

# 低温生淀粉糖化酶菌株 RS01 分离及其酶学性质

孙子羽<sup>1</sup> 迟乃玉<sup>1</sup> 王宇<sup>2</sup> 李兵<sup>1</sup> 张庆芳<sup>1\*</sup>

(1. 大连大学生物工程学院 辽宁省海洋微生物生物工程技术研究中心 辽宁 大连 116622)

(2. 大连工业大学 生物与食品工程学院 辽宁 大连 116034)

**摘要:** 自渤海湾海泥中分离得到一株产低温生淀粉糖化酶能力较强的菌株 RS01, 经形态学、生理生化特性及 16S rRNA 分析将其鉴定为气单胞菌属。对该菌株产的低温生淀粉糖化酶酶学性质进行初步研究, 结果表明其最适酶反应温度为 30°C, 酶的热稳定性比较差, 最适 pH 为 5.4, 经 TLC 鉴定酶解产物中有葡萄糖, 表明该分离菌株具有产低温生淀粉糖化酶的能力。

**关键词:** 低温生淀粉糖化酶, 气单胞菌, 酶学性质

## Characterization of Cold-active Raw Starch-digesting Glucoamylase from Isolated Strain RS01

SUN Zi-Yu<sup>1</sup> CHI Nai-Yu<sup>1</sup> WANG Yu<sup>2</sup> LI Bing<sup>1</sup> ZHANG Qing-Fang<sup>1\*</sup>

(1. Liaoning Technology of Marine Microbiological Engineering Research Center, Bioengineer College, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

(2. School of Bio & Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

**Abstract:** A strain producing cold-active raw starch-digesting glucoamylase was isolated from Bohai Bay samples. The strain RS01 was identified as *Aeromonas* sp. based on the morphological, physiological characteristics and 16S rRNA sequence. The foundation on the enzymatic properties of partially purified Cold-active RSGA explained that the maximum activity of the enzyme was exhibited at 30°C and pH 5.4. The enzyme thermal stability was poor. The glucose was identified by the TLC, which proved that the strain RS01 has the ability to produce cold-active raw starch-digesting glucoamylase.

**Keywords:** Cold-active raw starch-digesting glucoamylase, *Aeromonas* sp., Enzymatic properties

淀粉是一种用之不竭的可再生天然资源<sup>[1]</sup>。生淀粉糖化酶是指能将不经过蒸煮糊化的生淀粉颗粒直接水解成葡萄糖的酶类, 其作用特点是能够将淀粉糖化传统工艺中的糊化、液化、糖化三步合并为一步<sup>[2-5]</sup>。高效生淀粉糖化酶的研究开发是可再生资源利用的关键, 对解决工农业原料、能源、环境问题十分重要<sup>[6]</sup>。目前, 用于研究和应用的主要是中

温生淀粉糖化酶, 其产生淀粉糖化酶的微生物主要有黑曲霉(*Aspergillus*)<sup>[7-8]</sup>、根霉(*Rhizopus*)<sup>[9]</sup>、噬纤维菌属(*Cytophaga*)<sup>[10-11]</sup>、芽孢杆菌<sup>[12]</sup>等, 而高效的低温生淀粉糖化酶及其气单胞菌(*Aeromonas*)产生淀粉糖化酶的研究报道尚没有。低温生淀粉糖化酶(最适作用温度 15°C–30°C)与中温生淀粉糖化酶(最适作用温度在 70°C 左右)相比在应用上更具有优

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA021306)

\* 通讯作者: Tel: 86-411-87402624; 信箱: zqf7566@126.com

收稿日期: 2009-12-14; 接受日期: 2010-04-13

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

势和潜力,其在自然条件下具有高酶活力及高催化效率,可大大缩短处理所需时间并节省昂贵的加热或冷却费用,经过温和的热处理即可使其活力丧失,不会影响产品品质。因此,其应用对于减少工艺流程、降低生产成本以及节能方面有相当大的优势<sup>[13-15]</sup>。本文选育了一株低温生淀粉糖化酶菌株并对其酶学性质进行了初步研究,拟为低温生淀粉糖化酶工业化生产和应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 主要药品及试剂:**玉米淀粉(北京联合华友商贸有限公司)。

**1.1.2 样品:**渤海湾海泥样品 8 个、水样 5 个。

### 1.2 培养基及培养条件

**1.2.1 平板分离培养基:**生淀粉 20 g, NaNO<sub>3</sub> 2 g, KCl 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, 琼脂 15–20 g, 水 1000 mL, 自然 pH, 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。

**1.2.2 富集培养基:**生淀粉 2 g, 蛋白胨 1 g, 牛肉膏 0.5 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, KCl 0.5 g, 水 1000 mL, 自然 pH, 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。

**1.2.3 种子培养基:**蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, 葡萄糖 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g, 水 1000 mL, 自然 pH, 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。

**1.2.4 发酵培养基:**玉米生淀粉 20 g, NaNO<sub>3</sub> 3 g, KCl 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, 水 1000 mL, 自然 pH; 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。其中生玉米淀粉在 105℃ 下干热灭菌 2 h, 然后在常温下无菌操作加入。250 mL 的三角瓶, 装液量为 100 mL。培养温度 20℃, 摇床转速为 150 r/min<sup>[16]</sup>。

### 1.3 菌株筛选方法

取 5 g 土样(或 5 mL 水样)加入 50 mL 带有小玻璃珠的无菌水中,充分振荡摇匀后静置片刻,用移液枪吸取 1 mL 上清液加入富集培养基中,置于 20℃、150 r/min 冷冻恒温振荡器培养。培养 3 d 后将富集液涂布平板。以菌落周围是否出现透明圈和液体发酵培养后的生淀粉糖化酶活力为筛选指标。

### 1.4 酶活测定方法

2%的生淀粉悬浮液 2.0 mL 加入到 25 mL 具塞

比色管,添加 pH 5.4 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 2 mL, 30℃ 预热 10 min, 加入 1.0 mL 酶液,于 30℃ 恒温振荡(180 r/min)反应 10 min 后,加入 DNS 试剂 2 mL 终止反应;摇匀,置沸水浴中煮沸 5 min。取出后流水冷却,加蒸馏水定容至 20 mL。以不加酶液管作为空白调零点,在 520 nm 波长下比色测定吸光度值。酶活单位定义:在分析条件下,1 min 释放 1 μg 的还原糖(以葡萄糖计算)所需的酶量定义为 1 个酶活力单位。

### 1.5 酶的初步分离提纯

将发酵液 6000 r/min 离心 15 min, 取上清液加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 至饱和度为 80%, pH 调为 3.4, 4℃ 过夜, 5000 r/min 离心 30 min, 取沉淀溶于少量蒸馏水,用蒸馏水透析,每隔 2 h 换 1 次水,至无 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>。此硫酸铵脱盐酶液用于酶的初步性质研究。

### 1.6 菌株分子生物学鉴定

采用酚氯仿抽提法,提取菌株 DNA。应用 16S rDNA 引物:正向引物 P1 (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')和反向引物 P2 (5'-AAGTCGTAACAA GGTAACC-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL): ExTaq (5 U/μL) 0.25 μL, 10 × ExTaq buffer 5.0 μL, dNTPs mixture 5.0 μL, 上游 Primer 1.0 μL, 下游 Primer 1.0 μL, 补加 ddH<sub>2</sub>O 到 50 μL。扩增程序: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 5 min。PCR 产物直接送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。测得 1506 bp 的 16S rDNA 基因核苷酸序列,输入 GenBank 数据库,进行 BLAST 比对,获取 16S rDNA 基因序列相似度高的菌种。采用 ClustalX 进行多序列匹配比对,通过 MEGA 4.1 软件计算出序列的系统进化距离,采用 Neighbor-joining 构建系统进化树。

### 1.7 酶解产物薄层层析(TLC)方法

用前将硅胶 G 薄板于 110℃ 活化 1 h。取一定量的粗酶液(方法 1.5),以玉米生淀粉为底物进行酶解反应,把反应液用毛细吸管进行点样,点样点距离板底部 1 cm,点样斑点间距 1 cm,用电吹风缓缓吹过点样点,使溶剂迅速挥发。展开剂为正丁醇:冰乙酸:水(2:1:1, V/V/V),置层析缸内在室温下展开,待展开剂前沿走至距板上端 1 cm 处取出吹干,喷显色剂(苯胺-二苯胺),于 100℃ 烘箱中干燥 10 min 左右,直到薄板上显示出清晰的斑点。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离鉴定

渤海湾海泥及水样富集培养后稀释涂布平板, 分离得到透明圈较大的菌株 11 株。经摇瓶发酵复筛, 获得一株高活性的低温生淀粉糖化酶菌株 RS01, 发酵培养基优化后酶活可达到 103.47 U/mL。生理生化鉴定见表 1。

RS01 菌株在 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃ 下的透明圈与菌落直径比值(mm)分别为 4(16/4)、6.3(19/3)、2.5(5/2)、2(4/2)、2(4/2), 其最适生长温度在 20℃ 左右, 比常温淀粉酶类生产菌低 10℃ 左右, 与文献报道的产低温淀粉酶类的低温微生物生长温度一致。形态学观察菌落呈白色, 粘滑不易挑起; 菌体短杆状, 单个或成对排列, 不形成链状, 能滑行运动; 革兰氏染色阴性。RS01 和相关菌株的亲缘关系见图 1。

序列分析结果表明, 菌株 RS01 的 16S rDNA 序列全长 1506 bp, 将序列输入 GenBank 进行相似度比较, 其中 *Aeromonas punctata* (NR 029252.1)与 RS01 的亲缘性达到 99.45%, *Aeromonas caviae* (X60408.1) 与 RS01 的亲缘性达到 99.33%。结合菌株的形态和生理生化特征, 菌株初步鉴定为 *Aeromonas* sp.。

2.2 低温生淀粉糖化酶酶学性质的初步研究

2.2.1 酶降解产物分析: 取一定量粗酶液, 按照酶活测定方法进行酶解反应, 以薄层层析法鉴定酶解

产物, 结果见图 2。

由图 2 可知, 酶解产物中有葡萄糖, 另外还有寡糖的存在, 说明粗酶液除了含有低温生淀粉糖化酶以外, 还含有其他的生淀粉酶组分。

表 1 菌株 RS01 的常规生理生化反应特征 Table 1 Tradition taxonomical properties of the strain RS01	
鉴定指标 Indentification index	鉴定结果 Indentification result
革兰氏实验 Gram test	-
葡萄糖产酸 Glucose acid production	+
葡萄糖产气 Gas from Glucose	+
接触酶实验 Catalase test	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
氧化酶实验 Oxidase test	+
鸟氨酸脱羧酶实验 Ornithine decarboxylase test	-
明胶酶实验 Gelatinase test	+
麦芽糖实验 Maltose test	+
木糖实验 Xylose test	-
精氨酸实验 Arginine test	+
蔗糖实验 Sucrose test	+

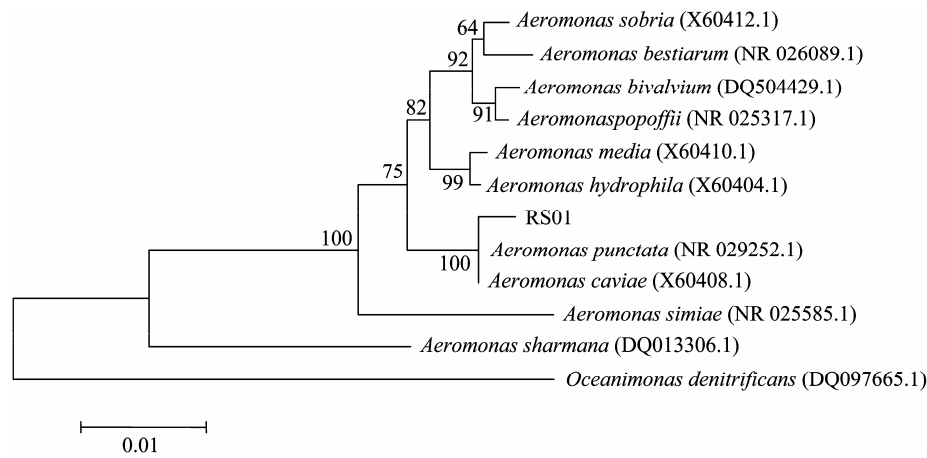


图 1 菌株 RS01 的 16S rRNA 基因系统发育进化树

Fig. 1 Phylogenetic trees for 16S rRNA sequence of RS01

注: 发育树节点的数字表示 Bootstrap 值, 括号内的数字是在 GenBank 上的序列登录号, 图例为遗传距离。  
Note: Numbers at nodes present bootstrap percentages (based on 1000 samplings), the numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. Bar: 0.001 sequence divergence.

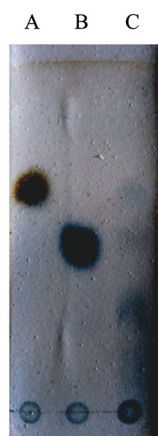


图2 RS01 粗酶液降解玉米生淀粉产物 TLC 分析

Fig. 2 TLC profile of the end product of raw starch hydrolysed by the enzyme

Note: A: Glucose; B: Lactose; C: Enzymatic hydrolysate.

**2.2.2 酶作用最适温度:** 取一定量的粗酶液, 分别在 5°C、10°C、20°C、30°C、40°C 和 50°C 按照低温生淀粉糖化酶的酶活力测定方法测定酶活, 其测定结果如图 3。由图 3 可以看出, 酶的最适作用温度为 30°C, 40°C 以后酶活力迅速下降, 在 5°C–30°C 酶活力能保持在 80% 以上, 这符合低温酶的特性。在低温条件下, 相对嗜温型酶而言, 来自低温微生物的酶反应所需时间更短<sup>[17–18]</sup>, 这是低温生淀粉糖化酶的应用优势。

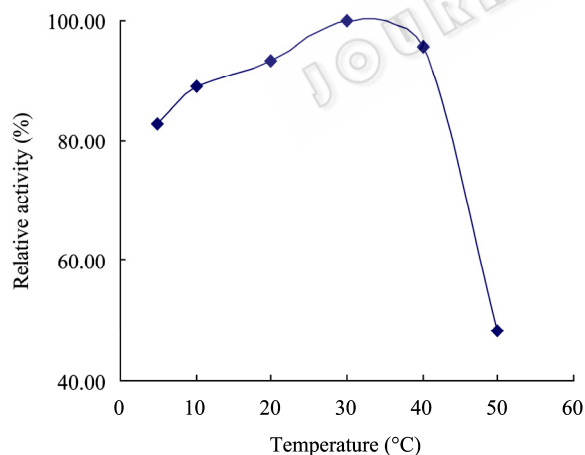


图3 反应温度对酶活的影响

Fig. 3 The effect of temperature on relative activity

**2.2.3 酶的热稳定性:** 将粗酶液分别置于 30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°C 水浴中保温 1 h, 立即冷却并测定剩余酶活力, 结果见图 4。从图 4 可以看出, 经初步提纯的低温生淀粉糖化酶热稳定性比较低, 70°C 处理 1 h, 酶活力不足 10%, 80°C 时, 酶活已全部丧失。

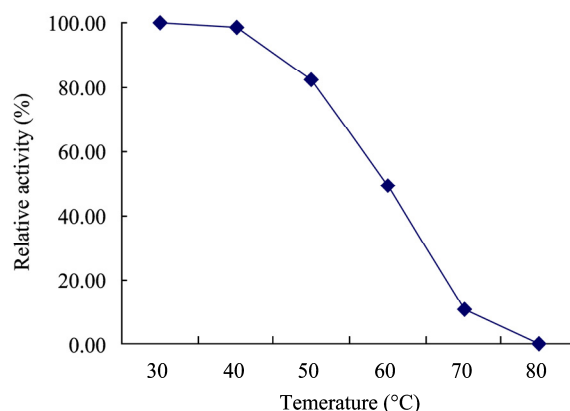


图4 低温生淀粉糖化酶的热稳定性

Fig. 4 Thermal stability of cold-active raw starch-digesting glucoamylase

**2.2.4 酶作用最适 pH:** 在酶反应最适温度下, 分别用 pH 为 3.4、3.8、4.2、4.6、5.0、5.4、5.8、6.4、7.0 和 7.6 的柠檬酸盐缓冲液, 按照低温生淀粉糖化酶的酶活力测定方法测定酶活, 其测定结果如图 5。

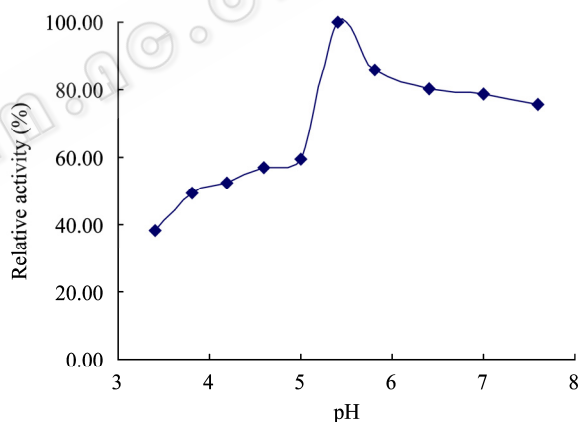


图5 pH 对酶活的影响

Fig. 5 The effect of pH on relative activity

由图 5 可知该低温生淀粉糖化酶最适反应 pH 为 5.4; 在 pH 4.2 至 pH 5.0 之间均有 50% 以上的酶活, 说明此酶具有一定的耐酸性。

### 3 讨论

生淀粉糖化酶是直接将生淀粉转化为葡萄糖, 所以生淀粉只能依靠干热灭菌或用醛熏一定时间来灭菌, 这样灭菌的不彻底性使发酵工程中极容易污染杂菌。本文从渤海湾海泥中分离得到一株产低温生淀粉糖化酶的细菌 RS01, 通过对 RS01 菌株生理生化特性和 16S rRNA 分析, 确定该菌属于气单胞菌属。其低温生淀粉糖化酶活力能够达到

103.47 U/mL, 与文献报道的常温生淀粉糖化酶活力相差不大<sup>[19]</sup>, 但由于其分离自低温环境, 具有低温微生物的特点。一般认为在可防止微生物污染(尤其是在连续运转系统中的)0–20°C 温度范围内(此时同源的嗜温型酶不活泼), 低温酶具有高酶活力及高催化效率, 可大大缩短处理过程的时间并省却昂贵的加热系统等, 因此在节能方面有相当大的进步<sup>[17–18]</sup>, 并在一定程度上可防止发酵工程中污染杂菌。这为低温生淀粉糖化酶的广泛应用提供了可能。

糖化酶具有多型性, 即同一个菌种会产生多个组型的糖化酶。生淀粉糖化酶是其中的一个组型, 因为它具有淀粉结合域(Starch-binding domain), 所以能够吸附到生淀粉颗粒上直接水解生淀粉为葡萄糖; 另外,  $\alpha$ -淀粉酶的协同作用能够促进生淀粉糖化酶的活性<sup>[20–21]</sup>。本文通过对酶解产物的薄层层析鉴定, 得出粗酶液中除了低温生淀粉糖化酶以外, 还有其他的生淀粉酶, 这有助于生产高效的低温生淀粉糖化酶制剂。研究温度对酶活力的影响发现从40°C 到50°C, 酶活急剧下降, 且酶的热稳定性比较差, 其原因可能是低温酶具有高柔顺、高分散的分子结构, 而松散、柔顺的蛋白分子结构会导致低温酶在常温或高温条件下更高的热不稳定性; 低温酶能够广泛应用于生物工程的两大要素, 就是它们在低温环境中的高催化活力和在中高温条件下的热不稳定性<sup>[15]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] 章毅鹏, 廖建和, 桂红星. 浅析我国变性淀粉的应用现状. 中国粮油学报, 2007, **22**(6): 179–184.
- [2] 李凤玲, 张璐, 刘连成, 等. 生淀粉糖化酶产生菌 *Cellulosimicrobium* sp. SDE 的分离鉴定及酶学性质研究. 工业微生物, 2008, **38**(5): 45–49.
- [3] 孙海彦, 张伟国. *Penicillium* sp. X-1 液态发酵产生生淀粉酶的优化. 食品与生物技术学报, 2007, **26**(3): 106–109.
- [4] 长清, 戚天胜, 赵海. 生淀粉糖化酶产生菌 *Aspergillus niger* (6#) 的分离筛选及其产酶条件. 应用与环境生物学报, 2006, **12**(1): 76–79.
- [5] 诸葛斌, 姚惠源, 诸葛健. 生淀粉糖化酶高产菌的选育. 微生物学通报, 2001(28): 60–64.
- [6] HaiyanSun, PingjuanZhao, XiangyangGe. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, **160**(4): 988–1003.
- [7] Omemu AM, Akpan I, Bankole MO. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. *African Journal of Biotechnology*, 2005, **4**(1): 19–25.
- [8] Rajoka MI, Yasmeen A. Induction, and production studies of a novel glucoamylase of *Aspergillus niger*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2005(21): 179–187.
- [9] 诸葛斌, 姚惠源, 诸葛健. 生淀粉糖化酶催化位点氨基酸及酶合成调控的初步研究. 工业微生物, 2002, **32**(3): 24–27.
- [10] Shiou JR, Hung HC, Jeang CL. Improving the thermostability of raw starch digesting amylase from a *Cytophaga* sp. by site directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol*, 2003(69): 2383–2385.
- [11] Jeang CL, Chen LS, Shiou RJ. Cloning of a gene encoding raw starch digesting amylase from *Cytophaga* sp. and its expression in *E. coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2002(68): 3651–3654.
- [12] Goyal N, Gupta JK, Soni SK. A novel raw starch digesting thermostable-amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005(37): 723–734.
- [13] 陆小波, 魏云林. 低温酶及其冷适应性机制研究进展. 生物技术通报, 2006(4): 51–58.
- [14] 朱非, 王珊, 周培瑾. 低温酶冷适应的分子机制及其在生物技术中的应用. 微生物学报, 2002, **42**(5): 640–644.
- [15] 曾胤新, 俞勇, 蔡明宏, 等. 低温微生物及其酶类的研究概况. 微生物学杂志, 2004, **24**(5): 83–88.
- [16] 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. 食品工业科技, 2008, **29**(5): 151–154.
- [17] 光南, 傅世宗, 彩海洋. 极端环境微生物的研究概况. 福建建作科技, 2000(2): 12–15.
- [18] 方金瑞, 黄维真. 海洋极端微生物的分离及开发研究. 中国海洋药物, 1996(1): 5–9.
- [19] 刘连成, 陆正清. 生淀粉糖化酶产生菌营养条件的初步优化. 酿酒科技, 2009, **6**(180): 43–46.
- [20] 姚卫蓉, 姚惠源. 复合淀粉酶酶解生淀粉机理探讨. 工业微生物, 2005, **35**(4): 15–24.
- [21] 徐忠, 王鹏, 缪铭. 复合酶水解生淀粉形成微孔的机理研究. 哈尔滨商业大学学报, 2007, **23**(1): 49–52.