4] John H.Pazur and Shigetaka Okada, *J.Biol. Chem.*, **241**,4146(1966)

[5] Shigetaka Okada, Sumio Kitahata, et al, *Agric. Biol. Chem.*, **33**,900(1969)

[6] 北畑寿美雄、吉川惠温等《淀粉科学》，**25**，19(1978)

[7] S.Kitahata, S.Okada et al, *Agric. Biol. Chem.*, **42**,2369(1978)

[8] S.Kitahata and S.Okada, *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **29**,7(1982)

[9] 北畑寿美雄等，《淀粉科学》，**28**，142(1981)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

86010

枯草芽孢杆菌糖化型α-淀粉酶的研究(Ⅲ)一酶的催化作用《无锡轻工业学院学报》1986年，第5卷，第2期

主题词 淀粉酶；枯草杆菌；酶；催化／枯草芽孢杆菌；糖化型α-淀粉酶；催化作用

摘 要 糖化型α-淀粉酶(BSA)作用于淀粉时与液化型α-淀粉酶(BLA)具有相同的基本特性——随机切割α-1.4葡萄糖苷键，产生小分子糊精、低聚糖。BSA能水解低聚糖(G7-G4)，且对G3有一定的分解力，主要产物为G2和G。其水解淀粉程度比BLA彻底，同一蓝值时产生的还原端比BLA多。BSA不能切割1.6-葡萄糖苷键，作用于支链淀粉时残留异麦芽糖苷麦芽糖BSA还有一定的分子间糖基转移催化活性。

作者：陶文沂　北畑寿美雄(日)　冈田茂孝(日)

86011

浸入式折光计测定啤酒原麦汁浓度《无锡轻工业学院学报》1986年，第5卷，第2期

主题词 啤酒；麦芽汁；浸渍法；折光仪/浸入式

摘 要 本文叙述用浸入式折光计测定啤酒的原麦汁浓度具有快速、准确、连续测定的优点。通过实例，对折光法与蒸馏法进行了比较。

作者：赵光鳌

86012

菜籽加工工艺的初步探讨——芥子甙在各主要加工过程中的分解

《无锡轻工业学院学报》1986年，第5卷，第2期

主题词 甙；腈；分解/芥子甙；菜籽

摘 要 本文通过对菜籽加工工艺中蒸炒，预榨和浸出脱溶三个主要加工阶段的芥子甙分解产物的提取，纯化，色谱分析以及质谱分析，鉴定出样品中芥子甙分解产物主要有四种腈，预期的芥子甙分解产物ITC和OZT却没有发现。色谱分析的峰面积表明：在菜籽的这些加工阶段中，腈的含量是不同的，以脱溶液中的含量为最高，由所得结果可以推测，现行加工工艺条件有利于芥子甙的热分解的腈类的生成，因而在菜籽粕中主要的分解产物是腈类化合物。

作者：华欲飞　华　东　刘复光

86013

粮食立筒仓减压管的研究《无锡轻工业学院学报》1986年，第5卷，第2期

主题词 筒仓；减压装量；粮食/减压管

摘 要 本文介绍了我国首次对粮食立筒仓减压管进行的研究，包括模拟试验和生产试验的结果。通过模拟试验得到的减压管合理参数，对实际应用有指导意义。

作者：戴则佑

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

86012

A TENTATIVE STUDY of the RAPESEED PROCESSING The DECOMPOSITION of GIUCOSINOLATES in SEVERAL PROCESSING STUGES «Journal of the Wuxi Institute of Light Industry», Vol.5, No.2, 1986

SUBJECTWORD Rapeseed; Nitrile; decompsition/Glucosinolate;

ABSTRACT By pretreatig the extract to remove impurities. SCOT-Column GLC and GC—MS analysis, four nitriles are found in the extract of steam frying rapeseed, prepress cake and steam dehexane meal. The expected glucosinolate decomposition products ITCS and OZT are not found. The peak of GLC Chromatograph indicates that the contentes of nitriles in these rapeseed processing stages are different and the steam dehexane meal has the largest content. It is inferred that the currently used rapeseed processing conditions seem to be in favor of the thermal decomposition of glucosinolates Therefore. the predominate decomposition products in rapeseed meal are nitriles

Author: Hua Yufei, Hua Tung, Liu Fukuang

86013

THE STUDY ABOUT DEPRESSION COLUMN of GRAIN SILO «Journal of the Wuxi Institute of Light Industry», Vol.5, No.2, 1986

SUBJECTWORD silo pressure relief device; grain/depression column.

ABSTRACT The study about depression column of grain silo. Including the results of simulated and industrial test, which carried out first time in china, is recommended. The reasonable paremeters for design of depression column of grain silo are determined, and can be used for practical purposes effectively.

Author: Dai Zeyou

86010

STUDIES on BACTERIAL SACCHAROGENIC α-AMYLASE (BSA) FROM Bacillus subtilis (III) —The CATALYTIC ACTION of the ENZYME BSA «Journal of the Wuxi Institute of Light Industry», Vol.5, No.2, 1986

SUBJECTWORD Amylase; Bacillus subtilis; Enzyme; Catalyst/Bacillus Subtilis; Bacterial Saccharogenic α-Amylase (BSA); Catalytic action

ABSTRACT The foundamental properties of Saccharogenic α-amylase is similar to liquefying α-amylase when they act on starch. They cut α-1.4-glucoside bond randomly, produce lower dextrin and oligosaccharides. BSA is able to hydrolyze oligosaccharides (G7—G4) and has a weak ability for hydrolyzing G3, the main products are G2 and G. As compared with BLA, BSA can split starch more completely. The reducing ends produced by BSA are more than that produced by BLA when the blue values are at the same level. Being not able to cut α-1.6glucoside bond, isomaltosyl, maltose G4 may be remained when amylopectin or glycogen is acted In addition, BSA has some catalytic activity for intermolecular transglycosylation.

Author: Tao wenyi

S. Kitahata, S. Okada (Osaka Municipal Technical Research Institute, Japan)

86011

The DETERMINATION of BEAR ORIGINAL WORT CONCENTRATION USING DIPPING REFRACTOMETER «Journal of the Wuxi Institute of Light Industry», Vol.5, No.2, 1986

SUBJECTWORD Beer; mort; Dipping; refractometer/Dipping refractometer.

ABSTRACT The method using dipping refractometer to determined the beer original wort concentration is described. The advantages of this method are rapid, accurate and continuous. Some Comparisons are made between the refractometry and distillation by means of the living examples.

Author: Zhao Guangao