

# 黑曲霉变异株 UV-11-48 的选育及产糖化酶条件的研究

孔显良 陈必成 王俊英 唐国敏 蒋仕彦 扈芝香 方一澄 李淑媛

(中国科学院微生物研究所, 北京)

**摘要** 以黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 变异株 UV-11 为出发菌株, 经亚硝基胍多次诱变, 获得一株比亲株产糖化酶活力提高 30% 左右的变异株 UV-11-48。对 UV-11-48 菌株进行了发酵条件及酶系组成等的研究。固体曲生产性试验, 种曲糖化酶活力最高达 12240u/g, 麸曲酶活力平均 8000—9000u/g, 最高达 11700u/g, 在酿酒工业固体曲生产中, 取得明显经济效益。

**关键词** 黑曲霉; 选育; 糖化酶

选育具有多种优良性状的高产菌株, 对促进糖化酶工业生产的发展, 降低成本、节约粮食、能源和提高设备利用率, 都具有重要的经济意义。几年来, 我们对黑曲霉变异株 UV-11 进行了系统研究<sup>[1-4]</sup>, 并在全国推广应用。为进一步提高酶活力, 以 UV-11 为出发菌株进行诱变, 选育出一株 UV-11-48 高产菌株。本文报道有关此菌株的选育和产酶条件的研究。

## 材料和方法

1. 菌株: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 变异株 UV-11。

2. 培养基: 查氏 (Czapek) 斜面琼脂培养基。

3. 摇瓶筛选培养基 (%): 玉米粉 6, 玉米浆 2, 豆饼粉 2。250ml 摇瓶装量 50ml。30℃ 下摇床振荡 (220r/min) 培养 72 小时。

4. 发酵条件培养基 (%): 玉米粉 5, 玉米浆 2, 豆饼粉 2, 麸皮 3, 自然 pH。250ml 三角瓶装量 50ml。接种后置旋转摇床振荡培养 (220r/min, 30℃) 72 小时。

5. 诱变剂: 亚硝基胍为我所根据 McKay 和 Wright 的方法合成, 熔点为 118℃, 黄色结晶。

6. 分析方法: 糖化酶活力测定用次亚碘酸法<sup>[5]</sup>。1ml 酶液在 40℃、pH4.6 的条件下, 1 小时分解可溶性淀粉产生 1mg 葡萄糖的酶量为 1

个酶活力单位。 $\alpha$ -淀粉酶活力测定用碘色反应法<sup>[6]</sup>。1ml 酶液于 60℃、pH6.0 的条件下, 1 小时液化 1g 可溶性淀粉为一个酶活力单位。

## 结 果

### 一、菌株选育

以 UV-11 为出发菌株, 取 30℃ 培养 7 天的查氏斜面培养物, 加生理盐水制成浓度为  $10^6$ /ml 左右的孢子悬液。

称取一定量亚硝基胍, 加入少量甲酰胺溶解后, 用 0.05M、pH6.0 的 Tris 缓冲液配制成一定浓度溶液。取上述孢子悬液与亚硝基胍溶液混合, 使浓度为 300—500 $\mu$ g/ml, 于 30℃ 振荡处理 30 分钟, 用离心法终止反应。孢子经洗涤后涂平板。

经多次反复诱变处理, 筛选出两株比原菌株具有较高活力的菌株, 稳定性较好, 对其中一株 UV-11-48 进行了产酶条件的试验。

### 二、形态和生化特性

在查氏平板上, 除菌落显示出比原菌株有更多的皱褶外, 其他特征基本相同。

生理生化特征: 与出发菌株相比, 具有以下特性: 1. 前期生长较迅速, 产酶快; 2. 酸度低, pH 稳定; 3. 除糖化酶增加外,  $\alpha$ -淀粉酶也有一定的增加。

### 三、摇瓶发酵条件试验

为适应酒精工业的应用, 在发酵条件中, 采

表1 不同培养基组成对产酶活力的影响

| 编号 | 培养基组成(%) |     |     |    |    | 酶活(u/ml) |      |       |      | 提高(%) |      |
|----|----------|-----|-----|----|----|----------|------|-------|------|-------|------|
|    | 玉米粉      | 豆饼粉 | 玉米浆 | 米糠 | 麦麸 | UV-11-48 |      | UV-11 |      | 2.5天  | 3天   |
|    |          |     |     |    |    | 2.5天     | 3天   | 2.5天  | 3天   |       |      |
| 1  | 6        | 2   | 2   |    |    | 2362     | 2394 | 1728  | 2131 | 36.7  | 12.3 |
| 2  | 6        | 2   | 2   | 2  |    | 2534     | 3312 | 2131  | 2616 | 18.9  | 26.6 |
| 3  | 6        | 2   | 2   |    | 2  | 2217     | 3456 | 1699  | 2656 | 30.5  | 31.1 |
| 4  | 5        | 2   | 2   | 3  |    | 2764     | 3384 | 1843  | 2477 | 49.9  | 36.6 |
| 5  | 5        | 2   | 2   |    | 3  | 2938     | 3686 | 2131  | 2757 | 37.9  | 33.7 |

用较稀配方进行试验,除各组试验的不同要求外,一般均采用与筛选方法一致的配方。

### 1. 不同培养基组成对产酶活力的影响

在筛选用的配方中三种原料以外,增加米糠或麦麸对产酶有利。采用表1中5种原料配方,发酵时间为2.5天,结果表明,1、4、5号培养基分别提高酶活力36.7%、49.9和37.9%。

### 2. 玉米浆对产酶活力的影响

培养基中添加玉米浆与不添加者,UV-11-48菌株比UV-11分别提高27.6%和16.7%。且菌株在两种培养基中比较,添加玉米浆者活力较高(表2)。

表2 玉米浆对产酶活力的影响

| 培养基组成(%) |     |     |    |  | 酶活(u/ml) |       | 提高(%) |
|----------|-----|-----|----|--|----------|-------|-------|
| 玉米粉      | 豆饼粉 | 玉米浆 | 麦麸 |  | UV-11-48 | UV-11 |       |
| 5        | 2   | 2   | 3  |  | 3283     | 2573  | 27.6  |
| 5        | 2   | 0   | 3  |  | 2438     | 2073  | 17.7  |

### 3. 培养时间与产酶活力的关系

培养基采用玉米粉5%,豆饼粉2%,玉米浆2%,麸皮3%,从培养48小时开始分期测定酶活、pH、残糖,结果表明,培养72小时前要比72小时后提高的幅度大。UV-11-48和UV-11的pH分别稳定在4.0和3.0(表3)。

### 4. 通气量与产酶活力的关系

采用250ml三角瓶以不同装量进行通气量试验,装液量分别为25、50、75、100ml。结果表明,两株菌均以25ml装液量酶活力最高,随着装液量增加酶活力减低(表4)。

### 5. 通气量和培养时间与产酶活力的关系

表3 培养时间与产酶活力的关系

| 培养时间(h) | UV-11-48 |       |     | UV-11    |       |     | 酶活提高(%) |
|---------|----------|-------|-----|----------|-------|-----|---------|
|         | 酶活(u/ml) | 残糖(%) | pH  | 酶活(u/ml) | 残糖(%) | pH  |         |
| 48      | 1541     | 4.49  | 4.0 | 1245.5   | 3.59  | 3.0 | 23.8    |
| 60      | 2025.5   | 2.89  | 4.0 | 1619.5   | 2.45  | 3.0 | 19.2    |
| 72      | 2500.5   | 1.37  | 4.0 | 2040     | 1.17  | 3.0 | 22.5    |
| 84      | 2779     | 0.77  | 4.0 | 2510.5   | 0.77  | 3.0 | 10.7    |
| 96      | 2894     | 0.84  | 4.0 | 2593     | 0.87  | 3.0 | 11.6    |

表4 通气量与产酶活力的关系

| 装液量(ml) | 酶活力(u/ml) |        | 酶活提高(%) |
|---------|-----------|--------|---------|
|         | UV-11-48  | UV-11  |         |
| 25      | 3134.5    | 2668.5 | 19.4    |
| 50      | 3005      | 2419   | 24.2    |
| 75      | 2582.5    | 2027   | 27.4    |
| 100     | 1958.5    | 1838.5 | 6.5     |

通气量以培养基装液量表示,以装量25、50、75ml三组进行试验,48、72、96小时取样测定。试验结果表明,培养48小时,装量为25、50ml处理组,菌株UV-11-48比UV-11分别提高27%和26.4%,而75ml装量组仅提高13.5%,但培养72、96小时测定,装液量少的反比装量多的提高少(表5),这说明菌株UV-11-48在通气量大的情况下,早期产酶更快。

### 6. 转速对菌株UV-11-48产酶活力的影响

摇床转速分别为280r/min和220r/min。试验表明转速快慢对UV-11-48菌株产酶影响不大。而原株UV-11在转速快时明显优于慢者(表6)这说明变异株UV-11-48可以更适合于酒精行业采用的非搅拌形式的发酵罐,可以

表5 通气量和培养时间与产酶活力的关系

| 时 间 (h)      |          | 48   |      |      | 72   |      |      | 96   |      |      |
|--------------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 装液量 (ml)     |          | 25   | 50   | 75   | 25   | 50   | 75   | 25   | 50   | 75   |
| 酶活<br>(u/ml) | UV-11-48 | 2031 | 1556 | 1447 | 2923 | 3197 | 2909 | 3298 | 3687 | 3398 |
|              | UV-11    | 1599 | 1231 | 1275 | 2621 | 2679 | 2419 | 3118 | 3053 | 2937 |
| 提高(%)        |          | 27.0 | 26.4 | 13.5 | 11.5 | 19.3 | 20.3 | 5.8  | 20.7 | 15.7 |

节省电源。

表6 转速对产酶活力的影响

| 转 速<br>(r/min) | 酶 活 (u/ml) |      |       |      |
|----------------|------------|------|-------|------|
|                | UV-11-48   |      | UV-11 |      |
|                | 3 天        | 4 天  | 3 天   | 4 天  |
| 220            | 3341       | 3686 | 2006  | 3125 |
| 280            | 3182       | 3643 | 2721  | 3342 |

### 7. 比活力的比较

对 UV-11-48 及其亲株进行了蛋白量与酶活力的测定比较。UV-11-48 菌株的比活为 317.3u/mg, 而 UV-11 为 246.1u/mg, 证明前者的比活较后者高 71.2u/mg。

### 8. 表面活性剂对产酶活力的影响

表面活性剂可加大细胞膜的通透性, 采用 5 种常用的表面活性剂, 添加量均为 0.2%。试验结果表明, Tween 等表面活性剂对变异株 UV-11-48 产酶活力有一定促进作用(表 7), 而十二烷基硫酸钠有一定抑制作用。

表7 表面活性剂对产酶活力的影响

| 表面活性剂      | UV-11-48 (u/ml) | UV-11 (u/ml) |
|------------|-----------------|--------------|
| 对照         | 3053            | 2621         |
| Tween-20   | 3235            | 2347         |
| Tween-60   | 3475            | 2441         |
| Tween-80   | 3149            | 2447         |
| Triton 100 | 3264            | 2352         |
| 十二烷基硫酸钠    | 1756            | 1670         |

### 四、酶系的组成

1.  $\alpha$ -淀粉酶活力: 取 72 小时培养的酶液, UV-11-48 的酶活力为 9.6 u/ml, UV-11 菌株为 3.7 u/ml (均为两次平均值)。

凝胶电泳分析及扫描结果表明(图 1), 除

一条明显的糖化酶主带外, UV-11-48 还出现一条比原株较清楚的次带, 即  $\alpha$ -淀粉酶。

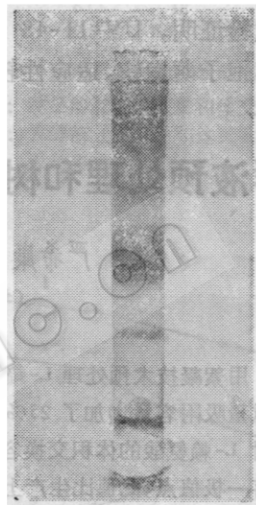


图1 UV-11-48 凝胶电泳图谱

2. 转移葡萄糖苷酶: 纸层析分析表明, 根据异麦芽糖斑点的大小情况看, 变异株和亲株无明显差异。

3. 2% 酸性白土处理后酶的存活率: 经处理后的酶存活率为 91.2% (三次平均数), 证明酶系较纯。

### 五、固体曲试验

在山东索镇、江苏海安、湖北石化等酒厂进行固体曲试验, 种曲糖化酶活力最高达 12240 u/g, 麸曲糖化酶活力平均 8000—9000u/g, 最高达 11700u/g。

## 讨 论

糖化酶是工业上重要的酶类之一, 自从我所研制出黑曲霉变异株 UV-11 后, 很快在有关行业普遍推广使用, 取得了显著的经济效益。

商品酶制剂从 1979 年的几百吨, 1985 年激增至 2 万吨左右, 成为我国目前产量最大的酶品种。

从 UV-11 菌株再进行诱变选育的 UV-11-48 菌株, 不仅提高了酶活力, 且前期产酶提高幅度大, 可以缩短发酵周期。近年来糖化酶制剂主要应用于酿酒工业, UV-11-48 菌株在发酵过程中, pH 稳定在 4.0 左右, 中期不下降, 后期不上升。酸度也稳定在 6.5 左右, 有利于原料糖化。

固体曲试验证明, UV-11-48 较亲株提高 30% 以上, 其孢子萌发快, 适应性较强, 抗污染

能力强, 容易培养, 产酶速度快, 在固体曲生产上已普遍推广应用, 均取得明显经济效益。

### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物所糖化酶组: 微生物学通报, 6(5): 19—22, 1979。
- [2] 中国科学院微生物所糖化酶组: 微生物学通报, 7(4): 153—155, 1980。
- [3] 中国科学院微生物所糖化酶组等: 微生物学通报, 9(3): 114—116, 1982。
- [4] 中国科学院微生物所糖化酶组等: 食品与发酵工业, 1981, 2: 63—67。
- [5] 轻工业部部颁标准: 工业用液化型糖化型淀粉酶质量测定标准 (试行), QB 746-747-80, 1981。