

# 黑曲霉变异株 AS 3.4309 产葡萄糖淀粉酶研究

## III. 糖化酶酶制剂的生产

中国科学院微生物研究所糖化酶组

(北 京)

江苏省无锡酶制剂厂

(无 锡)

为了更好的推广和应用黑曲霉变异株 AS3.4309 产葡萄糖淀粉酶,我们从 1977 年底开始进行了酶制剂生产的研究<sup>[1,2]</sup>,现报道如下。

采用将发酵滤液用盐酸水解,以斐林法测定还原糖后换算。

## 结 果

### 材 料 与 方 法

1. 菌株: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 变异株 AS 3.4309。

2. 培养基: Czapek 琼脂培养基。

3. 分析方法: 发酵滤液糖化酶活力的测定采用常规的次亚碘酸盐法。可溶性总糖的测定

### 一、糖化酶的深层发酵生产条件

1. 不同培养基与产酶活力的关系: 在 3 吨(搅拌速度 210 rpm/min) 和 1.2 吨发酵罐 (350 rpm/min) 中,用不同培养基进行试验,结果见表 1。

试验结果表明,无论是在搅拌速度低的 3.0

表 1 不同培养基与产酶活力的关系

发酵罐容积 T	培养基成分* 配 比	测定项目	取 样 时 间(h)											
			24	36	48	60	72	79	84	96	108	110	120	125
3.0	玉米粉:玉米浆: 米糠=6:2:3	酶活力(u/ml)	453	728	1035	1543	1862	1935						
		pH	3.5	3.7	3.3	3.4	3.15	3.3						
		残糖(%)	—	3.75	1.57	1.35	1.08	1.17						
	玉米粉:玉米浆: 米糠=10:2:3	酶活力(u/ml)	594	1237	1579	2450	2480	—	3043	3215	3536	3258		
		pH	4.15	3.95	3.8	3.65	3.62	—	3.45	3.3	3.5	3.5		
		残糖(%)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.43		
1.2	玉米粉:玉米浆: 黄豆饼粉 =10:2:2	酶活力(u/ml)	771	1755	2474	3307	3802	—	4297	4463				
		pH	3.75	3.65	3.6	3.48	3.45	—	3.52	3.55				
		残糖(%)	—	—	—	—	—	—	—	1.18				
	玉米粉:玉米浆: 黄豆饼粉 =15:2:2	酶活力(u/ml)	606	1225	2009	2786	3577	—	3665	4172	4624	—	5388	5206
		pH	3.7	3.7	3.5	3.35	3.4	—	3.5	3.4	3.45	—	3.4	3.7
		残糖(%)	10.65	9.0	8.0	6.15	5.4	—	—	4.08	3.7			

T 罐,还是速度高的 1.2 T 罐,培养液中的酶活力,都随着玉米粉浓度的增加而升高。如在玉米粉:玉米浆:米糠=10:2:3 的培养基中,发

酵 72 小时就比比配为 6:2:3 的培养基产酶活力高 32%。发酵结束时,高浓度培养基比低浓度培养基酶活力高 84%。

表 2 不同搅拌转速对产酶活力的影响

搅拌速度 (rpm)	测定项目	取 样 时 间(h)					
		24	36	48	64	72	84
210	酶活力(u/ml)	551	1016	1229	1715	1764	2306
	pH	3.6	(40h) 3.8	3.48	3.4	3.6	3.4
280	酶活力(u/ml)	778	1180	2340	2760	2856	3398
	pH	3.5	3.4	3.4	3.4	3.1	3.4

2. 搅拌速度与产酶活力的关系: 在培养基不变的条件下, 3 T 罐采用 6:2:3 培养基, 通气量在 24 h 以前为 1:0.5 (V/V), 24 h 后为 1:0.8, 培养温度 32℃。进行了 210rpm 和 280rpm 搅拌速度的对比产酶试验, 结果见表 2。

表 2 说明, 在容积相同的发酵罐中, 搅拌速度高的酶活力单位上升快, 48 h 酶活力单位已

相当于搅拌速度低的发酵结束时的酶活力单位, 最终酶活力单位高 47%。

3. 高浓度培养基、高搅拌速度发酵试验: 根据前述试验结果, 我们确定用 15% 玉米粉, 2% 黄豆饼粉和 2% 玉米浆为培养基, 以容积 1.2 T 发酵罐、搅拌速度 350rpm 的条件, 进行了 3 批发酵试验, 结果见表 3。

表 3 高浓度培养基高搅拌转速发酵试验结果

酶活力 (u/ml)	发酵时 间(h)	24	36	48	60	72	84	96	108	120	124	128
		实验 批次										
1	606	1225	2009	2786	3517	3665	4172	4624	5388			
2	1123	1901	2246	2484	2592	—	3888 (92h)	4330	4752 (116h)	5184 (120h)		5616
3	734	1728	2124	2679	3340	3744	4392	4968	5472	5472		

结果表明, 酶活力可达 5000u/ml 以上。

4. 20 T 发酵罐生产试验: 根据上述试验结果, 我们用原料配比为 6:2:3 的培养基(见表 1), 在 20 T 发酵罐上进行多次试验, 结果见表 4。

表 4 20 T 罐试验结果\*

时 间 (年·月)	总罐数	平均酶活力 (u/ml)
79.3	16	2743
79.4	25	2342
79.5	30	2479

\* 搅拌速度 160rpm。

表 4 说明, 1979 年 3—5 月份试验的平均酶活力为 2571u/ml。

## 二、糖化酶制剂的制备

AS 3.4309 菌产生的糖化酶具有酶活力高、热稳定性好、耐强酸性条件的特点。因此我们

采用了浓缩的方法来制备酶制剂。这个方法具有流程短、回收率高等优点。具体方法如下:

发酵液  $\xrightarrow{\text{压滤}}$  滤液  $\xrightarrow{\text{酸性白土或离子交换树脂处理}}$  处理液  $\xrightarrow{\text{过滤}}$  滤液  $\xrightarrow{\text{浓缩}}$  液体酶制剂。

酸性白土处理过程是用稀盐酸将酶液的 pH 调至 3.0, 加入 2% (按 W/V 比) 酸性白土, 搅拌 1—2h, 让其自然澄清或离心得酶液供浓缩用。结果见表 5。

表 5 用酸性白土处理酶液的结果

结 果 项 目 批 次	处理前酶活 力(u/ml)	处理后酶活 力(u/ml)	回收率 (%)
1	3969	3871	97.5
2	4320	4320	100
3	3801	3600	94.7
平 均			97

同时, 试验了在不同真空度条件下浓缩酶液对酶活力回收率的影响。具体做法是: 在三口烧瓶中, 加入酶液(水浴加热)在不同真空度条件下浓缩酶液(约 1h), 计算回收率, 结果见表 6。

表 6 说明, 随着真空度的提高, 品温下降而酶活力的回收率逐步提高。真空度在 700mm Hg 以上时, 酶活力的回收率可达 90% 以上。

采用 SP 13-E6-10 型真空浓缩锅进行放大试验, 结果见表 7。

表 6 不同真空度浓缩酶液对酶活力回收的影响

结 果 真空度 (mmHg)	项 目 品温 (°C)	浓缩前酶活 力 (u/ml)	浓缩后酶活 力 (u/ml)	回收率 (%)
680	52	4277	12564	86
690	50	4225	17942	89.2
700	46	5136	39760	96.9
700—720	44	7000	30520	99.5

表 7 生产规模的浓缩试验结果

结 果 批次	项 目 进料体积 (L)	酶活力 (u/ml)	真空度 (mmHg)	品 温 (°C)	蒸汽压 (kg)	浓缩时间 (h)	出料体积 (L)	酶活力 (u/ml)	回收率 (%)
1	513	2900	720	40	0.8	115	145	8943	90
2	584	2500	730	38	1.0	1.0	150	9428	97
3	1360	3969	710—730	40	0.5	3.5	274	17517	93.2
4	1260	2633	720	40	1.0	4—5	230	14000	92.8
5	900	2330	720	40	1.0	4—5	270	8352	95.1
6	2120	2500	720	40	1.0	4—5	400	11700	88.3
7	860	3456	720	40	1.0	4—5	240	11520	93
平 均									92.4

表 7 说明, 它与实验室的研究结果是一致的。此外也可以用硫酸铵盐析的方法生产。硫酸铵用量为 55%(W/V)。盐析后静置 12 小时以上。过滤后取固形物, 45°C 以下烘干、粉碎, 总回收率可达 73% 左右。

## 讨 论

通过生产证明, 采用浓缩法生产酶制剂是可行的。它具有工艺流程短、产品质量好、收率

高(总收率为 80% 左右), 生产成本低等优点。它的正式投产, 为我国酶制剂工业提供了一个廉价、大量应用的产品。

## 参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所糖化酶组: 微生物学通报, 6(5): 19, 1979。
- [2] 中国科学院微生物研究所糖化酶组: 同上, 7(4): 153, 1980。