

一株产酸性 α -淀粉酶产生菌的分离鉴定及所产酶学特性的初步研究

张大为, 张洁, 王能强, 梁芳

(湖南科技大学生命科学院, 湖南湘潭 411201)

摘要: 从食醋厂内土壤中分离得到一株产酸性 α -淀粉酶能力较强的菌株, 通过形态学和 ITS 区基因序列分析的手段对其进行鉴定, 对其生长温度及发酵液初始 pH 值等生物学特性进行分析, 并对其所产酶的特性进行研究, 研究结果表明: 通过形态学及分子生物学鉴定为黑曲霉, 并命名为 *Aspergillus niger* ZTL; 菌株最适生长温度为 35 °C; 最适产酶温度为 40 °C; 最适生长 pH 值为 6.0, 最适产酶 pH 值为 5.0; 所产 α -淀粉酶在 pH 值 4.5~7.0 时酶活性保持在 80% 以上; 该酶的最适作用温度范围是 40~50 °C; 通过测定该酶的热稳定性表明, 在 40~50 °C 时酶较稳定, 但在 60 °C 时保温一段时间后, 酶稳定性显著下降; Ca^{2+} 对该酶有一定的激活作用, Na^+ 对该酶的活性作用不明显, 而 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 对酶的活性均有比较明显的抑制作用; 该酶的 K_m 值为 4.52×10^{-3} g/L。从而确定该菌株所产的 α -淀粉酶具有具有很大的开发价值。

关键词: 淀粉酶; 黑曲霉; 鉴定; 酶学; 特性

文章编号: 1673-9078(2015)2-93-99

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.017

Isolation, Identification and Preliminary Enzymology of an Acidic α -Amylase-producing Fungus

ZHANG Da-wei, ZHANG Jie, WANG Neng-qiang, LIANG Fang

(College of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China)

Abstract: An acidic α -amylase-producing fungal strain was isolated from the soil near a vinegar factory and was identified by morphology and ITS sequence analysis. Growth characteristics such as growth temperature and pH of the initial fermentation solution as well as the characteristics of the enzyme produced by this strain were examined. The strain was identified as *Aspergillus niger* and was named *Aspergillus niger* ZTL. The optimal growth and enzyme-producing temperatures were determined as 35 °C and 40 °C, respectively, while optimum growth and enzyme-producing pH values were 6.0 and 5.0, respectively. The activity of α -amylase produced was above 80% within the pH range of 4.5 to 7.0. The optimum functional temperature range was between 40 °C and 50 °C, and the enzyme was stable within this range, as determined by thermal stability analysis. Additionally, the enzyme stability decreased significantly when kept at 60 °C for some time. The enzyme was activated by Ca^{2+} to some extent and inhibited by Mg^{2+} , Fe^{2+} , and Cu^{2+} , while Na^+ showed no obvious effect. The K_m value was 4.5×10^{-3} g/L. These results indicate that α -amylase produced by the strain isolated in this study has potential development value.

Key words: amylase; *Aspergillus niger*; identify; enzymology; characteristics

从古至今, 我国都是世界上的农业大国, 主要粮食作物的产量在世界上同样是名列前茅。在这些粮食作物中, 如玉米、薯类等淀粉含量高的作物, 就为我国的淀粉深加工产业的良好发展打下了较好的发展基础。在淀粉深加工产业中, 淀粉的应用主要是淀粉制糖和发酵工业, 淀粉酶的运用, 解决了淀粉质原料的

收稿日期: 2014-07-02

基金项目: 基金项目: 湖南省教育厅优秀青年项目 (14B063); 湖南省科技计划项目 (2014NK3129)

作者简介: 张大为 (1977-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 应用微生物

通讯作者: 张洁 (1980-), 女, 讲师, 研究方向: 食品科学

液化和糖化的问题。

近年以来, 对淀粉酶的研究大力推动着淀粉深加工的发展, 淀粉酶在酒精的生产、酿酒、纺织业、食品业、饲料及医药都应用广泛^[1]。淀粉酶是一种非常重要的酶制剂, 其大量的应用与粮食加工、食品加工、酿造、发酵、纺织品工业和医药行业中, 它占据了整个酶制剂市场份额的 25% 左右。目前, 在生产中, 都是以微生物发酵法大规模的生产 α -淀粉酶^[2-5]。

淀粉酶的研究重点已经转为对其不同特性的开发与筛选。目前, 国内外市场中两种常用的淀粉酶为中温和高温淀粉酶, 其适用 pH 范围为 6~7, 而在酸性

条件下,其酶活将会有明显的降低,已经不能满足一些极端如酸性条件下的淀粉原料的深加工工艺的要求。其中,对耐酸性淀粉酶的研究是其中一个比较重要的方向^[6]。我国淀粉原料的深加工过程一般需要经过液化和糖化,在工业生产中,淀粉的液化是先将淀粉酶先加入淀粉乳中,加热,淀粉糊化后进行液化^[7-8]。目前在液化过程中使用的淀粉酶其最适的 pH 在 6.0 左右,但是在随后的糖化过程中,糖化酶的最适 pH 在 5.0 左右,这就会出现淀粉液化后要耗费大量酸碱来调 pH,而耐酸性淀粉酶的开发将有助于解决液化酶和糖化酶最适 pH 存在差异的这个难题。自 1963 年日本研究人员发现 *Aspergillus niger* 可以产酸性 α -淀粉酶以来,许多国家都开始对其研究^[9]。

本文研究从醋厂酸性环境的土壤中筛选的一株能分泌酸性 α -淀粉酶的野生菌株,通过形态学和分子生物学鉴定为黑曲霉,并对其生物学特性进行了研究,本菌株所产淀粉酶具有中温和偏酸性等特性,在食品、化工等行业有着良好的应用前景,并且也为进一步的筛选酶学性能优良的淀粉酶奠定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料与主要仪器

材料:土壤采集于食醋厂内;对照菌株(*Aspergillus oryzae* 2195):购于中国工业微生物菌种保藏中心,现保存于湖南科技大学生命科学学院微生物实验室;平板筛选培养基(质量分数,%):牛肉膏 0.5%,蛋白胨 1.0%,氯化钠 0.5%,可溶性淀粉 2.0%,琼脂 1.5~2.0%,调 pH 到 4.5,高压蒸汽灭菌 121 °C、30 min;种子培养基(质量分数,%):称取可溶性淀粉 10 g,蛋白胨 10 g,酵母膏 5 g,氯化钠 10 g,七水硫酸镁 0.5 g,磷酸二氢钾 3 g,氯化钙 0.5 g,七水硫酸亚铁 0.1 g。调 pH 到 4.5,定容到 1 L,高压蒸汽灭菌 121 °C、30 min;发酵培养基(质量分数,%):称取可溶性淀粉 5 g,蛋白胨 5 g,玉米粉 20 g,七水硫酸镁 0.5 g,磷酸二氢钾 3 g,氯化钙 0.5 g,七水硫酸亚铁 0.1 g,调 pH 到 4.5,定容到 1 L,高压蒸汽灭菌 121 °C、30 min;DNA 凝胶回收试剂盒,购自 Omega 公司,其它如 Tap 酶、dNTPs 等分子生物学试剂,由上海生工生物工程技术服务公司提供。

主要仪器: BSP-400 型生化培养箱,上海博讯实业有限公司; SW-CJ-2F 型超净工作台,苏州苏洁净化设备厂; AU-Y-120 型分析天平,日本岛津公司; PB-10 型 pH 计,北京赛多利斯仪器系统有限公司; YXQ-LS-75SII 型立式压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业

有限公司医疗设备厂; SZX10 摄影显微镜,日本 OLYMPUS。

1.2 试验方法及内容

1.2.1 菌株的初筛

称取所收集土壤样品 1 g 溶于 9 mL 无菌水中,分别用无菌水梯度稀释至 10^5 、 10^6 、 10^7 倍,分别将其涂布于平板筛选培养基表面。36 °C 培养 72 h,用无菌的接种环挑选单菌落影印 2 至 3 皿,同时用签字笔对各单菌落标号。影印过的培养皿 36 °C 培养 72 h,取其中一皿喷洒稀碘液记录有水解圈的单菌落。根据记录从剩余 2 皿中挑取对应透明圈的单菌落,转接,经平板划线法得到纯种。接种斜面保存培养基中,培养后于 4 °C 保藏。本次共取到三个纯的初筛样品。

1.2.2 菌株的复筛

初筛的纯菌种接种于 30 mL/250 mL 的种子培养基上,以 36 °C、150 r/min 摇床培养过夜。种子培养液以 5% 的接种量接种于发酵培养基 200 mL/500 mL,相同条件培养 72 h,比酶活最高的一组菌株即本次实验所需菌种。

1.2.3 粗酶液的提取和酶活的测定方法

发酵液经 8000 r/min 离心 10 min,所得上清液加入终浓度为 60% (m/V) 的硫酸铵,冰浴中持续搅拌 30 min,充分沉淀后,10000 r/min 低温离心 10 min,弃去上清,沉淀物用适量的 20 mmol/L, pH 5.5 的醋酸缓冲液复溶后再次离心(条件同上),弃去不溶物,上清液用 20 mmol/L、pH 5.5 的醋酸缓冲液透析 12 h,以除去酶液中的大量硫酸铵成分,中间更换两次透析缓冲液。透析所得酶液用于酶学性质的初步研究。

参照文献^[10]中所用测定酸性 α -淀粉酶活力的方法。

酶活=[(D₀-D)×100/D₀×10]×稀释倍数

注: D₀ 为空白吸光度, D 为样品吸光度, 100 为系数(%), 10 为反应时间(min)。

1.2.4 蛋白质含量的测定方法

采用福林酚试剂法测定蛋白质含量。

1.2.4.1 蛋白标准曲线的绘制

精确称取牛血清白蛋白溶解于生理盐水中,终浓度为 2 mg/mL 作为母液。

蛋白含量测定的标准曲线如图 1。

样品液适当稀释,使蛋白浓度为 0.05~1.00 mg/mL。

取两支试管,分别加入 0.1 mL 的样品和等量的蒸馏水,按上述标准曲线绘制的方法,测定样品的光吸收度。

图 1 的标准曲线方程为 $y=2.41x$; $R^2=0.9996$ 。

根据标准曲线, 计算出样品的蛋白浓度。

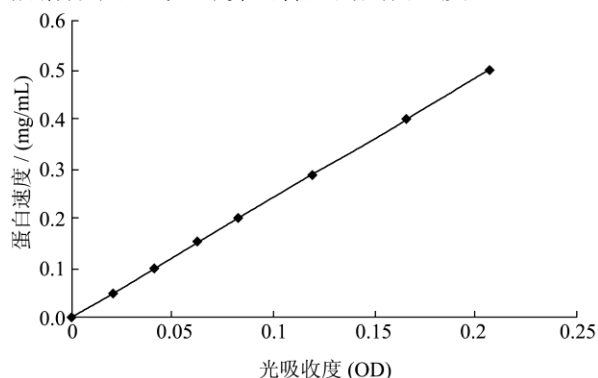


图 1 蛋白质浓度标准曲线

Fig.1 Standard curve of protein concentration

1.2.5 比酶活的计算

根据 1.2.3 和 1.2.4 所得的结果, 所得发酵液测其淀粉酶酶活和其蛋白含量, 取三次实验的平均值, 算得比酶活。

1.2.6 菌株形态学鉴定

形态学鉴定参照于《真菌鉴定手册》(魏景超著)。

1.2.7 菌株的分子生物学鉴定

1.2.7.1 菌株 DNA 的提取

采用磁珠试剂盒来提取总菌体 DNA。

1.2.7.2 PCR 扩增及序列分析

以所得 DNA 基因组为模板, 利用 ITS1 和 ITS4 为引物扩增 ITS 区的基因。PCR 反应体系参照文献^[11]。将扩增产物送上海生工生物工程公司进行测序。

将菌株 ITS 序列输入 NCBI (美国国家生物信息中心) 的 GenBank 数据库中进行比对, 分析序列同源性, 确定该菌株的分类地位。

1.2.8 最适培养温度及产酶温度的确定

将菌体种子接入发酵培养基中, 分别在 25~45 °C 摇床转速为 150 r/min 时恒温培养 72 h, 显微镜观察菌体的生长情况, 确定最适培养温度, 按照上述方法测定发酵液的比酶活, 来确定最适产酶温度。

1.2.9 最适生长 pH 值及产酶 pH 值的确定

将发酵培养基 pH 值分别调节为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0, 在最适温度下培养 72 h, 按照上述方法测定发酵液的比酶活, 同时结合菌体生长状态来确定最适的发酵培养基初始 pH 值。

1.2.10 酶的 pH 值稳定性

分别采用醋酸缓冲液、磷酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液将粗酶液的 pH 值控制在 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0, 在 40 °C 条件下水浴保温

1 h, 测定剩余酶活。绘制曲线, 确定酶的稳定性, 以未经任何处理的酶所测得的酶活力为 100%, 计算相对酶活性。

1.2.11 酶的最适反应温度的确定

在制作温度与酶活力的关系曲线时, 即保持其它条件恒定, 在不同温度的条件下测定酶的反应速度, 以温度为横坐标, 酶的相对活性为纵坐标作图。

取等量的粗酶液, 在温度分别为 20、30、40、50、60、70 °C 的条件下, 以 pH 为 4.0 的马铃薯淀粉溶液为底物溶液, 测定酶的活性, 得到该酶的最适反应温度。

绘制曲线, 得到酶的最适反应温度。以最高酶活力为 100%, 计算相对酶活力。

1.2.12 酶的热稳定性

将粗酶液分别放在温度为 40、50、60 °C 的条件下保温一定时间, 取出后立即冰浴中冷却。

取等量的粗酶液, 以 pH 为 5.0 的马铃薯淀粉溶液为底物溶液, 在 40 °C 的条件下测定剩余酶活。

得到酶在不同温度下保温不同时间的酶活, 绘制曲线。以未经任何处理的酶所测得的酶活力为 100%, 计算相对酶活力。

1.2.13 金属离子对酶活的影响

在反应体系中加入 1 mL、终浓度为 1 mmol/L 的不同的金属离子。

充分混匀后, 在 40 °C 的条件下放置 24 h, 再测定酶活性。观察酶在不同金属离子的作用下的剩余酶活。以不含金属离子的酶活力为 100%, 计算相对酶活力。

1.2.14 酶的 Km 值的确定

分别配制浓度为 0.05%、0.1%、0.15%、0.2% 的马铃薯淀粉溶液为底物。

在 pH 为 5.0, 温度为 40 °C 的条件下, 采用 1.2.3 的酶活力测定方法测定酶的反应速度 V (以单位时间内吸光度的减少量 dA/dt 来表示)。

再用 Lineweaver-Burk 法, 以反应速度的倒数对底物浓度的倒数作图得一直线, 计算 Km 值。

2 结果与分析

2.1 初筛结果

以采集于食醋厂内的土壤为分离源分离得到具有水解淀粉特性的菌株 5 株, 通过淀粉透明圈试验选取得到淀粉水解圈最大的 4 号菌株, 分离到及对照菌株的水解淀粉情况如表 1 所示:

表 1 各菌株的淀粉水解圈

Table 1 Hydrolysis of different sizes of starch rings by each strain

项目	菌株					对照菌株
	1号	2号	3号	4号	5号	
淀粉水解圈直径/cm	1.83±0.02	1.72±0.02	1.43±0.01	2.36±0.01	1.34±0.02	2.05±0.02

从表 1 可以看出：分离得到的菌株具有水解淀粉的能力，1~5 号菌株的水解淀粉的透明圈分别为 1.83±0.02 cm、1.72±0.02 cm、1.43±0.01 cm、2.36±0.01 cm 和 1.32.05±0.02 cm，水解能力最强的是 4 号菌株，且 1, 2, 4 号菌株的产淀粉酶能力均接近于对照的商品菌株，表明上述 3 种菌株均具有可能的开发前景。

2.2 复筛结果

对上述 3 种菌株进一步通过发酵试验得到所产比酶活的结果如表 2 所示。

表 2 复筛菌株比酶活的测定结果

Table 2 Enzyme specific activity results from the secondary screening of strains

菌株编号指标	1号	2号	4号
比酶活(U/mg)	32.16±0.02	27.73±0.02	37.59±0.01

通过酶活及相对应的蛋白质含量计算可知，各备选菌株的比酶活分别为，1 号：32.16±0.02 U/mg，2 号：27.73 ±0.02 U/mg，4 号：37.59±0.01 U/mg。经比较，4 号菌株比酶活较其他组的高，说明该菌株所产酶的性能要优于 1, 2 两株菌，故选择 4 号菌株为本次实验筛选的菌株。

2.3 形态学鉴定结果



图 2 菌落形态图

Fig.2 Colony morphology



图 3 显微镜菌体形态图 (40×40)

Fig.3 Thallus morphology under a microscope (40×40)

对本次筛选的菌株进行平板培养，根据《真菌鉴

定手册》观察其菌落的形态学特征，再挑取成熟的菌落，进行镜检。菌落形态、菌体形态及菌丝形态分别见图 2、图 3 和图 4 所示。

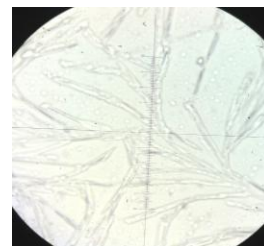


图 4 显微镜菌丝形态图 (40×40)

Fig.4 Mycelial morphology under a microscope (40×40)

经观察，此菌株菌落初时呈黄白色，到生长后期呈黑褐色，菌落背面中央略带黄褐色，周围呈白色，其壁厚而光滑。菌落表面呈粉末状，干燥，不透明。菌落与培养基之间的连接很紧密，不易挑起。菌落直径在 1~2 cm 间，产黑褐色孢子。孢子在菌成熟后期会自动弹出。在显微镜下观察，发现其为多细胞，菌丝间有分隔。分生孢子梗从厚壁而膨大的菌丝细胞上垂直生出，分生孢子梗顶端膨大，呈球形，顶囊表面产生单层的小梗，分生孢子生于小梗上。初步鉴定为黑曲霉。

2.4 分子生物学鉴定结果

将该菌株的 ITS 区 DNA 基因序列在 NCBI 种 GenBank 上进行同源性比对，结果表明该序列与黑曲霉同源性为 100%。结合形态学鉴定和分子生物学两种鉴定手段，确定该菌株为黑曲霉，命名为黑曲霉 ZTL (*Aspergillus niger* ZTL-04)。

2.5 *Aspergillus niger* ZTL-04 最适生长温度及产酶温度的确定

将菌株置于 25~45 °C 下培养 72 h 后，通过显微镜观察发现菌株在 35 °C 时菌丝粗壮、均匀，菌丝球数量最多，且大小均匀。故确定该菌株最适生长温度为 35 °C。

从图 5 可看出，在 25~45 °C 培养条件下，*Aspergillus niger* ZTL 所产酶的比活度逐渐升高，到 40 °C 以后略有下降，但是下降幅度不大。在该菌株最适培养温度 35 °C 下，虽然菌体生长最好，但是产酶

的比活度不是最高, 到 40 °C 时酶的比活度达到最高, 故确定 40 °C 是产酶的最适温度。

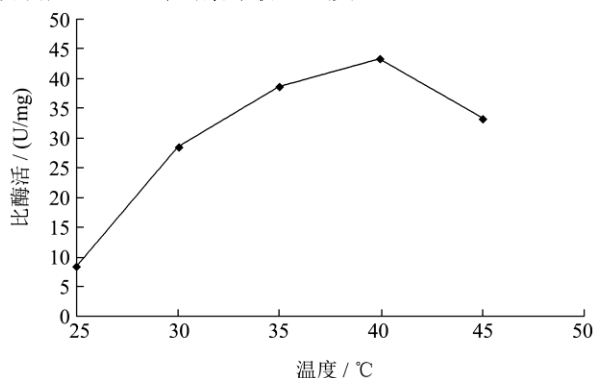


图 5 *Aspergillus niger* ZTL-04 的最适产酶温度

Fig.5 Optimal temperature for enzyme production by *Aspergillus niger* ZTL-04

2.6 *Aspergillus niger* ZTL-04 最适生长 pH 值

及产酶 pH 值的确定

将菌种置于 35 °C 下培养 72 h 后, 通过显微镜观察发现菌株在发酵液初始 pH 值为 2.0~7.0 不同条件下, 在 pH 值为 6.0 时菌丝粗壮、均匀, 菌丝球数量最多, 且大小均匀。故确定该菌株最适生长 pH 值为 6.0。

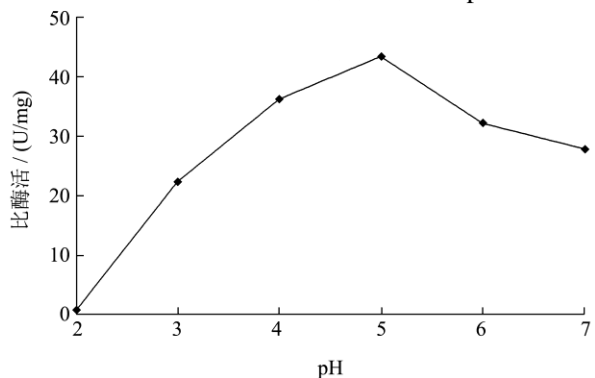


图 6 *Aspergillus niger* ZTL-04 的最适产酶初始 pH 值

Fig.6 Optimal initial pH for enzyme production by *Aspergillus niger* ZTL-04

如图 6 所示, 发酵液初始 pH 值在 2.0~7.0 范围内, 该菌株所产酶的比酶活逐渐升高, 在酸度较大时酶活力很低, 随着酸度的降低比酶活逐渐增大, 到 pH 值为 5.0 时, 比酶活达到最大, 继续增加 pH 值时, 比酶活有所下降。故确定发酵液初始 pH 值为 5.0 时最适合于菌株产酶。

2.7 pH 值对酶稳定性的影响

如图 7 所示, 该淀粉酶在 pH 值为 4.5~9.5 的时候, 酶活力相对来说比较稳定, 在 40 °C 的情况下放置一个小时后仍然保留有 60% 左右的酶活性, 尤其是 pH

值在 4.5~7.0 时, 酶活性能保持在 80% 以上, 如此看来, 该淀粉酶具有一定的耐酸性。并且在图中可明显看出, 该 α -淀粉酶的 pH 稳定范围也比较宽。现在, 淀粉加工行业中一般普遍使用的中温 α -淀粉酶, 它的最适 pH 为 6.0^[12], 在 pH 为 6.0~7.0 的范围内比较趋于稳定, pH 值低于 5.0 时就会严重失活; 而相对来说, 该淀粉酶在酸性条件下具有比较明显的优势。

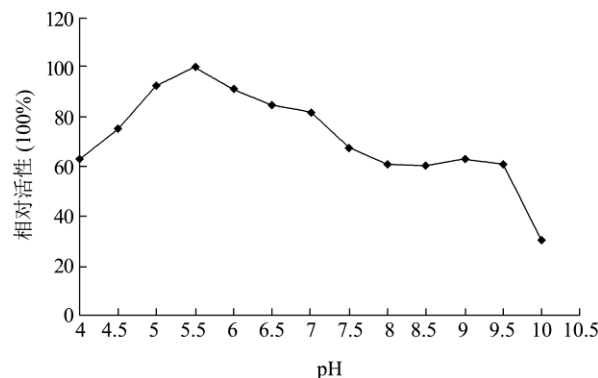


图 7 pH 对酶稳定性的影响

Fig.7 Effect of pH on enzyme stability

2.8 酶反应最适温度的确定

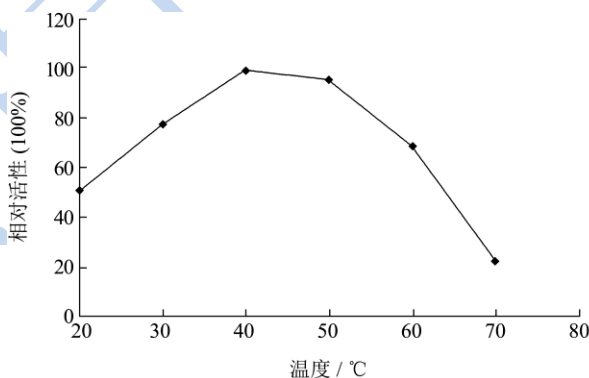


图 8 温度对酶活力的影响

Fig.8 Effect of temperature on enzyme activity

如图 8 所示, 该淀粉酶的最适反应温度为 40~50 °C, 在温度为 25~60 °C 之间的时候, 酶活性保留 60% 以上。由此可见, 该淀粉酶属于中温淀粉酶, 具有广泛的应用价值和前景。

2.9 酶的热稳定性

如图 9 所示, 在最适温度 40 °C 条件下, 在不同时间内, 测定的酶的活性相对稳定, 可见, 在 40 °C 时, 该淀粉酶的热稳定性最好。

总体看来, 随着保温温度的升高, 经过一定时间之后, 酶的活性逐渐降低。在 60 °C 的条件下, 保温 15min 后, 该 α -淀粉酶的活性都没有 40%。而保温到一个小时后, 40 °C 条件下保温的仍然保留有 90% 的活性; 50 °C 条件下保温的剩余酶活只有 50%; 而

60 °C条件下保温的剩余酶活不到 10%。即该淀粉酶在 40 °C拥有良好的稳定性；50 °C下保温 45 min 后，仍有 60% 以上的酶活力；在 60 °C保温一段时间后，酶活力大大降低。

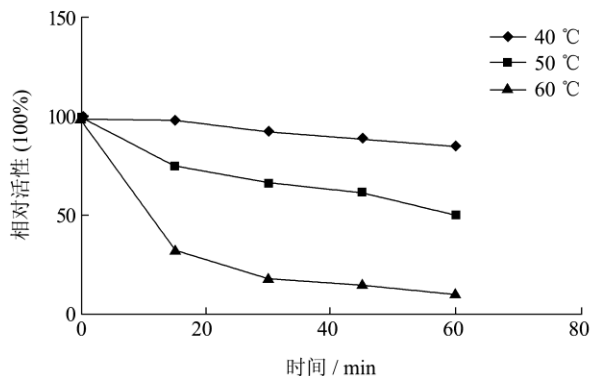


图 9 温度对酶稳定性的影响

Fig.9 Effect of temperature on enzyme stability

2.10 金属离子对酶活的影响

表 3 金属离子对酶活力的影响

Table 3 Effect of metal ions on enzyme activity

金属离子	浓度/(mmol/L)	相对活性
无	1	100±0.00
Ca ²⁺	1	114±0.03
Na ⁺	1	93±0.02
Mg ²⁺	1	82±0.04
Fe ²⁺	1	73±0.06
Cu ²⁺	1	68±0.02

如表 3 所示，Ca²⁺对该酶有一定的激活作用。通常，淀粉酶作为金属酶类，对 Ca²⁺的亲合力比其他离子要强，而且，结合的 Ca²⁺数目可以有 1~10 个不等，这将有助于酶的稳定性。Na⁺对该酶的活性作用不明显，而 Mg²⁺、Fe²⁺和 Cu²⁺对酶的活性均有比较明显的抑制作用。

2.11 酶 K_m 值的确定

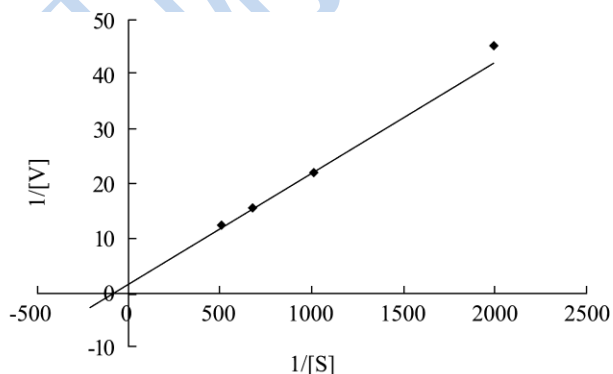


图 10 酶的动力学曲线

Fig.10 Kinetic curve of the enzyme

当底物在较低范围内增加时，随着底物浓度的增加，酶促反应速度也加快。而当底物增至一定浓度后，即使再增加底物浓度，反应速度也不再变化。这是因为酶浓度限制了所形成的中间络合物的浓度。底物浓度和酶促反应速度的关系式是米氏方程，由米氏方程可推出，米氏常数等于反应速度达到最大反应速度一半时所需底物的浓度。

在酶反应动力学性质分析时，米氏常数 K_m 值是酶的一个基本特征常数，它意味着酶与底物结合和解离的特性。特别是当同一种酶能够结合各种不同底物时，酶与各种底物的亲和力的强弱一般都可利用 K_m 值来反映。K_m 数值越大，酶与底物的亲和力越弱；反之，K_m 值越小，说明酶与底物的亲和力越强。

由 Lineweaver-Burk 双倒数作图法得到酶的动力学曲线，如图 10 所示，斜线与横坐标的截距为 K_m 值的倒数。经计算，该酶的 K_m 值为 4.52×10⁻³ g/L。

3 结论

3.1 从食醋厂内土壤中分离得到一株产酶能力强的菌株，经过形态学和分子生物学鉴定为黑曲霉，并命名为 *Aspergillus niger* ZTL-04；

3.2 通过适当的实验方法确定该菌株的最适生长温度为 35 °C，最适产酶温度为 40 °C；

3.3 通过调节发酵液的初始 pH 值，确定该菌株最适生长 pH 值为 6.0，最适产酶 pH 值为 5.0。

3.4 该酶在 pH 值 4.5~7.0 时，酶活性能保持在 80% 以上，表明该淀粉酶具有一定的耐酸性，且 pH 值作用范围较宽；

3.5 该酶的最适作用温度范围在 40~50 °C；

3.6 通过测定该酶的热稳定性表明，在 40~50 °C 时酶较稳定，但在 60 °C 时保温一段时间后，酶稳定性显著下降；

3.7 通过考察金属离子对该酶的影响表明，Ca²⁺对该酶有一定的激活作用，Na⁺对该酶的活性作用不明显，而 Mg²⁺、Fe²⁺和 Cu²⁺对酶的活性均有比较明显的抑制作用。

3.8 研究分析酶动力学表明，该酶的 K_m 值为 4.52×10⁻³ g/L。

参考文献

[1] Van der Maarel MJEC. van der Veen B, Uitdehaag JCM, et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family [J]. Biotechnol, 2002, 94: 137-155

[2] Pennapa Manitchotpisit, Christopher D Skory, et al. α-amylase activity during pullulan production and α-amylase gene

- analyses of aureobasidium pullulans [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(9): 1211-1218
- [3] 张丽珍,樊晶晶,牛伟,等.盐碱地柠条根围土壤中黑曲霉的分离鉴定及解磷能力测定[J].生态学报,2011,31(24):7571-7578
ZHANG Li-Zhen, FANG Jing-Jing, NIU Wei, et al. Isolation of phosphate solubilizing fungus (*Aspergillus niger*) from *Caragana* Rhizosphere and its potential for phosphate solubilization [J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(24): 7571-7578
- [4] Mridu Gupta, Pratima Sharma, Amarjit K, et al. Purification of a novel α -amylase inhibitor from local himalayan bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds with activity towards bruchid pests and human salivary amylase [J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(7): 1286-1293
- [5] Om Prakash, Nivedita Jaiswal. Erratum to: α -amylase: an ideal representative of thermostable enzymes [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(7): 2123-2124
- [6] Shigeru Morimura, Wen due Zhangetal. Genetic engineering of white shochu kojito achieve higher levels of acid stable α -amylase and glucoamy lase and other properties when used for shochumaking on a laboratory scale [J].The Tnstitute of Brewing, 1999, 105(5): 309
- [7] Rui Yamaguchi, Hiroko Tokunaga, Matsujiro Ishibashi, et al. Salt-dependent thermo-reversible α -amylase: cloning and characterization of halophilic α -amylase from moderately halophilic bacterium, *Kocuria varians* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 89(3): 673-684
- [8] 张力田.淀粉糖[M].北京:轻工业出版社,1981
ZHANG Li-Tian. Starch sugar [M], Beijing: Light industry press, 1981
- [9] Toshikazu Sugimoto, Hiroshi Shoji. Indigestible dextrin is an excellent inducer for α -amylase, α -alucosidase and glucoamy lase production in a submerged culture of *Aspergillus oryzae* [J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(2): 347-351
- [10] LIU Xu-Dong, XU Yan. A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and chracterization [J]. Bioresource Technology 2008, 99: 4315-4320
- [11] 高健,邓先余,康健,等.一株分离于湘江污染水域的酵母(*Candida fermentati*)的鉴定及其 Cd^{2+} 的吸附性[J].海洋与湖沼,2010,41(3):327-332
GAO Jian, DENG Xian-Yu, KANG Jian, et al. Identification of cadmium-absorbing strain of candida fermentati from a polluted areain the xiang jiang river in Xiangtan [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2010, 41(3): 327-332
- [12] Haki G D, Rakshit S K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review [J]. Biores Technol, 2003, 89(1): 17-34