

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.06.001

β -淀粉酶的分离纯化及酶学性质研究^①

陶 敏¹, 杨 浩¹, 白亚娟¹, 郭小路²,
唐 菁¹, 傅玉凡¹, 唐云明¹

1. 西南大学 生命科学学院/重庆市甘薯工程研究中心/三峡库区教育部重点实验室, 重庆 400715;
2. 丰都县生态环境监测站, 重庆 408299

摘要: 以“渝薯 17”为实验材料, 从淀粉生产废水中分离纯化 β -淀粉酶. 去皮、1:10(m/V)匀浆抽提, 经过乙醇分级沉淀、DEAE-Sepharose 离子交换层析和 Superdex-200 凝胶过滤层析获得电泳纯 β -淀粉酶并对其酶学性质进行了研究. 结果表明: 该酶的比活力高达 333.15 U/mg, 显著高于市售枯草杆菌来源酶活(50 U/mg); 纯化倍数 9.93 倍, 回收率 66.60%; 亚基分子量约为 55.12 kD, 全酶分子量约为 223.54 kD; 最适温度 50 °C, 最适 pH 值 6.2; 50 °C 以下, pH 值 6~8 具较好的稳定性. 在最适条件下以可溶性淀粉为底物, 测得 K_m 为 0.001 36 g/mL, V_{max} 为 0.112 mg/mL·min; Mn^{2+} , Pb^{2+} , Li^+ , Zn^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , 草酸, SDS 对该酶有不同程度的抑制作用, Co^{2+} 有激活作用, 有机物作用不明显.

关键词: 甘薯; β -淀粉酶; 分离纯化; 酶学性质

中图分类号: Q946.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)06-0001-08

中国的甘薯种植面积占世界 50% 以上, 是全球的甘薯生产大国^[1-2]. 甘薯富含纤维、淀粉、维生素和蛋白质等^[3]. 甘薯淀粉生产会产生大量废水, 废水中富含水溶性物质, 如 β -淀粉酶(1, 4- α -D-glucan maltohydrolase EC3.2.1.2)的含量非常高^[4], 回收该 β -淀粉酶可创造巨大的经济效益. 我国甘薯消费以鲜食和加工为主, 由于甘薯品种多元化, 因此推广面积有所增加. 研究和利用高淀粉甘薯品种的一个重要任务就是探究 β -淀粉酶性质. β -淀粉酶是一种外切酶, 在高等植物内比较常见, 断裂淀粉的非还原性末端的 α -1, 4 糖苷键, 逐个除去二糖单位, 最后形成大约 50% 的麦芽糖和大分子核心—— β -极限糊精^[5]. β -淀粉酶多用于医药、酿造、纺织以及食品加工行业^[6], 在食品发酵方面可以作为饮料、啤酒等生产的糖化剂; 在啤酒酿造上, 利用 β -淀粉酶代替麦芽, 可节约麦芽用量, 辅料比可提高 50%~75%^[7]; 在食品行业, 主要用来生产麦芽糊精、麦芽糖和麦芽糖浆. 不同物种、同物种不同品系来源的 β -淀粉酶, 其特点和含量差别较大^[8-9]; 不同的提取分离纯化方法其纯化效果也有较大差别^[10-11]. 本实验以重庆市甘薯工程研究中心综合应用型甘薯品种“渝薯 17”为实验材料, 分离纯化 β -淀粉酶并研究其酶学性质, 为综合利用和深度开发 β -

① 收稿日期: 2017-08-03

基金项目: 重庆市科委项目(cstc2015shms-ztx80002).

作者简介: 陶 敏(1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事蛋白质与酶工程研究.

通信作者: 唐云明, 教授, 博士.

淀粉酶奠定理论基础.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜“渝薯 17”块根,由重庆市甘薯工程研究中心实验基地提供.

DEAE-Sepharose、Superdex-200、蛋白质 SDS-PAGE Marker 标准品、Superdex-200 凝胶层析分子量标准品(美国 GE Healthcare 公司);葡聚糖 2000(瑞典 Pharmacia 公司);甲叉-双丙烯酰胺、丙烯酰胺(瑞士 Fluka 公司);考马斯亮蓝 R-250(美国 Bio-Rad 公司);考马斯亮蓝 G-250(美国 Sigma 公司).其他试剂均为国产分析纯.

1.2 仪器与设备

精密电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);多功能食品加工机(德清拜杰电器有限公司);pH 计(上海理达仪器厂);高速冷冻离心机(美国 Thermo Scientific 公司);电泳仪、蛋白质纯化收集系统、垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司);冷冻干燥机(德国 Uni Equip 公司);超纯水仪(美国 Millipore 公司);紫外分光光度计 UV-2550(日本岛津公司);恒温水浴锅(常州易晨仪器制造有限公司)等.

1.3 实验方法

1.3.1 β -淀粉酶活力测定

β -淀粉酶活力测定采用 DNS 法^[12]:反应体系 2.05 mL,1 mL 0.05 mol/L pH 值 5.6 柠檬酸缓冲液,0.5 mL 1%可溶性淀粉,50 μ L 酶液,37 $^{\circ}$ C 保温 3 min,0.5 mL 终止液 DNS,沸水浴 5 min,冷却至室温,加 15 mL 去离子水,混合均匀,测 OD 540 nm 吸光值.对照组先加 DNS 后加酶液.酶活力单位(U)定义:在实验条件下(37 $^{\circ}$ C, pH 值 5.6),以每分钟催化底物(淀粉)产生 1 mg 麦芽糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(U).

1.3.2 蛋白质浓度测定

在凝胶层析前采用紫外分光光度法测蛋白质浓度,凝胶层析后用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度^[13].

1.3.3 β -淀粉酶粗酶液的制备

取 10 g 新鲜“渝薯 17”样品,按 1:10(m/V)加入预冷的 0.05 mol/L pH 值 7.0 Tris-HCl 匀浆,4 $^{\circ}$ C 抽提 2 h,纱布过滤,离心 30 min(4 $^{\circ}$ C, 4 700 r/min),上清液即为 β -淀粉酶的粗酶液.

1.3.4 乙醇分级沉淀

向粗酶液中加入预冷乙醇至乙醇浓度为 40%,静置 2 h(4 $^{\circ}$ C),4 700 r/min(4 $^{\circ}$ C)离心 30 min,继续向上清液中加预冷乙醇至乙醇浓度 60%,4 $^{\circ}$ C 静置 2 h,4 700 r/min(4 $^{\circ}$ C)离心 30 min,弃上清,沉淀用 10 mL 0.05 mol/L pH 值 7.0 Tris-HCl 溶解,即为 β -淀粉酶初酶液.

1.3.5 DEAE-Sepharose 离子交换层析

用 0.05 mol/L pH 值 7.0 Tris-HCl(含 1 mol/L NaCl)缓冲液洗脱 DEAE-Sepharose 离子交换层析柱 300 mL(3~4 个柱床体积),再用 0.05 mol/L pH 值 7.0 Tris-HCl 平衡 300 mL,流速 1 mL/min.取 10 mL 初酶液上样,用 0~0.5 mol/L NaCl(0.05 mol/L pH 值 7.0 Tris-HCl 配制)进行线性洗脱,流速 0.5 mL/min,每管收集 5 mL.测每管 β -淀粉酶活力和蛋白含量.

1.3.6 Superdex-200 凝胶过滤层析

用 0.05 mol/L pH 值 7.0 Tris-HCl 缓冲液平衡 Superdex-200 凝胶过滤层析柱 2~3 个柱床体积.将 DEAE-Sepharose 酶活管浓缩成 5 mL 样品上样,0.05 mol/L pH 值 7.0 Tris-HCl 缓冲液洗脱,流速 0.3 mL/min,每管收集 3 mL.测每管酶活力及蛋白含量.收集酶活峰酶液,去离子水透析 48 h(4 $^{\circ}$ C)

后冷冻干燥.

1.3.7 β -淀粉酶纯度鉴定与全酶分子量测定

用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行 β -淀粉酶亚基分子量计算和纯度鉴定. SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶质量分数分别为 12%和 5%, 上样量 10 μ L. 通过 SDS-PAGE 测定 β -淀粉酶亚基分子量, 通过 Superdex-200 测定其全酶分子量.

1.3.8 最适反应温度与温度稳定性

取经“1.3.6”步骤纯化并稀释一定倍数的酶液, 在 pH 值 5.6、不同温度(25~70 $^{\circ}$ C)下测定 β -淀粉酶活力, 最高酶活力设置为 100%, 计算各温度下 β -淀粉酶的相对酶活力, 确定最适反应温度. 将纯化的酶液稀释, 置于不同温度条件(20~60 $^{\circ}$ C)下, 按照“1.3.1”方法, 每隔 30 min 测一次酶活, 未保温的酶活力设置为 100%, 计算不同时间及不同温度条件下 β -淀粉酶的相对酶活, 研究该酶的热稳定性.

1.3.9 最适反应 pH 值与 pH 值稳定性

取纯化并稀释一定倍数的酶液, 在 37 $^{\circ}$ C、不同 pH 值(3.0~10.0)下测定 β -淀粉酶活力, 最高酶活力设定为 100%, 测定各 pH 值下 β -淀粉酶相对酶活力, 确定最适反应 pH 值. 将纯化的酶液稀释, 取 100 μ L 与不同 pH 值(4.0~10.0)缓冲液等体积混合, 静置 3 h(4 $^{\circ}$ C), 每隔 30 min 测一次酶活力, 以相同酶液与去离子水等体积混合测得的酶活力为 100%, 计算不同 pH 值、不同时间 β -淀粉酶的相对酶活力, 研究该酶的 pH 值稳定性.

1.3.10 不同金属离子对 β -淀粉酶活性影响

将不同浓度(10~50 mmol/L)、不同金属离子和稀释一定倍数的 β -淀粉酶纯化酶液 1:1 混合, 静置 30 min(4 $^{\circ}$ C)后测酶活力. 以等体积的酶液与去离子水混合作为对空白对照, 酶活力设为 100%, 测不同浓度以及不同金属离子对 β -淀粉酶的相对酶活.

1.3.11 不同化合物对 β 淀粉酶活性影响

以去离子水与稀释一定倍数的酶液等体积混合作对照, 酶活力设定为 100%, 将不同浓度(5~25 mmol/L)的抗坏血酸(Vc)、尿素、乙二胺四乙酸(EDTA)、草酸、十二烷基硫酸钠(SDS)分别与相同酶液等体积混合, 静置 30 min(4 $^{\circ}$ C)后测相对酶活力, 研究不同浓度、不同化合物对 β -淀粉酶的影响.

1.3.12 不同有机物对 β -淀粉酶活性影响

将不同体积分数(10%~50%)的甲醇、乙醇、正丙醇、正丁醇和稀释一定倍数的 β -淀粉酶酶液 1:1 混合, 对照组同“1.3.11”, 静置 30 min(4 $^{\circ}$ C)后测相对酶活力, 研究不同浓度、不同有机物浓度对 β -淀粉酶的影响.

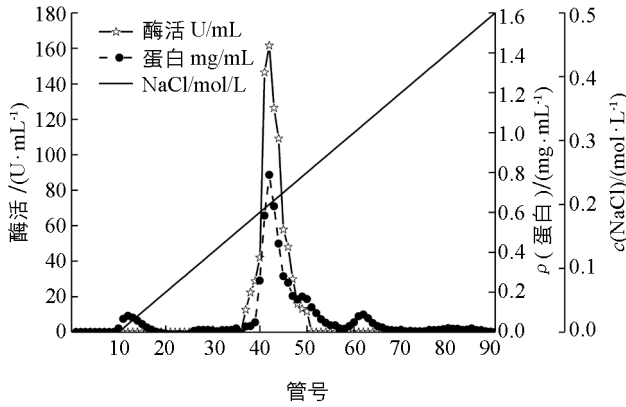
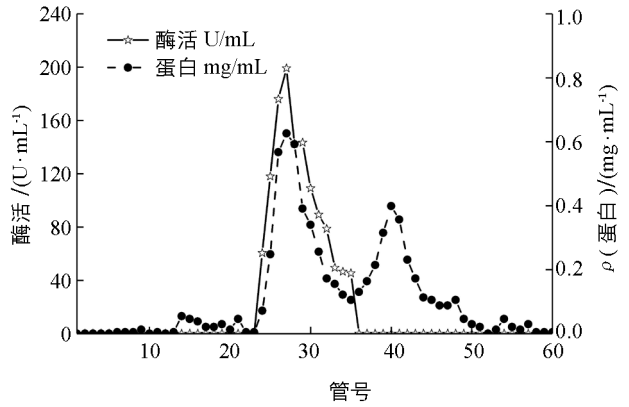
1.3.13 β -淀粉酶最大反应速率(V_{\max})与米氏常数(K_m)的测定

配制不同浓度(0.1%~0.8%)的可溶性淀粉溶液, 在最适反应条件下测 β -淀粉酶活力, 采用双倒数(Lineweaver-Burk)作图法, 求 β -淀粉酶的 K_m 值和 V_{\max} .

2 结果与分析

2.1 β -淀粉酶的分离纯化

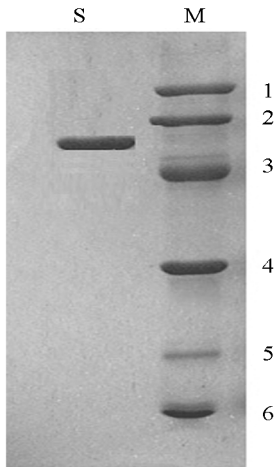
β -淀粉酶经 DEAE-Sepharose 离子交换层析后, 酶活峰主要集中在 38—49 号管(图 1), 42 管酶活性最高, 收集酶活性较高管的酶液浓缩上样, 经 Superdex-200 凝胶过滤层析后, 酶活峰集中于 24—35 号管(图 2), 27 管酶活最高, 用去离子水透析 48 h, 冷冻干燥后进行 SDS-PAGE, 结果显示单一条带(图 3), 说明该 β -淀粉酶已经达到电泳纯. 10 g 鲜质量甘薯的 β -淀粉酶纯化结果如表 1 所示.

图 1 β -淀粉酶 DEAE-Sepharose 离子交换层析图 2 β -淀粉酶 Superdex-200 凝胶过滤层析表 1 10 g 鲜质量“渝薯 17”中 β -淀粉酶分离纯化结果

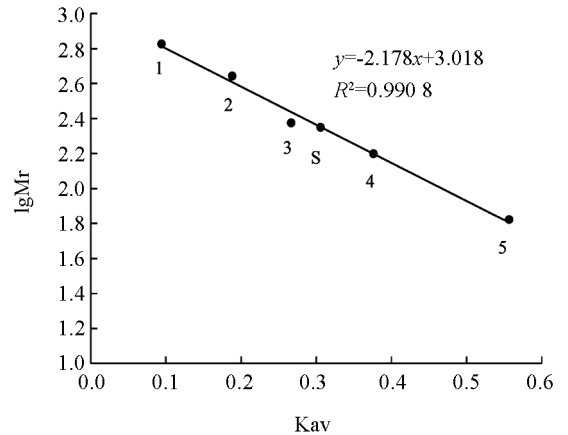
纯化步骤	总酶活/ IU	总蛋白/ mg	比活力/ (U · mg ⁻¹)	回收率/ %	纯化倍数
粗酶液	5 667.53	169.01	33.53	100	1
乙醇沉淀	4 953.51	29.32	168.95	87.40	5.04
DEAE-Sepharose 层析	4 069.94	19.31	210.77	71.81	6.29
Superdex-200 层析	3 774.57	11.33	333.15	66.60	9.93

2.2 β -淀粉酶全酶分子量测定与纯度鉴定

经 SDS-PAGE 测得 β -淀粉酶的亚基分子量约为 55.12 kD(图 3), 经过 Superdex-200 测得全酶分子量约为 223.54 kD(图 4), 推算 β -淀粉酶由 4 个相同的亚基构成。



M 分子质量标准品: 1. 兔磷酸化酶 B 97.20 kD; 2. 牛血清蛋白 66.40 kD; 3. 鸡卵清蛋白 44.30 kD; 4. 牛碳酸酐酶 29.00 kD; 5. 大豆胰蛋白酶抑制剂 20.10 kD; 6. 鸡蛋白溶菌酶 14.30 kD; S. β -淀粉酶 55.12 kD。

图 3 β -淀粉酶的 SDS-PAGE 图谱

分子质量标准品: 1. 牛血清蛋白 66.45 kD; 2. 醛缩酶 158 kD; 3. 过氧化氢酶 232 kD; 4. 铁蛋白 440 kD; 4. 甲状腺球蛋白 669 kD; S. β -淀粉酶 223.54 kD。

图 4 Superdex-200 凝胶层析测 β -淀粉酶分子量

2.3 β -淀粉酶的部分酶学性质研究

2.3.1 最适反应温度与温度稳定性

实验结果表明,“渝薯 17” β -淀粉酶最适温度为 50 °C(图 5)。将酶放置在不同温度条件下孵育,随时间增长,20~50 °C 条件下相对酶活力基本不变;55 °C 相对酶活力 80% 以上;60 °C 条件下酶活力迅速降低,

30 min时相对酶活力 52.30%, 60 min时几近失活. 因此“渝薯 17” β -淀粉酶在 50 °C 以下具有良好的热稳定性(图 6).

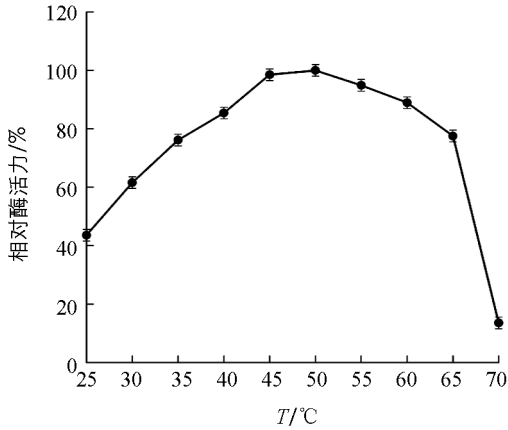


图 5 温度对 β -淀粉酶活力的影响

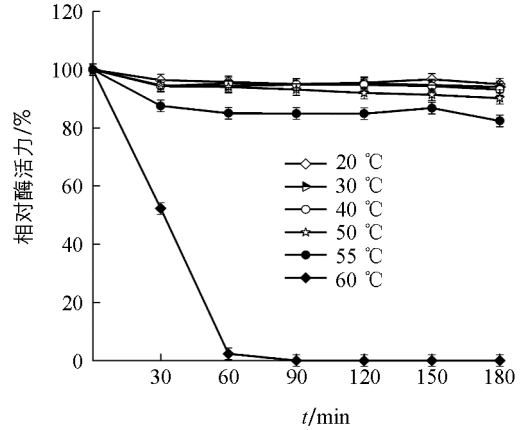


图 6 β -淀粉酶的热稳定性

2.3.2 最适反应 pH 值与 pH 值稳定性

为更准确研究“渝薯 17” β -淀粉酶最适 pH 值, 本实验 pH 值选择 3~5、7~10(间隔梯度 1), 5.4~6.8(间隔梯度 0.2)^[14]. 结果表明, 此酶最适 pH 值为 6.2(图 7). pH 值 3, 酶无活力, 随 pH 值增大, 相对酶活力先升高后降低. pH 值 5.8~6.6 范围内相对酶活力可达 90% 以上; pH 值 6.8 时, 相对酶活力力低于 80%; pH 值 10 时, 相对酶活力仅 17.4%. 将酶于不同 pH 值条件下保温, 随时间延长, pH 值 4, 5, 9, 10 相对酶活力逐渐降低; 180 min 时 pH 值 4, 5, 9 相对酶活力不及 80%, pH 值 10 仅 58.94%; pH 值为 6~8 时相对酶活力保持在 100% 左右. 因此, pH 值为 6~8 时 β -淀粉酶具有较好稳定性(图 8).

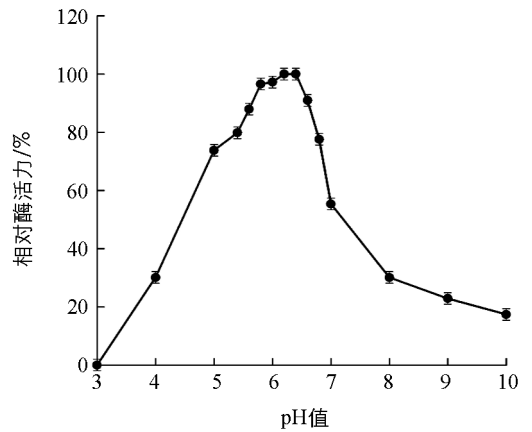


图 7 pH 值对 β -淀粉酶活力的影响

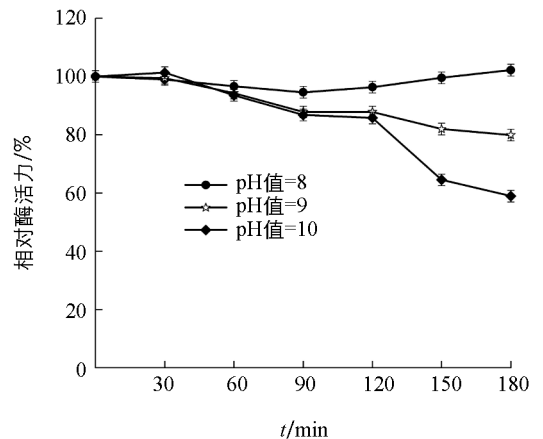
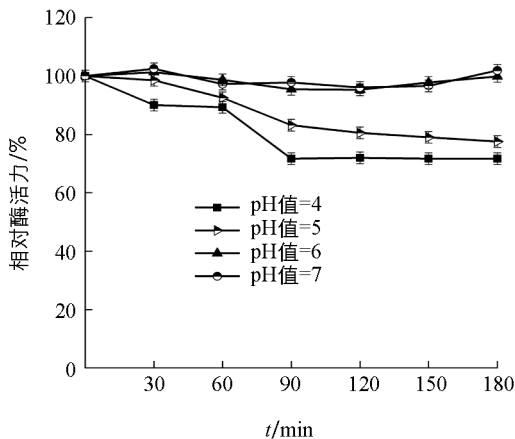
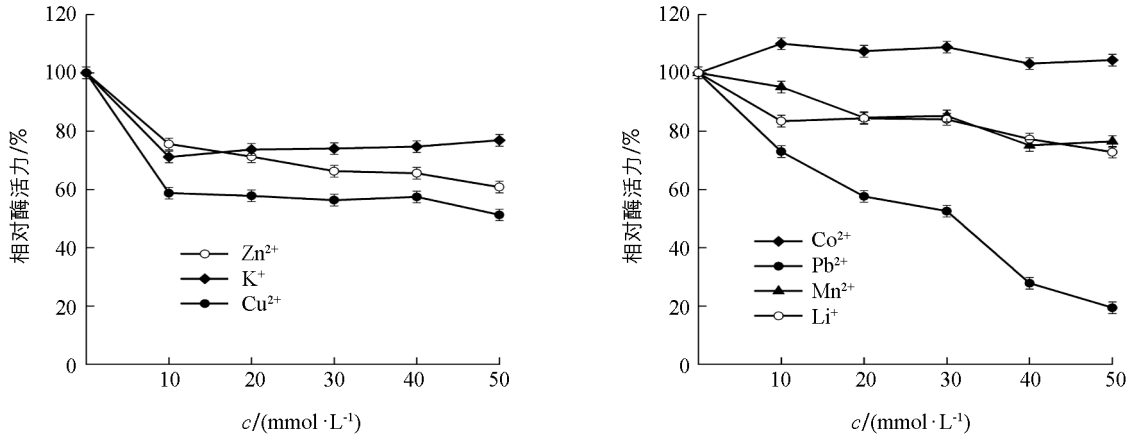


图 8 β -淀粉酶的 pH 值稳定性

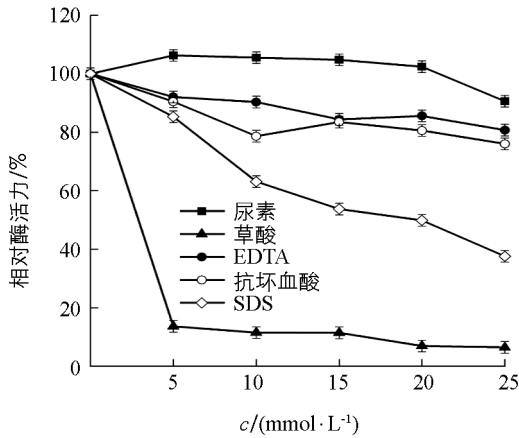
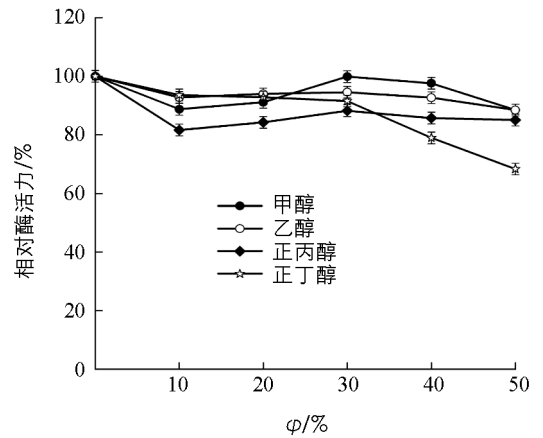
2.3.3 不同金属离子对 β -淀粉酶活性影响

结果表明(图 9), Co^{2+} 对该酶具有一定程度的激活作用; Mn^{2+} , Pb^{2+} , Li^{+} , Zn^{2+} , K^{+} , Cu^{2+} 对该酶有不同程度的抑制作用. 其中, Pb^{2+} 的抑制作用最大, 随其浓度增大, 相对酶活力逐渐降低, 当浓度达 50 mmol/L 时, 相对酶活力不足 20%.

图 9 不同金属离子对 β -淀粉酶活力的影响

2.3.4 不同化合物对 β -淀粉酶活性影响

结果显示(图 10), 草酸对 β -淀粉酶有明显的抑制作用, 5 mmol/L 时, 相对酶活力 13%; 25 mmol/L 时, 接近失活. SDS 对该酶也具有一定的抑制作用, 25 mmol/L 时, 相对酶活力为 37%. 低浓度尿素对 β -淀粉酶有激活作用, 5 mmol/L 时, 相对酶活力超过 100%; 10~20 mmol/L 时, 酶活力保持相对稳定; 25 mmol/L 时, 相对酶活力仍有 90.6%. EDTA 和抗坏血酸对该酶的影响作用不明显.

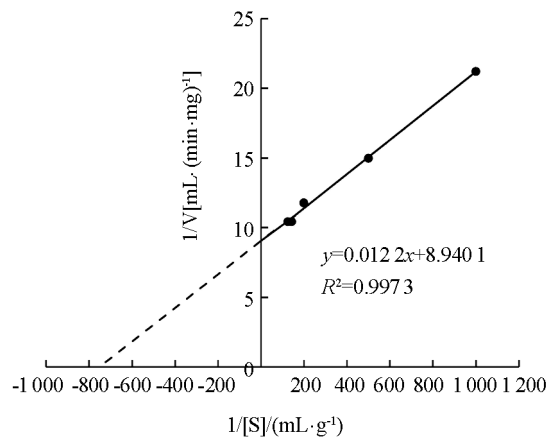
图 10 不同化合物对 β -淀粉酶活性影响图 11 不同有机物对 β -淀粉酶活性影响

2.3.5 不同有机物对 β -淀粉酶活性影响

4 种不同的有机溶剂对 β -淀粉酶有不同程度的影响(图 11). 甲醇、乙醇、正丙醇对酶活力影响不大, 正丁醇体积分数为 40% 时, 酶活性骤然下降, 体积分数为 50% 时, 相对酶活力仅有 68%.

2.3.6 β -淀粉酶米氏常数(K_m)与最大反应速率(V_{max})的测定

在最适反应条件下(50 °C, pH 值 6.2), 以不同质量分数的可溶性淀粉作为 β -淀粉酶反应底物, 测定其反应速率(V), 利用双倒数(Lineweaver-Burk)作图法计算 $1/V$ 与 $1/S$ 的关系(图 12), β -淀粉酶的 K_m 值为 0.001 36 g/mL, V_{max} 为 0.112 mg/mL · min.

图 12 双倒数法测 β -淀粉酶的米氏常数

3 讨论

本实验以 10 g“渝薯 17”样品 1:10(m/V)提取比例分离出 β -淀粉酶,粗酶液总酶活 5 667.53 U,比活力 33.53 U/mg. 经乙醇沉淀、DEAE-Sepharose 和 Superdex-200 层析后得到电泳纯酶,总酶活 3 774.57 U,比活力 333.15 U/mg,高于市售枯草杆菌来源酶活(50 U/mg),高于紫甘薯 Superdex-200 层析比活力 35.50 U/mg^[15]以及“宁紫 1 号”Superdex-75 层析 12.34 U/mg^[16];纯化倍数为 9.93 倍,高于“宁紫 1 号”(7.2 倍)^[16],低于“徐薯 18”(11.85 倍)^[17]和大豆乳清废液(16.49 倍)^[18]. 本实验酶回收率为 66.60%,高于紫甘薯(0.92%)^[15]、麦芽(41.1%)^[19]、大豆乳清(17.32%)^[18]和“宁紫 1 号”(16.7%)^[16].

“渝薯 17” β -淀粉酶的酶学性质与其他来源的有所不同^[17]. 该 β -淀粉酶的最适反应温度和 pH 值分别是 50 °C 和 6.2. 最适温度高于紫甘薯(40 °C, pH 值 6.8)^[15],低于大豆乳清(55 °C, pH 值 6.0)^[18],同麦芽(50 °C, pH 值 5.5)^[19]、甘薯(50 °C, pH 值 5.0)一致^[4];最适 pH 值高于麦芽^[19]、甘薯^[4]、大豆乳清^[18],低于紫甘薯^[15]. 亚基分子量约为 55.12 kD,全酶分子量约为 223.54 kD,与“徐薯 18”、大豆、紫甘薯和麦芽等^[16-19]的结果接近.

金属离子 Co^{2+} 对酶有一定的激活作用,原因可能是酶与金属离子、底物形成的三元复合物降低了反应活化能,进而提高反应速率^[25]; Mn^{2+} , Pb^{2+} , Li^{+} , Zn^{2+} , K^{+} 和 Cu^{2+} 对酶有不同程度的抑制作用. 其中, Pb^{2+} 抑制作用最大. 原因可能是在该金属离子影响下,酶的空间结构受到较严重影响,构象中心发生变化,使酶活降低^[20].

草酸对 β -淀粉酶的抑制作用很明显. 5 mmol/L 时,相对酶活只有 13%;浓度为 25 mmol/L 时,几乎失活. SDS 在一定程度上对该酶也有抑制作用,可能原因是 SDS 破坏酶分子中的氢键和疏水键,降低酶活性. 低浓度尿素对 β -淀粉酶有激活作用. EDTA 是金属螯合剂,能阻止 Pb^{2+} 等金属离子对酶的抑制作用,同时也阻止 Co^{2+} 等对酶的激活作用,故 EDTA 对 β -淀粉酶的影响不明显.

本实验提取了高纯度、高回收率、高纯化倍数的甘薯 β -淀粉酶,对甘薯淀粉生产中的废水利用可提供一定的技术指导. 实验过程统一使用同一缓冲液,操作更简便,适合于规模化生产.

参考文献:

- [1] 农业部科技教育司,财政部教科文司. 中国农业产业技术发展报告(2009 年度) [M]. 北京:中国农业出版社,2010.
- [2] 农业部科技教育司,财政部教科文司. 中国农业产业技术发展报告(2010 年度) [M]. 北京:中国农业出版社,2010.
- [3] 贾彦杰. 甘薯 β -淀粉酶提取纯化及酶学性质研究 [D]. 洛阳:河南科技大学,2011:6-42.
- [4] 马代夫,李强,曹清河,等. 中国甘薯产业及产业的发展与展望 [J]. 江苏农业学报,2012,28(5):969-973.
- [5] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学教程 [M]. 北京:高等教育出版社,2008.
- [6] AINA A J, FALADE K O, AKINGBALA J O, et al. Physicochemical Properties of Twenty-One Caribbean Sweet Potato Cultivars [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2009, 44(9): 1696 - 1704.
- [7] 张万利,梁新红,孙俊良,等. 离子交换层析分离纯化甘薯 β -淀粉酶 [J]. 河南科技学院学报(自然科学版),2017,45(2):23-28.
- [8] SWANSTON J S, molINA-CANO J L. Beta, Amylase Activity and Thermostability in Two Mutants Derived from the Malting Barley cv. Triumph [J]. Journal of Cereal Science, 2001, 33(2): 155-161.
- [9] VAN DAMME E J, HU J, BARRE A, et al. Purification, Characterization, Immunolocalization and Structural Analysis of the Abundant Cytoplasmic Beta-Amylase from Calystegia Sepium (Hedge Bindweed) Rhizomes [J]. Febs Journal, 2001, 268(23): 6263.
- [10] 田亚平,郭鸿飞,肖光焰,等. 一种麦芽 β -淀粉酶的纯化和特性研究 [J]. 食品工业科技,2003,24(9):22-24.
- [11] TEOTIA S, KHARE S K, GUPTA M N. An Efficient Purification Process for Sweet Potato Beta-Amylase by Affinity

Precipitation with Alginate [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2001, 28(9-10): 792.

- [12] SAGU S T, NSO E J, HOMANN T, et al. Extraction and Purification of Beta-Amylase from Stems of Abrus Precatorius by Three Phase Partitioning. [J]. *Food Chemistry*, 2015, 183: 144-153.
- [13] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [14] 王丹, 傅婷, 万骥, 等. 牛肝谷氨酸脱氢酶的分离纯化及部分酶学性质 [J]. *食品科学*, 2015, 36(13): 178-183.
- [15] 高路. 紫甘薯多酚氧化酶和 β -淀粉酶酶学特性的研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2008.
- [16] 李莹, 周剑忠, 黄开红. 甘薯 β -淀粉酶的纯化和特性研究 [J]. *江苏农业学报*, 2009, 25(1): 182-184.
- [17] 梁新红, 孙俊良, 马汉军, 等. 两步超滤法分离甘薯 β -淀粉酶 [J]. *食品科学*, 2015, 36(21): 180-184.
- [18] 关艳艳. 大豆乳清废水中 β -淀粉酶的分离纯化、性质及应用研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2016.
- [19] 靳纪培. 麦芽中 β -淀粉酶的提取、纯化及应用研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [20] 张晓晴. 香樟果实酪氨酸酶的分离、纯化和性质分析 [D]. 无锡: 江南大学, 2008.

A Study of Isolation and Purification of β -Amylase and Its Enzymatic Properties

TAO Min¹, YANG Hao¹, BAI Ya-juan¹, GUO Xiao-lu²,
TANG Jing¹, FU Yu-fan¹, TANG Yun-ming¹

1. School of Life Sciences, Southwest University, Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing Sweet Potato Engineering Research Center, Chongqing 400715, China;
2. Fengdu Ecological Environmental Monitoring Station, Fengdu, Chongqing 408299, China

Abstract: β -Amylase was extracted and purified from the starch production wastewater with the sweet potato variety “Yushu 17” as the raw material. After peeling, 1 : 10 (m/V) homogenizing extraction, fractional precipitation with ethanol, DEAE-Sepharose ion exchange chromatography and Superdex-200 gel filtration chromatography, electrophoretically pure β -amylase was obtained. Then its enzymatic properties were studied. The results showed that the specific activity of β -amylase obtained in this study (333.15 U/mg) was significantly higher than that of commercially available sources of *Bacillus subtilis* (50 U/mg); its purification fold was 9.93 and its recovery rate was 66.6%; its subunit molecular weight was about 55.12 kD and its enzyme molecular weight was about 223.54 kD; and its optimum temperature was 50°C and its optimum pH was 6.2. This β -amylase showed good stability with a temperature of <50°C and a pH of 6~8. Measured under the optimal conditions with soluble starch as the substrate, it had a K_m of 0.00136 g/mL and a V_{max} of 0.112 mg/mL · min. In addition, Mn^{2+} , Pb^{2+} , Li^+ , Zn^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , oxalic acid and SDS inhibited, in different extents, this β -amylase, Co^{2+} activated it, and organic matter had no obvious effect on it.

Key words: sweet potato; β -amylase; separation and purification; enzymatic property

