

一株酸性糖化酶的分离纯化及酶学性质研究

朱婧, 王青艳, 廖思明, 秦艳, 申乃坤, 黄日波

(广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西南宁 530007)

摘要: 从土壤中筛选得到一株产酸性糖化酶的黑曲霉ASP-S21, 粗酶液通过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀、Sephacryl S-200层析柱分离纯化, SDS-PAGE电泳测定其分子量为120 kDa。该酶最适作用温度为65 °C; 酶的最适反应pH值为4.0; 在pH 2.2~7.6之间, 具有较好的酸稳定性; 酶的 K_m 值为0.94 mg/mL, $V_{max}=142.43 \text{ mol}(\text{Glu})/\text{min}\cdot\text{L}$ 。 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 对酶活有较强的促进作用, 10 mM的 Cu^{2+} 使酶活力提高到129%, Fe^{3+} 对酶催化活力抑制作用较强。该酶且具有部分降解生淀粉的能力, 在pH 4.0, 50 °C反应1h, 生淀粉酶活力为0.39 U, RDA值为4.57%。得到的黑曲霉ASP-S21酸性糖化酶, 产生的糖化酶活力高、耐酸稳定性好, 酶学性质符合淀粉糖化工业化过程中对酶的要求, 具有良好的研究前景。

关键词: 酸性; 糖化酶; 黑曲霉; 分离纯化

文章编号: 1673-9078(2012)10-1294-1297

Purification of an Acidic Glucoamylase from *Aspergillus niger* and its Enzymatic Properties

ZHU Jing, WANG Qing-yan, LIAO Si-ming, QIN Yan, SHEN Nai-kun, HUANG Ri-bo

(National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: An acidic glucoamylase producing strain *Aspergillus niger* ASP-S21 was isolated from soil. Glucoamylase was purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation, ion-exchange chromatography with a Sepharose HP column, and column chromatography with a Sephacryl S-200 column, the molecular weight of SDS-PAGE was 120 kDa. The study of its enzymatic properties showed that the optimum temperature and pH for glucoamylase of such strain were 65 °C and 4.0, respectively. Besides, it had good acid stability within the range of pH value from 2.2 to 7.6. The K_m for glucoamylase was calculated to be 0.94 mg/mL, and the V_{max} was 142.43 mol(Glu)/min·L. The enzyme activity was enhanced by Cu^{2+} and Co^{2+} , and the 10 mM of Cu^{2+} could improve the glucoamylase activity to 129%. However, the enzyme was strongly inhibited by Fe^{3+} . Its RSGA activities were 0.39U and the RDA values were 4.57%. The glucoamylase was suitable for applying in starch sugar industry.

Key words: acidity; glucoamylase; *Aspergillus niger*; purification

糖化酶(Glucoamylase, EC 3.2.1.3)又名葡萄糖淀粉酶, 是一种外切型糖苷水解酶, 主要从淀粉的非还原性末端依次水解 α -1,4糖苷键产生葡萄糖, 它也可以少量地水解 α -1,6和 α -1,3糖苷键, 是水解淀粉产生葡萄糖的主要酶类。糖化酶广泛地应用于食品、医药和发酵等工业, 并可作为糖化剂用于白酒、黄酒、酒精、醋、啤酒、乳酸钙、柠檬酸和味精等的生产, 是最重要的工业酶制剂之一^[1~2]。

收稿日期: 2012-06-08

基金项目: 区科学研究与技术开发课题(桂科攻 11107008-4); 广西科学院基本科研业务费资助项目(11YJ24SW04); 广西自然科学基金重点项目(2010GXNSFD013030); 广西培养新世纪学术和技术带头人专项资金项目资助

作者简介: 朱婧(1983-), 女, 硕士研究生, 研究实习员, 研究方向为发酵工程

通讯作者: 黄日波

目前, 工业中广泛使用黑曲霉(*A.niger*)、泡盛曲霉(*A.awamori*)、米根霉(*R.oryzae*)和臭曲霉(*A.foetidus*)为生产菌株来提取葡萄糖淀粉酶^[3~4]。黑曲霉产的 α -淀粉酶活性低, 糖化酶活力强, 多数黑曲霉的糖化酶能水解80%以上的淀粉。一般糖化酶都具有较窄的pH值适应范围, 但最适pH一般为4.5~6.5。Tomoko等报道来自于*A.saitoi*的糖化酶GLUM1其最适pH范围为2.5~7.5, 最适pH值为4.5^[1], 梁新红纯化得到黑曲霉糖化酶最适反应pH值也为4.5^[5]。本研究筛选得到一株产糖化酶的黑曲霉并进行分离纯化, 研究其酶学性质, 发现该酶的最适pH为4.0, 且在pH 2.2的条件下仍保持较稳定的酶活, 该酶还具有部分的生淀粉降解能力。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 主要仪器及试剂

Taq酶、pMD18-T载体, 购自大连TaKaRa宝生物工程公司; 酵母基因组DNA提取试剂盒、PCR产物纯化试剂盒, 购自上海华舜生物工程有限公司; 交联丙烯基葡聚糖凝胶Sephacryl S-200, Sepharose HP阴离子交换层析购自Amersham公司; 其他试剂为国产或进口的分析纯和生化试剂。

1.1.2 土样来源

广西南宁市周边的淀粉厂。

1.1.3 培养基

(1) 斜面培养基: PDA培养基;

(2) 筛选培养基: 可溶性淀粉1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, FeSO_4 0.001%, MgSO_4 0.05%, 琼脂1.5%, pH 4.6; 121 °C, 灭菌20 min, 降温至50 °C加入1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素;

(3) 固体发酵培养基: 麸皮3 g, 木薯淀粉2 g, 水5 mL; MgSO_4 0.1%; KH_2PO_4 0.3%, FeSO_4 0.001%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%, 以上浓度均为最终浓度), pH 4.6, 121 °C, 灭菌20 min^[6]。

1.2 筛菌

稀释土样 10^{-3} ~ 10^{-5} 倍, 制成土壤混悬液, 将其涂布到筛选培养基上, 28 °C恒温培养4 d左右, 筛选有较大透明圈的菌株, 进行固体发酵培养。

1.3 菌株的鉴定

观察菌落的形态特征, 对菌株进行26S rDNA鉴定, 提取真菌基因组的总DNA, 测序后将获得的目的DNA片段的序列输入GenBank, 利用在线Blast程序与NCBI数据库中的所有序列进行比较分析。

1.4 酶活力测定及蛋白含量测定

酶活力测定: 将0.4 mL的1%可溶性淀粉与0.3 mL 0.05 mol/L pH 4.0的柠檬酸-磷酸盐缓冲液混合后置于60 °C保温10 min, 再加入适当稀释的酶液0.1 mL反应10 min后, 利用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定生成的还原糖^[7]。以在上述条件下每分钟产生1 μmol 还原糖(葡萄糖当量)所需要的酶量为一个酶活力单位(U)。

蛋白含量的测定: 利用牛血清蛋白为标准, 采用Bradford法^[8]测定蛋白含量。

1.5 糖化酶的分离纯化

1.5.1 粗酶液的制备

将筛选菌株接种到发酵培养基中, 置于28 °C培养4 d, 以1:20 (*m/V*)加入蒸馏水, 40 °C水浴振荡浸提1 h后, 用4层纱布过滤, 8000 \times g离心6 min去除菌体, 得到粗酶液。

1.5.2 酶的分离纯化

用60%饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, 4 °C静置2 h,

8000 \times g离心30 min后分离沉淀与上清液, 取沉淀加入0.05 mol/L pH 6.0磷酸盐缓冲液溶解。经过透析12 h后离心, 取上清液, 将之上样至Sepharose HP 阴离子交换层析柱(1.2 cm \times 20 cm), 利用AKTA prime蛋白质纯化系统分离, 并将收集的试样进行活性测定。样品用超滤管浓缩后, 上样至Sephacryl S-200层析柱(1.2 cm \times 80 cm)进一步分离纯化, 收集后测定酶活和蛋白含量, 最后用SDS-PAGE凝胶电泳检测^[9]。

1.6 SDS-PAGE分析

具体步骤参照^[10], 用于分析蛋白质的分子量, 分离胶浓度为10%, 浓缩胶浓度为5%, 染色液用考马斯亮蓝R-250。

1.7 糖化酶酶学性质

1.7.1 酶的最适反应温度及热稳定性

在0.05 mol/L pH 4.0柠檬酸-磷酸盐缓冲液中, 酶分别在45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C、75 °C、80 °C不同温度下按酶活力测定法测定酶活, 考察酶的最适反应温度, 以酶活最高者为100%, 计算相对活力。酶液在0.05 mol/L pH 4.0柠檬酸-磷酸盐缓冲液中于不同温度(30 °C~70 °C)保温30 min后, 在最适温度下测定其相应的剩余酶活力, 考察酶的温度稳定性。用于酶学性质研究的待试酶样品均为粗酶液经纯化后的酶, 再经适当稀释酶活力达11.92 U/mL(最适条件下测得)。

1.7.2 酶的最适反应pH及pH稳定性

酶分别在不同pH (2.2~8.0)的0.05 mol/L柠檬酸-磷酸盐缓冲液和酶的最适反应温度条件下按酶活力测定法测定酶活, 研究酶促反应的最适pH, 以酶活最高者为100%, 计算相对活力。将酶液分别置于不同pH (2.2~8.5)的0.05 mol/L柠檬酸-磷酸盐缓冲液体系中于45 °C放置2 h后, 在调至最适pH条件下测定其对应的剩余酶活力, 研究酶的pH稳定性^[11]。

1.7.3 动力学常数 K_m 及 V_{max} 的测定

将酶液与不同浓度的可溶性淀粉底物作用, 测定酶的反应初速度, 用Lineweaver-Burk双倒数作图法求出以可溶性淀粉的酶的 K_m 值及 V_{max} ^[12-13]。

1.7.4 金属离子和其它试剂对酶活力的影响

在0.05 mol/L pH 4.0柠檬酸-磷酸盐缓冲液中分别加入各种金属离子和试剂, 致使金属离子和试剂的终浓度为0.005 mol/L、0.01 mol/L, 按标准方法测定酶活力, 以未加入金属离子和试剂的酶液为对照100%, 计算相对活力。观察金属离子和试剂对酶活力的影响。

1.7.5 酶的生淀粉降解性质分析

用pH 4.0、0.05 mol/L柠檬酸-磷酸盐缓冲液配制质量分数为1%的木薯生淀粉悬液, 作为底物。首先在

50 mL三角瓶中加入4 mL底物, 50 °C预热10 min, 然后加入1 mL经过适当稀释的酶液, 50 °C恒温振荡(180 r/min)反应1 h后, 加入0.5 mL、4% NaOH终止反应, 最后取适当体积的反应液于5 000 r/min离心5 min, 上清液用DNS法测定还原糖量。

1.7.6 生淀粉降解能力(RDA)计算

根据文献^[4]的方法, RDA: $B/A \times 100\%$, 其中B为降解生淀粉酶活, A为降解糊化淀粉酶活。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

对采集的试样经过多次富集后, 筛选到1株具有较高淀粉酶活的菌株ASP-S21, 发酵结束后酶活达到

136.34 U/mL。

2.2 菌株的26S rDNA鉴定结果

用26S rDNA序列进行同源性比对分析, 确定其分类地位。在GenBank中进行同源比对分析, 发现该菌株ASP-S21与黑曲霉具有99%的同源性, 因而可初步认为其属于黑曲霉。

2.3 糖化酶的分离纯化

粗酶液浓缩后通过 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀、Sephacryl S-200阴离子交换层析、Sephacryl S-200层析柱分离纯化, 结果如表1所示。由表1可知, 实验获得纯化的酶蛋白比活为U/mg, 纯化倍数为28.35, 回收率为8.74%。在10% SDS-PAGE凝胶电泳中鉴定为相对分子质量约为120 kDa的蛋白质, 结果见图1。

表1 纯化过程总表

Table 1 Separation and purification of Glucoamylase of *Aspergillus niger*

Enzyme sample/mg	Total protein/mg	Total activity/U	Specific activity/(U/g)	Purification fold	Total activity recovery/%
Crude culture supernatant	129.51	1363.4	10.53		
60% Ammonium sulphate and dissolve	32.88	961.74	22.3	2.12	70.54
DEAE-Sephacryl chromatography	5.97	348.12	58.31	5.54	25.53
Phenyl-Sephacryl chromatography	0.39	119.17	298.52	28.35	8.74

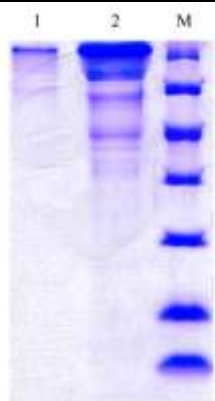


图1 ASP-S21糖化酶的SDS-PAGE图

Fig.1 SDS-PAGE pattern of the purified glucoamylase from ASP-S21

注: M: 蛋白质Marker; 1: Sephacryl S-200纯化后的蛋白; 2: Sepharose HP纯化后的蛋白。

2.4 酶学性质研究结果

2.4.1 酶的最适温度及热稳定性

在不同温度下测定的酶活结果见图2a, 该酶的最适反应温度为65 °C左右, 在60 °C到70 °C之间都具有较高的酶活力。酶在45 °C保温30 min后剩余活力为原来的80.07%, 当温度达到65 °C以上保温30 min后酶几乎全部失活, 表明该酶对热较敏感(图2b)。

2.4.2 酶的最适反应pH值及pH稳定性

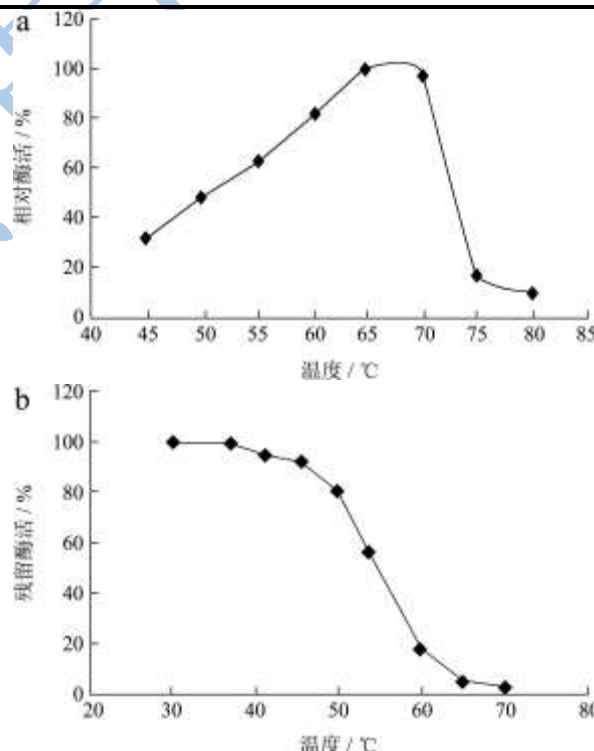


图2 温度对糖化酶活性的影响 (a) 及热稳定性 (b)

Fig.2 Effect of temperature on the activity and thermostability of glucoamylase

pH对酶活力影响的实验结果见图3, 结果表明该酶催化反应的最适pH值为4.0, 在pH 3.0~5.0之间活

力较好,当反应 pH 升到 5.5 以上,酶活下降比较快,因此该酶为酸性酶。酶的 pH 稳定性实验结果(图 3)表明该酶在 pH 值为 2.2~7.6 的条件下稳定性相对较好,酶在 pH 2.2 的条件下 45 °C 保存 2 h 后酶活力仍保留原来的 72.91%,而在 pH 为 8.0 条件下保存,酶活力有明显的下降。

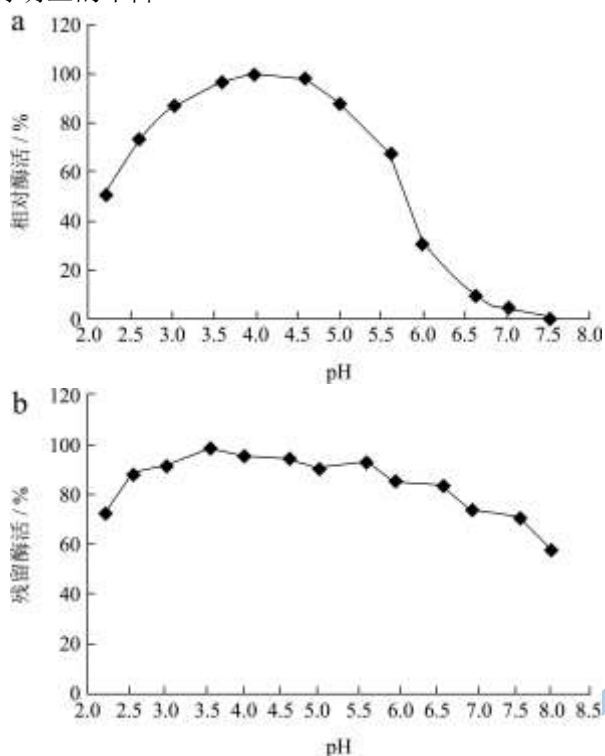


图3 pH值对糖化酶活性的影响 (a) 及pH值稳定性 (b)

Fig.3 Effect of pH on the activity and stability glucoamylase

2.4.3 动力学常数Km及Vmax的测定

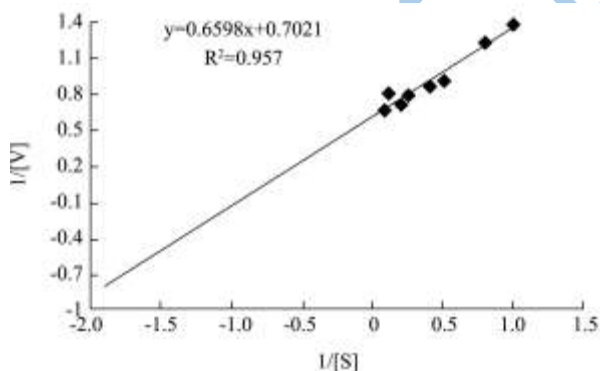


图4 糖化酶的Lineweaver-Burk图

Fig.4 Lineweaver-Burk's plot of glucoamylase

分别以1、1.25、2、2.5、4、5、8、10 mg/mL的可溶性淀粉为底物,测定底物反应的初速度,反应10 min后,测得相应的酶活力值(OD₅₄₀),再采用Lineweaver-Burk 双倒数作图,求得 Km 值为 0.94 mg/mL, Vmax=142.43 mol(Glu)/min·L。

2.4.4 金属离子对酶活的影响

表2 不同金属离子及EDTA对糖化酶活性的影响

Table 2 Effects of different metal ions and EDTA on activities of glucoamylase

Cation	Relative enzyme activity	
	(5mM)/%	(10mM)/%
Ba ²⁺	95.7	87.3
Fe ³⁺	78.6	68.2
K ⁺	92.6	88.6
Mg ²⁺	107	104
Cu ²⁺	115	129
Na ⁺	101	107
Ca ²⁺	96.1	88.6
Co ²⁺	108	120
Ni ²⁺	95.1	89.4
Li ⁺	95	93.1
Zn ²⁺	95.3	90.5
EDTA	93.5	86.3
Control	100	100

如表2所示, Cu²⁺、Co²⁺对该酶有显著的促进作用,而Fe³⁺对其有抑制作用,其他金属离子及EDTA作用均不显著。

2.4.5 酶的生淀粉降解性质分析

该酶主要为酸性糊化淀粉糖化酶,在pH 4.0的条件下反应,酶液具有部分降解生淀粉的能力,生淀粉酶活力为0.39 U, RDA值为4.57%。

3 结论

黑曲霉糖化酶ASP-S21粗酶液通过(NH₄)₂SO₄沉淀、Sephacryl HP阴离子交换层析、Sephacryl S-200层析柱分离纯化,酶的比活力达到了298.52 U/mg,较粗酶液纯化了28.35倍,酶活回收率达到8.74%。经分离纯化的糖化酶其最适作用温度为65 °C;在45 °C保温30 min后剩余活力为原来的80.07%。酶的最适反应pH 值为4.0,在pH 2.2的条件下45 °C保存2 h后酶活力仍保留原来的72.91%。该酶液并具有部分降解生淀粉的能力,在pH 4.0, 50 °C反应1 h,生淀粉酶活力为0.39 U, RDA值为4.57%。

3.2 该酶的最适pH可达到4.0,在3.0到4.5之间都有较为稳定的酶活,并且在pH 2.2的条件下保存2 h后酶活力仍较为稳定,其酶学性质符合淀粉糖化工业化过程中对酶的要求,适合应用于淀粉糖化工业。

参考文献

[1] 张秀媛,袁永俊,何扩.糖化酶的研究概况[J].食品研究与开发,2006.27(9):163-166
 [2] 曹慕琛,徐健勇,罗立超,等.黑曲霉糖化酶基因的克隆及其在

- 毕赤酵母X33中的表达[J].安徽农业科学, 2011, 39 (14): 8226-8230
- [3] 孙俊良,李新华,梁新红.不同碳源对黑曲霉产糖化酶活力的影响[J].食品科学,2008,29(8):433-436
- [4] Wang QH, Wang XQ, Wang XM. Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation [J]. Process Biochemistry, 2008,43(3): 280-286
- [5] 梁新红,孙俊良,唐玉,等.黑曲霉糖化酶分离纯化与酶学性质研究[J].河南科技学院学报,2011,39(4):24-27
- [6] 孟国庆,赵林,王婷,等.一株糖化酶高产菌株的筛选和鉴定[J].中国饲料添加剂,2011,8:21-25
- [7] Friederike, Manger-Jacob, Tobias Muller, et al. Isolation and sequencing of a new glucoamylase gene from an *Aspergillus niger* aggregate strain (DSM 823) molecularly classified as *Aspergillus tubingensis* [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2005 88: 267-275
- [8] Bradford MM.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976,72: 248-254
- [9] 谭颖嫦,彭中健,夏枫耿,等.纳豆激酶分离纯化的工艺研究[J].现代食品科技,2011,27(8): 985-987
- [10] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].第一版.北京:科学出版社, 1999
- [11] 张浩,张帅,张娜,等.地衣芽孢杆菌2709蛋白酶分离纯化与性质[J].现代食品科技,2010,26(2):129-132
- [12] Yue Wang, Erica Fuchs, Roberto da Silva, et al. Improvement of *Aspergillus niger* Glucoamylase Thermostability by Directed [J]. Evolution Starch/Stärke,2006, 58: 501-508
- [13] 张树政,孟广震,何忠效.酶学研究技术[M].北京:科学出版社, 1987
- [14] 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的研究[J].工业微生物,2008,10(5):45-49