

产糖化酶根霉菌的分离及其酶学性质研究

孔维锐,郭福宗,周 胜,寸跃芳,唐湘华

(云南师范大学生命科学学院,云南 昆明 650500)

摘要: 从五粮液酒厂周边采集土样中分离出6株产糖化酶且酶活较高的菌株,选取酶活最高的1株K-1为出发菌,进行发酵实验和酶学性质研究,结果表明,糖化酶酶活在50~55℃较高,最适作用温度为55℃,糖化酶在pH5.5~6之间酶活力较高。酶对玉米粉、小麦粉、木薯粉、苦荞粉、黄豆粉有较强的液化能力,其中对玉米粉的糖化能力最强。在酶的动力学实验中测得 $K_m=1.446\text{ mg/mL}$, $V_m=0.269\text{ mg/mL}\cdot\text{min}$ 。

关键词: 根霉; 糖化酶; 酶学性质

中图分类号: TS261.1; Q55; TQ920

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2012)09-0032-04

Isolation of Glucoamylase-producing *Rhizopus* Strains and Study on Their Enzyme Properties

KONG Weirui, GUO Fuzong, ZHOU Sheng, CUN Yuefang and TANG Xianghua

(Life Science College of Yun'nan Normal University, Kunming, Yun'nan 650500, China)

Abstract: 6 *Rhizopus* strains producing glucoamylase with high enzyme activity were isolated from that were isolated from soil samples collected from surroundings of Wuliangye Distillery. Strain K-1 with the highest enzyme activity was used as starting strain for fermentation experiments and enzyme properties research. The results showed that glucoamylase displayed the highest enzyme activity both at 50~55℃ (the optimum temperature was at 55℃) and pH value was 5.5~6. Glucoamylase could liquefy corn flour, wheat flour, tapioca starch, buckwheat powder, and soybean meal, and it could saccharify corn flour easily. The kinetics experiment of glucoamylase showed $K_m=1.446\text{ mg/mL}$ and $V_m=0.269\text{ mg/mL}\cdot\text{min}$.

Key words: *Rhizopus*; glucoamylase; enzyme properties

根霉细胞中不仅含有丰富的糖化酶,还含有一定的酒化酶系,可以边糖化边酒化,同时含有能产生曲酒香味前体物质的酶系^[1]。而且根霉糖化力比曲霉更高,且具适应性强、繁殖速度快等特点;生长速度快,对温度、湿度、营养的适应范围很广。

糖化酶是淀粉糖化酶(Glucoamylase EC.3.2.1.3)的简称,又称为 γ -淀粉酶(γ -amylase),糖化酶能从淀粉非还原性末端依次切下一个葡萄糖单位,将淀粉水解为葡萄糖。因此,它被广泛应用于酒精、白酒酿造、抗生素、氨基酸、有机酸、甘油、纺织、日化等生物工业中^[2],是我国最大的工业酶制剂产品^[3],多年来对糖化酶的研究主要集中于提高菌株的产酶能力^[3-5]、改善发酵条件^[6]。本实验旨在筛选出复合酶系协同作用强的菌种,供葡萄糖生产或酿酒工业应用。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器

土样:宜宾五粮液酒厂周边土壤。

药品与试剂:无菌水,3,5-二硝基水杨酸(DNS)^[7],2%可溶性淀粉溶液,pH4.6乙酸-乙酸钠溶液^[8];生长因子:FeSO₄(0.01%)、KCl(0.05%)、MgSO₄(0.05%)、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄、KNO₃、NaNO₃、NH₄NO₃。

仪器及设备:高速冷冻离心机,飞鸽牌;UV-2000紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;超净工作台;等。

分离培养基:可溶性淀粉0.5g,蛋白胨0.5g,酵母膏0.5g,KH₂PO₄0.05g,MgSO₄·7H₂O0.01g,CaCl₂·2H₂O0.05g,琼脂2.5g,pH值为5.0。0.1MPa,121℃条件下灭菌30min,冷却至约50℃,倒5~6块平板/100mL,冷

基金项目 2011年“云南省大学生创新性实验计划项目-宜宾五粮液酒厂周边根霉产糖化酶能力筛选及其固体发酵条件优化”,项目编号 KXX2011-12-284。

收稿日期:2012-05-21

作者简介:孔维锐(1987-),男,云南曲靖人,在读本科,生物技术专业。

通讯作者:唐湘华,讲师,生物工程专业。

优先数字出版时间 2012-07-20;地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120720.1041.008.html>。

却备用。

液体发酵培养基:可溶性淀粉 2.0 g,蛋白胨 0.5 g,酵母膏 0.5 g, KH_2PO_4 0.05 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g, 水 100 mL, pH6.0。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株分离及培养方法

称取 5 g 土样,在研钵中研成粉末状,放入盛有 45 mL 无菌水并带有玻璃珠的三角瓶中。振摇 10 min,使样本与水充分混合。振荡混匀后静置,取上清液 1 mL 至 9 mL 无菌水试管中,以此类推,制成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 等各种稀释度的溶液,吸取各稀释度溶液 0.1 mL 于分离培养基上涂布均匀,置于 30 °C 培养箱中培养 48 h。观察分离培养基平板上长出的菌落周围有无透明水解圈,取水解圈较大者接种于筛选平板上划线分离至纯种,斜面保存^[9]。

1.2.2 糖化酶活力的测定

葡萄糖标准曲线制作:分别在 25 mL 的具塞试管中加入 0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL、1.4 mL、1.6 mL 的 1mg/mL 的葡萄糖标准液,加蒸馏水补至 2 mL,分别再加入 3 mL 的 DNS 试剂,置沸水浴中煮沸 5 min,然后取出流水冷却,加蒸馏水 10 mL 振荡摇匀,以无葡萄糖标准液管作空白调零点,在 540 nm 波长下比色测定。以葡萄糖含量为横坐标,以吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线^[10]。

糖化酶酶活力的定义:1 mL 酶液在 55 °C, pH6.0 的条件下,1 min 水解可溶性淀粉产生 1 μmol 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位 (U) (国标法糖化酶活力单位定义)。

酶活力单位 (U/mL) = $\{[K(\text{OD}_A + \text{OD}_B)]/2 + b\} \times N \times 10^3 / 10 / 0.2 / 180.2$

式中: OD_A ——A 管的吸收光度值;

OD_B ——B 管的吸收光度值;

10^3 ——mg 转换为 μg ;

180.2——葡萄糖的摩尔质量;

N——酶液的稀释倍数;

10——表示酶反应时间为 10 min;

K——标准曲线斜率。

酶液的制备:取液体发酵液 1 mL 于装有 9 mL 蒸馏水的试管中并振荡混匀,然后倒入离心管中离心,取上清液备用。

酶活测定方法:取 2 % 淀粉悬浮液 1.8 mL 于 25 mL 的试管中,55 °C 预热 10 min,加入 0.2 mL 酶液,于 55 °C 条件下反应 10 min 后,加入 3 mL DNS 终止反应,摇匀,置沸水浴中煮沸 5 min,取出流水冷却,加蒸馏水至 15 mL 振荡摇匀,以不加酶液作为空白调零点,在 540 nm 波长下比

色测定。

1.2.3 酶学性质的初步研究

温度对酶活的影响:分别在 37 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C 条件下进行酶反应,10 min 后测定酶活力。

pH 值对酶活的影响:配制 pH4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 的乙酸-乙酸钠溶液缓冲液,用不同 pH 值缓冲液配制 2 % 的淀粉底物,测定各不同 pH 值条件下的酶活。

1.2.4 酶的动力学研究

分别配制 0.3125 mg/mL、0.625 mg/mL、1.25 mg/mL、2.5 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL 可溶性淀粉溶液,各取 1.8 mL 在 55 °C 下预热加入 0.2 mL 酶液,55 °C 下反应 5 min 后测还原糖含量,计算反应速度。根据米氏方程采用最常用的双倒数作图法作图,然后以 $1/[S]$ 对 $1/v$ 作图,可得到一条直线。这条直线在横轴上的截距为 $-1/K_m$,在纵轴上的截距为 $1/V_m$,由此即可求得 K_m 和 V_m 。

1.2.5 糖化酶对酿酒原料液化能力的测定

分别称取通过 0.1~0.125 mm 孔径筛子筛出来的 5 g 玉米粉、小麦粉、木薯粉、苦荞粉、黄豆粉末于装有 95 mL 水的 200 mL 烧杯中,在酒精灯上加热煮沸至浆糊状,55 °C 预热 10 min,然后向每个样品液烧杯中取出 0.2 mL 于试管中待用,作为比色时的对照。然后向各烧杯中加入 1 g 酶粉并计时,且在 55 °C 下不断搅拌,反应,每隔 10 min 用移液枪各取 0.2 mL 上清液于 25 mL 的试管中补加蒸馏水 1.8 mL,分别再加入 3 mL DNS 试剂,置于沸水浴中煮沸 5 min,然后取出流水冷却,加蒸馏水 10 mL 振荡摇匀,在 540 nm 波长下比色测定,计算还原糖含量。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

如图 1 所示,得回归直线方程 $y=kx+0.026$, $k=0.941$, $R^2=0.998>0.99$,该标准曲线相关性很好。式中,Y 表示测定的吸光度 (OD) 值,X 表示还原糖的浓度,0.026 表示补偿参数。

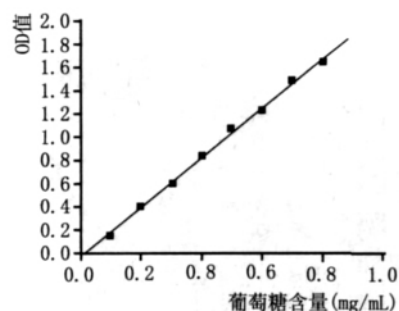


图 1 标准曲线

2.2 菌株筛选结果

将土样进行稀释涂布分离,在以淀粉为唯一碳源的分离培养基上以 30 °C 倒置培养 1~2 d,筛选到 6 株酶活

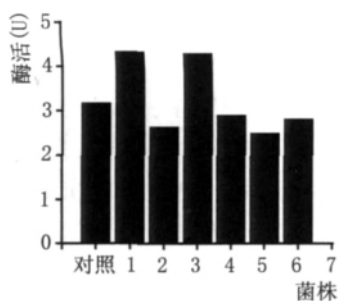


图2 菌株筛选

较高的菌株,测得酶活力见图2,选取酶活最高的菌株K1作为实验菌株。菌株在分离培养基上生长快,菌落近似圆形,表面为褐黑色,菌丝白色,菌丝无隔膜、有分枝和假根,初步鉴定为根霉。菌落、菌丝体、孢子见图3~图5。

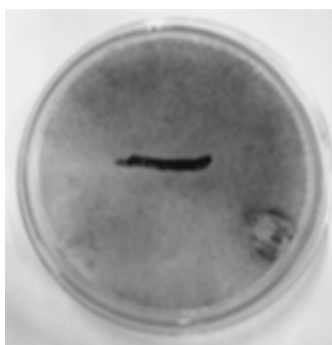


图3 菌落

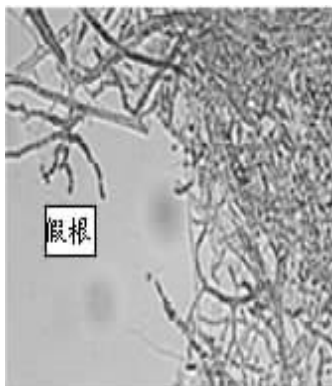


图4 假根

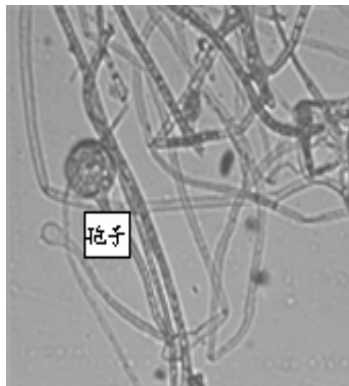


图5 孢子

2.3 酶学性质的初步研究

2.3.1 温度

在不同温度下测定酶活力,结果见图6。由图6可知,酶作用的最适温度为55℃,而且随着温度的升高,酶活的变化较大。

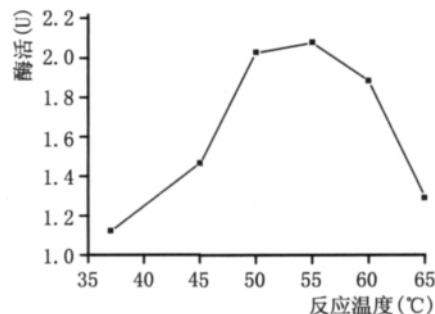


图6 温度对酶活的影响

2.3.2 pH值

不同pH值下酶活的测定结果见图7。由图7可知,酶在pH5.5~6之间酶活较高,最适pH值为5.5。

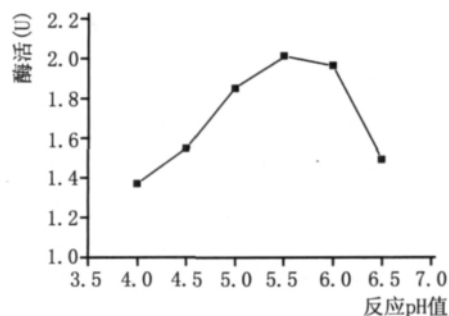


图7 pH值对酶活的影响

2.4 动力学实验研究

该酶动力学研究结果见图8,以 $1/[S]$ 对 $1/v$ 作图得图9,所得方程为 $y=5.372x+3.716$ 。由曲线与X轴的焦点 $-1/K_m$ 计算得到 $K_m=1.446\text{ mg/mL}$,曲线与Y轴焦点纵坐标 $1/V_m$ 计算得到 $V_m=0.269\text{ mg/mL}\cdot\text{min}$ 。

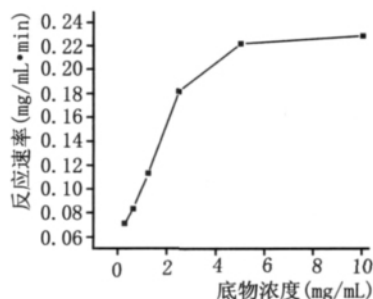


图8 动力学结果

2.5 液化力测定

糖化酶对酿酒原料液化能力的测定结果见图10。

由图10可知,该酶对几种原料具有较强糖化作用。

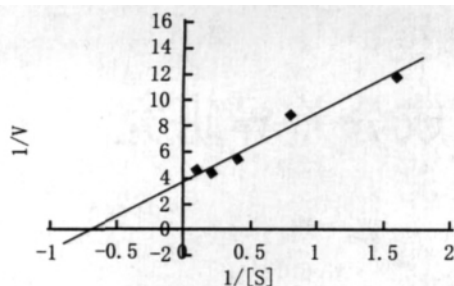


图9 动力学方程图

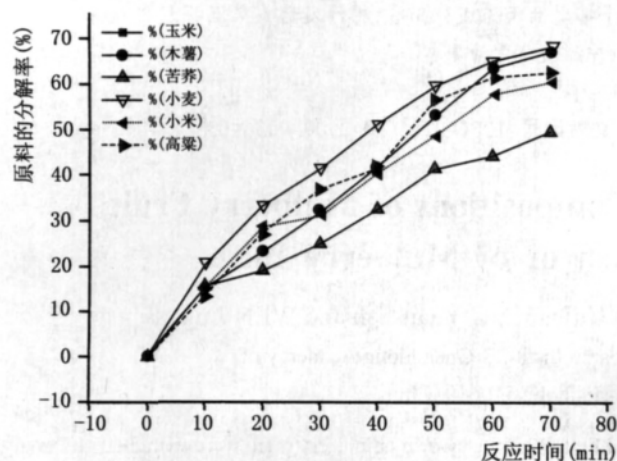


图10 糖化酶对酿酒原料的液化能力

其中,玉米粉、高粱粉、小麦粉的液化能力比小米粉、苦荞粉、木薯粉的强。云南玉米、高粱产量高,原料来源方便,该酶具较强现实应用价值。

3 结论

从样品中分离出6株酶活较高的菌株,选取酶活最高的菌株K-1作为出发菌株,初步鉴定为根霉,酶最适作用温度为55℃,而且随着温度的升高,酶活的变化较大。酶活在pH5.5~6之间较高。该菌株对传统酿酒原料

液玉米粉、小麦粉、木薯粉、苦荞粉、黄豆粉具有较强的液化能力,酶的动力学实验测得 $K_m=1.446 \text{ mg/mL}$, $V_m=0.269 \text{ mg/mL} \cdot \text{min}$ 。将进一步对该菌株进行鉴定,研究酶的形成条件以及对其固体发酵产酶条件进行优化,提高产酶率,最终应用于酿酒生产。

参考文献:

- [1] 郑曼新.复合酶中糖化酶活力的测定[J].无锡轻工业大学学报,2003,24(3):90-93.
- [2] 武金霞,等.糖化酶的研究进展及趋势[J].自然杂志,2002,25(3):161-163.
- [3] 谷海先,张玉玲,曹钰.高活力糖化酶菌种选育及发酵研究[J].食品与发酵工业,1998,24(5):31-34.
- [4] KUMAR S, SATYANARAYANA T. Purification and kinetics of a raw starch-hydrolyzing, thermostable, and neutral glucoamylase of the thermophilic mold *Thermomucor indicae-seudaticae*[J]. Biotechnol Prog, 2003, 19(3): 936-944.
- [5] ELLAIAH P, A DINARAYANA K, B HAVANI Y, et al. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus species*[J]. Proc Biochem, 2002, 38(4): 615-620.
- [6] 李俊刚,方善康.生淀粉糖化菌 NL-3 的发酵条件[J].西南师范大学学报:自然科学版,1998,23(1):92-96.
- [7] 大连轻工业学院,等.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994:101.
- [8] 蔡定域.食用白酒分析[M].成都:成都科技大学出版社,1994:218,434.
- [9] 诸葛斌,姚惠源,诸葛健.生淀粉糖化酶高产菌的选育[J].微生物学报,2001,2(6):60-64.
- [10] 刘建军,姜鲁燕,赵祥颖.根酶 PE-8 菌株淀粉降解酶类的研究[J].食品科学,2002, 23(11):34-37.

(上接第31页)

- [5] Ainsworth G C, Sparrow F K, Sussman A S. The fungi, an advanced treatise[M]. New York and London: Academic Press, 1973.
- [6] White TJ, Bruns TD, Lee SD, et al. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes[M]. In PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, 1990:315-322.
- [7] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16 (2): 111-120.
- [8] Shenoy BD, Jeewon R, Hyde KD. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi [J]. Fungal Diversity, 2007, 26: 1-54.
- [9] 匡治州,许杨.核糖体 rDNA ITS 序列在真菌学研究中的应用

[J].生命的化学,2004,24(2):120-122.

- [10] 姚婷婷.糖化酶生产菌的遗传改良[D].无锡:江南大学,2006.
- [11] Haifeng Li, Wei Sun, Yunyun Gao, et al. Cloning, recombinant expression and characterization of a new glucoamylase gene from *Aureobasidium pullulans* NRRL 12974 and its potential application in raw potato starch degradation [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10 (45):9122-9131.
- [12] 张良,李宗珍,张宿义,等.泸州古酿酒作坊空气曲霉菌初步研究[J].酿酒,2009,36(1):35-37.
- [13] 杨丹丹,钱志伟,陈茂彬,等.高糖化力菌种的筛选及诱变育种[J].中国酿造,2010(1):36-39.
- [14] 刘春莉.高效耐酸性液化糖化酶的制备及其应用[D].成都:四川大学,2003.
- [15] 赖登辉,薛常有,潘华文.入窖七因素的变化规律及相互关系的研究(四):入窖酸度[J].酿酒科技,2011(4):43-45.