

提高黑曲糖化酶活力的研究

——菌种选育

毛醒一 修道高 顾国贤

(发酵系)

近年来,糖化酶在我国的酒精、酿酒、葡萄糖、抗菌素、乳酸钙等工业中得到广泛应用,糖化酶科研,生产水平不断提高^[1-3]。菌种的产酶能力是糖化酶生产水平的重要因子,美、日等国在十多年间,由于对菌种的改良加上适当的培养方法,使酶的产量成倍增加,质量也大大提高。1978至1980年,我们对提高糖化酶的活力进行了研究,并于1980年12月技术鉴定后推广应用,获得了显著的经济效益。

一、材料与方 法

1. 菌种

将中国科学院微生物研究所选育的优良黑曲霉变异株 A.S.3.4309(UV-11) 作为诱变处理的初始菌株。

2. 培养基

- 1) 保藏培养基 查氏琼脂培养基
- 2) 分离培养基 ①查氏淀粉琼脂培养基(以玉米淀粉代替蔗糖); ②查氏淀粉琼脂培养基中加入2%柠檬酸
- 3) 摇瓶培养基 ①玉米粉8%、豆饼粉3%、麸皮1%; ②玉米粉10%、豆饼粉4%、麸皮1%
- 4) 发酵罐培养基 玉米粉10%、豆饼粉4%、麸皮1%
- 5) 种子罐种子培养基 麸皮:水=1:1.2
- 6) 发酵罐种子培养基 玉米粉4%、豆饼粉3%、麸皮1%

3. 突变株的诱变和分离

- 1) 诱变剂 硫酸二乙酯(DES)、⁶⁰Co γ 射线、5-氟尿嘧啶(5-FU)、亚硝基胍(NTG)等。
- 2) 菌悬液制备 ①将生长7天的斜面孢子悬浮于0.9%NaCl中,供DES、 γ 射线和5-FU处理用; ②将生长对数期的菌丝体(用玉米粉10%、豆饼粉4%、麸皮1%的水解液摇瓶培养40h)离心后加入石英砂和pH6.5高渗磷酸缓冲液研磨制成菌体悬浮液,供NTG处理用。
- 3) 诱变剂处理条件 ①DES 浓度1%、0.5%、0.25%、0.125%, 30℃, 振荡处理30min, 浓度0.125%, 30℃, 振荡处理30、60、90min ② γ 射线 照射剂量10、22、30($\times 10^4$ rad),

(照射5h); 照射剂量20、30、40($\times 10^4$ rad), (照射18h)。

③5-FU 浓度200 μ g/ml, 1000 μ g/ml, 30 $^{\circ}$ C, 在查氏培养基中振荡处理12h, 浓度20 μ g/ml, 100 μ g/ml, 平板培养基上生长处理。④NTG 浓度1000 μ g/ml, 30 $^{\circ}$ C, 处理45min。

4) 变异株的分离方法 将处理后的悬浮液, 用菌丝过滤法浓缩, 即在查氏培养基中培养一定时间, 滤去菌丝、滤液涂布于分离培养基平板上生长, 挑取生长代谢快的菌落进行摇瓶筛选。

黑曲糖化酶发酵过程中产生有机酸, 主要为柠檬酸^[7], 因此pH降低, 在低pH时产酶受到抑制, 在分离培养基中加入柠檬酸, 所分离的菌株不因发酵过程中pH降低而抑制产酶。

5) 菌种筛选 于500ml三角瓶中装入培养基50ml, 接种一小块斜面培养物, 用旋转式摇床(180r/min)摇瓶培养88h(摇瓶培养基①)或136h(摇瓶培养基②), 取出测定发酵上清液酶活力。

在3000l发酵罐(直径1.2m, 高2.4m, 箭叶涡轮搅拌器二挡, 直径400mm, 功率5.5kW)中投料180l, 在下述条件下进行发酵: 温度 $31 \pm 1^{\circ}$ C, 风量1:0.5~0.8, 转速200r/min, 种量8%, 发酵时间96h。

4. 分析方法

- 1) 糖化酶, α -淀粉酶, 酸性蛋白酶活力, 按轻工业部部颁方法测定(1980)
- 2) 还原糖、总糖用碘量法测定(总糖用硫酸水解后测定)
- 3) 柠檬酸按张宽厚《细菌生理学》中的方法测定^[8]
- 4) 酸度用0.1Mol/lNaOH以酚酞为指示剂确定
- 5) DE值、转移葡萄糖苷酶按中国科学院微生物研究所研究报告^[2]中的方法测定

二、结果与讨论

1. 诱变效应

经过诱变处理的菌种是否起到诱变作用, 首先根据处理后菌落形态的变化来判断, 若形态变化初步认为有效, 然后再进行筛选。现将几种诱变剂的诱变效应分述如下:

1) DES诱变效应 将DES处理UV-11, 其诱变效应表示于图1。

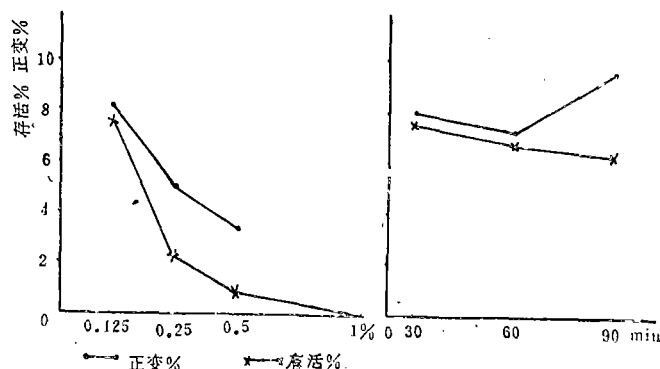


图1(1) DES处理30min

图1(2) DES处理浓度0.125%

由图1可见, DES 处理浓度从 0.125% 增加至 0.500%, 存活率由 7.7 降至 1.0%, 正变率由 8.2% 降至 3.6%; 在 0.125% 浓度下延长处理时间, 至 90min 没有明显变化。用 0.125%、30min 处理时提高 10% 至 15%, 获得变异株 D-8 比 UV-11 提高 12.5%

2) γ 射线诱变效应 γ 射线处理 D-8, 诱变效应表示于图 2

由图 2 可见, 随着照射剂量增加, 存活率降低, 当照射剂量相同时, 则剂量率小的存活率低。用 $10 \times 10^4 \text{ rad}$, $2 \times 10^4 \text{ rad/h}$ 照射时, 酶活力提高 15%, 其中 Co-66, Co-71 比 UV-11 提高 30%

3) 5-FU 诱变效应 将 Co-71 涂布于含 5-FU 的平板培养基上生长处理, 菌落生长少而弱, 甚至全部死亡, 而用含 $200 \mu\text{g/ml}$, $1000 \mu\text{g/ml}$ 液体振荡培养处理 12 h, 死亡率分别为 75%、79%, 正变率高达 40%。用 $200 \mu\text{g/ml}$ 处理时, 变异株酶活力提高 20~30%, 其中 7E-19 与 UV-11 对比, 提高 65%。

4) NTG 诱变效应 用 NTG 处理 7E-19, 出现了更高酶活力的变异株, 其中 7E-19-12 与初始菌株 UV-11 比较, 酶活力提高 100.6%。

此外静电加速器电子也具有诱变效应, 用 $3.8 \times 10^4 \text{ rad}$ 辐照 Co-71, 酶活力提高 10% 左右。

5) 变异株的酶活力

表 1 变异株的酶活力

菌株号码	摇瓶培养基①		摇瓶培养基②	
	酶活力 (u/ml)	提高 (%)	酶活力 (u/ml)	提高 (%)
UV-11	3200	—	4514	—
D-8	3600	12.5	—	—
Co-71	4100	28.1	—	—
7E-19	4960	55.0	7450	65.0
7E-19-12	—	—	9057	100.6

由表 1 可见, 通过上述几种诱变剂累积处理, 连续筛选, 酶活力大幅度提高, 最终可提高 100.6%。

2. 变异株的形态和产酶的关系

据报道^[9], 糖化酶产量变异株与原菌株形态相同或不同, 如分生孢子比原菌株少等等。

现将分离过程中观察、测定结果概括如下:

1) 分生孢子略少, 生长稍慢的菌株, 酶活力提高 10~20% 的菌株数较多, 这种菌株在麸皮培养基上恢复产孢子能力; 分生孢子很少或者分生孢子厚而密聚或者分生孢子形成很早

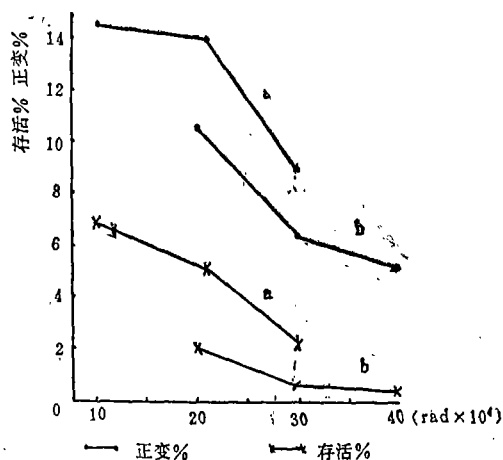


图 2 γ 射线诱变效应

a、照射 5h b、照射 18h

的平坦形菌落皆为负变株；孢子呈不同颜色的菌株，酶活力提高不大，大部分为负变株。

2) 随着处理剂量的增加，出现的小菌落数增加，菌落直径和产酶能力的关系见表2。

表2 菌落直径和产酶能力

菌落直径 (cm)	测定株数	变 异 率			
		正 变 (%)	负 变 (%)	提高5~10% (%)	提高10~20% (%)
3.5~5.0	44	27.3	34.1	18.2	9.1
2.0~3.5	45	24.4	17.8	13.3	11.1
1.0~2.0	51	15.7	39.2	13.7	1.9

由表2可见，挑取鼓凸形中等至稍大菌落获得高产变异株的机率较大。

根据遗传学理论，每个基因各有相对一定突变频率，二个独立基因同时发生突变为二个基因各自发生突变频率的乘积，因此诱变处理后的菌株中，既发生形态变异又发生产量变异的机率很小，尽管如此，获得形态变异的高产株仍为人们所重视。

3. 变异株性能

1) 7E-19 菌株性能 ①7E-19 与 UV-11 形态比较 将 UV-11、7E-19 在查氏琼脂培养基平板上生长7天观察，以及液体摇瓶培养定时观察，结果如表3。

表3 7E-19与 UV-11 形态

培 养 方 式	UV-11 形 态	7E-19 形 态
平 板 培 养 32℃、7 日	菌落 3.5~4.0cm 略呈辐射状皱纹、孢子形成快	菌落 3.0~3.5cm 鼓凸皱纹密而深、稍慢
摇 瓶 培 养	菌丝分枝长而细、隔膜间距大	分枝多，短而粗、间距小

② 7E-19 与 UV-11 酶活力对比 采用二种培养基：培养基1配方为玉米粉6%、豆饼粉2%、玉米浆2%；培养基2配方同摇瓶培养基②。UV-11 菌种及摇瓶机(210r/min)由生产工厂提供。试验结果如表4。

表4 7E-19与UV-11酶活力对比

编 号	菌 号	培 养 基	摇 瓶 时 间 (h)	pH	酶 活 力 (u/ml)	提 高 (%)
1	UV-11	1	72	3.4	2520	34.3
2	7E-19	1	72	4.0	3384	
3	UV-11	2	120	3.1	4320	63.2
4	7E-19	2	120	3.1	7050	
5	7E-19	2 (48h 调 pH)	120	4.0	8064	

由表4可见,用培养基1时,7E-19酶活力比UV-11提高34.3%,用培养基2时,7E-19酶活力比UV-11提高63.3%,若控制pH则酶活力更高。同时可见,对同一菌种改变培养基和培养时间能够提高酶活力,说明选育新菌株后,调整培养工艺才能发挥菌种潜力。

表5 装液量对产酶的影响

编 号	装 液 量 (ml)	终 pH	酶 活 力 (u/ml)
1	100	3.4	3720
2	75	3.4	4200
3	50	3.5	4650
4	25	3.8	6050

③ 装液量对产酶的影响
500ml锥形瓶内,装不同体积的摇瓶培养基①,瓶口扎8层纱布,结果见表5。

由表5可知,提高通风量有利于发酵产酶。

④ 碳氮比对产酶影响 改变培养基中玉米粉和豆饼粉比例,摇瓶5天,结果如表6。

表6 碳氮比对产酶的影响

编 号	培 养 基 配 比 (%)			终 pH	酶 活 力 (u/ml)
	玉 米 粉	豆 饼 粉	麸 皮		
1	10	1	1	6.6	3000
2	10	2	1	6.5	4670
3	10	3	1	6.5	5560
4	10	4	1	5.3	6700
5	10	5	1	4.5	7250
6	10	6	1	—	5900
7	10	7	1	4.0	6050
8	10	8	1	4.0	5400

由表6可见,玉米粉和豆饼粉按2~2.5:1效果较好。

⑤ 铁和锌对产酶的影响 铁和锌对黑曲糖化酶的形成是必需的^[8],在摇瓶培养基①中加入Fe⁺⁺、Zn⁺⁺,结果如表5。

表5 铁和锌对产酶的影响

编 号	离子名称	浓 度 (%)	pH	酶 活 力 (u/ml)	酶 活 对 比 (%)
1	Fe ⁺⁺	0	3.2	5000	100
2		0.002	3.4	5000	100
3		0.020	3.5	4455	89.1
4		0.200	3.5	3730	74.6
5	Zn ⁺⁺	0.002	3.5	5230	104.6
6		0.020	3.7	5120	102.4
7		0.200	3.4	5000	100

由表5可见,少量 Fe^{++} 没有影响,但当浓度较高时对产酶有抑制作用,因此发酵罐不宜用铁制罐。 Zn^{++} 没有明显抑制或激活产酶的作用,大概因为天然原料中已含有微量铁和锌,所以显示不出其激活作用。

⑥酶液质量测定 通常糖化酶对淀粉糖化率的不利因素是酶液中糖化酶含量低, α -淀粉酶含量高以及转移葡萄糖苷酶的存在,黑曲糖化酶的淀粉分解率为95~96%^[4]。

取培养终了的发酵液,测定糖化酶活力7320u/ml、DE值为95%(糖化48h),转移葡萄糖苷酶5.24mg/ml, α -淀粉酶12u/ml,酸性蛋白酶460u/ml。

以上测定值表明,该菌株培养终了时酶液的质量是较好的。

2) 7E-19-12菌株性能

7E-19-12菌株的外观菌落形态及发酵培养过程菌丝体形态与7E-19类同,其他性能为:

①稳定性 据报道^[10],产糖化酶的臭曲霉变异株,连续移植20次,酶活力提高1.9倍,而有些菌株移植后酶活力降低,为不稳定菌株,在不同培养基上移代对变异株的稳定性也是有影响的。

将7E-19-12连续移代,考察在查氏琼脂培养基上移代的稳定性

表6 7E-19-12稳定性

斜面代数	1	2	3	4
酶活力(u/ml)	9057	8933	8812	9302
pH	4.5	4.0	3.9	4.0

由表6可见,菌株移代后基本稳定。

②7E-19-12在不同配方中的产酶能力 按下表中配方,每瓶接种麸曲孢子悬浮液1ml,32℃、摇瓶136h,测定结果见表7。

表7 7E-19-12在不同配方中的产酶能力

编号	培养基配方			终pH	酶活力(u/ml)
	玉米粉(%)	豆饼粉(%)	麸皮(%)		
1	9	3	3	4.0	7090
2	10	2	3	4.0	7738
3	10	4	1	4.0	9374
4	15	4	1	3.5	9650
5	12	6	1	3.5	9581

由表7可见培养基配方以10%、4%及1%较好,如增加玉米粉或豆饼粉浓度,酶活增加不多,这是由于培养基浓度高,通风不良,或者发酵时间不够的缘故。

③培养过程生化测定 采用摇瓶培养基②,摇瓶培养,测定培养过程的变化,结果如图3。

由图3可见,随着时间的变化总糖下降,96h降至1%左右,此时酶活力为7000u/ml左

右。pH值前期下降很快,酸度上升很快,是因为在产生酶的同时也产生一部分酸,在72~96h保持低pH值(3.0),直至总糖不再下降,继而酸被消耗,pH又回升,回升至3.5~4.0时发酵产酶趋于结束,发酵终了酶活力9050u/ml,其他酶含量较少。 α -淀粉酶随发酵时间而增加,120h为24u/ml。酸性蛋白酶前期缓慢增加,pH回升后有下降趋势,其总含量很低(为460u/ml),由于酸性蛋白酶存在,致使酶蛋白一级结构(氨基酸肽键)分解,而使酶失活。

④ 发酵罐验证产酶能力 为了使7E-19-12在生产条件下继续表现出它的产酶能力,在3000 l发酵罐中,用15%浓度配方,在低转速下通风培养96h,结果如图4。

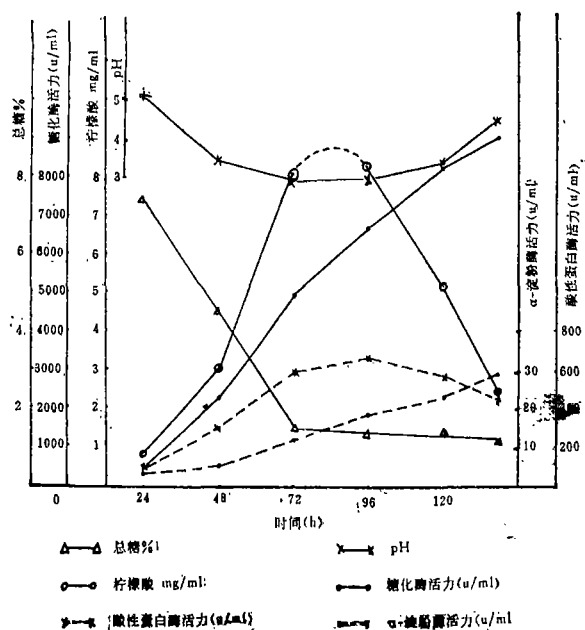


图3 代谢曲线

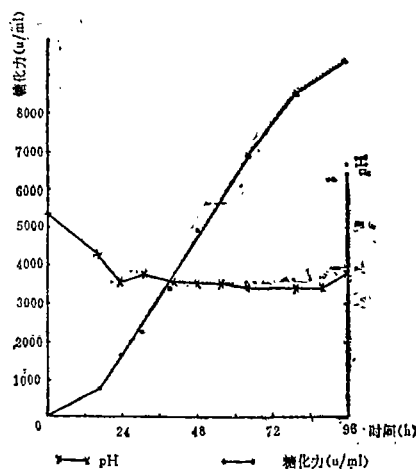


图4 发酵罐产酶曲线

注:糖化率,指糖化酶活力

由图4可见,产酶速度较快,而且没有产酶停滞期,发酵周期96h,酶活力9300u/ml。如果改进工艺条件和设备,以适应7E-19-12的特性,将进一步发挥它的潜力。

三、小 结

1) 用DES, γ 射线, 5-FU, NTG等诱变剂处理黑曲霉 A.S.3.4309, 具有较好的诱变效应,特别是5-FU, NTG可以提高酶的活力20%以上,通过以上诱变剂累积处理,连续筛选,7E-19-12较UV-11酶活力提高100.6%。

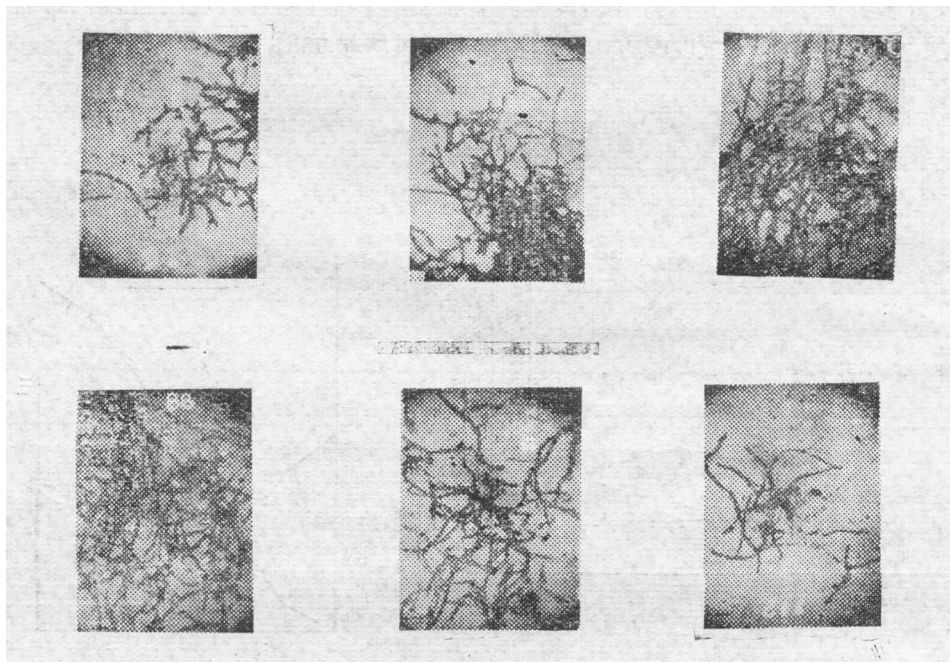
2) 筛选菌种的培养基和培养条件应和大生产相似,这样筛选出的菌种比较容易在生产上见效。同样的条件下,摇瓶机或发酵罐转速快,则酶活力高、发酵周期亦短。7E-19-12菌株适应浓醪发酵,在全面权衡经济效益前提下采用高浓度高转速,酶活力将相应提高,本试验考虑我国目前生产工厂的装备及电耗、成本等因素,使用较低转速(摇瓶机180r/min, 3000 l发酵罐200r/min),采用10%玉米粉,4%豆饼1%麸皮培养基,酶活力可达9300u/ml。

3) 试验中有些变异株摇瓶时酶活力高,而发酵罐培养时酶活力不高,利用摇瓶培养的

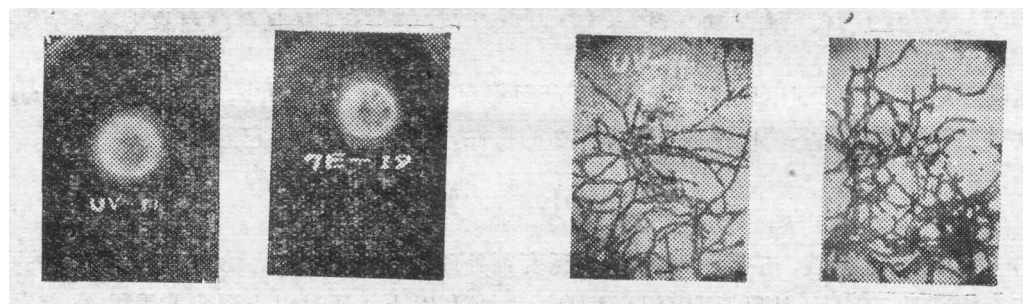
筛选方法得到的最佳结果只是初步结果,只有用发酵罐验证才能最后确定是否为高产菌株,有无应用意义。经发酵罐验证,7E-19-12的产酶能力达到相应摇瓶酶活力水平。

7E-19-12变异株性能稳定,可利用廉价原料,发酵周期短,酶系较纯,是具有优良性能的高产变异株。

附 图



附图一 7E-19-12 发酵过程菌丝体形态(16、32、72、88、104、112 h)



附图二 UV-11、7E-19-12 菌落形态

UV-11、7E-19-12 菌丝体形态

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所,《微生物学通报》,6(5): 19(1979)
- [2] 中国科学院微生物研究所,《微生物学通报》,7(4): 153(1980)
- [3] 上海市工业微生物研究所,《工业微生物》,6: 1—16(1980)
- [4] 过版好夫,《应用酵素学》156—163,请谈社サイエンティフィック

-
- [5] Agric Biol Chem 45(12) 2675—2681 (1981)
- [6] Agric Biol Chem 46(1) 83—89 (1982)
- [7] 大出通资,《发酵协会志》,26(9):400(1968)
- [8] 张宽厚,《细菌生理学》,51,229,(1961)
- [9] Y. K. Park, et al, J Ferment Technol 55(12) 193~195 (1977)
- [10] “工业微生物”,3:43 (1977)(译文)

86026

提高黑曲糖化酶活力的研究——诱变育种,《无锡轻工业学院学报》,1986年,第5卷,第4期

主题词 变异株,糖化酶/糖化酶活力

摘要 使用DES、 γ 射线、5-FU、NTG等诱变处理黑曲霉A.S.3.4309,获得高产变异株7E-19-12,糖化酶活力比初始菌株提高100.6%,用30001发酵罐验证,其酶活力达9300 u/ml,并且 α -淀粉酶,酸性蛋白酶,转移葡萄糖苷酶含量较低。

作者:毛理一、修道高、顾国贤

86027

中华猕猴桃蛋白酶性质的研究及其在肉类嫩化剂制备中的应用,《无锡轻工业学院学报》,1986年,第5卷,第4期

主题词 中华猕猴桃,蛋白酶/嫩化剂

摘要 本文研究了中华猕猴桃蛋白酶的一些性质和它在配制肉类嫩化剂中的应用。此酶对两种不同的底物具有两种不同的最适pH,即以酪蛋白为底物时,最适pH为5.0~6.5,而以苯甲酰精氨酸乙酯(BAEE)为底物时,最适pH为7.5。在pH4.0~10.0范围内,酶能保持稳定。在65℃热处理16分钟,酶活力残存50%。将此酶配制成肉类嫩化剂处理牛肉,其蛋白萃取液中总可溶性含氮及可溶性非蛋白氮含量均比对照样品高,其脯氨酸甘氨酸含量也有明显的增加。这表明猕猴桃蛋白酶对肌肉组织中的胶原蛋白和弹性蛋白产生了一定作用。流变性试验也表明该嫩化剂是有效的。

作者:臧大存、王璋、

陈舜祖

86028

食品中微量硒的荧光测定法,《无锡轻工业学院学报》,1986年,第5卷,第4期

主题词 荧光分析;微量元素;硒/荧光分光光度法

摘要 本文介绍用2,3-二氨基苯(DAN)与食品中微量硒作用产生4,5-苯并苯硒脑的荧光测定法,并对实验条件进行了探讨。本方法的最低检出量为6.0 ng,硒含量为0.01 ppm;0.1~1 ppm时变异系数分别为9~13.3%、2.4~5.2%,回收率为90~105%。本法的精密度及准确度均高。

作者:沈若荃、刘明

86029

食用羟丙基淀粉的研究,《无锡轻工业学院学报》,1986年,第5卷,第4期

主题词 食品添加剂;淀粉/羟丙基淀粉

摘要 用化学方法对淀粉分子结构进行改造,使其部分脱水葡萄糖单位上的羟基与烷基化试剂反应生成羟丙基淀粉。经羟丙基醚化后的淀粉糊化温度明显降低,糊化速度大大加快,老化现象改善,凝胶较为透明清晰,在冷藏、冻融以及微酸性条件下,能保持凝胶的稳定性。参照F.C.C标准,羟丙基淀粉可供食用。动物毒理试验结果无异常。性能稳定。食用羟丙基淀粉可以代替或部分代替天然胶(果胶、阿拉伯胶等)。

作者:姜雪珍、吴宽民、杨荣珍

86028

A METHOD OF FLUOROMETRIC DETERMINATION OF TRACE AMOUNT OF SELENIUM in FOOD «Journal of the Wuxi Institute Light Industry», Vol.5, No.4, 1986

SUBJECTWORDS fluorometric analysis; microelement, selenium/fluorimetric determination

ABSTRACT A method using the reaction of 2,3-diaminonaphthalene with the trace amount of selenium to form Se-DAN complex is introduced for the fluorimetric determination of selenium in food. The condition of experiments was studied. The detection limit was 6 ng. The content of selenium was 0.01 ppm, 0.1—1 ppm, the coefficients of variation were 9.0—13.2%, 2.4—5.2% respectively. The recovery was 90—105%. Both precision and accuracy of this method are satisfactory.

Author: Shen Ruquan, Leu Ming

86029

STUDY on FOOD HYDROXYL-PROPYL STARCH «Journal of the Wuxi Institute Light Industry», Vol.5, No.4, 1986

SUBJECTWORDS food additives starch/hydroxypropyl starch

ABSTRACT The structure of starch molecules modified chemically that part of dehydroglucose units' hydroxyl group react with alkylating agent and form hydroxypropyl starch. Hydroxypropyl ethers of starch have apparently lowered temperatures and much faster speed of gelatinization, improved retrogradation, and the granules more clearly transparent. Its stability can be retained in refrigeration, thawing and under weak acid or acid environments.

Food hydroxypropyl starch in compliance with FCC regulations can be used in food. Its toxicity found to be normal, also stable in characteristics. Hydroxypropyl starch can be used to substitute or partly substitute expensive natural gums (pectin, acacia gum, etc.)

Author: Jian Xuechen, Wu Kuanmin, Yang Yungchen

86027

STUDY on the PROPERTIES of PROTEINASE in KIWI FRUIT and ITS APPLICATION to PREPARING MEAT TENDERIZER «Journal of the Wuxi Institute Light Industry», Vol.5, No.4, 1986

SUBJECTWORDS actinia chinensis; proteinase/acl:inidin

ABSTRACT Some properties of proteinase in kiwi fruit and its application to preparing meat tenderizer were investigated. The enzyme has two different optimum pH ranges with two different substrates, namely, 5.0—6.5 for casein and 7.5 for benzylarginine ethylester(BAEE). The enzyme was stable in the pH range from 4.0 to 10.0. 50% enzymatic activity still remained after sixteen minutes of heat treatment at 65°C. The effect of tenderizer prepared with the recovered proteinase on beef tenderizing was investigated. The content of the total soluble nitrogenous compounds and the nonprotein nitrogen in the extract was higher from the beef sample treated by the tenderizer than that from the control. The increase in the amount of the proline and glycine in the beef extract showed that the proteinase in kiwi fruit could hydrolyze the collagen and elastin in muscle tissue to a certain extent. Rheology determination also demonstrated that the tenderizer was effective.

Author: Zang Decun Wang Zhang

Chen Shunzu

86026

STUDIES to RAISE the ACTIVITY or GLUCOAMYLASE of ASPERGILLUS NIGER—MUTATION BREEDING «Journal of the Wuxi Institute Light Industry», Vol.5, No.4, 1986

SUBJECTWORDS aspergillus niger; mutant/activity of glucoamylase

ABSTRACT A high yield mutant Te-19-12 is obtained by mutation for aspergillus niger A.S.3.4309 using DES.R rays, 5-FU, NTG and so on. As compared with initial strain, the activity of glucoamylase of the mutant is increased by 100.6%. To test with 300-L fermentor, the activity of glucoamylase is as high as 9300u/ml, and the content of γ -amylase, acidic protease and γ -glucosidase is lower.

Author: Mao Xingyi, Xiu Daogo, Gu Guoxian