



耐酸生淀粉糖化酶的菌种筛选、 酶的性质及发酵条件

罗军侠, 李江华*, 陆 健, 房 俊

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘 要: 从大曲中分离到一株在酸性条件下降解生玉米淀粉能力较强的菌株 *Aspergillus* MS-09。该菌产生的生淀粉糖化酶在 pH3.6 的条件下对生玉米淀粉有较好的分解作用, 可达到其最适 pH 条件下酶活的 95% 以上。通过对 *Aspergillus* MS-09 菌的形态和 18S rDNA 分析, 确定该菌是一株烟曲霉。对粗酶液的性质进行初步研究发现, 酶的最适作用温度为 65℃, 最适作用 pH 为 4.6。进一步考察了碳源、氮源对形成耐酸生淀粉糖化酶 (Acidproof Raw Starch-digesting Glucoamylase, ARSDG) 的影响, 发现生玉米粉 (2%, w/v) 和蛋白胨 (1.5%, w/v) 更有利于 ARSDG 的形成。在最佳条件下, 液体发酵酶活在 pH3.6 的条件下可达到 80U/mL。

关键词: 耐酸生淀粉糖化酶, 烟曲霉, 酶的性质, 发酵条件

Production of acidproof raw starch-digesting glucoamylase from a newly isolated strain of *Aspergillus fumigatus* MS-09

LUO Jun-xia, LI Jiang-hua*, LU Jian, FANG Jun

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A novel strain, isolated from Daqu samples showed better raw starch-digesting activity towards raw corn starch at pH3.6 and remained more than 95% of its enzyme activity at pH3.6. The species attribution of the strain was confirmed to be *Aspergillus fumigatus* by the characterization of morphological, physiologic and the similarity of the nucleotide sequence of the 18S rDNA gene of the strain. The characterization of partially purified enzyme exhibited the maximum activity at 65℃, pH4.6. The influence of carbon and nitrogen sources on the production of the acidproof raw starch-digesting glucoamylase (ARSDG) was investigated. Maximum enzyme yield was achieved in a medium containing corn flour (2%, w/v) as the carbon source and peptone (1.5%, w/v) as the nitrogen source. Upon optimization of various environmental and cultural conditions, the yield of ARSDG reached 80U/mL at pH3.6.

Key words: acidproof raw starch - digesting glucoamylase; *Aspergillus fumigates*; properties of enzyme; fermentation condition

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)05-0151-04

生淀粉糖化酶 (Raw Starch - digesting Glucoamylase, RSDG) 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, 它可以将淀粉传统工艺中的糊化、液化和糖化合并为一步直接进行糖化, 所以具有良好的节能前景。如果将其应用于无蒸煮的酒精发酵, 可节约总能耗的 30% ~ 40%^[1]。上世纪 70 年代由于两次石油危机, 各国学者从节能和有效利用天然资源出发, 开始重视对生淀粉糖化酶的研究。目前, 国内外学者已经报道了黑曲霉、根霉、内生真菌、青霉、芽孢杆菌和赤霉菌等微生物能够产生 RSDG^[2-7], 而对于烟曲霉可以产生 RSDG 却未见报道。一般认为在 pH 为 3.5 左右时, 许多杂菌都难以生长, 耐酸生淀粉糖化酶 (Acidproof

Raw Starch - digesting Glucoamylase, ASRDG) 是在酸性条件下 (pH3.5 左右) 还能够对生淀粉颗粒表现出强的水解活性的酶, 筛选出高产 ASRDG 的菌种特别重要。本文介绍了从大曲和土壤中分离到 1 株能够在 pH3.6 的条件下有效降解生玉米淀粉的烟曲霉 *Aspergillus* MS-09, 并选取为实验材料, 初步探讨了粗酶液的性质及碳源、氮源对 ASRDG 形成的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

生玉米淀粉 购自附近的市場; 两种大曲, 淀粉厂附近的土壤。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 平皿分离培养基 生玉米淀粉 30g、NaNO₃ 2g、KH₂PO₄ 1g、MgSO₄ · 7H₂O 0.5g、KCl 0.5g、FeSO₄ 0.01g、琼脂 20g, 蒸馏水 1000mL, pH 自然, 121℃ 灭菌 20min。其中生玉米淀粉在 105℃ 下干热灭菌 2h, 然

收稿日期: 2007-09-03 * 通讯联系人

作者简介: 罗军侠 (1980-), 女, 在校研究生, 研究方向: 酶技术。

后在 65℃ 下无菌操作加入。

1.2.2 液体发酵培养基 生玉米淀粉 2g、 NaNO_3 3g、 KH_2PO_4 2g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 蒸馏水 1000mL, pH 自然, 121℃ 灭菌 20min。其中生玉米淀粉在 105℃ 下干热灭菌 2h, 然后在常温下无菌操作加入。250mL 的三角瓶, 装液量为 25mL。培养温度 30℃, 摇床转速为 200r/min。

1.2.3 试管斜面培养基 可溶性淀粉 30g、 NaNO_3 2g、 KH_2PO_4 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、KCl 0.5g、 FeSO_4 0.01g、琼脂 20g, 蒸馏水 1000mL, pH 自然, 121℃ 灭菌 20min。

1.2.4 淀粉琼脂平板 生玉米淀粉 20g、琼脂粉 20g, pH3.6 的柠檬酸盐缓冲液 1000mL。先加热使琼脂粉溶解后, 在 65℃ 下加入生玉米淀粉, 摇匀后倒平板。

1.3 菌种筛选方法

称 5g 大曲(或土壤), 用 50mL 无菌水浸提 30min 后, 以不同稀释倍数涂布在平皿分离培养基上, 30℃ 培养 4~5d, 将菌落周围有明显淀粉透明水解圈的菌转接到试管斜面上。4~5d 后, 再将其接到摇床培养基上, 72h 后用平板透明圈法检测粗酶液中 ASRDG 的酶活。所谓平板透明圈法是指, 将牛津杯放置在已经凝固的淀粉琼脂平板上, 每个平板放 3~4 个牛津杯(根据酶活大小), 然后将粗酶液定量加入到牛津杯中, 粗酶液就会通过扩散分解牛津杯周围的生玉米淀粉, 经过一段时间, 淀粉琼脂平板上的牛津杯周围就会有透明的淀粉水解圈, 酶活越大的则水解圈也越大, 根据透明圈的大小, 就可以确定酶活大小。在牛津杯周围有明显的淀粉透明水解圈的菌再通过摇床实验, 使粗酶液水解生玉米淀粉, 用 DNS (3,5-二硝基水杨酸) 法测定其水解产物中还原糖的量, 从而确定粗酶液中 ASRDG 的酶活^[8]。

1.4 酶活测定方法

发酵结束后, 在 4℃, 8000r/min 下离心 20min, 所得的上清液为粗酶液。于 50mL 三角瓶中加入 0.5g 生玉米淀粉, 19mL pH3.6 的柠檬酸盐缓冲液和 1mL 粗酶液, 在 30℃ 下水解 2h 后, 用 0.5mL 4% 的 NaOH 溶液终止反应。反应液在 4℃, 4000r/min 离心 5min, 用 DNS 法测定上清液中还原糖量, 从而确定 ASRDG 的酶活。酶活力单位的定义: 在分析条件下, 1min 释放 1μg 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 DNA 提取、PCR 扩增及序列测定

DNA 的提取用石英砂法。将待测定的菌种接到 YDP 培养基中培养 24h 后, 挑出菌丝体到一个干净的研钵中, 加入 3mL TAB 溶液和适量的石英砂研磨 30min 后, 转到离心管中, 8000r/min 离心 1min, 将上清液转到另一离心管中, 再 8000r/min 离心 1min, 将上清液转到新离心管中, 加入 CTAB 溶液至 0.8mL, 在 65℃ 下保温 30min 后, 冷却至室温, 8000r/min 离心 5min, 取上清液到新离心管中, 加入等体积的酚/氯仿 (1:1) 混合液, 轻轻摇匀后, 8000r/min 离心 5min, 将上清液转到新离心管中, 再加 2.5 体积的无水乙醇和 0.1 体积的 3mol/L 的 NaAc, 摇匀后, 8000r/min 离心

5min, 使 DNA 充分沉淀, 弃去上清液, 用 75% 的乙醇再洗一次。将含有沉淀的离心管放在超净工作台上, 待乙醇挥发完全后, 用 TE 溶解沉淀。用琼脂糖凝胶电泳进行检测。

PCR 扩增采用引物 P18s01 (5'-ACCGAATTCCCGGGATCGCTTGTGTTGAG-3') 和 P18s02 (5'-ACCGAATTCCATGGCGCCTCCTGCGCCGC-3')。扩增反应如下: 在 200μL 的离心管中顺序加入超纯水 36μL、Taq 酶 Buffer 5μL、2.5mol/L dNTP 5μL、引物各 1μL、染色体 DNA 1μL、Taq 酶 1μL, 混匀后进行 PCR 反应。PCR 产物由上海申速有限公司测序。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选结果

从平皿分离培养基上挑出在菌落周围明显有淀粉透明水解圈的菌 13 株, 将它们转移到斜面上。再根据牛津杯法, 得到相对产 ASRDG 酶活较高的一株菌种 MP-09, 该菌在察氏培养基上菌落生长旺盛, 气生菌丝丰富, 初为白色, 微带黄色或绿色菌落, 老龄菌落呈黑褐色。镜下分生孢子梗带绿色、光滑、短, 顶囊绿色、烧瓶形, 小梗单层、密集, 布满顶囊表面, 分生孢子球形, 表面粗糙, 带绿色, 有小棘, 分生孢子头短且呈柱状, 长短不一。依据该菌形态学特征, 菌株鉴定为烟曲霉菌。

2.2 耐酸生淀粉糖化酶粗酶性质的初步研究

2.2.1 酶反应的最适 pH 配制 pH 分别为 3.0、3.6、4.0、4.6、5.0、5.6、6.0、6.6、7.0 的柠檬酸盐缓冲液, 在不同 pH 缓冲液中测定 ASRDG 的酶活力。由图 1 可见, 该酶反应的最适 pH 为 4.6, 在 pH3.6 下, 可保持其酶活的 95% 以上, 具有很好的耐酸性。在 pH 为 3.5 左右时一般杂菌都很难生长^[9], 所以, 该菌比已经报道的产生淀粉糖化酶的菌种更加容易应用到工业生产中。

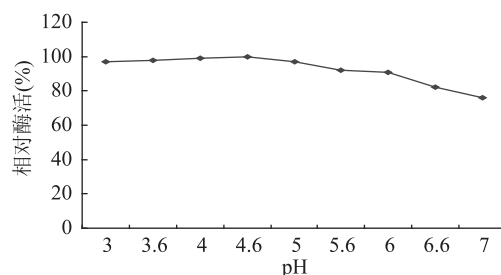


图1 不同 pH 下, 由烟曲霉 MS-09 产生的 ASRDG 降解生玉米淀粉的能力曲线

2.2.2 酶反应的最适温度 分别在 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70℃ 下, 按 ASRDG 的酶活力测定方法测酶活, 图 2 结果表明, 该酶反应的最适温度为 65℃, 但是从图上可以看出温度对 ASRDG 的酶活影响不大。

2.3 对 MP-09 菌株的 18S rDNA 分析

Aspergillus MS-09 菌株的系统发育进化树见图 3。对 *Aspergillus* MS-09 菌株的 PCR 扩增产物进行了序列测定, 用 BLAST 将 *Aspergillus* MS-09 菌株序列与 GeneBank 数据库中的真菌序列比较发现, *Aspergillus* MS-09 菌株的 18S rDNA 部分序列与棒曲霉 *Aspergillus clavatus* 同源性较高, 相似率达到

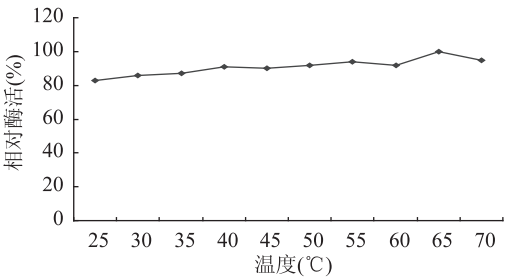


图2 不同温度下,烟曲霉 MS-09 产生的 ASRDG 降解生玉米淀粉的能力曲线

100%,与烟曲霉 *Aspergillus fumigates* 的同源性也较高,相似率也达到 100%。结合形态分析及 18S rDNA 序列分析,确认 *Aspergillus* MS-09 菌株是烟曲霉。通过测序得到的 *Aspergillus* MS-09 菌株的 18S rDNA 序列如下:

1 TTAACGAGGA ACAATTGGAG GGCAAGTCTG
GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT TCCAGCTCCA
61 ATAGCGTATA TTAAAGTTGT TGCAGTTAAA
AAGCTCGTAG TTGAACCTTG GGTCTGGCTG
121 GCCGGTCCGC CTCACCGCGA GTACTGGTCC
GGCTGGACCT TTCCTTCTGG GGAACCTCAT
181 GGCCTTCACT GGCTGTGGGG GGAACCAGGA
CTTTTACTGT GAAAAAATTA GAGTGTTCAA
241 AGCAGGCCCTT TGCTCGAATA CATTAGCATG
GAATAATAGA ATAGGACGTG CGGTTCTATT
301 TTGTTGGTTT CTAGGACCGC CGTAATGATT
AATAGGGATA GTCGGGGGCG TCAGTATTCA
361 GCTGTCAGAG GTGAAATTCT TGGATTGCT
GAAGACTAAC TACTGCCAAA GCATTGCCCCA
421 AGGATGTTTT CATTAAATCAG GGAACGAAAG
TTAGGGGATC GAAGACGATC AGATACCGTC
481 GTAGTCTTAA CCATAAACTA TGCCGACTAG
GGATCGGGCG GTGTTTCTAT GATGACCCGC
541 TCGGCACCTT ACGAGAAATC AAAGTTTTTG
GTTTCTGGGG GGAGTATGCT CGCAAGGCTG
601 AAACCTAAAG AAATTGACGG AAGGGCACCA
CAAGGCGTGG AGCCTGCGGCTTAATTTGAC
661 TCAACACGGG GAAACTCACC AGTCCAGAC
AAAATAAGGA TTGACAGATT GAGAGCTCTT
721 TCTTGATCTT TTGGATGGTG GTGCATGGCC
GTTCTTAGTT GGTGGAGTGA TTTGTCTGCT
781 TAATTGCGAT AACGAACGAG ACCTCGGCCC
TTAAATAGCC CGGTCCGCAT TTGCGGGCCG
841 CTGGCTTCTT AGGGGACTA
TCGGCTCAAG CCGATGAA

2.4 不同的碳源和氮源对 *Aspergillus fumigates* MS-09 菌产 ASRDG 的影响

以硝酸钠为氮源,加入 12 种不同的碳源(2% , w/v),液体培养 72h,考察不同碳源对 *Aspergillus fumigates* MS-09 菌产 ASRDG 的影响,结果见表 1。根据表 1,以 2% 的玉米粉(干热灭菌)为碳源时, *Aspergillus fumigates* MS-09 菌产 ASRDG 的量最大。干热灭菌较湿热灭菌更容易产生 ASRDG,可能是因

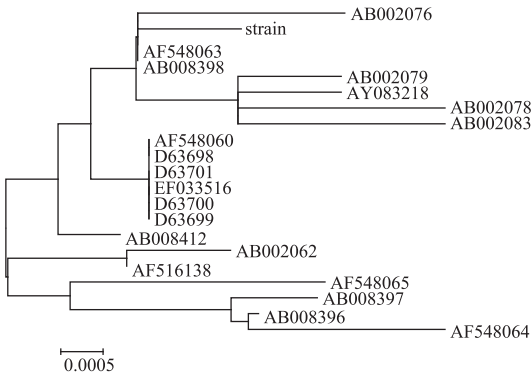


图3 依据 18S rDNA 序列构建的 *Aspergillus* MS-09 菌株(strain)的系统发育进化树

为干热灭菌中的生玉米淀粉诱导了 ASRDG 的产生。以 2% 的玉米粉(干热灭菌)为碳源,加入 10 种不同的氮源及其组合,液体培养 72h,考察不同氮源对 *Aspergillus fumigates* MS-09 菌产 ASRDG 的影响,结果见表 2。从表 2 可以看到,由蛋白胨(1.5% , w/v) + NaNO₃(0.3% , w/v)组成的复合氮源,使 *Aspergillus fumigates* MS-09 菌更容易产生 ASRDG。

表1 不同碳源对 *Aspergillus fumigates* MS-09 菌产 ASRDG 的影响

碳源	ASRDG 相对酶活(%)
玉米粉(干热灭菌)	120.9
玉米粉(湿热灭菌)	18.9
可溶性淀粉(湿热灭菌)	13.2
可溶性淀粉(干热灭菌)	16.6
玉米淀粉(湿热灭菌)	56.3
玉米淀粉(干热灭菌)	16.8
葡萄糖	16.3
麦芽糖	—
蔗糖	—
果糖	—
糊精	35.6
乳糖	29.8

注:“—”表示没有 ASRDG 酶活。

表2 不同氮源对 *Aspergillus fumigates* MS-09 菌产 ASRDG 的影响

氮源	ASRDG 相对酶活(%)
蛋白胨(1.16% , w/v)	100
蛋白胨(1.5% , w/v)	129.3
蛋白胨(2.0% , w/v)	112.6
豆饼粉(2% , w/v)	48.5
酵母浸膏(1.4% , w/v)	7.7
牛肉浸膏(1.12% , w/v)	6.3
花生饼粉(1.84% , w/v)	52.4
尿素(0.28% , w/v)	26.4
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.65% , w/v)	2.5
NaNO ₃ (0.83% , w/v)	36.9
NH ₄ NO ₃ (0.4% , w/v)	18.3
NH ₄ Cl(0.52% , w/v)	2.7
蛋白胨(1.5% , w/v) + NaNO ₃ (0.3% , w/v)	211.5
蛋白胨(1.5% , w/v) + 花生饼粉(3.0% , w/v)	114.9
蛋白胨(1.5% , w/v) + 豆饼粉(3% , w/v)	139.3
豆饼粉(2% , w/v) + NaNO ₃ (0.8% , w/v)	123.5

2.5 不同金属离子对 *Aspergillus fumigates* MS-09 菌产 ASRDG 的影响

以2%的玉米粉(干热灭菌)为碳源,以由蛋白胨(1.5%,w/v)+NaNO₃(0.3%,w/v)组成的复合氮源为氮源,考察了不同金属离子对 *Aspergillus fumigates* MS-09 菌产 ASRDG 的影响,结果见图4,金属离子的浓度为1mmol/L。由图4可见,Mg²⁺、Ca²⁺、K⁺、Li⁺对ASRDG的产生都有抑制作用,其中Li⁺的抑制作用最强,其次是Mg²⁺、Ca²⁺和K⁺。

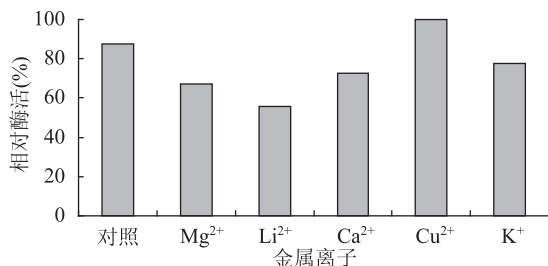


图4 不同金属离子对 *Aspergillus fumigates* MS-09 菌产 ASRDG 的影响

3 结论

从大曲中分离到一株在能够产耐酸生淀粉糖化酶的菌株 *Aspergillus fumigates* MS-09。该菌产生的生淀粉糖化酶在 pH3.6 的条件下对生玉米淀粉有较好的分解作用,可达到其最适 pH 条件下酶活的95%以上。酶的最适作用温度为65℃,最适作用 pH 为4.6。生玉米粉(2%,w/v)和蛋白胨(1.5%,w/v)有利于 ARSDG 的形成。在最佳条件下,液体发酵酶活在 pH3.6 的条件下可达到80U/mL。

参考文献:

- [1] 方善康,周凤臻. 黑曲霉 S₄ 生淀粉糖化酶的分离纯化及其特性[J]. 食品与发酵工业,1998(2):13~19.
- [2] 肖长清,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[J]. 应用与环境生物学报,2006,12(1):76~79.
- [3] 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.
- [4] Yeti Marlida, Nazamid Saari, Zaiton Hassan, Son Radu. Raw starch ~ degrading enzyme from newly isolated strains of endophytic fungi [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, 16:573~578.
- [5] Haiyan Sun, Xiangyang Ge, Weiguo Zhang. 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 J Microbiol Biotechnol, 2007, 23:603~613.
- [6] B N Gawande, A Goel, A Y Patkar, S N Nene. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51:504~509.
- [7] Yeti Marlida, Nazamid Saari, Son Radu, Fatimah Abu Bakar. Production of an amylase - degrading raw starch by *Gibberella Pulicaris*[J]. Biotechnology Letters, 2000,22:95~97.
- [8] 尹银嘉,魏氏超,马宝瑕. 3,5-二硝基水杨酸法测二味康口服液中多糖的含量[J]. 中国医学杂志,2003,23(7):414~416.
- [9] 崔振东,杨海凤. 谈酒精生产过程中的杂菌控制[J]. 中国甜菜糖业,2001,2:52~53.

(上接第150页)

本文利用热均质-喷雾干燥法制备包埋双组分 V_A、V_E 的纳米球/微球产品,经配方和工艺的优化,微球壁材辛烯基琥珀酸酯化淀粉与纳米球壁材单甘酯的质量比为8:1(w/w),芯材 V_A 的载量为25%(w/w),固形物含量为40%(w/w),微球芯材与壁材辛烯基琥珀酸酯化淀粉的百分比为50%(w/w);喷雾工艺条件为进风温度185℃,出风温度80℃,均质压力40MPa。制得的纳米球/微球的 V_A、V_E 包封率高,常温下贮存稳定性好。

参考文献:

- [1] 常世敏. 浅谈维生素 A 代谢与生理功能[J]. 中国食物与营养,2005(2):55~57.
- [2] 郑景洲. 维生素 E 的功能、吸收与代谢(1)[J]. 生物学通报,2005,40(11):1~2.
- [3] Sklan D, Donoghue S. Vitamin E response to high dietary vitamin A in chick[J]. J Nutr,1982,112:759~765.
- [4] 丁丽敏,张日俊. 维生素 A 最适需要量的研究进展[J]. 饲料工业,2004,25(10):14~19.
- [5] Shefer A, Shefer S. Novel encapsulation system provides controlled release of food ingredients [J]. Food Technology, 2003,57(11):40~42.
- [6] Pearce K N. Kinsella JE. Emulsifying properties of proteins:

- Evaluation of a turbidimetric technique[J]. J Agric Food Chem, 1978,26(3):716~723.
- [7] Lennart M. Determination of vitamins A and E in milk powder using supercritical fluid extraction for sample clean-up [J]. Journal of Chromatography A, 2000, 874: 275~283.
- [8] Soledad A, Sonia N. Determination of vitamins A and E in infant formulae by high-performance liquid chromatography [J]. Chromatography A, 1997,778:243~246.
- [9] F J Ruperez. Direct liquid chromatography method for retinol, α- and γ- tocopherols in rat plasma [J]. Journal of Chromatography B, 2004, 800: 225~230.
- [10] Lubor U, Dagmar S. Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamin A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 573~574,267~272.
- [11] Fennema O R 著,王璋,许时婴,江波等译. 食品化学(第三版)[M]. 北京:中国轻工业出版社,2003. 312.
- [12] M Fuchs, C Turchiuli. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration [J]. Food Engineering,2006, 75:27~35.
- [13] Lim S T, Chang E H, Chung H J. Thermal transition characteristics of heat~moisture treated corn and potato starches [J]. Carbohydrate Polymers,2001, 46:107~115.