

# 黑曲霉变异株 A. S. 3.4309 产葡萄糖淀粉酶的研究

## 1. 发酵条件的研究

中国科学院微生物研究所糖化酶组

(北 京)

关于葡萄糖淀粉酶(简称糖化酶)的研究,国外近年来发展较快<sup>[1-4]</sup>,我们为更好地发挥菌株的产酶潜力,研究了黑曲霉变异株 A. S. 3.4309 的发酵条件。

### 材 料 与 方 法

#### 一、菌株

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 变异株 A. S. 3.4309。

#### 二、培养基

查氏琼脂培养基 (Czapek)。

#### 三、分析方法

发酵滤液中糖化酶活力的测定,采用常规的次亚碘酸盐测定还原糖的方法。可溶性总糖的测定是将发酵滤液用盐酸水解后,用斐林法测定后换算。氨基氮的测定是采用甲醛滴定法。酸度采用 NaOH 滴定。

### 结 果 和 分 析

#### 一、摇瓶发酵条件试验

在 250 毫升的三角瓶中,装培养基 50 毫升,经 15 磅 30 分钟灭菌并冷却后,将在斜面上培养好的菌体接入三角瓶中,于 32℃, 220 转/分的摇床上振荡培养 72 小时,取滤液测定酶活力。

(一) 培养基成分的不同配比对产酶活力的影响

试验按正交试验设计组合进行。结果见表 1。

表 1 培养基成分的不同配比对产酶活力的影响

试验组号	玉米粉 (%)	玉米浆 (%)	豆饼粉 (%)	平均酶活力 (单位/毫升)	发酵液 pH
1	2	1	3	1540	5.5
2	6	2	2	2102	5.8
3	4	3	2	2160	6.0
4	8	0	3	1910	5.8
5	2	2	1	864	6.0
6	6	1	0	1219	2.5
7	4	0	0	768	2.3
8	8	3	1	1929	3.0
9	2	0	2	878	6.5
10	6	3	3	1977	4.0
11	4	2	3	2140	5.3
12	8	1	2	1843	3.0
13	2	3	0	1084	6.7
14	6	0	1	1468	2.5
15	4	1	1	1584	5.5
16	8	2	0	1723	2.5
对照组	4	2	1	1689	5.8
效应值*	759	531	693		

\* 效应值系根据正交设计表结果计算。

从表 1 看出,用玉米粉时的效应值最高为 759,因此以玉米粉作碳源对产酶活力的影响较大。从酶活力来看,2、3、4、8、10、11 等组较好,都在 1900 单位/毫升以上,其共同点是培养基的浓度高,玉米粉含量(重量/体积)为 9—12%。进一步的重新组合实验表明,培养基配比以玉米粉 6% 或 8%,玉米浆 2%,豆饼粉 2% 的酶活力较高。

#### (二) 无机盐对产酶活力的影响

利用正交设计对不同量的硫酸铵,磷酸二氢钾和硫酸镁进行了试验,了解它们对产酶活力的影响。结果说明,无机盐对产酶活力影响不大。

## 二、发酵条件的扩大试验

在摇瓶发酵条件试验的基础上,于本所中间试验工厂的240升发酵罐上进行了不同培养基成分配比、搅拌不同转速和通气量对产酶活力影响的试验。

### (一) 摇瓶种子培养(一级)

摇瓶种子培养基成份为玉米粉2.5%;玉米浆2.0%;500毫升三角瓶中装培养基125毫

升,接种后于32℃,摇床上培养24—36小时。

### (二) 扩大种子培养(二级)

用30升发酵罐做扩大种子培养。培养基成分配比与摇瓶相同。培养24—36小时,当其酶活力大约在150—200单位/毫升时,镜检菌体生长正常,按接种量(体积/体积)5—7%转入240升罐培养。

(三) 不同培养基配比对产酶活力的影响  
试验结果见表2。

表2 不同培养基配比对产酶活力的影响\*

发酵液 pH及酶活力		培养时间(小时)	24	36	48	60	72	84	96
培养基配比(%)									
玉米粉 4 玉米浆 2 豆饼粉 1	pH		3.5	3.5	3.5	5.8			
	酶活		360	878	1130	(1700)			
玉米粉 6 玉米浆 2 豆饼粉 2	pH		3.7	3.3	3.3	3.5	5.8		
	酶活		597	1368	1928	2764	(3484)		
玉米粉 10 玉米浆 2 豆饼粉 2	pH		3.3	3.1	3.0	2.8	2.9	3.8	
	酶活		677	1102	1958	2995	3802	(3931)	
玉米粉 15 玉米浆 2 豆饼粉 2	pH		3.8	3.7	3.6	3.3	2.8	2.8	3.0
	酶活		878	1123	2188	3944	4800	5400	5616

\* 搅拌转速: 330—340 转/分;通气量 1:0.8 (体积/体积)

从表2看出,玉米粉含量高的培养基的配比其酶活力也高。在发酵过程中,随pH上升, $\alpha$ -淀粉酶的产生会增加,使酶液混浊,质量降低,过滤困难,因此我们控制pH回升到3.5—3.8时放罐。

### (四) 发酵罐的搅拌转速对产酶活力的影响

试验中,发酵罐搅拌采用三种不同转速,以玉米粉6%,玉米浆2%,豆饼粉2%的配比组成培养基,进行发酵试验。结果见表3。

结果表明,搅拌转速快,比搅拌转速慢的发酵产酶活力高。

### (五) 通气量对产酶活力的影响

结果见表4。培养基配比同表3试验。

结果表明,发酵罐搅拌转速高的罐批较转速低的产酶活力高。

### (六) 发酵过程中酶活力、总糖、氨基氮、pH、酸度的变化情况

1. 发酵接种前的糖、氮含量分析:结果见表5。

2. 发酵过程中酶活力,总糖、氨基氮、酸度的变化:上述2号培养基发酵过程中总糖、氨基氮、酶活力、pH、酸度的变化情况见图1。

图1说明,在发酵72小时后,总糖降至

表 3 发酵罐搅拌转速对产酶活力的影响\*

发酵罐 搅拌转速 (转/分)	发酵液 pH 及 酶活力	培养 时间 (小时)	24	36	48	60	72	84
230	pH		4.2	3.8	3.7	3.7	3.8	4.0
	酶 活		555	878	1122	1440	1812	(2340)
270	pH		4.0	3.5	3.3	3.3	3.3	3.5
	酶 活		187	611	1222	2360	2848	3281
330	pH		3.7	3.3	3.3	3.5	5.8	
	酶 活		597	1368	1928	2764	(3484)	

\* 通气量 1:0.8 (体积/体积), 发酵罐为标准罐。

表 4 通气量对产酶活力的影响

搅拌 转速 (转/分)	通气 量 (体积/ 体积)	发酵液 pH 及 酶活	培养 时间 (小时)	24	36	48	60	72
230 转	1:0.8	pH	4.2	3.8	3.7	3.7	3.8	
		酶活	555	878	1122	1440	1812	
230 转	1:1.2	pH	4.0	3.5	3.5	3.3	3.3	
		酶活	345	900	1454	1840	2416	
270 转	1:0.8	pH	4.0	3.5	3.3	3.3	3.3	
		酶活	187	611	1222	2360	2848	
270 转	1:1.2	pH	3.6	3.6	3.5	3.3		
		酶活	547	600	2030	2740		

表 5 接种前三种培养基的糖、氮含量分析

编 号	培养基配比 (%)	总 糖 (%)	总 氮 (%)	由总氮换算 为蛋白质 (%)
1	玉米粉 6	7.03	0.32	(2.00)
	玉米浆 2			
	豆饼粉 2			
2	玉米粉 10	9.95	0.35	(2.19)
	玉米浆 2			
	豆饼粉 2			
3	玉米粉 15	14.00	0.41	(2.56)
	玉米浆 2			
	豆饼粉 2			

0.83%。而 pH 值在发酵前期随培养时间的延长而下降, 发酵后期开始回升。高浓度碳源的

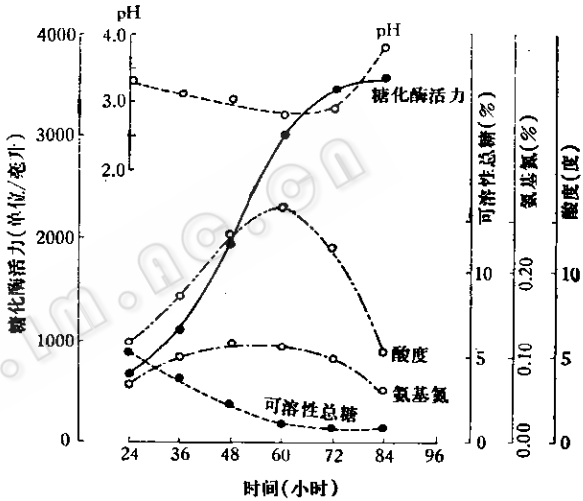


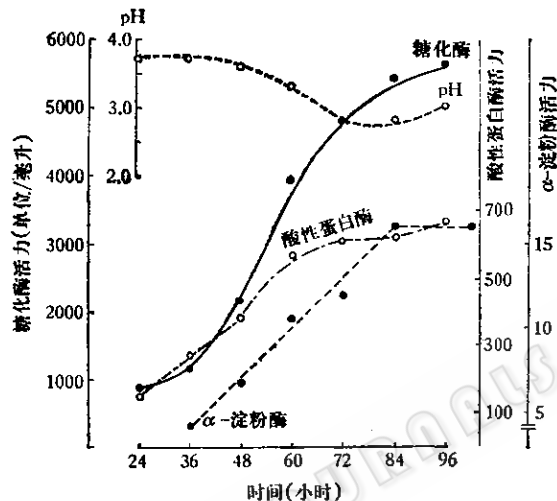
图 1 发酵过程中酶活力、总糖、氨基氮、酸度、pH 的变化情况

培养基配比, 在发酵时 pH 回升较慢, 而 pH 回升对酶液质量影响较大, 所以放罐必须控制在合适的 pH 范围。

(七) 发酵过程中其他酶产生的情况

为了解此诱变菌株的其他酶产生的情况, 我们在上述 1, 3 号培养基配比的发酵罐批中, 还测定了  $\alpha$ -淀粉酶, 酸性蛋白酶, 结果见图 2。

实验结果表明,  $\alpha$ -淀粉酶随发酵时间的延长其积累量递增, 当延长发酵时间时, pH 值上升,  $\alpha$ -淀粉酶的量提高得很快, 而高浓度培养基在发酵后期其 pH 回升不明显, 所以  $\alpha$ -淀粉酶增加也不明显。在表 5 中培养基配比 1 发酵终了,  $\alpha$ -淀粉酶活力为 4.3 单位/毫升, 配比 3 为 16 单位/毫升, 所以总的  $\alpha$ -淀粉酶活力是低



培养基配方: 玉米粉 15%, 玉米浆 2%, 豆饼粉 2%

图2 发酵过程中其他酶产生的情况

的。而发酵过程中的酸性蛋白酶的含量为, 每100单位糖化酶仅有10多单位的酸性蛋白酶。因此, 总的来说, 此诱变株主要产生葡萄糖淀粉

酶, 是一株优良菌株。

## 讨 论

1. 扩大的发酵条件试验表明, 最高酶活力达5616单位。在发酵过程中, 发酵前期 pH 值逐渐下降, 后期 pH 回升。当回升到 pH 3.5—3.8 时可视为发酵终了。

2. 此变异株仅产生少量的 $\alpha$ -淀粉酶和酸性蛋白酶, 而大量积累的是糖化酶, 发酵终了 pH 值又较低, 因此该菌株是一株产葡萄糖淀粉酶的优良菌株。

## 参 考 文 献

- [1] 大出通资: 醱酵协会志 26 (9): 12, 1968.
- [2] Aschengreen, N. H.: Process Biochem. 4 (8): 23, 1969.
- [3] Smiley, K. L., U. S. Patent, 3301768, 1967.
- [4] Underkofler, L. A.: Cellulose and There applications Advances in chemistry Series p.343, 1969.