

图4 葡萄籽粗提物对葡萄籽油及猪油的抗氧化效果

由图3可见,提取率在30min内随浸提时间的延长而提高,特别是在起始阶段(0~15min)变化显著,30min后总多酚含量变化不明显,延长时间对提取率影响不大。

#### 2.4 料液比及提取次数对提取率的影响

粉碎后的葡萄籽以60%的丙酮溶液为提取剂,室温浸提,每次浸提时间为30min,结果见表1。

由表1可知,当料液比为1:20时,一次操作,提取率可达90%以上,进行两次提取即比较完全(提取率为99%)。当进行三次提取操作时,料液比1:5为宜,此时提取率亦可达99%,且提取剂用量少,提取成本较低。

#### 2.5 对食用油脂的抗氧化作用

市售植物油中多含有抗氧化剂,干扰检测,所以本实验选用自制葡萄籽油及猪油为材料。按国标规定,猪油的过氧化值应 $\leq 16\text{mgq/kg}$ (GB10146-88),参照食用植物油卫生标准(BG2716-88),葡萄籽油的过氧化值应 $\leq 20\text{mgq/kg}$ 。因此,烘箱实验中,当各样品的过氧化值拉近规定值时,增加检测频率,并绘制过氧化值与时间的关系曲线,通过曲线即可求

出各样品的过氧化值达到规定值时所对应的时间,结果见图4。

从图4可以看出,葡萄籽粗提物对葡萄籽油及猪油均有着较好的抗氧化作用,200mg/kg的浓度即可延长葡萄籽油的保质期近4倍,使猪油的保质期延长约15倍,其作用效果优于BHT。

### 3 结论

对含水率8%的玫瑰香葡萄籽,60%~80%的丙酮溶液为最佳提取剂。在20℃~50℃的范围内,温度对提取率无明显影响。当提取次数少于两次时,料液比以1:20为宜,提取3次时,最佳料液比为1:5,每次均浸提30min。上述葡萄籽提取物可使葡萄籽油及猪油的保质期分别延长约4倍和15倍,其抗氧化效果优于BHT。

### 参考文献

- 1 Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 2000, 148: 187 ~ 197.
- 2 Bruyne TD, Pieters L, deestra H and Vlietinck A. condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1999, 27: 445 ~ 459.
- 3 许申鸿 杭瑚. 葡萄籽和葡萄皮清除自由基作用的研究. *食品科学*, 1999, 20(12): 28 ~ 30.
- 4 Shrikhande AJ. Wine by-products with health benefits. *Food Research International*, 2000, 33: 469 ~ 474.
- 5 Singleton VL and Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965, 16: 144 ~ 158.

# 生淀粉糖化酶的菌种筛选及酶学研究

郭爱莲 郭延巍 杨琳 西北大学生命科学院 710069

赵建社 西北大学化学系 西安

**摘要** 从自然界分离到一株高酶活的生淀粉糖化酶菌株黑曲霉 Sx。在最适产酶条件: 固体培养基 pH6.5, 固水比 1:1.6, 30℃ 发酵 24h 酶活达 382u/g。经纸层析鉴定酶解产物为葡萄糖。粗酶液在贮藏时, 当酶液中的 SDS 浓度达 6mg/ml 时, 30℃ 保藏 10 天, 酶活保持不变。分析经初步分离提纯的酶的性质得: 以玉米淀粉为底物时, 该酶最适 pH4.5, 最适酶反应温度为 60℃。pH4.0~7.0 范围内酶活力稳定。酶具有较强的热稳定性, 80℃ 保温 1h 以后, 酶

活力仍能保持 15%。金属离子等对酶的影响为： $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Sn}^{2+}$ 对酶有强烈抑制作用； $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 有抑制作用；EDTA、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 对酶无影响； $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 有一定的激活作用。

**关键词** 生淀粉糖化酶 黑曲霉 发酵条件 酶学性质

**Abstract** *Aspergillus niger* Sx, isolated from nature, could secrete raw – starch glucoamylase (RSAG) with high enzyme activity at level of 382u/g. After fermentation for 24 hours at 30°C in solid wheat bran culture, the maximum secretion of RSAG was achieved at pH6.5 with the ratio of solid to water as 1:1.6. Further, the enzymatic production was confirmed by paper chromatography as glucose. Interestingly, it was discovered that SDS could keep RSGA in its initial state. When the concentration in the crude enzyme was 6mg/ml, the activity of enzyme was kept intact and active after 10days storage at 30°C. Additionally, RSGA was purified initially by means of ammonium sulfate fractionation and dialysis. The optimum hydrolysis conditions for the purified enzyme were pH4.5, 60°C. Amazingly, it preserved a high stability at pH between 4.0 and 7.0. After incubation at 80°C for 1 hour, the enzyme still retained 15% activity. Metal ions such as  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Sn}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  could inhibit the enzyme to different extents, whereas EDTA、 $\text{Ca}^{2+}$  showed effect on the activity of the enzyme. In contrast to the forenamed cation,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  could stimulate the activity of enzyme slightly.

**Key words** Raw Starch Glucoamylase *Aspergillus niger* Fermentation condition Enzyme character

生淀粉糖化酶能将未经高温蒸煮糊化的生淀粉转化为葡萄糖，比传统的高温蒸煮糖化节能近 40%<sup>[1]</sup>，而且可进行浓醪发酵，因此广泛的应用于生淀粉酒精发酵、生料酿酒、酿醋等食品工业。产生生淀粉糖化酶的菌株与产生纤维素酶、果胶酶等菌种共同作用，可将秸秆等农业废弃物转化为家畜可利用的饲料，从而有利于环境保护及生物能的充分利用。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品来源：

从淀粉厂附近土壤、农田中取样 6 份，牛瘤胃内容物 12 份

### 1.2 培养基：

#### 1.2.1 斜面培养基：马铃薯蔗糖培养基

1.2.2 平皿分离培养基<sup>[2]</sup>(%)：生小麦淀粉 1， $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.1， $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.14， $\text{CaCl}_2$  0.05， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02，酵母膏 0.01，琼脂 2.0，加入氯霉素 0.005，pH 调至 5.5， $1\text{kg}/\text{cm}^2$  灭菌 30min。小麦淀粉用甲醛蒸气灭菌 24h，然后 105°C 干热灭菌 2h 后，用无菌操作加入。

#### 1.2.3 加富培养基：同分离培养基，不加琼脂

1.2.4 产酶固体培养基：麸皮：水 = 1:1.6， $1\text{kg}/\text{cm}^2$  灭菌 30min。250ml 三角瓶装 12.5g 麸皮按比例加入作成。

1.3 菌株的分离筛选：将采集的样品在加富培养基中经多次加富培养，每次培养 5d，划线分离，霉菌(28°C)培养 5d 后，以菌落周围出现的透明圈和菌落直径的比值作为初筛指标，以固体发酵培养后的生

淀粉糖化酶活力为复筛指标。

### 1.4 生淀粉降解产物的鉴定<sup>[3]</sup>：

用纸层析鉴定。展开剂为正丁醇：吡啶：水(6:4:3)，显色剂为：100ml 4% (W/V) 二苯胺丙酮液，100ml 4% (W/V) 苯胺的丙酮液与 20ml 85% 磷酸液的混和液，80°C 显色 10min。

### 1.5 酶活力的测定：

1.5.1 酶液的浸出：在每 250ml 三角瓶中，有麸皮 12.5g，在其中加入 88ml 蒸馏水，搅拌均匀，于 40°C 水浴中浸泡 1h，用滤纸过滤，即得粗酶液。

1.5.2 酶的初步分离提纯：粗酶液中加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和度为 80%，pH 调为 2.5，5°C 过夜，4000r/min 离心 30min，取沉淀溶于少量蒸馏水，用蒸馏水透析过夜，每隔 1h 换一次水，至无  $\text{NH}_4^+$ 。此硫酸铵脱盐酶液用于酶的一般性质研究。

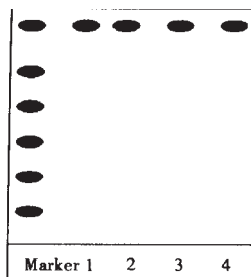
### 1.5.3 生淀粉糖化酶、糊化淀粉糖化酶的活力测定<sup>[4]</sup>：

在 50ml 三角瓶中，加入 2.0ml 2.5% (W/V) 生玉米淀粉悬液，2.0ml pH3.5 的 0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液，40°C 预热 10min，加入 10ml 适当稀释的酶液，在 40°C 下振荡(200r/min)反应 30min，再加入 0.5ml 14% NaOH 溶液终止反应。反应液于 3000r/min 离心 5min，上层清液用 DNS 法测定还原糖。

糊化淀粉糖化酶的活力测定，只需将底物换为

表 1 黑曲霉 Sx 对不同生淀粉的分解活性

底物	小麦淀粉	玉米淀粉	甘薯淀粉	土豆淀粉
酶活(U/g)	487	380	361	287



Marker: 标准低聚糖, 自上而下依次是: 葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖

1 小麦淀粉 2 玉米淀粉 3 甘薯淀粉 4 土豆淀粉

图1 黑曲霉 S<sub>x</sub> 粗酶液降解各种生淀粉的产物图谱

表2 贮存条件对酶活力的影响

贮存条件	初始酶活(U/g)	4天后的酶活	10天后的酶活
30℃	382	313	264
5℃	382	363	345

2.5%的可溶性淀粉, 其它同生淀粉糖化酶。

酶活力单位定义: 40℃, pH3.5 条件下, 1g 干麸曲 1h 降解生淀粉(糊化淀粉)释放 1mg 葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的分离与筛选:

加富样品经平板划线分离, 筛选在淀粉平板上能产生较大透明圈的霉菌 20 株, 经三角瓶固体发酵 20 株均有生淀粉糖化酶活力, 其中有 1 株酶活最高。根据《中国真菌志》Vol5<sup>[5]</sup>, 鉴定为黑曲霉 *Aspergillus niger*, 定名为黑曲霉 S<sub>x</sub>。

### 2.2 黑曲霉 S<sub>x</sub> 对不同生淀粉的分解活性及酶解产物分析:

从表 1 中可以看出, 黑曲霉 S<sub>x</sub> 产生的酶不但对玉米淀粉、小麦淀粉有很好的分解能力, 而且对很难消化的土豆淀粉、甘薯淀粉也有一定的降解活性。从表 1 中还可以看出, 各种生淀粉的分解活性: 小麦淀粉>玉米淀粉>甘薯淀粉>土豆淀粉, 这与文献报导相同<sup>[6]</sup>。

将上述酶解产物适当浓缩, 点样, 40℃ 恒温展开 4h, 得图 1, 由图 1 可知黑曲霉 S<sub>x</sub> 产生的酶降解小麦、玉米、甘薯、土豆淀粉, 其产物均为葡萄

糖, 从而证实此酶为生淀粉糖化酶。

### 2.3 黑曲霉 S<sub>x</sub> 产酶条件的研究:

经过对各种影响黑曲霉 S<sub>x</sub> 产酶的因素的研究, 知产酶的最佳条件为: 培养基含水量为 61.5% (即: 麸皮: 水 = 1: 1.6), 超始 pH6.5, 30℃ 培养 24h, 酶活力达最高, 为 382U/g。

### 2.4 黑曲霉 S<sub>x</sub> 所产生的淀粉糖化酶的研究:

#### 2.4.1 粗酶液贮存条件的研究:

##### 2.4.1.1 贮存温度对酶稳定性的影响:

从表 2 中可以看出, 室温 30℃ 放置 4d 后, 酶活降至初始酶活的 82%, 10d 后降至 69%。冰箱(5℃)中放置 4 天后, 酶活降至初始酶活的 95%, 10d 后仍能保持 90%。

##### 2.4.1.2 SDS 的浓度对酶的贮存的影响:

为延长酶液的室温保藏时间, 在粗酶液中, 加入不同量的 SDS(二烷基磺酸钠), 室温放置 4d, 测其酶活力, 见表 3, 由表 3 可知, 当 SDS 浓度为 6mg/ml 时, 4d 后酶活维持不变, 10d 后仍没有变

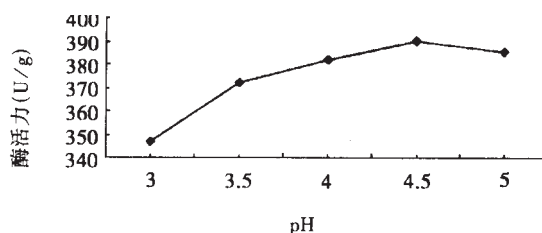


图2 pH 对酶活力的影响

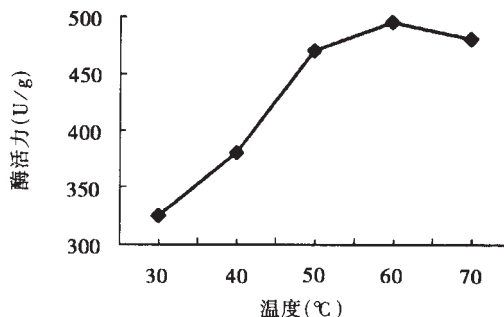


图3 温度对酶活力的影响

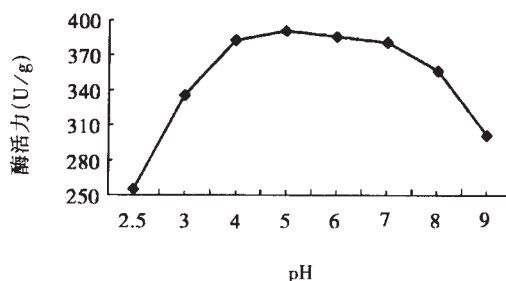


图4 pH 对酶稳定性的影响

表3 SDS 浓度对酶贮存的影响(酶液初始酶活 382U/g)

SDS	2mg/ml	4mg/ml	6mg/ml	8mg/ml	10mg/ml
4天后的酶活(U/g)	436	363	384	319	335

表 4 金属离子及 EDTA 对酶活力的影响

金属离子	H <sub>2</sub> O	EDTA	CaCl <sub>2</sub>	KCl	CoCl <sub>2</sub>	AgNO <sub>3</sub>	SnCl <sub>2</sub>	HgCl <sub>2</sub>	CuCl <sub>2</sub>
相对酶活(%)	100	100	100	103.6	104	54.4	61.2	86.9	94.1

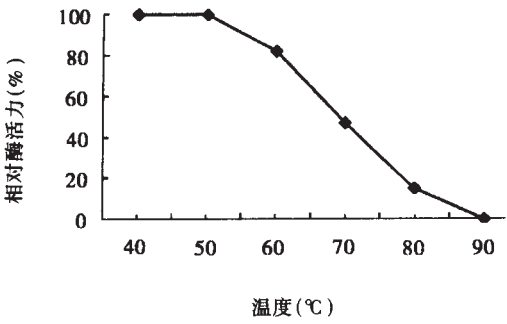


图 5 生淀粉糖化酶的热稳定性

化, 其原因是: 生淀粉糖化酶(GAI)在胞内及胞外蛋白酶的作用下, 产生不能降解生淀粉, 但可降解糊化淀粉的Ⅱ型糖化酶(GAⅡ)<sup>[6]</sup>, 而 SDS 可强烈抑制粗酶液中酸性蛋白酶的活性<sup>[7]</sup>, 而且 SDS 作阴离子表面活性剂可抑制细菌的生长, 也对生淀粉糖化酶有保护作用<sup>[8]</sup>, 因此酶液可长期贮存, 性质稳定。

2.4.2 初步分离提纯的酶的性质:

2.4.2.1 pH 值对生淀粉糖化酶活力的影响:

用不同的 pH 值的 0.1mol/L, 柠檬酸—Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 缓冲液(pH3~5)测定酶活, 结果见图 2, 从图 2 中可以看出, 在以玉米淀粉为底物时, 酶反应最适 pH 为 4.5。

2.4.2.2 温度对生淀粉糖化酶活力的影响:

将酶促反应在不同温度的摇床下进行, 测其酶活力(温度高于 80℃, 则生淀粉将糊化, 生淀粉糖化酶将失去意义), 结果见图 3, 由图 3 可知, 60℃为酶反应的最适温度。

2.4.2.3 pH 值对酶稳定性的影响:

将酶液用不同 pH 值的缓冲液(pH2.5~8.0 的柠檬酸—Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液, pH9 的硼酸缓冲液)稀释, 40℃保温 30min, 测其酶活, 结果见图 4, 图 4 表明, 在 40℃pH4~7 之间酶较稳定。

2.4.2.4 酶的热稳定性:

将酶液分别置于 50、60、70、80、90℃水浴中保温 1h, 立即冷却稀释, 测剩余酶活力, 结果见图 5, 由图 5 中可以看出, 经初步提纯的生淀粉糖化酶热稳定性较高, 80℃处理 1h, 酶活力仍能保持 15%, 根据文献报道, 生淀粉糖化酶热稳定性最高的是 90℃水浴 0.5h 酶活保持 10%<sup>[9]</sup>。

2.4.2.5 金属离子及 EDTA 对酶活力的影响:

用不同的金属离子稀释, 使离子终浓度为 1mmol/L, 40℃水浴 30min, 以用蒸馏水稀释的为 100, 测其相对酶活力, 结果见表 4, 由表 4 中可以看出, EDTA、Ca<sup>2+</sup>对酶活力无影响; Ag<sup>+</sup>、sn<sup>2+</sup>对酶有强烈抑制作用; K<sup>+</sup>、Co<sup>2+</sup>有微弱激活作用。Hg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>对酶有一定的抑制作用。

3 小结

黑曲霉 S<sub>x</sub> 产生的生淀粉糖化酶具有很高的热稳定性, 80℃处理 1 小时酶活力仍能保持 15%。这有利于生淀粉糖化酶的进一步提纯精制。

黑曲霉 S<sub>x</sub> 分泌的生淀粉糖化酶酶活力高达 382U/g。而文献中报道的诱变后的酶活仅有 219.4U/g。<sup>[10]</sup> 并且一般菌株要在发酵 2~3d 后才可达到产酶高峰, 黑曲霉 S<sub>x</sub> 24h 即可达到产酶高峰, 从而缩短了发酵周期, 有利于工业生产。

参考文献

- 1 方善康, 朱明田. 无蒸煮生淀粉酒精发酵研究. 食品与发酵工业, 1988 (2): 13~19.
- 2 S. Hayashida, P. Q. Folz: raw starch - digestive Glucoamylase Productivity of Protease - less Mutant from Aspergillus awamori var kawachi: Agric. Biol. Chem, 1981, 45 (12): 2675 ~ 2681.
- 3 张惟杰主编, 复合多糖生化研究技术, 1987, 65, 上海科学技术出版社.
- 4 谢舜珍, 严自正, 张树政. 生淀粉产生菌的分离和筛选. 微生物学通报, 1992, 19 (5): 267 ~ 270.
- 5 齐祖同. 中国真菌志. 北京: 科学出版社, 1997, 5, 93.
- 6 陈薇芳. 生淀粉的降解及其中酒精工业中的应用. 应用微生物, 1984, (2): 6 ~ 12.
- 7 S. Hayashida, P. Q. Folz: Raw starch - digestive Glucoamylase Productivity of Protease - less Mutant from Aspergillus awamori var kawachi: Agri. Bio 1. Chem, 1981, 45 (12): 2675 ~ 2681.
- 8 武汉大学、复旦大学微生物教研室: 微生物学, 北京: 人民教育出版社, 1980, 261.
- 9 Lefuji H, Chino M, Kato M, Limura Y: Raw - starch - digesting and thermostable alpha - amylase from the yeast Cryptococcus sp. S - 2: purification, characterization, cloning and sequencing. : Biochem J 1996 Sep 15; 318 (Pt3): 989 ~ 996.
- 10 陈佩华, 李朝季. 生淀粉降解菌株的选育和酒精发酵实验. 微生物学通报, 1991, 45 (5): 268 ~ 270.