

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2015.05.002

酸性 α -淀粉酶研究进展

张玉然 张晓云 田田 杨胜超
(济宁医学院生物科学学院, 山东日照 276862)



张玉然,女,汉族,1985年7月出生于山东省济宁市。2014年6月毕业于江南大学生物工程学院发酵工程专业,主要从事酶的分离纯化与发酵生产。2014年8月于济宁医学院生物科学学院工作。目前以第一作者发表SCI论文3篇,中文核心期刊3篇,累计影响因子6.133。

摘要 酸性 α -淀粉酶是指在低 pH 值条件下可保持高活性,通过随机切断分子内 α -1,4 糖苷键,将淀粉降解为糊精和低聚糖等的一种重要工业酶制剂。本文对酸性 α -淀粉酶产生菌的来源、高产菌株选育、产酶条件优化及应用潜力进行了综述,为进一步研究酸性 α -淀粉酶提供参考借鉴。

关键词 酸性 α -淀粉酶;选育;条件优化;应用

中图分类号: TQ925 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2015)10-310-04

Research progress of acid-stable α -amylase

ZHANG Yuran, ZHANG Xiaoyun, TIAN Tian, YANG Shengchao
(School of Biological Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Acid-stable α -amylase with high catalytic activities at low pH can randomly cleave the α -1,4-glycosidic linkages in starch, generating dextrin and oligosaccharide. In this paper, we reviewed the source of the production strain, breeding of the high-producing strain, optimization of the fermentation condition and application potential of this enzyme.

Keywords: Acid-stable α -amylase; Breeding; Optimization of conditions; Application

α -淀粉酶(1,4- α -D-葡聚糖水解酶),又称液化酶,根据酶学性质的不同,可分为酸性 α -淀粉酶、碱性 α -淀粉酶、耐热性 α -淀粉酶和耐盐性 α -淀粉酶^[1]。酸性 α -淀粉酶因其可在低 pH 值条件下保持高活性迅速水解淀粉而得名,它可随机切断淀粉分子内的 α -1,4 糖苷键,将其降解为糊精、寡糖、麦芽糖等小分子,使淀粉黏度下降,酸性 α -淀粉酶具有广阔的应用潜力和开发前景^[2-3]。

1 酸性 α -淀粉酶的开发价值及应用

淀粉质原料的水解制糖工艺,涉及液化和糖化两阶段,所使用的酶分别为 α -淀粉酶(液化酶)和

糖化酶^[4]。 α -淀粉酶的最适反应 pH 多为 5.8~6.2,糖化酶的最适反应 pH 则为 4.0~5.0^[5-6],这致使淀粉质原料液化后进入糖化前需加入大量酸试剂调低 pH 值,因此,开发酸性 α -淀粉酶,使其最适反应 pH 与糖化酶相近,可节省大量酸试剂的消耗,节约成本。

在固态发酵行业,如酿酒、食醋酿造,微生物的生长繁殖促使发酵 pH 值偏酸性,而在酸性 pH 条件下,常用中高温及碱性 α -淀粉酶酶活性明显降低,这导致淀粉质原料利用不彻底。因此,开发耐酸性的 α -淀粉酶,提高发酵过程中淀粉质原料的利用率,可大幅降低生产成本,提高生产率。

据报道,酸性 α -淀粉酶已广泛应用于食品加工、酿酒、制糖、纺织、饲料生产、造纸等行业^[7-11],该酶占据了酶制剂市场约 25% 的份额,开发耐酸性 α -淀粉酶具有良好的经济和社会效益。

2 酸性 α -淀粉酶的来源

酸性 α -淀粉酶广泛存在于动植物和微生物中,目前工业上应用的酸性 α -淀粉酶多为微生物来源。已报道的可产酸性 α -淀粉酶的微生物有黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[12-13]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[2,14]、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)^[15]、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)^[16]、酒香酵母菌(*Brettanomyces*)^[17]、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)^[18]、嗜热真菌(*Thermomyces lanuginosus*)^[19]、酸居芽孢杆菌(*Bacillus acidicola*)^[20-21]、玫瑰暗黄链霉菌(*Streptomyces roseofulvus*)^[22]、小孢根霉(*Rhizopus microsporus*)^[23]、桔青霉菌(*Penicillium citrinum*)^[24]、嗜酸酸居芽孢杆菌(*Acidophilic Bacillus acidicola*)^[25]、白曲霉(*Aspergillus kawachii*)^[26-27]等。工业上生产酸性 α -淀粉酶的菌株则主要为黑曲霉和枯草芽孢杆菌^[1,4],这主要是由于二者发酵周期短,易于操作,所产酸性 α -淀粉酶的耐酸性强,发酵酶活力高。

3 酸性 α -淀粉酶高产菌株的选育

自然界中可产酸性 α -淀粉酶的微生物众多,但各菌株产量有差异,为提高生产率,满足工业生产需求,需利用特定的筛选培养基,从自然界中分离出酸性 α -淀粉酶高产菌株。研究者利用筛选的野生菌株,通过诱变育种、基因工程育种等技术进一步选育高产酸性 α -淀粉酶的优良菌株。目前,应用于酸性 α -淀粉酶高产菌株筛选的方法有紫外线诱变育种^[28]、紫外-硫酸二乙酯(DES)复合诱变育种^[29]、原生质体诱变育种^[30-31]、氮离子束诱变育种^[32]、基因工程育种^[33-38]等。

紫外线诱变具有设备简单、操作方便的优点,是目前微生物育种中最常用的诱变方法。游玫娟等^[28]利用 30 W 紫外灯于 30 cm 处照射枯草芽孢杆菌 BF7658,利用变色圈法结合摇瓶复筛获得一株高产突变株,酶活达 3418.8 U/mL,比出发菌株提高了 59.7%。紫外-硫酸二乙酯复合诱变是联合使用物理和化学诱变处理的方法,钱萍等^[29]利用该法诱变黑曲霉(ATCC-1602),利用透明圈法

获得一株高产突变株,酶活最高达 394.1 U/g,较原始菌株提高了 10 倍。

原生质体诱变育种是以微生物原生质体为育种材料,采用物理或化学诱变剂处理,而后从再生培养基中筛选出高产突变株的技术。相比于传统诱变育种,该方法诱变效率高,操作简便,但周期比传统诱变育种长^[31]。目前,应用原生质体诱变育种选育高产酸性 α -淀粉酶菌株的报道较少。黄伟等^[30]利用紫外线诱变处理黑曲霉 0-2-1 孢子原生质体,结合透明圈法筛选出了高产酸性 α -淀粉酶的突变株,与出发菌株相比,高产突变株产酶活力提高了 54.9% (184.7 U/mL),且遗传稳定性良好。

氮离子束诱变育种是近年来发展起来的一种诱变方法,由于离子注入具有能量沉积、动量传递、电荷交换等多重效应,氮离子束诱变的效果更为理想。戚薇等^[32]将低能(30 keV)氮离子注入枯草芽孢杆菌 BF7658 中,诱变筛选获得一株高产选型 α -淀粉酶的突变株,酶活力达 343 U/mL。

基因工程育种是在分子水平上对菌株进行改造,根据人为设计,使目的基因在工程菌内大量异源表达。该育种技术可定向设计,具有极强的目的性,周期短,效率高,是育种技术中最为高效的方法。来自芽孢杆菌酸性 α -淀粉酶基因的异源表达研究最多,其表达宿主菌主要有枯草芽孢杆菌^[33]、大肠杆菌^[34,38]等。除芽孢杆菌外,魏涛等^[36]报道了超嗜热古菌高温酸性 α -淀粉酶基因在大肠杆菌中的异源表达;Zeng 等^[37]报道了黑曲霉酸性 α -淀粉酶基因在毕赤酵母中的异源表达,酶活达 2838 U/L,高于已报道的芽孢杆菌和超嗜热古菌酸性 α -淀粉酶的异源表达量。

4 酸性 α -淀粉酶发酵条件优化

发酵条件优化是增强微生物生长及产酶的重要手段,可优化的发酵参数主要有培养基组成、温度、溶解氧、湿度、pH 值等。目前,研究者已对固态发酵^[10,39]和液态发酵^[2,21,26-27]合成酸性 α -淀粉酶的条件进行了优化,所涉及的产酶菌株主要有黑曲霉、枯草芽孢杆菌、小孢根霉、副干酪乳菌、酵母菌等。固态发酵方面,Sharma 等^[39]以酸居芽孢杆菌为菌株,通过响应面法优化了湿度、淀粉和硫酸铵 3 因素,最终使酸性 α -淀粉酶产量达 28 U/g。液态发酵方面,Masuda 等^[27]利用白曲霉发酵生产酸性 α -淀粉酶,通过控制无硬壳淀粉质原料中葡萄糖的释

放量,使酸性 α -淀粉酶的酶活力达51 U/ml;王建玲等^[2]则利用筛选获得的枯草芽孢杆菌,经发酵条件优化使该酶酶活力达221 U/ml。

5 展望

酸性 α -淀粉酶由于其耐酸特性,可在低pH下高效率催化淀粉质原料的水解液化,该酶的开发利用,可提高酸性条件下淀粉质原料的利用率,节省成本。目前对酸性 α -淀粉酶的研究已取得大幅进步,但仍存在待改进事宜。诱变育种方面,目前仅采用紫外线诱变、紫外-硫酸二乙酯复合诱变、原生质体诱变及氮离子束诱变对产酶菌株进行诱变筛选,后续可引入其他化学诱变剂诱变或使用近年来兴起的常压室温等离子体诱变(ARTP)进行筛选高产菌株。基因工程育种方面,高产酸性 α -淀粉酶工程菌的构建仍存在不足,酶产量偏低,诱导方式复杂,难于规模工业化生产,研究者应进一步探寻酸性 α -淀粉酶耐酸的机理及相关基因的调控,优化诱导方式。发酵条件优化控制方面,研究者仅对摇瓶发酵水平上的产酶条件进行了优化,后续可对发酵参数进行过程控制。如固态发酵时,可针对湿度、温度等关键参数,设计便于固态发酵控制的反应器,在反应器中进行控制。液态发酵时,则可选取合适的发酵罐,对温度、pH值、溶解氧等关键参数进行控制,结合发酵动力学参数变化,探寻最适于酸性 α -淀粉酶生产的发酵条件。

参考文献:

- [1] Sharma A, Satyanarayana T. Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications[J]. *Process Biochem*, 2013, 48(2): 201-211.
- [2] 王建玲, 陈志鑫, 刘逸寒, 等. 产耐酸性 α -淀粉酶菌株的分离、鉴定、酶学特性研究及发酵培养基的优化[J]. *生物技术*, 2014, 17(2): 34-37.
- [3] Gupta R, Pares G, Harapriya M, et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective[J]. *Process Biochem*, 2003, 38(11): 1599-1616.
- [4] 石方方, 焦国宝, 丁长河, 等. 耐酸耐高温 α -淀粉酶的研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2014, (4): 171-176.
- [5] Hashida M, Bisgaard-Frantzen H. Protein engineering of new industrial amylases[J]. *Trends Glycosci Glyco*, 2000, 12(68): 389-401.
- [6] Liu J H, Xia W G, Abdullahi A Y, et al. Purification and partial characterization of an acidic α -amylase from a newly isolated *Bacillus subtilis* ZJ-1 that may be applied to feed enzyme[J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2015, 45(3): 259-267.
- [7] Reddy N S, Nimmagadda A, Sambasiva Rao K R S. An overview of the microbial α -amylase family[J]. *Afr J Biotechnol*, 2003, 2(12): 645-648.
- [8] Sharma A, Satyanarayana T. Cloning and expression of acid-stable, high maltose-forming, Ca^{2+} -independent α -amylase from an acidophile *Bacillus acidicola* and its applicability in starch hydrolysis. *Extremophiles*, 2012, 16(3): 515-522.
- [9] Kalpana B J, Pandian S K. Halotolerant, acid-alkali stable, chelator resistant and raw starch digesting α -amylase from a marine bacterium *Bacillus subtilis* S8-18[J]. *J Basic Microbiol*, 2014, 54(8): 802-811.
- [10] 吴茜茜, 王红梅, 张增辉, 等. 黑曲霉耐酸性 α -淀粉酶的固态发酵条件研究[J]. *包装与食品机械*, 2012, 30(3): 18-22.
- [11] Fogarty W M, Collins B S, Doyle E M, et al. The high maltose-forming α -amylase of *Saccharomonospora viridis*: mechanisms of action[J]. *J Indust Microbiol*, 1993(3): 199-204.
- [12] 张大为, 张洁, 王能强, 等. 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[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(2): 93-99.
- [13] Liu Y L, Wang F X, Yu J, et al. Comparison and analysis of acid-stable and acid-unstable α -amylases from *Aspergillus niger* with computer[J]. *Adv Mater Res*, 2012, 554-556: 1021-1024.
- [14] Liu J, Xia W, Abdullahi A Y, et al. Purification and partial characterization of an acidic α -amylase from a newly isolated *Bacillus subtilis* ZJ-1 that may be applied to feed enzyme[J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2015, 45(3): 259-267.
- [15] 刘洋, 王一琰, 白黎婧, 等. 一株酸性淀粉酶产生菌的分离鉴定及其酶学性质研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(4): 174-178.
- [16] Kamasaka H, Sugimoto K H, Nishimura T, et al. *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase selective hydrolysis of amylose to maltose in the presence of amylopectin[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(4): 1658-1664.
- [17] 孙会刚, 秦卫东, 李同祥, 等. 蜜湾甜油中霉菌和酵母菌的鉴定及其淀粉酶性质[J]. *中国调味品*, 2014, 39(2): 42-46.
- [18] 凌玲, 金元昌, 张建贺, 等. 湘莲中产耐酸性 α -淀粉酶菌株的分离及鉴定[J]. *中国生物治贫血杂志*, 2014, 27(8): 1006-1009.
- [19] Petrova S D, Ilieva S Z, Bakalova N G, et al. Production and characterization of extracellular α -amylases from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* (wild and mutant strains)[J]. *Biotechnol Lett*, 2000, 22(20): 1619-1624.
- [20] Sharma A, Satyanarayana T. Structural and biochemical features of acidic α -amylase of *Bacillus acidicola*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, (61): 416-423.
- [21] Sharma A, Satyanarayana T. Optimization of medium components and cultural variables for enhanced production of acidic high maltose-forming and Ca^{2+} -independent α -amylase by *Bacillus acidicola*. *J Biosci Bioeng*, 2011, 111(5): 550-553.
- [22] 李鹏, 王建鑫, 罗红宇, 等. 一株产淀粉酶海洋放线菌菌株的选育及发酵条件的研究[J]. *水产学报*, 2014, 38(12): 2059-2067.

[6] Bianchi M E, Agresti A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(5): 496-506.

[7] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi M E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation[J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 191-195.

[8] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. *Science*, 1999, 285(5425): 248-251.

[9] Kim S W, Lim C M, Kim J B, et al. Extracellular HMGB1 Released by NMDA Treatment Confers Neuronal Apoptosis via RAGE-p38 MAPK/ERK Signaling Pathway [J]. *Neurotox Res*, 2011, 20(2): 159-169.

[10] 贺欣, 贺丹, 储小飞, 等. 通过调节高迁移率族蛋白 B1 治疗相关疾病的药物研究进展[J]. *药学服务与研究*, 2014, 14(5): 321-327.

[11] Keyue Liu, Shuji Mori, Hideo K. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction in-

duced by transient ischemia in rats[J]. *FASEB J*, 2007, 21(14): 3904-3916.

[12] Takashi Shichita, Ryota Sakaguchi, Mayu Suzuki, et al. Post-ischemic inflammation in the brain[J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 132.

[13] Huang J, Upadhyay U M, Tamargo R J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia[J]. *Surg Neurol*, 2006, 66(3): 232-245.

[14] Jung J E, Kim G S, Chan P H. Neuroprotection by interleukin-6 is mediated by signal transducer and activator of transcription 3 and antioxidative signaling in ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2011, 42(12): 3574-3579.

[15] Gertz K, Kronenberg G, Kälin R E, et al. Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis[J]. *Brain*, 2012, 135(Pt 6): 1964-1980.

(收稿日期 2015-06-29)

(上接第 312 页)

[23] Shen H, Mo X, Chen X, et al. Purification and enzymatic identification of an acid stable and thermostable α -amylase from *Rhizopus microsporus*[J]. *J I Brewing*, 2012, 118(3): 309-314.

[24] Metin K, KoçÖznur, Bıyık Z B B A H. Purification and characterization of α -amylase produced by *Penicillium citrinum* HBF62[J]. *Afr J Biotechnol*, 2010, (45): 7692-7701.

[25] Sharma A, Satyanarayana T. Characteristics of a high maltose-forming, acid-stable, and Ca^{2+} -independent α -amylase of the acidophilic *Bacillus acidicola*[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 171(8): 2053-2064.

[26] Shoji H, Sugimoto T, Hosoi K, et al. Simultaneous production of glucoamylase and acid-stable α -amylase using novel submerged culture of *Aspergillus kawachii* NBRC4308[J]. *J Biosci Bioeng*, 2007, 103(2): 203-205.

[27] Masuda S, Shoji H. Development of a submerged culture method for high production of acid-stable α -amylase and glucoamylase using *Aspergillus kawachii* without glucose concentration control[J]. *J I Brewing*, 2012, 118(4): 346-351.

[28] 游玟娟. 紫外线诱变选育酸性 α -淀粉酶高产菌株[J]. *安徽农学通报*, 2010, 16(11): 70-71.

[29] 钱萍. 酸性淀粉酶菌株的诱变选育及酶学性质研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(11): 183-186.

[30] 黄伟, 刘永乐, 王发祥, 等. 原生质诱变选育高产酸性 α -淀粉酶黑曲霉菌株[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(3): 160-167.

[31] 王发祥, 俞健, 王建辉, 等. 1 株产酸性 α -淀粉酶黑曲霉原生质体制备和再生条件优化[J]. *食品科学*, 2014, 35(1): 155-158.

[32] 戚薇, 王海燕, 王建玲, 等. 氮离子注入选育耐酸性 α -淀粉酶产生菌诱变效应的研究[J]. *天津科技大学学报*, 2007, 22(3): 6-9.

[33] Heng C, Chen Z J, Du L X, et al. Expression and secretion of an acid-stable α -amylase gene in *Bacillus Subtilis* by SacB promoter and signal peptid[J]. *Biotechnol Lett*, 2005, 27(21): 1731-1737.

[34] Mehta D, Satyanarayana T. Biochemical and molecular characterization of recombinant acidic and thermostable raw-starch hydrolysing α -amylase from an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2013, 85(3): 229-238.

[35] Roy J K, Manhar A K, Nath D, et al. Cloning and extracellular expression of a raw starch digesting α -amylase (Blamy-I) and its application in bioethanol production from a non-conventional source of starch[J]. *J Basic Microbiol*, 2015, doi: 10.1002/jobm.201400949.

[36] 魏涛, 孙浩, 申玉龙, 等. *Sulfolobus tokodaii* strain 7 高温酸性 α -淀粉酶基因在大肠杆菌中克隆表达及其酶学性质[J]. *食品与发酵工艺*, 2013, 39(5): 13-17.

[37] Zeng Q, Wei C, Jin J, et al. Cloning of the gene encoding acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus niger* and its expression in *Pichia pastoris*[J]. *Afr J Food Sci*, 2011(5): 668-675.

[38] Hmidet N, Bayouhd A, Berrin J G, et al. Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli* [J]. *Proc Biochem*, 2008, 43(5): 499-510.

[39] Sharma A, Satyanarayana T. Production of acid-stable and high-maltose-forming α -amylase of *Bacillus acidicola* by solid-state fermentation and immobilized cells and its applicability in baking[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 168(5): 1025-1034.

(收稿日期 2015-09-08)