

## *Aspergillus* sp. RSD 生淀粉糖化酶的分离纯化及酶学性质

韦荣霞<sup>1,2</sup> 张梁<sup>1,2</sup> 石贵阳<sup>1,2\*</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:**【目的】纯化得到一种生淀粉糖化酶, 并对其酶学性质进行分析。【方法】从曲霉 RSD 发酵液中, 经过硫酸铵分级盐析, HiPrep DEAE FF16/10 弱阴离子交换层析, 凝胶过滤层析, Hiprep 16/10 source 30S 阳离子交换层析最终纯化出一种电泳纯的生淀粉酶。【结果】粗酶液纯化倍数为 12.65 倍, 活力回收率为 9.02%, SDS-PAGE 结果显示该酶的相对分子质量约为 82 kD。对该酶的酶学性质分析结果表明, 该酶最适作用温度为 50 °C, 在 50 °C 以下稳定性很好, 对高温较为敏感; 最适作用 pH 为 4.5, 在 pH 3.5-7.0 范围内酶活力较为稳定, 在 40 °C、pH 4.6 条件下以可溶性淀粉为底物时的  $K_m$  值和  $V_{max}$  值分别为 7.44 g/L 和 1.45 g/(L·min); 金属离子对酶活性的影响试验表明,  $Fe^{2+}$  对该酶具有显著激活效果, EDTA、 $Cu^{2+}$ 、 $K^+$  对该酶酶活力有不同程度的抑制作用; 底物特异性研究表明该酶对麦芽糊精具有较高酶活力。【结论】与市售糖化酶及生淀粉糖化酶相比, 该酶对生淀粉的降解能力更高, 在工业应用上有较好的前景。

**关键词:** 生淀粉糖化酶, 分离纯化, 酶学性质

## Purification and characterization of a raw starch-digesting glucoamylase from *Aspergillus* sp. RSD

WEI Rong-Xia<sup>1,2</sup> ZHANG Liang<sup>1,2</sup> SHI Gui-Yang<sup>1,2\*</sup>

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. National Engineering Laboratory of Cereal Fermentation and Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] A raw starch-digesting glucoamylase was got, and its characterizations were studied. [Methods] A raw starch-digesting glucoamylase was purified from the fermentation broth of *Aspergillus* sp. RSD using the combination of ammonium sulfate fractionation, HiPrep DEAE FF16/10 anion exchange, Gel filtration chromatography and Hiprep 16/10 source 30S cation exchange. [Results] The crude enzyme was purified 12.65 times with 9.02% recovery of enzyme activity. The molecular weigh of the purified raw starch glucoamylase was about 82 kD identified by SDS-PAGE. The enzyme properties showed that it's optimal reaction temperature was 50 °C, and the enzyme had a good stability under 50 °C as well as unstable under high temperature; the optimal reaction pH of this enzyme was 4.5, and there was a good stability between pH 3.5 and pH 7.0. At the

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA100905, 2012AA021201); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(No. NCET-11-0665)

\*通讯作者: Tel: 86-510-85918229; ✉: gyshi@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2013-02-27; 接受日期: 2013-04-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

condition of 40 °C and pH 4.6, its  $K_m$  and  $V_{max}$  for soluble starch were 7.44 g/L and 1.45 g/(L·min). The effects of different metal ions on enzyme activity showed that the enzyme was strongly activated by  $Fe^{2+}$ , however, EDTA,  $Cu^{2+}$  and  $K^+$  inhibited the enzyme activity at various extents. The substrate specificity of raw starch-digesting glucoamylase showed that the enzyme had higher enzyme activity on malt dextrin. **[Conclusion]** Compared with commercially available glucoamylase and raw starch-digesting glucoamylase, this enzyme has higher degradation ability on raw materials, and has a good application prospect in industry.

**Keywords:** Raw starch-digesting glucoamylase, Purification, Enzymatic properties

生淀粉糖化酶是指能将未经过蒸煮糊化的生淀粉颗粒直接水解成葡萄糖的酶类,是淀粉酶种类中具有水解生淀粉颗粒作用的酶,因此生淀粉酶所涉及的酶有多种,包括 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、普鲁兰酶等均可作用于生淀粉<sup>[1-5]</sup>。它可以将传统工艺中的糊化、液化和糖化合并为一步直接进行糖化,省去了高温蒸煮糊化工艺,避免了高温条件下可发酵性糖的损失,因而具有降低能耗、简化操作工序、降低生产成本等优点<sup>[6-8]</sup>,具有较好的节能前景<sup>[9]</sup>。

在传统的以淀粉质为原料的发酵过程中,需要经过液化、糖化等步骤将淀粉水解为葡萄糖等能被各种微生物利用的小分子糖类,在此过程中往往需耗费大量能源和成本,因此近年来从节约能源,降低成本出发,各国学者开始注重研究生淀粉酶。目前国内外已报道的产生淀粉酶的菌株有黑曲霉、根霉、内生真菌、青霉、芽孢杆菌和赤霉菌等<sup>[10-15]</sup>,对于微生物来源之外的已知的生淀粉来源也有 50 多种,目前研究较多的是真菌来源的生淀粉葡萄糖淀粉酶,但大多由于酶活力低,酶活不稳定等原因未能很好的应用。本文研究了来源于曲霉 RSD 一种新型生淀粉糖化酶的分离纯化以及酶学性质的探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 材料:曲霉 RSD 为本研究室保藏,液体糖化酶 1 (130 000 U/mL)购自无锡赛德生物公司,液体生淀粉糖化酶 2 (140 000 U/mL)购自杰能科公司,固体生淀粉糖化酶 3 来自日本某公司。

1.1.2 斜面培养基(质量体积比):葡萄糖 3%,  $NaNO_3$  0.2%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%,  $KCl$  0.05%,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.001%,  $K_2HPO_4$  0.1%, 琼脂 2%, pH 自然,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

1.1.3 固体产酶培养基:麸皮:水=1.0:1.5 (质量体积比, 250 mL 三角瓶装 25 g),  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

### 1.2 方法

1.2.1 生淀粉酶粗酶液的制备:将制备好的孢子悬浮液接种于固体培养基中,于 28 °C 静置培养 3 d, 每 12 h 翻曲 1 次,发酵结束后,加入 100 mL 无菌蒸馏水,搅拌均匀后于 40 °C 浸提 1 h,用无菌纱布过滤,滤液于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min,上清液即为粗酶液。

1.2.2 糖化酶酶活及生淀粉酶活测定:糖化酶酶活测定:以 2%的可溶性淀粉溶液为底物,反应体系为:400  $\mu$ L 底物,400  $\mu$ L pH 4.6 的乙酸-乙酸钠缓冲液,200  $\mu$ L 酶液,于 40 °C 反应 10 min 后,立即加入 2 mL DNS 终止反应,用 DNS 法<sup>[16]</sup>测定体系中产生的还原糖量(以葡萄糖计),对照为灭活后酶液,带入葡萄糖标准曲线,计算酶活反应体系中产生还原糖浓度,进而换算为相应糖化酶酶活。糖化酶酶活力定义:在 pH 4.6、40 °C 反应条件下,1 min 水解 2%可溶性淀粉溶液产生 1  $\mu$ g 还原糖所需的酶量定义为一个酶活力单位。

生淀粉糖化酶酶活测定:以 2%的可溶性淀粉悬浮液作为底物(用 pH 4.6 乙酸-乙酸钠缓冲液配制),反应体系:20 mL 底物,0.5 mL 酶液,于 40 °C 反应 60 min 立即加入 0.5 mL 0.1 mol/L NaOH

终止反应, 对照为灭活后酶液, 反应结束后将反应液 8 000 r/min 离心 5 min, 上清用 DNS 法测定还原糖浓度(以葡萄糖计), 从而换算出相应生淀粉酶酶活。生淀粉糖化酶酶活力定义: 在 pH 4.6、40 °C 反应条件下, 1 h 水解 2%可溶性淀粉悬浮液产生 1 mg 还原糖所需的酶量定义为一个酶活力单位。

**1.2.3 蛋白浓度测定:** 采用 Bradford 法<sup>[17]</sup>测定。

**1.2.4 生淀粉糖化酶的纯化步骤:** (1) 硫酸铵盐析: 取一定体积的粗酶液, 置于冰上加硫酸铵至饱和度 20%, 沉淀完全后离心取上清, 继续加硫酸铵至饱和度 50%, 沉淀完全后 8 000 r/min 离心 10 min, 所得沉淀用缓冲液复溶后透析至除去盐分并超滤浓缩, 作为下一步待分离的样品。(2) HiPrep DEAE FF16/10 阴离子交换层析: 将上一步得到的样品上样至 DEAE FF 层析柱, 进行离子交换, 收集活性组分。分离条件: 0–1 mol/L NaCl–50 mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液, pH 7.2 线性梯度洗脱, 流速: 2 mL/min。将收集到的活性组分合并用超滤管浓缩。(3) Superdex 7510/300GL 凝胶过滤层析: 将离子交换得到的活性成分上样至 Superdex 7510/300GL 层析分离, 色谱条件: 0.15 mol/L NaCl–50 mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液, pH 7.2, 流速: 0.3 mL/min。将收集到的活性组分合并脱盐浓缩。(4) HiPrep 16/10 source 30S 阳离子交换层析, 上一步得到的样品进行阳离子交换层析, 分离条件: 0–1.5 mol/L NaCl–50 mmol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, pH 4.0 线性梯度洗脱, 流速: 2 mL/min。收集活性组分并 SDS-PAGE 鉴定其纯度<sup>[18]</sup>。

**1.2.5 温度对生淀粉糖化酶酶活力及稳定性的影响:** 将纯酶与底物在 pH 4.6 和不同温度(25–85 °C) 条件下反应 60 min 后, 分别测定生淀粉酶活力, 以最高酶活力为 100%, 确定酶的最适反应温度。

将该生淀粉糖化酶分别在 40、50、60、70 和 80 °C 不同温度保温 2 h, 中间取样测定生淀粉酶酶活, 以未保温的酶液酶活力为 100%, 分别计算相对酶活力, 确定酶的温度稳定性。

**1.2.6 pH 对生淀粉糖化酶酶活力及酶活稳定性的影响:** 分别用不同 pH 值的缓冲液(其中 pH 2.5–7.0 为 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-柠檬酸缓冲液, pH 7.5–9.0 为 Tris-HCl 缓冲液)配制底物, 将纯酶与各个 pH 值的底物在 40 °C 条件下反应, 分别测定生淀粉酶活力, 以最高酶活力为 100%, 计算相对酶活力, 确定酶的最适反应 pH。

为了测定不同 pH 值条件对酶活稳定性的影响, 分别将该生淀粉糖化酶在不同 pH 值(2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)下保温 1 h, 测定残余生淀粉酶活力, 以未处理的酶液为 100%, 计算相对酶活力, 确定酶的 pH 稳定性。

**1.2.7 金属离子以及 EDTA 对生淀粉糖化酶的影响:** 为了测定各种金属离子对酶活力的影响, 在 40 °C、pH 4.6 的条件下测定酶活力时, 分别向反应体系中加入终浓度为 5 mmol/L 的各种金属离子(NaCl、CaCl<sub>2</sub>、KCl、MgCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)和 EDTA, 分别测定生淀粉酶活力, 以未添加任何其他金属离子的酶活力为 100%, 计算相对酶活力, 确定离子和 EDTA 对酶活力的影响。

**1.2.8 生淀粉糖化酶动力学参数的测定:** 分别取不同浓度的可溶性淀粉悬浮液(1–10 g/L) 400 μL, pH 4.6 的乙酸缓冲液 400 μL, 加入 200 μL 的纯酶液, 40 °C 反应 10 min, DNS 法测定产生的还原糖浓度, 从而计算不同底物浓度时的初速度值。采用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 得出该酶在上述底物时的  $K_m$  值和  $V_{max}$  值。

**1.2.9 生淀粉糖化酶的底物特异性研究:** 分别配制质量分数均为 2%的可溶性淀粉、玉米淀粉、糊精、支链淀粉、糖原、蔗糖作为作用底物, 加入酶液 200 μL, 在 pH 4.6、40 °C 条件下反应 30 min 后, 立即加入 200 μL 0.1 mol/L NaOH 停止反应, 离心取上清, DNS 法测定还原糖量, 计算相应酶活力, 以最高酶活为 100%, 计算相对酶活力。

**1.2.10 酶水解产物分析:** 分别以 2%可溶性淀粉悬浮液以及 2%糊化后可溶性淀粉溶液为底物, 加入定量的酶液, 反应 4 h 后 HPLC 分析其产物组成。色谱条件: 色谱柱, Agilent 氨基柱; 流动相, 80% 乙腈; 流速, 0.8 mL/min; 检测器, 示差折光检测器。

**1.2.11 生淀粉糖化酶的质谱序列分析:** 将纯化后得到的纯生淀粉糖化酶进行质谱序列肽段分析<sup>[19]</sup>。

**1.2.12 几种酶对玉米粉的水解产物变化趋势:** 为了进一步比较几种糖化酶的作用效果, 均以 1% 玉米粉作为底物, 研究其水解产物的变化趋势。作用条件为: 加酶量: 加酶 100 U/g 底物; 温度: 33 °C 水浴恒温振荡; pH 4.6, 每隔 2 h 取样测定还原糖浓度, 以时间为横坐标, 还原糖浓度为纵坐标绘制水解产物变化曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 生淀粉糖化酶的分离纯化

曲霉 RSD 发酵所得粗酶液分别经过硫酸铵盐析, HiPrep DEAE FF16/10 阴离子交换层析, Superdex 7510/300GL 凝胶过滤层析, Hiprep 16/10 source 30S 阳离子交换层析这几个步骤, 得到了电泳纯的生淀粉糖化酶, 其中纯化后糖化酶活性回收率为 9.02%, 纯化了 12.65 倍。纯化结果见表 1 和图 1。

### 2.2 生淀粉糖化酶的酶学性质

**2.2.1 温度对酶活力和酶稳定性影响:** 为了测定生淀粉酶的最适反应温度, 在同一 pH 下, 分别测定

不同温度条件下的酶活力, 以最高酶活力为 100%, 计算相对酶活力, 如图 2 所示, 该酶的最适反应温度为 50 °C, 高于 65 °C 时, 酶活已丧失大部分。

将该酶分别在 40、50、60、70、80 °C 保温 2 h, 每隔 20 min 取样测定残余酶活力, 以未经保温处理的酶活力为 100%, 计算相对酶活力, 结果如图 3 所示, 该酶在 40 °C 和 50 °C 酶活稳定性很好, 当在此温度下保温 2 h 时, 仍能保持 90% 以上的酶活力, 说明该酶在 50 °C 以下较为稳定, 当温度达到 60 °C 时, 1 h 内该酶活性丧失大部分, 残留酶活仅为 21.9%, 当该酶在 70 °C 和 80 °C 分别保温 2 h 后酶活性基本全部丧失, 说明该酶对热较为敏感。

**2.2.2 pH 对酶活力和酶稳定性的影响:** 用不同 pH 值的 50 mmol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液和 Tris-HCl 缓冲液配制底物, 分别将该酶与这些底物在 40 °C 条件下反应, 测定生淀粉酶活力, 以最高酶活力为 100%, 计算相对酶活力, 如图 4 所示, 该生淀粉糖化酶的最适 pH 为 4.5 左右, 在 pH 3.5–6.5 范围内均有较高的活性, 当 pH 高于 7.5 时酶活性迅速下降。

为了测定不同 pH 值条件对酶活稳定性的影响, 分别将该酶在不同 pH 值保温 1 h, 测定残余酶活力, 以未处理的酶液为 100%, 计算相对酶活力, 结果如图 5 所示, 该酶在 pH 3.5–7.0 范围内酶活性较为稳定, 保温 1 h 后酶活均能保持 60%

表 1 曲霉生淀粉糖化酶的分离纯化  
Table 1 Purification of raw-starch digesting glucoamylase

纯化步骤 Purification step	总活力 Total activity (U)	总蛋白 Total protein (mg)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification fold	回收率 Yield (%)
Crude enzyme extract	2 023.10	25.01	80.92	1.00	100.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitate	1 524.63	8.22	185.43	2.29	75.40
HiPrep DEAE FF16/10	823.79	2.34	351.08	4.34	40.72
Superdex 7510/300GL	315.26	0.75	417.65	5.16	15.58
Hiprep 16/10 source 30S	182.51	0.17	1 048.77	12.65	9.02

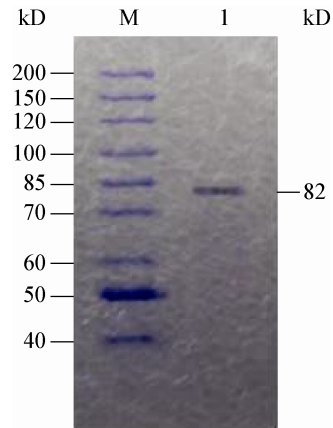


图 1 生淀粉糖化酶的 SDS-PAGE 图谱  
**Figure 1** SDS-PAGE profile of purified raw-starch glucoamylase  
 Note: M: Marker; I: Purified raw starch-digesting glucoamylase.

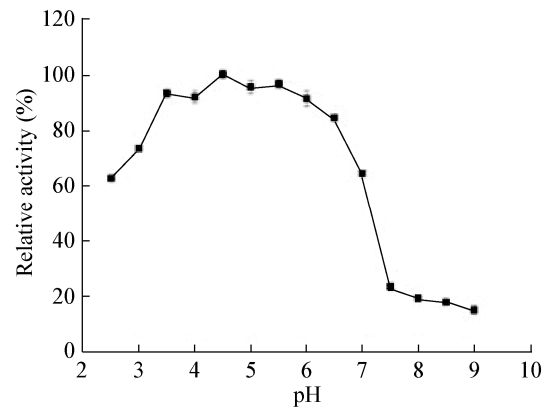


图 4 pH 对酶活力的影响  
**Figure 4** Effect of pH on the activity of purified enzyme

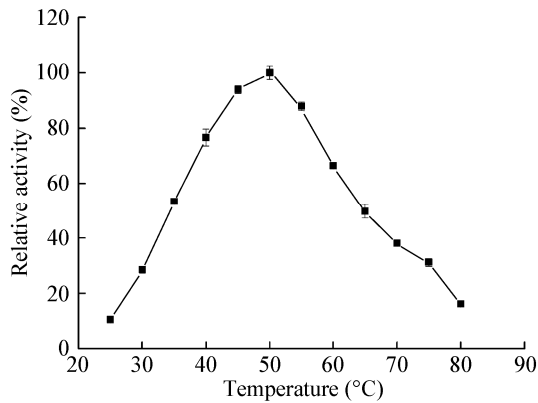


图 2 温度对酶活力的影响  
**Figure 2** Effect of temperature on the activity of purified enzyme

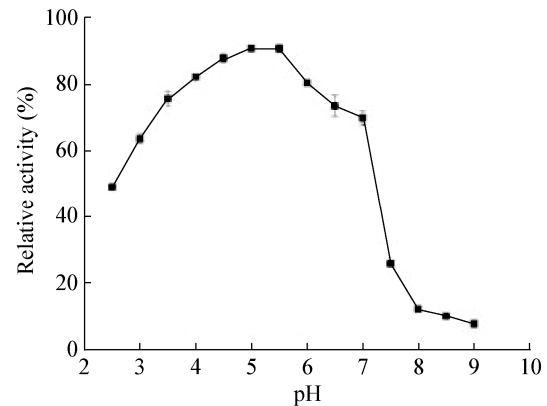


图 5 pH 对酶活稳定性的影响  
**Figure 5** Effect of pH on the stability of purified enzyme

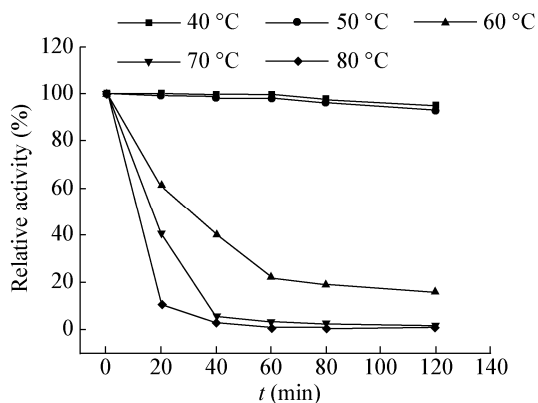


图 3 温度对酶活稳定性的影响  
**Figure 3** Effect of temperature on the stability of purified enzyme

以上,而当在 pH 2.5 保温 1 h 后酶活仍能保持 45% 左右,说明该酶在酸性条件下较为稳定,具有较好的耐酸性;当 pH 高于 7.5 时酶活性稳定性很差,可能是在该 pH 范围内破坏了酶的活性结构。

**2.2.3 金属离子以及 EDTA 对生淀粉糖化酶的影响:** 在 40 °C、pH 4.6 的条件下,向反应体系中加入终浓度为 5 mmol/L 的各种金属离子,分别测定残余酶活力,以未加金属离子的原酶液活力为 100%,计算相对酶活力,比较不同金属离子及 EDTA 对酶活力的影响,结果如图 6 所示,在该离子浓度下,Fe<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和 Co<sup>2+</sup>对该酶均有激活作用,其中 Fe<sup>2+</sup>作用明显,EDTA、Cu<sup>2+</sup>和 K<sup>+</sup>对该酶的酶活力有抑制作用,但 EDTA 对该酶的

抑制作用较为强烈,而其他离子对酶活的影响较小,即该酶对其他金属离子的敏感性较低。

**2.2.4 生淀粉糖化酶的反应动力学研究:**将适当浓度的纯酶分别与不同浓度的底物反应,利用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图,求出  $K_m$  值以及  $V_{max}$  值,结果如图 7 所示,当以可溶性淀粉溶液为底物时,得到双倒数方程  $y=5.1317x+0.69$ ,该酶的  $K_m$  值为 7.44 g/L,最大反应速度  $V_{max}$  值为 1.45 g/(L·min)。

**2.2.5 生淀粉糖化酶的底物特异性研究:**由于酶对于不同底物有不同的亲和力,水解能力也有差异,分别配制质量分数 2%的可溶性淀粉、玉米淀粉、糊精、支链淀粉、糖原和蔗糖作为作用底物,与该

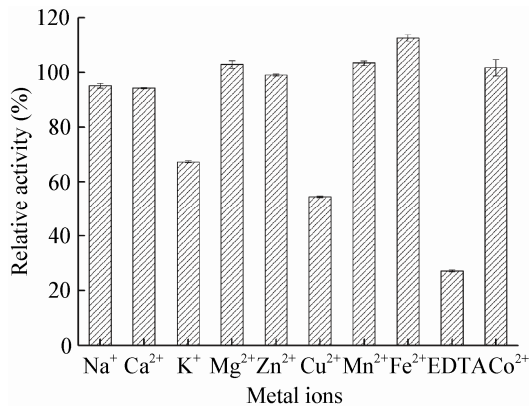


图 6 金属离子和 EDTA 对酶活力的影响  
Figure 6 Effects of metal ions and EDTA on the activity of purified enzyme

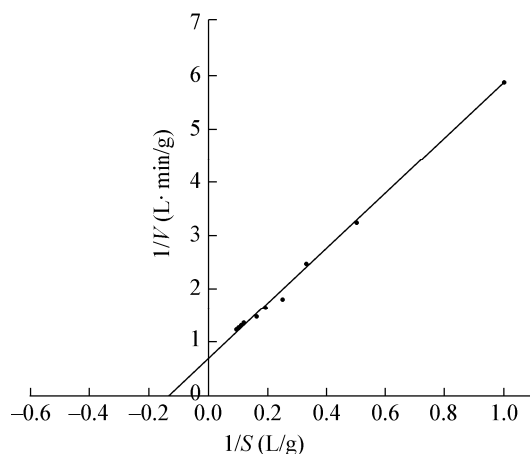


图 7 底物为可溶性淀粉时生淀粉糖化酶的动力学曲线  
Figure 7 Kinetic curve of raw starch glucoamylase hydrolyzing soluble starch

生淀粉糖化酶在 pH 4.6、40 °C 条件下反应 30 min 后,离心取上清,DNS 法测定产生的还原糖量,计算酶活力,以最高为 100%,计算相对酶活力,结果如表 2 所示,可以看出,该酶对糊精的水解强度最高,可溶性淀粉次之,而对糖原、支链淀粉和玉米淀粉的水解相对较弱,说明该酶对  $\alpha$ -1,4-糖苷键有较强的水解作用,对  $\alpha$ -1,6-糖苷键有较弱的水解作用,对蔗糖基本无水解作用。

**2.2.6 酶水解产物分析:**分别以 2%可溶性淀粉悬浮液以及 2%糊化后可溶性淀粉溶液为底物,于 40 °C、pH 4.6 进行酶解反应 2 h,HPLC 分析其产物组成,结果如图 8 所示。

该酶作用于未经糊化的可溶性淀粉时水解产物主要是葡萄糖,还有少部分未水解完全的麦芽糖,作用于可溶性淀粉溶液其水解产物全部为葡萄糖,通过分析反应液中两种糖含量的比例关系可知该酶对淀粉类底物水解产物主要为葡萄糖。

**2.2.7 生糖化酶质谱序列分析:**将经过一系列分离纯化得到的纯酶进行胶回收,且经过脱色、胰蛋白酶处理、浓缩等步骤,对得到的样品蛋白肽段进行质谱分析。利用 MADLI-TOF-MS 分析获得生糖化酶的质谱图,检测到被胰蛋白酶酶解的生糖化酶的肽段,结果如图 9 所示,其中横坐标为质荷比,纵坐标为各肽段的相应值。

所得结果进行 MASCOT 数据库比对,结果显示该酶与曲霉 *Aspergillus* 来源的  $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷酶有较高的同源性,匹配分值为 548,超过 56 ( $P<0.05$ ) 即具有显著意义,确定其为具有生淀粉水解功能的  $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷酶。

底物 Substrates	相对酶活力 Relative activity (%)
Soluble starch	37.50
Corn starch	8.10
Malt dextrin	100.00
Amyl pectin	8.40
Glycogen	23.53
Sucrose	0.21

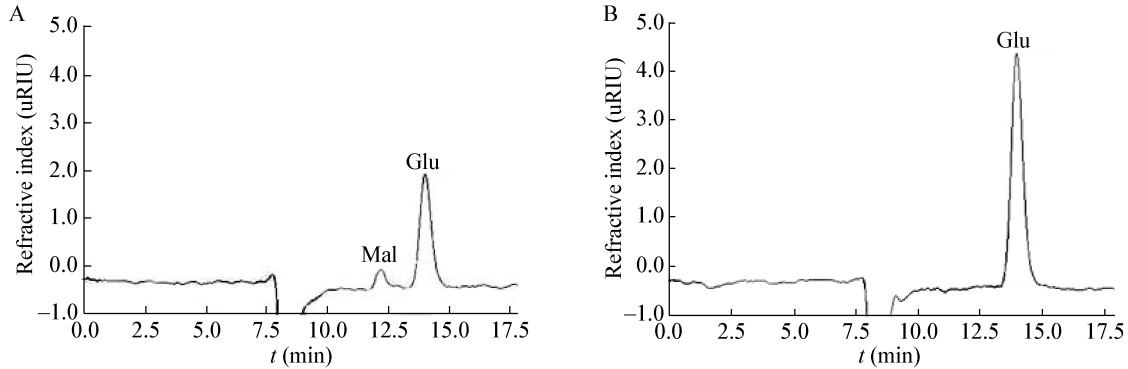


图 8 酶水解产物的 HPLC 图谱

Figure 8 Chromatogram of hydrolysis products

Note: A: Chromatogram of hydrolyzed raw-starch products; B: Chromatogram of hydrolyzed gelatinized-starch products.

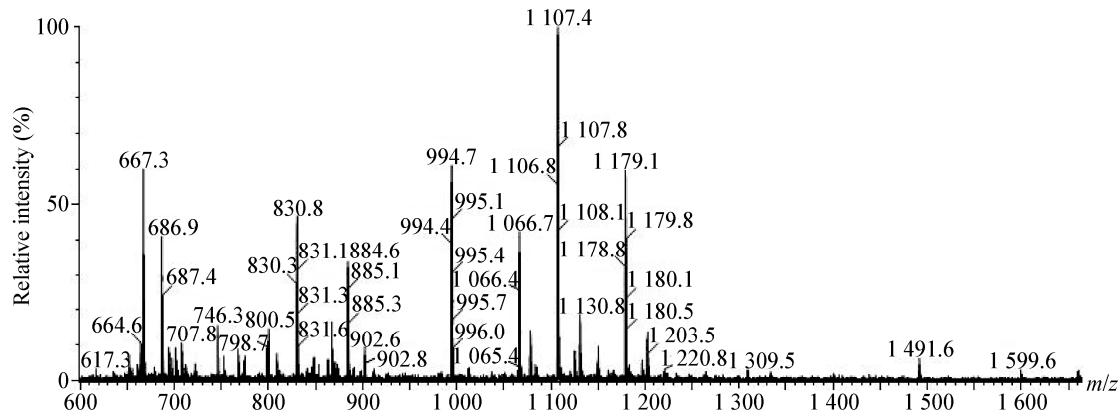


图 9 生糖化酶质谱图

Figure 9 The mass spectrum of raw starch-digesting glucoamylase

2.2.8 糖化酶酶活及生糖化酶酶活测定结果:以糖化酶 1、生糖化酶 2、固体糖化酶 3 及本研究糖化酶作为对象,分别参照表 3 中酶活测定方法测其糖化酶比活力和生淀粉糖化酶比活力,并计算生淀粉糖化酶活/糖化酶活比值,以计算其对生淀粉的降解能力。结果如表 3 所示,市售的普通糖化酶 1 和普通生糖化酶 2 其生淀粉糖化酶比酶活/糖化酶比活大小分别为 0.04、0.13,远小于本实验研究生糖化酶的 0.27,固体糖化酶 3 为 0.26,本研究生淀粉糖化酶对生淀粉的水解功能优越于目前市售普

通糖化酶及生淀粉糖化酶,是一种功能优良的生淀粉糖化酶,且通过几种酶的糖化酶比活力和生淀粉糖化酶比酶活的比较也可知本实验所研究生糖化酶均优越于其他 3 种酶,具有较好的应用前景。

由于通过上述比较,该酶与固体生淀粉酶 3 的优势不是很明显,进一步研究了几种酶对于 1%的玉米粉悬浮液的水解产物变化情况,以比较其作用于生淀粉的效果。结果如图 10 所示,可见通过进一步比较,该酶对生淀粉水解产物积累的较快且最终生成量也最高,可以说明该酶具有较好的生淀粉水解效果。

表 3 糖化酶比活及生淀粉糖化酶比活  
Table 3 Glucoamylase specific activity and raw starch glucoamylase specific activity

酶类 Enzyme	糖化酶比活力( <i>I</i> ) Glucoamylase activity ( <i>I</i> ) (U/mg)	生糖化酶比酶活( <i>P</i> ) Raw starch glucoamylase activity ( <i>P</i> ) (U/mg)	生糖化酶比酶活/糖化酶 比活力 <i>P/I</i>
Glucoamylase 1	625.93	25.03	0.04
Glucoamylase 2	796.11	103.49	0.13
Solid glucoamylase 3	958.42	249.19	0.26
Glucoamylase in this study	1 048.77	285.13	0.27

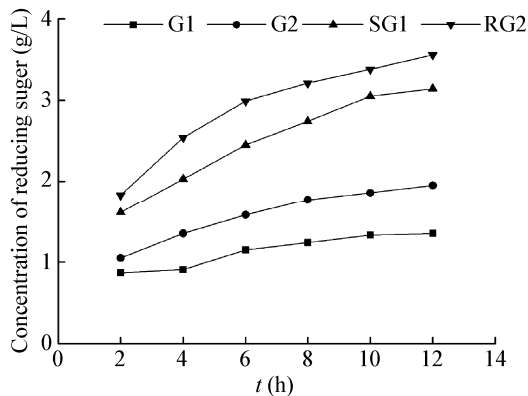


图 10 对生淀粉的水解产物变化趋势比较

Figure 10 Comparison of hydrolyzate trend on raw starch

Note: G1: Glucoamylase 1; G2: Glucoamylase 2; SG1: Solid glucoamylase 3; RG2: Glucoamylase in this study.

### 3 讨论

目前工业上淀粉类原料用途非常广泛,但是传统的淀粉加工过程需要经过糊化、液化和糖化 3 个步骤才能转化为葡萄糖和寡糖分子,该过程需要液化酶和糖化酶的作用,需要耗费大量的能源,因此对于能够直接水解生淀粉颗粒的生淀粉酶的研究在工业方面具有较大的潜在应用价值,也引起各方的重视。对于产生淀粉酶的菌株报道最多的是黑曲霉、米曲霉、根霉、芽孢杆菌,以及罗军侠等筛选出的烟曲霉 *Aspergillus* MS-09 能够产生生淀粉酶并对其性质进行了研究,但是由于酶活力低,酶活力不稳定等因素,往往很难符合其在工业上的应用要求,与已报道的其他真菌相比,该菌采用固态发酵产酶培养基组分简单,产酶量大,通过与市售

的普通糖化酶及生糖化酶的比较,该酶生淀粉糖化酶活/糖化酶活比值为 0.27,远高于前二者,对生淀粉的水解糖化功能更为优异。且通过对玉米粉的水解产物变化趋势比较可以得知,该酶水解效率更高,产物积累快。当以可溶性淀粉为底物时,该菌所产的生淀粉酶最大反应速度可达到 1.449 g/(L·min), $K_m$  值为 7.436 g/L,且可将生淀粉基本全部降解为葡萄糖。

本研究首次报道了来源于 *Aspergillus* sp. RSD 的生淀粉糖化酶的分离纯化和酶学性质研究。经过对发酵液的分级盐析、凝胶过滤层析、阴离子交换层析和阳离子交换层析四步纯化得到电泳纯的生淀粉糖化酶,纯化倍数为 12.65 倍,活力回收率为 9.02%,纯化后该酶糖化酶比活力为 1 048.77 U/mg,生淀粉糖化酶比酶活为 285.13 U/mg,对生淀粉的吸附率高于已报道的生淀粉酶及普通的糖化酶,原料利用率高,相对分子量约为 82 kD,纯化得到的生淀粉糖化酶最适作用温度为 50 °C,在 50 °C 以下酶活比较稳定,于 50 °C 以下保温 2 h 后,残余酶活能保持 95%以上,能更好地应用于工业上对生料的利用;最适反应 pH 为 4.6,在 pH 3.5–7.0 范围内稳定。与已报道的生淀粉酶相比<sup>[20]</sup>,本研究得到的生淀粉糖化酶 pH 作用范围更宽,大多数金属离子对该酶的影响不大,对该酶底物特异性研究表明,该酶对麦芽糊精、可溶性淀粉等具有较高酶活力,说明其主要对  $\alpha$ -1,4-糖苷键起水解作用,通过该酶水解淀粉的产物 HPLC 分析,水解淀粉产物主要为葡萄糖。



## 参 考 文 献

- [1] Jeang CL, Lee YH, Chang LW. Purification and characterization of a raw-starch digesting amylase from a *Soilbacterium cytophaga* sp.[J]. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1995, 35: 549-557.
- [2] Kaneko T, Ohno T, Ohisa N. Purification and characterization of a thermo stable raw starch digesting amylase from a *Streptomyces* sp. isolated in a milling factory[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2005, 69: 1073-1081.
- [3] Kumar S, Satyanarayana T. Purification and kinetics of a raw starch hydrolyzing thermostable and neutral glucoamylase of the thermophilic mold *Thermomucor indiciae-seudaticae*[J]. *Biotechnology Progress*, 2003, 19: 936-944.
- [4] Matsubara T, Ben AY, Anindyawati T, et al. Degradation of raw starch granules by alpha-amylase purified from culture of *Aspergillus awamori* KT-11[J]. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 2004, 37: 422-428.
- [5] Novotny JF. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1992, 58: 2393-2396.
- [6] 张栋梁, 王启军, 张水华. 生料酿酒工艺概述[J]. *酿酒*, 2006, 33(6): 46-48.
- [7] 邹东辉, 梁敏, 马翠翠. 生料酿酒技术的应用与开发[J]. *酿酒科技*, 2005, 6: 61-64.
- [8] 诸葛斌, 姚惠源, 诸葛健. 生淀粉糖化酶高产菌的选育[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(6): 60-64.
- [9] 罗军侠, 李江华, 陆健, 等. 耐酸生淀粉糖化酶的菌种筛选, 酶的性质及发酵条件[J]. *食品工业科技*, 2008, 5: 151-154.
- [10] 肖长清, 戚天胜, 赵海. 生淀粉糖化酶产生菌 *Aspergillus niger* 的分离筛选及其产酶条件[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(1): 76-79.
- [11] 庞宗文, 梁静娟, 陈桂光. 生淀粉分解酶产生菌的分离筛选[J]. *中国酿造*, 1997, 3: 10-11.
- [12] Yeti M, Saar N, Hassan Z, et al. Raw starch degrading enzyme from newly isolated strains of entophytic fungi[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, 16: 573-578.
- [13] Sun HY, Ge XY, Zhang WG. Production of a novel raw starch digesting glucoamylase by *Penicillium* sp. X-1 under solid state fermentation and its use in direct hydrolysis of raw starch[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23: 603-613.
- [14] Gawande BN, Goel A, Patkar AY, et al. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclom alto dextrin glucoamylase from *Bacillus firmus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 51: 504-509.
- [15] Yeti M, Saar N, Radu IS, et al. Production of an amylase-degrading raw starch by *Gibberella pulicaris*[J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22: 95-97.
- [16] 张永勤, 王哲平, 宋雨梅. 还原糖测定方法的比较研究[J]. *食品工业科技*, 2010, 6: 321-323.
- [17] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 38-55.
- [18] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [19] Shin HS, Rogers PL. Biotransformation of benzaldehyde to L-phenylacetylcarbinol, an intermediate in L-ephedrine production by immobilized *Candida utilis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 44(1/2): 7-14.
- [20] 苏小军, 熊兴耀, 谭兴和, 等. 产生淀粉酶菌株的诱变选育及酶学性质研究[J]. *食品与机械*, 2009, 25(2): 11-14.