

米曲霉 5037 α -淀粉酶性质的研究

孔显良 左静 姜丽萍

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 5037 产生的 α -淀粉酶,酶反应最适温度范围为 55—63°C,以 60°C 为最好。反应 pH 范围在 4.4—6.0 之间,最适 pH 为 4.8—5.2。酶的 pH 稳定性为 5.5—8.5。酶的热稳定性在 50°C 以下较好,加 Ca^{++} 对酶的稳定性有显著的作用。凝胶电泳分析,此菌株产生的酶系较纯。酶作用产物为糊精和低聚糖,延长反应时间则产生麦芽三糖和多量麦芽糖以及部分葡萄糖。

关键词 米曲霉; α -淀粉酶;酶性质

前文报道了产 α -淀粉酶米曲霉 5037 菌株的筛选及产酶条件的研究^[1]。为了解该菌株所产酶的应用价值,我们进一步研究了酶作用条件和反应产物的分析。现将有关酶性质的初步研究结果报道如下。

材料和方法

(一) 菌种

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 5037。在 30°C 恒温箱培养 5 天备用。

(二) 培养基

试管斜面培养, 采用查氏 (Czapek) 琼脂培养基。固体发酵培养基, 采用麸皮 100g 加水 120ml (含有 0.5% 尿素), 调匀后分装在 250ml 三角瓶中。

(三) 酶液制备

固体发酵培养基经高压蒸汽灭菌, 凉后接种, 30℃ 培养, 2.5 天后取出。培养物加蒸馏水捣碎摇匀, 浸泡 3 小时, 用脱脂棉花过滤即成粗酶液。

(四) 酶活力测定方法

采用轻工部部颁标准^[2]; α -淀粉酶活力测定用碘色反应法。1ml 酶液于 60℃, pH 为 4.8 条件下, 1 小时液化 1g 可溶性淀粉为 1 个酶活力单位。

(五) 纸谱分析

展开剂为正丁醇:吡啶:水 = 6:4:3。显色用 2g 二苯胺溶于 50ml 丙酮中制成 A 液, 用 2ml 苯胺溶液溶于 50ml 丙酮中制成 B 液。将 A 液和 B 液混合, 再加 85% 的磷酸 10ml 摇至透明。浸泡显色剂后在 85℃ 烘干 10 分钟左右, 即显示斑点。

(六) 凝胶电泳分析

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法^[3]。

(七) 试剂

可溶性淀粉: 浙江菱湖化工试剂厂生产。当天使用时配制。

结果和讨论

(一) 反应温度对酶活性的影响

在不同反应温度中测定酶活性, 见图 1。结果表明, 在 55—63℃ 测定酶活性较高, 以 60℃ 为最高。同时也说明在没有添加热稳定因子时, 反应温度在 66℃ 以上酶活性明显下降, 比枯草芽孢杆菌 BF7658 α -淀粉酶的反应适宜温度低 5℃ 左右。

(二) 反应 pH 对酶活性的影响

酶活性测定体系中分别加入不同 pH 的 0.2mol/L 的 NaAc-HAc 缓冲液, 进行酶活力测定便可得到酶作用 pH 曲线。图 2 表明, 酶

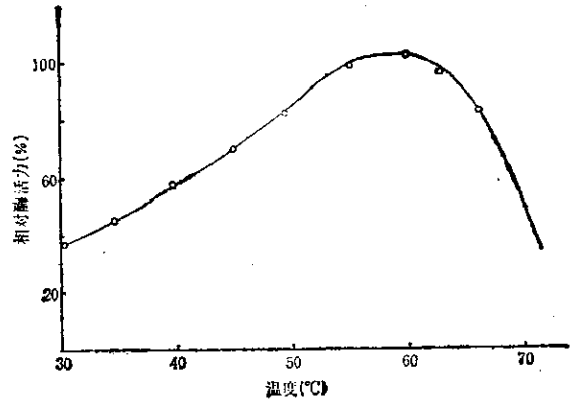


图 1 反应温度对酶活性的影响

反应 pH 范围在 4.4—6.0 之间, 最适 pH 为 4.8—5.2。比细菌 BF7658 α -淀粉酶的最适反应 pH 6.0 低。

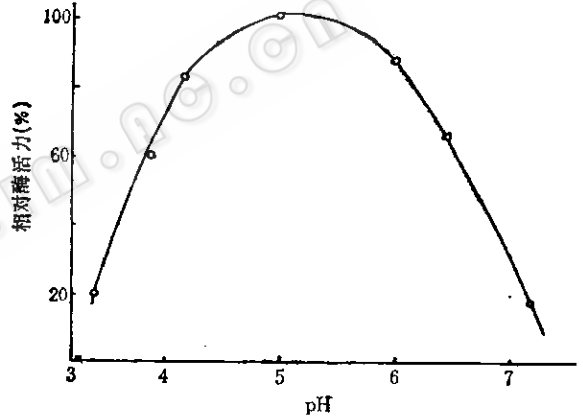


图 2 反应 pH 对酶活性的影响

(三) 酶的 pH 稳定性

将酶液用缓冲液调到不同 pH, 在 50℃ 保温 30 分钟后, 在 pH 4.8 的淀粉反应溶液中测定酶活力。由图 3 看出, 此酶在 pH 5.5—8.5 之间较稳定。最适 pH 为 7.0—8.5。说明该菌株产生的酶的 pH 稳定范围较宽。

(四) 酶的热稳定性及 Ca^{++} 的作用

酶液分别在 40, 50, 60 和 70℃ 处理 10', 30', 1h, 1.5h 和 2.0h, 然后测酶活力, 结果见图 4。 Ca^{++} 对酶的保护作用: 将 CaCl_2 溶液加入酶液, 使酶液中含 Ca^{++} 量为 0.02mol/L, 同样按上述方法处理和测定酶活力, 结果 (图 4) 表明, 50℃ 以下酶的热稳定性较好, 而 50℃ 以

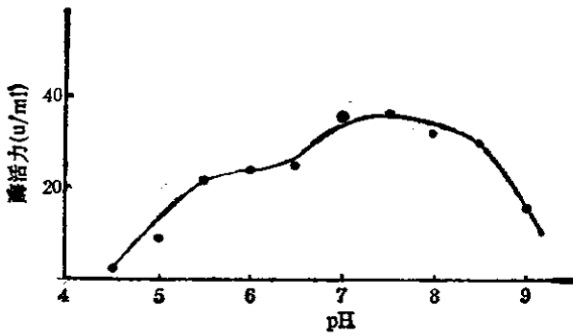


图3 酶的 pH 稳定性

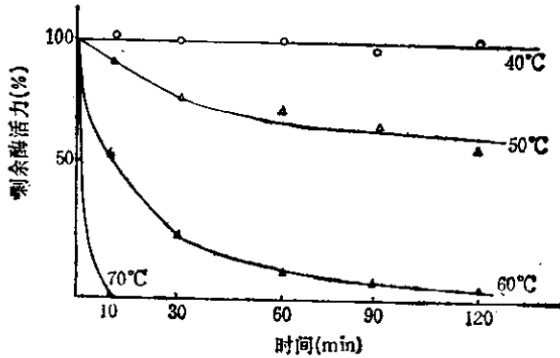


图4 反应的热稳定性

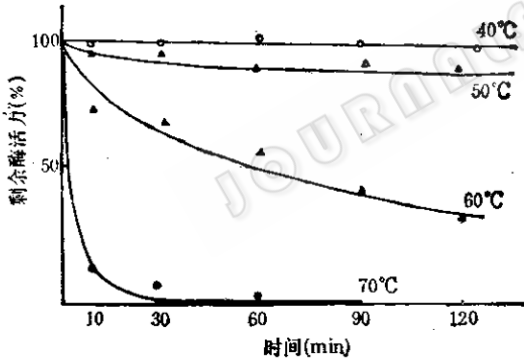


图5 Ca^{2+} (0.02mol/L) 对酶的稳定性的作用

上稳定性较差, 70°C 处理 10' 几乎完全失活。图 5 显示出 Ca^{2+} 对酶的稳定性有显著的作用, 50°C 以下处理酶活力基本不变, 60°C 处理 10' 能保留酶活力 75% 左右。

(五) 凝胶电泳分析

酶液经离心透析后, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。图 6 说明, 一条宽而清晰的区带为 α -淀粉酶, 其它成份很少, 表明 5037 菌株产生的酶系较纯。

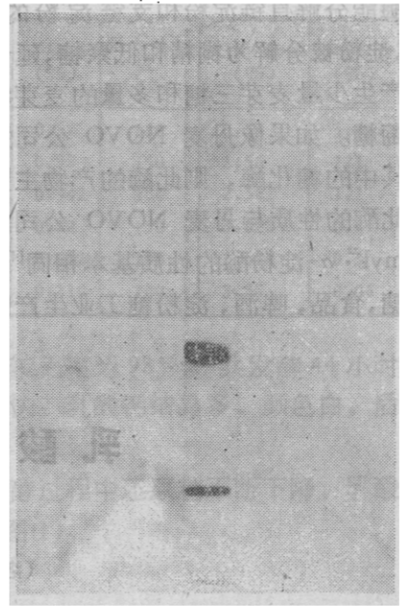


图6 米曲霉 α -淀粉酶凝胶电泳图

(六) 酶作用产物的分析

纸谱分析, 将含有 2% 可溶性淀粉 pH4.8 的溶液在 60°C 保温 10 分钟, 然后加入一定量的酶液进行酶解反应, 按时取出并立即冷却, 反应液进行点样分析, 结果见图 7。从图 7 中看

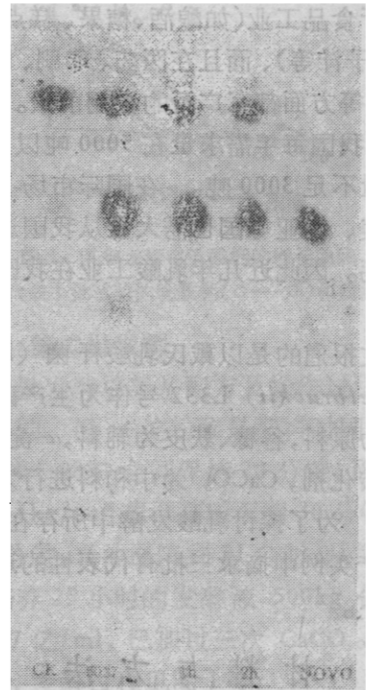


图7 米曲霉 α -淀粉酶纸谱分析

G: 葡萄糖 M: 麦芽糖 NOVO: 丹麦 NOVO 公司的真 α -淀粉酶样品

出,此酶能分解直链淀粉和支链淀粉的 1,4- α 糖苷键,淀粉被分解为糊精和低聚糖,延长反应时间则产生少量麦芽三糖和多量的麦芽糖以及部分葡萄糖。如果像丹麦 NOVO 公司的酶制剂去掉其中的糖化酶,则此酶的产物主要是麦芽糖。此酶的性质与丹麦 NOVO 公司的真菌“Fungamyl” α -淀粉酶的性质基本相同^[4],可适用于饴糖,食品,啤酒,淀粉糖工业生产以及医

药方面的应用。

参 考 文 献

- [1] 孔显良等:微生物学通报,15(2): 52—54,1988。
- [2] 轻工业部部颁标准(试行) QB746-747-80, 1981。
- [3] 北京大学生化实验室:生物化学实验指导,高等教育出版社,北京,1979。
- [4] NOVO Industri A/S Fungamyl, 1982.