

# 黑曲霉变异株 AS 3.4309 产葡萄糖淀粉酶的研究

## II 酶的性质和糖化条件的研究

中国科学院微生物研究所糖化酶组

(中国科学院微生物研究所, 北京)

葡萄糖淀粉酶(简称糖化酶), 在生产上有广泛的应用<sup>[1]</sup>。关于糖化酶的性质, 国内外已有不少报道<sup>[2-9]</sup>, 而 AS 3.4309 变异株, 与文献介绍的菌株相比, 具有产糖化酶活力高、耐酸性条件、产转移葡萄糖苷酶的量少等优点。本文主要介绍该菌株所产葡萄糖淀粉酶的性质和糖化条件。

### 材 料 和 方 法

#### 一、菌株

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 变异株 AS 3.4309, 黑曲霉 Pr-3。

#### 二、酶液的制备

1. AS 3.4309 糖化酶的制备: 采用含玉米粉 10%, 黄豆饼粉 2%, 玉米浆 2% 配比的培养基, 在 240 升发酵罐于 32℃, 搅拌速度 340 转/分的条件下, 培养三天后, 将培养液过滤去菌丝即得到酶液。

2. 黑曲霉 3912-12 糖化酶: 由天津葡萄糖厂供给。

3. 黑曲霉 Pr-3 糖化酶的制备: 采用含玉米粉 6%, 黄豆饼粉 2%, 玉米浆 2% 的培养基, 在三角瓶中, 于 220 转/分的旋转摇床上, 培养三天后, 将培养液过滤去菌丝后即得到酶液。

#### 三、分析方法

1. 葡萄糖淀粉酶活力的测定: 用次亚碘酸盐法测定<sup>[1]</sup>。

2. 葡萄糖值 (DE) 的测定: 用次亚碘酸钠

法测定葡萄糖后, 算出葡萄糖占干物质总重量的百分数, 以 DE 值表示。干物质总量用比重瓶法测定<sup>[10]</sup>。

3. 转移葡萄糖苷酶的测定<sup>[11]</sup>: 在直径 18 毫米的试管中, 加入 2 毫升酶液(按糖化酶活力单位计算一律稀释为 500 单位/毫升)和 2 毫升 20% 的麦芽糖-醋酸缓冲液 (pH 为 4.6), 摇匀, 塞棉塞后于 50℃ 水浴中保温 6 小时。取出后在沸水浴中煮 5 分钟, 使酶失活。冷却到 28℃, 加酵母悬浮液 2 毫升(用第一代或第二代的啤酒酵母, 离心, 水洗二次, 离心后得到的湿酵母, 按 1 克加 1 毫升的比例搅匀配成) 摇匀, 于 28℃ 温箱中放置 20—24 小时, 中间摇动数次。然后以 3000 转/分速度离心 5 分钟。取上清液进行适当稀释(以含 0.02—0.15 毫克葡萄糖/毫升为宜), 取稀释液 0.5 毫升加入蒽酮试剂(80 毫升浓硫酸加入 20 毫升水和 0.2 克蒽酮配成) 2.5 毫升, 充分摇匀, 在沸水中煮沸 10 分钟, 冷却后在 620 毫微米波长进行比色。同时以 0.5 毫升水代替上清液作为空白对照。用空白的光密度减去样品的光密度得到的数值, 然后查葡萄糖的标准曲线即得转移葡萄糖苷酶的活力。其单位由 1 毫升酶液所产生的非发酵糖的毫克数来表示。

### 实 验 结 果

#### 一、酶的性质

1. 酶作用的最适 pH: 取酶液在不同 pH 缓冲液-淀粉溶液中, 于 40℃ 反应 1 小时, 测定酶活力。结果见图 1。

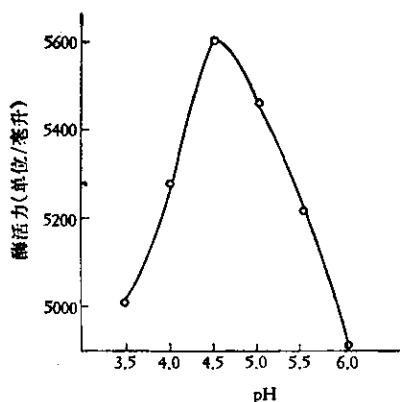


图1 酶活力与作用 pH 的关系

结果表明,作用最适 pH 为 4.5。与已报道的葡萄糖淀粉酶的最适作用 pH<sup>[2,4,5]</sup> 是比较接近的。

2. 酶作用的最适温度: 取 30% 浓度 pH 为 4.5 的淀粉液化液,加酶量为 100 单位,分别保温在 40—80℃ 的范围,反应 1 小时,测定酶活力,结果见图 2。

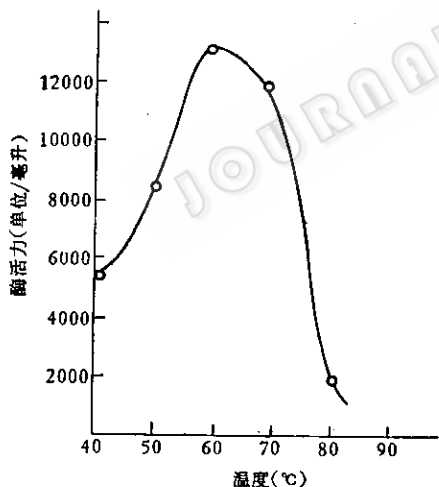


图2 酶活力与温度的关系

图 2 表明,酶作用的最适温度为 60℃,这与文献<sup>[4]</sup>报道大致相近。

3. 酶的热稳定性: 取酶液分别在 40℃、50℃、60℃、70℃ 水浴中保温 30 分, 60 分, 90 分, 120 分钟。然后取出分别测定酶活力,结果见图 3。

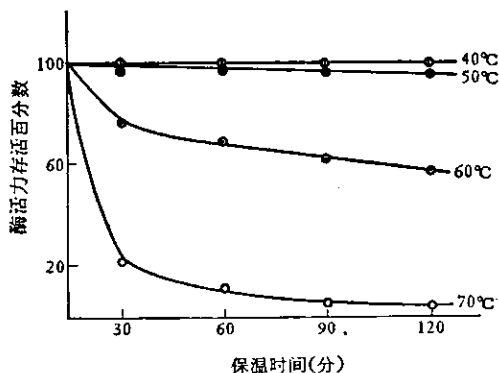


图3 酶的热稳定性

结果表明,该酶在 50℃ 以下是稳定的。50℃ 以上时,随温度的升高和保温时间的延长,酶活力存活的百分比下降。

4. 转移葡萄糖苷酶的含量: 将黑曲霉菌株 3912-12 和 Pr-3 与变异株 AS3.4309 一起进行了转移葡萄糖苷酶活力的测定,结果见表 1。

表 1 不同菌株的转移葡萄糖苷酶活力的测定

转移酶活力* 次 数	菌 株		
	3912-12	Pr-3	AS3.4309
1	15.68	15.25	10.48
2	17.60	18.18	11.67
3	14.92	15.24	9.32

\* 转移葡萄糖苷酶活力单位: 寡糖毫克数/毫升酶液。寡糖毫克数是以葡萄糖毫克数表示。

结果表明 AS 3.4309 菌株的转移葡萄糖苷酶的活力最低。

## 二、AS 3.4309 菌株糖化酶的糖化条件与糖化液葡萄糖值 (DE) 的关系

1. 糖化最适 pH: 取浓度 30% 的淀粉液化液,用 1N 的盐酸或氢氧化钠分别调 pH 至 3.0—6.0, 然后按每克干淀粉加入 100 单位糖化酶(酶液预先用 2% 酸性白土振荡处理 1 小时。以下试验所用酶液都同此)。于 60℃ 糖化 40 小时,测定 DE 值。并取 5 毫升糖化液加 0.05 克活性炭,煮沸过滤,取滤液 1 毫升加 9 毫升无水乙醇,摇匀,用光电比色计在 600 毫微米波长比

色,确定醇中不溶物含量。结果见表2。

表2 pH与DE值、醇中不溶物的关系

结果 项目	pH								
		3.0	3.5	3.8	4.2	4.5	4.8	5.2	6.0
DE 值		98.5	98.8	98.7	99.1	98.3	97.9	97.7	95.7
醇中不溶物*		0.75	0.80	0.48	—	0.59	0.91	0.88	1.43

\* 此数据为比色的光密度。

结果表明,最适糖化 pH 为 4.2,较适 pH 3.5—4.5,DE 值大约在 98—99%,醇不溶物最少的范围即是 DE 值最高的范围。

2. 糖化最适的酶用量: 在浓度 30%, pH 为 4.0 的淀粉液化液中,按每克淀粉计算分别加入 60、80、100、120、150 个单位的酶液,于 60℃ 糖化 40 小时,测 DE 值和醇中不溶物,结果见表 3。

表3 不同加酶量对 DE 值和醇中不溶物的影响

结果 项目	加酶量(单位)					
		60	80	100	120	150
DE 值		98.82	98.98	99.46	99.34	99.82
醇中不溶物		1.23	0.95	0.80	0.67	0.52

结果表明,糖化酶用量一般为 100 单位/克干淀粉较好。醇中不溶物含量则随酶用量的增加而下降。

3. 糖化最适温度: 取 pH3.5,浓度为 30% 的淀粉液化液,按每克干淀粉加 100 单位的酶量,分别在 50、55、60、65℃ 水浴中糖化 40 小时,测 DE 值和醇中不溶物,结果见表 4。

表4 不同温度对 DE 值和醇中不溶物的影响

结果 项目	温度(℃)				
		50	55	60	65
DE 值		98.13	98.85	98.92	90.13
醇中不溶物		1.15	0.75	0.84	1.46

表 4 指出,最适糖化温度为 60℃,较适糖化温度为 55℃,在此温度范围内,醇中不溶物含量较少。

4. 糖化最适时间: 取 pH3.5,浓度为 30% 的淀粉液化液,按 100 单位/克干淀粉的量加入糖化酶,60℃ 糖化,分别在 24、28、36、40、44、48 小时取样测定 DE 值和醇中不溶物,结果见表 5。

表5 糖化时间与 DE 值、醇中不溶物的关系

结果 项目	时间(小时)						
		24	28	36	40	44	48
DE 值		98.84	99.11	99.29	99.72	99.71	99.88
醇中不溶物		1.24	1.20	0.89	0.87	0.71	0.64

结果表明,糖化 24 小时,DE 值即可达 98.84,但醇中不溶物含量较高。如糖化 40 小时以上,醇中不溶物含量较少,符合作针用糖的要求。

## 讨 论

通过以上研究认为: 黑曲霉变异株 AS 3.4309 产生的糖化酶,是一种耐酸性的糖化酶,其发酵最低 pH 为 2.8。在曲霉中,特别是黑曲霉所产生的糖化酶中,都含有较多的转移葡萄糖苷酶。这种酶的含量多少,对淀粉糖化后产生的葡萄糖纯度有较大影响,因此一个产糖化酶菌株能否应用于生产,除考虑酶活力产生的水平外,转移葡萄糖苷酶含量的多少是关键因素。AS 3.4309 菌株所产生的糖化酶只含有少量的转移葡萄糖苷酶,它经离子交换树脂和酸性白土处理后可除去大部分。该菌株所产生的糖化酶具有较好的稳定性,经过滤后的酶液在室温下放置,一般情况下经 1—3 个月酶活力损失约 10%。

此外,该酶对热也有较好的耐受能力,在 50℃ 以下基本上是稳定的,因此给酶制剂的研究和生产带来了很大的方便。(下转第 152 页)

(上接第 155 页)

### 参 考 文 献

- [1] 应用微生物展览会编: 酶制剂的生产和测定方法, 中国工业出版社, 1971。
- [2] Pazur, J. H. and T. Ando: *J. Biol. Chem.* **234** (8): 1966, 1959.
- [3] Pazur, J. H. and K. Kleppe: *J. Biol. Chem.* **237** (4): 1002, 1962.
- [4] 大出通资: 发酵协会志 **9**: 17, 1968。
- [5] Linebach, D. R. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.* **134**: 539, 1969.
- [6] Linebach, D. R. et al.: *Carbohydr. Res.* **14** (3): 341, 1970.
- [7] Yamasahi, Y., Y. Suzuhi and Ozawa *Agri. Biol. Chem.* **41**: 2149, 1977.
- [8] 何秉旺等: 微生物学报, **13**(2): 142, 1973。
- [9] 中国科学院微生物所酶结构与功能组: 微生物学报, **17**(2): 101, 1977。
- [10] Horikoshi, K., S. Iide and Y. Ikeda: *J. Bacterial*, **89**: 326—330, 1965.
- [11] Kujawshi, M. and Zajac: *Bulletin DE L'academie des Sciences*, **22** (3): 135, 1974.