

葡萄糖异构酶生产和应用的研究

江苏省化工设计研究所
连云港洪门果酒厂

葡萄糖浆是以淀粉为原料用酶法制成的一种葡萄糖、果糖混合糖浆,其中葡萄糖含量为60—65%,果糖含量为35—40%,甜度相当于蔗糖,营养价值高于蔗糖。由于在生产上原料来源广泛,生产不受季节限制,设备简单,投资较低等优点,在世界上引起了越来越大的重视。我们在毛主席的革命路线指引下,以阶级斗争为纲,坚持党的基本路线,在各级党委的领导和关怀下,在葡萄糖浆研究工作方面取得了较好的进展。菌种、发酵、酶的提取和制糖等方面均已全面稳定达到了预定指标,现将基础性研究结果报告如下。

材料和方法

菌种:原始菌种玫瑰暗黄链霉菌 KC_{13} 。上海植物生理研究所提供,中国科学院微生物研究所鉴定。

培养基与培养方法:斜面种子与平板分离采用高氏1号培养基,其组成为:可溶性淀粉2%,磷酸氢二钾0.05%,硫酸亚铁0.001%,硝酸钾0.1%,硫酸镁0.05%,氯化钠0.05%,琼脂2%,用氢氧化钠调至pH7.2—7.4。

种子培养液组成为:葡萄糖3%,磷酸二氢钾0.05%,蛋白胨0.2%,氯化钠0.25%,硫酸铵0.5%,碳酸钙0.4%,用氢氧化钠调至pH7.2—7.5。

发酵培养液组成为:麸皮4%,豆饼粉1%,磷酸氢二钾0.1%,硫酸镁0.1%,氯化钴0.024%,用氢氧化钠调至pH7.2—7.5。

斜面于29—30℃培养4天左右接入种子培养液中,500毫升三角瓶装50毫升培养液,于往复式摇床(振幅8厘米,振次104次/分)29—30℃培养24小时左右,以5—7%接种量接入发酵培养液,培养条件同前,发酵48小时左右。

菌种的诱变方法:原始菌株 KC_{13} ,按照常规方法做成孢子悬浮液,取5毫升加入放线菌素“K”,使总浓度为25微克/毫升,处理30分钟,然后,再经15瓦紫外线30厘米距离照射1分钟,稀释分离,挑选菌落移至斜面,进行初筛,复筛。经过一千多支菌株的筛选,获得一株酶活性较高的变异菌株 KC_{13-575} 其酶活性是 KC_{13} 的2倍,之后又经过三年来的不断纯化,

目前保持在100单位/毫升以上。

酶活力的测定:按本所高渗法测定。以每毫升发酵液,70℃1小时,在特定反应系统下生成1毫克果糖的酶量定为1个酶单位。

摇瓶发酵条件试验

一、发酵培养基初 pH 对产酶的影响

灭菌前 pH 分别为7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 以前述方法培养46小时,测定酶活性结果表明,灭菌前 pH 7.0—7.5 较好。

二、种龄对产酶的影响

斜面菌种接入种子培养液,培养11, 19, 28, 40小时,分别转入发酵培养液,培养46小时,测酶活性,结果表明种龄以19—28小时较好,从形态上来看,此时菌丝生长旺盛,刚开始断裂。

三、接种量对产酶的影响

以接种量1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10% 接入发酵培养液,培养46小时,结果表明接种量大,生长快,产酶亦高,以7—10% 较好。

四、铁离子对产酶的影响

铁离子 (Fe^{++} , Fe^{+++}) 以 $7.5 \times 10^{-3}M$, $7.5 \times 10^{-4}M$, $7.5 \times 10^{-5}M$, $7.5 \times 10^{-6}M$ 添加于发酵培养液,培养46小时,测定酶活性的结果表明,上述铁离子浓度范围对产酶影响不大。

五、添加碳源对产酶的影响

在前述发酵基础培养基中添加碳源,以增加能源,提高菌体量和酶活性。结果表明添加0.5% 山芋淀粉或玉米粉,可提高酶活性约10%。

六、稳产试验

将斜面菌种接入种子瓶,培养22—24小时,培养液呈玫瑰暗黄色,镜检菌丝生长旺盛,开始断裂。以7—10% 接种量接入初 pH7.2 的发酵培养液,置于前述摇床,于29—30℃ 振荡培养48小时,产酶情况如

表 1 所示。

表 1 连续 12 批摇瓶发酵异构酶活力

产酶量(单位/毫升)	培养基	基本发酵培养基(对照)	发酵培养基加0.5%山芋淀粉	发酵培养基加0.5%玉米粉	发酵培养基加1.0%玉米粉
9		100.1	107.3	103.3	116.8
10		102.6	126.7	116.2	127.9
11		123.7	130.0	120.8	127.4
12		102.3	111.5	118.1	119.5
13		108.9	118.5	105.7	106.6
14		91.7	98.3	116.8	115.2
15		101.0	122.1	118.8	126.1
16		103.5	129.9	129.8	139.4
17		110.6	112.5	113.9	122.3
21		109.2	112.0	116.0	125.9
22		115.1	115.0	117.4	102.5
23		107.8	111.8	118.1	116.1
平均酶活力(单位/毫升)		106.4	116.9	116.2	120.5

* 18, 19, 20 批因停电和摇床故障未计入。

由上述连续 12 批摇瓶发酵结果表明,在基础发酵培养基中添加 0.5% 山芋淀粉或 0.5—1.0% 玉米粉,产酶量可以稳定在 120 单位/毫升左右。

酶的提取

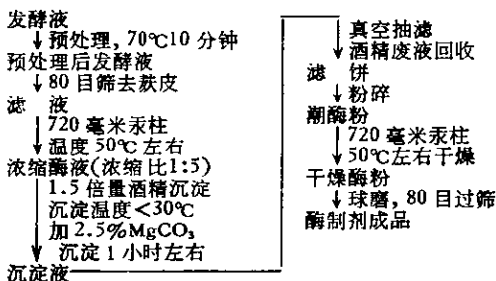
变异菌株 KC₁₃-575 产生的葡萄糖异构酶除细胞内酶以外,尚有较大部分的胞外酶。为此,采取了两种方法进行酶的提取。

一、菌丝体的离心收集

发酵液过 80 目筛,除去麸皮碎片,经 2000 转/分,离心 15 分钟,收集菌丝体。菌丝体的酶可直接用于葡萄糖的转化。

二、酒精沉淀法

用酒精将菌丝体和胞外酶一起沉淀。其工艺流程如下:



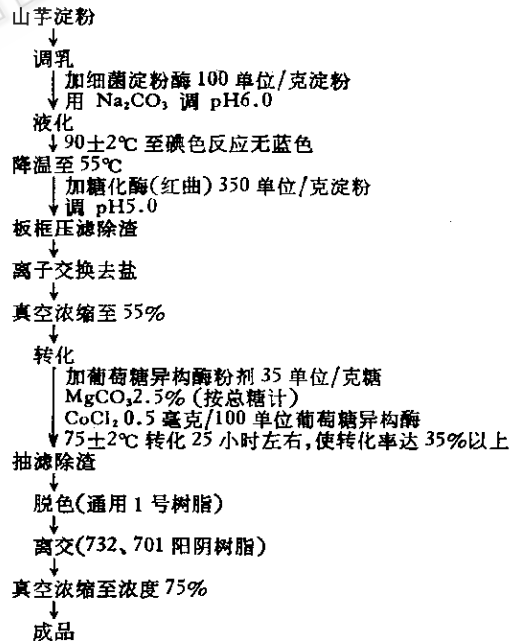
酒精沉淀法提取酶制剂时,沉淀温度在 30℃ 以下,沉淀时间可在 1 小时左右,加 MgCO₃ 作助滤剂,既可维持酶的较适 pH,又可在转化过程中起缓冲剂作用,平均提取得率为 69.1%。酶制剂质量为: 80 目粒度,灰白色,无异味,1000—2000 单位/克,水份小于 10%。

表 2 酒精沉淀法提取异构酶的得率

试验批号	发 酵 液			酒 精 沉 淀		粉 剂		得率 (%)	
	毫升数	单位/毫升	浓缩后体积(毫升)	酒精用量(毫升)	沉淀温度(℃)	沉淀时间(小时)	克数		单位/克
1	2000	91.8	600	1500	10	2	81.7	1527.5	68.0
2	2000	91.8	595	1500	30	1	80.5	1541.0	67.6
3	2000	91.8	565	1680	10	0.5	106.7	1216	70.6
4	2000	91.8	540	1620	30	2	108.9	1241.5	73.6
5	2000	81.9	515	1500	5	0.5	92.2	1300	73.3
6	2000	81.9	535	1500	25	2	100.4	1430	87.5
7	1600	84.0	550	1500	5	0.5	60.0	1242	55.5
8	1600	84.0	555	1500	30	0.5	65.0	1203	58
9	1600	89.7	450	1350	30	10分钟	75.0	1325	69.2
10	1600	89.7	450	1350	10	10分钟	78.0	1300	68.0

制葡果糖浆工艺流程

据上述结果确定制糖工艺如下:



按此工艺生产的成品葡果糖浆质量如下: 还原糖 79.36%, 果糖 31.0%, 转化率 39.0%, 总氮痕量, 金属及砷量达到口服葡萄糖规定标准(蚌埠葡萄糖厂测定), 钴符合卫生部部颁标准, 比抵抗 4.16 × 10.5 欧姆·厘米。