

# 地衣芽孢杆菌高温 $\alpha$ -淀粉酶的组成及光谱学性质

赵 荧 刘宝琦 王国彦 董庆初 马鹤文 闫宝山

(吉林大学分子生物学系 长春 130023)

**摘要**  $\alpha$ -III 是地衣芽孢杆菌变异株 A.4041 高温  $\alpha$ -淀粉酶中的主要组分, 每分子含 10 个钙原子, 氨基酸分析表明:  $\alpha$ -III 富含丝氨酸 (17.9%), 天门冬氨酸和谷氨酸 (包括酰胺) 占 20.7%, 碱性氨基酸占 7.7%。紫外光谱的最大和最小吸收分别在 278nm 和 249nm, 荧光光谱的最大激发波长和发射波长分别为 282nm 和 340nm。远紫外 CD 谱显示 222nm 和 219nm 的双负峰及 208nm 和 216nm 处鼓起两个正肩, 溶液中  $\alpha$ -螺旋构象占 38.8%。

**关键词** 地衣芽孢杆菌, 高温  $\alpha$ -淀粉酶, 光谱

**分类号** Q93-936

近年来, 对耐热酶特别是耐高温淀粉酶的研究十分活跃, 地衣芽孢杆菌变异株 A.4041 是我国自行诱变的产耐高温  $\alpha$ -淀粉酶的生产菌株<sup>[1]</sup>。对其产生  $\alpha$ -淀粉酶的基本性质已做报道<sup>[2]</sup>, 本文报道耐高温  $\alpha$ -淀粉酶的主成分  $\alpha$ -III 的主要化学组成及光谱学性质。

## 1 材料与方法

### 1.1 纯酶溶液

江苏宏达酶制剂厂生产的地衣芽孢杆菌变异株 A.4041 粗酶制剂, 经纯化后得到聚丙烯酰胺凝胶电泳一条带的  $\alpha$ -III 纯酶组分<sup>[2]</sup>。

### 1.2 酶分子结合钙的测定

将纯酶液用无离子水透析 48h, 用 6mol/L 盐酸, 110℃ 消化 24h, 用 WYX-402 型原子吸收分光光度计测定, 用透析外液作对照。

### 1.3 氨基酸组成分析

$\alpha$ -III 于 6mol/L 盐酸的水解管中, 真空封管, 105℃ 水解 24h, 48h, 72h, 蒸干, 稀释水解液后, 用日立-853-50 型氨基酸自动分析仪测定。Trp 采用  $Fe^{3+}$  法测定<sup>[3]</sup>。

### 1.4 紫外光谱和荧光光谱测定

用岛津 UV-250 分光光度计测定紫外光谱, 日立-850 型荧光分光光度计测定荧光光谱。测定条件: 酶蛋白浓度 0.049mg/ml, 采用 pH7,

0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液, 所用试剂均无紫外及荧光显示。

### 1.5 圆二色谱测定

用 jasco-500c 型圆二色谱仪测定, 酶蛋白浓度 0.125mol/L, 采用 pH7, 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液, 比色杯光径 0.5cm, 室温 20℃ 下测定。

### 1.6 蛋白质浓度测定

采用 Lowry 法<sup>[4]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 化学组成

**2.1.1 酶分子中的结合钙:** 酶溶液蛋白浓度为 586 $\mu$ g/ml, 由原子吸收光谱得钙含量为 4 $\mu$ g/ml, 按  $\alpha$ -III 分子量 60000<sup>[2]</sup> 计算, 每摩尔  $\alpha$ -III 约含 10 摩尔钙原子。

**2.1.2 氨基酸组成:** 按方法中所述测定  $\alpha$ -III 在水解 24, 48, 72h 后的各氨基酸含量, Thr 和 Ser 取外推至水解时间为零时的数值, 其它氨基酸取三个水解时间的平均值。每个酶分子所含各氨基酸残基数及百分含量列于表 1, 氨基酸总残基数约为 540。

$\alpha$ -III 中酸性氨基酸 Asp 和 Glu (包括酰胺)

表1  $\alpha$ -III的氨基酸组成

氨基酸	残基数	含量(%)
Asp	58	10.7
Thr	27	5.0
Ser	97	17.9
Glu	54	10.0
Gly	42	7.7
Ala	32	5.9
Cys	11	2.0
Val	25	4.6
Met	23	4.2
Ile	18	3.3
Leu	20	3.7
Tyr	19	3.5
Phe	13	2.4
Lys	16	2.9
His	14	2.6
Arg	12	2.2
Pro	36	6.6
Trp	23	4.2
总数	540	

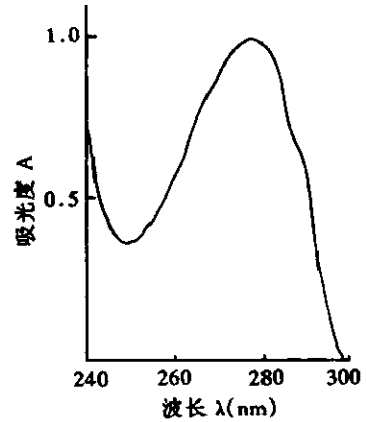
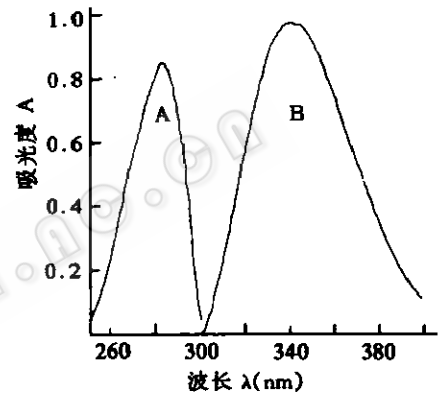
约占氨基酸残基总量的 20.7%，这与该酶的等电点偏酸性相符合<sup>[2]</sup>。同时，高含量的 Asp 和 Glu 是所有结合钙蛋白质的共同特点，可能与 Asp 和 Glu 残基的羧基参与结合钙有关。从表 1 可见  $\alpha$ -III 分子具有高含量的 Ser (17.9%)，羟基氧和天冬酰胺、谷氨酰胺的酰胺氧通常可与  $\text{Ca}^{2+}$  形成配位体，看来上述几种氨基酸的高含量与  $\alpha$ -III 中钙含量高有关。

## 2.2 光谱学性质

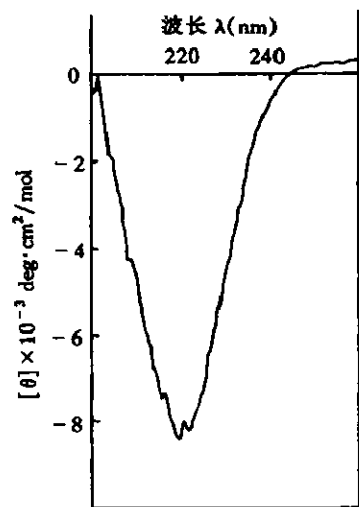
**2.2.1 紫外光谱:** 如方法中所述条件，在 240~300nm 范围内扫描，吸收峰值在 278nm，低谷在 249nm，为一典型的蛋白质紫外吸收光谱 (图 1)。

**2.2.2 荧光光谱:** 如方法中所述条件，测  $\alpha$ -III 荧光光谱 (图 2) 如图得最大激发波长  $E_x = 282\text{nm}$ ，在这一激发波长下测发射光谱，扫描范围 300~400nm，得最大发射波长  $E_m = 340\text{nm}$ 。

**2.2.3 远紫外圆二色谱(CD):** 如方法中所述条件，在 200~260nm 范围内扫描，结果如图 3，CD 谱显示 219nm 和 222nm 处两个相距很近的双负峰，208nm 和 216nm 处两个鼓起的负肩，

图1  $\alpha$ -III的紫外吸收光谱图2  $\alpha$ -III的荧光光谱

A. 激发光谱; B. 发射光谱

图3  $\alpha$ -III的圆二色谱

208nm 和 222nm 表明  $\alpha$ -III 分子中的  $\alpha$ -螺旋结构，216nm 的负肩可能与分子内存在  $\beta$ -折叠有

关<sup>[5]</sup>。根据 CD 谱的结果计算 $\alpha$ -III 分子中 $\alpha$ -螺旋<sup>[6]</sup>构象占 38.8%。此数据比嗜热芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶 20% 的 $\alpha$ -螺旋结构含量高<sup>[7]</sup>，而略低于 *Bacillus* SP-JF2 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶 41% 的 $\alpha$ -螺旋结构含量<sup>[8]</sup>。耐高温酶 $\alpha$ -螺旋结构是否与酶的热稳定性成正相关， $\alpha$ -螺旋结构对酶耐热性的贡献值得研究。

### 参 考 文 献

- [1] 胡学智, 凌展, 侯琴芳等. 微生物学报, 1991, 31(4): 267~273.
- [2] 赵 茨, 刘红岩, 官正宇等. 吉林大学自然科学学报,

1997, 3: 85~88.

- [3] 陶慰孙, 李 惟, 姜涌明等. 蛋白质分子基础, 北京: 科学出版社, 1982, 114.
- [4] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. *et al* J Biochem. 1951, 193: 265~275.
- [5] 鲁子贤, 崔 涛, 施庆洛等. 圆二色谱和旋光色散在分子生物学中的应用, 北京: 科学出版社, 1982, 114.
- [6] 陶慰孙, 李 惟, 林永齐等. 生物化学和分子生物学习题与计算, 北京: 高等教育出版社, 1984, 428~429.
- [7] Ogasahara K, Imanishi A, Isemura T, *et al* J Biochem. 1970, 67: 65.
- [8] Fengxie Jin, Xiomei cheng, Yifeng Shi, *et al* J Gen Appl Microbiol, 1990, 36: 415~424.

## THE COMPOSITION AND SPECTRUM CHARACTERISTICS OF THERMOSTABLE $\alpha$ -AMYLASE FROM *BACILLUS LICHENIFORMIS*

Zhao Ying Lu Baoqi Wang Guoyan Dong Qingchu Ma Hewen Yan Baoshan

(Department of Molecular Biology Jilin University, Changchun 130023)

**Abstract** The  $\alpha$ -III, major active component of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus Licheniformis* mutant A.4041 contained approximately 10moles of calcium per mole of protein. Analyses of amino acid composition showed that  $\alpha$ -III contained rich Ser (17.9%), 20.7% acidic acids and 7.7% basic amino acids. the maximum and minimum absorption wavelength of UV absorption spectra were at 278nm and 249nm. For fluorescent spectra the excitation and maximum emission wavelength were at 282nm and 340nm respectively. Determination of CD spectra showed two negative peaks at 222nm and 219nm, two small shoulders at 208nm and 216nm, 38.8%  $\alpha$ -helix in solution.

**Key words** *Bacillus licheniformis*, Thermostable  $\alpha$ -amylase, Spectrum