

# 酶法一步生产葡萄糖酸- $\delta$ -内酯的研究

殷蔚申 吴小荣 魏云路

(郑州粮食学院, 郑州)

**摘要** 从全国各地采集到的 400 多份土壤和谷物样品中分离到 501 株黑曲霉菌株, 经筛选后得一株葡萄糖氧化酶活力较高的黑曲霉 Y19 菌株, 以该菌株为出发菌株, 经 UV、 $\gamma$ -射线及硫酸二乙酯(DES)等诱变筛选后, 获得一株酶活较出发菌株高 15 倍多的黑曲霉 UCD 69 菌株。

通过正交试验确定了几个影响菌体生长和产葡萄糖氧化酶的主要因素水平, 并选出了该菌的最适培养条件。用上述条件培养出的菌丝来直接发酵葡萄糖生产葡萄糖酸- $\delta$ -内酯。产品收率可达所用葡萄糖重量的 50%。

**关键词** 葡萄糖氧化酶; 葡萄糖酸- $\delta$ -内酯; 黑曲霉

葡萄糖酸- $\delta$ -内酯是一种安全食品添加剂。在食品工业中可作为蛋白质凝固剂、膨松剂、抑菌剂和酸味剂。近年来在建筑、医药、化妆品、纺织业、塑料等方面也有广泛应用<sup>[1,2]</sup>。

葡萄糖酸- $\delta$ -内酯(GDL)是  $\beta$ -D-葡萄糖在葡萄糖氧化酶(GOD)作用下脱氢的产物。产品为白色粉末状结晶, 味先甜后变酸, 极易溶于水。在水溶液中 GDL 会部分地缓慢水解成葡萄糖酸及其  $\delta$ -和  $\gamma$ -内酯三者平衡的混合物。它在食品工业中的应用主要是基于这种水解缓慢产酸的性质。

目前国内外生产 GDL 的方法都是先生产葡萄糖酸钙或钾, 再经酸化脱钙、离子交换、浓缩结晶、分离洗涤及干燥而得。80 年代初, 日本有专利报道<sup>[2]</sup>, 用菌丝体内 GOD 可直接发酵葡萄糖生产 GDL。这种方法具有生产、分离工艺简便, 产物含杂少, 收率高等优点。但关键是发酵过程中始终要保持发酵液 pH 值在 3.0 以下。

本试验研究目的即为选育一株 GOD 酶活

本院蔡静平、周展明分别参加了菌种筛选及产品鉴定的部分工作, 菌种鉴定工作由殷蔚申完成。

高且耐低 pH 环境的黑曲霉菌株,找出其最适培养条件并进行直接发酵生产 GDL。

## 材料与方 法

### (一) 材料及仪器

1. 从广州、南宁、长沙、武汉、郑州等地采集的 400 多份土壤、粮食样品。

2. 培养基 I: 察氏琼脂培养基。

培养基 II (g/L): 葡萄糖 50, 蛋白胨 3,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.4,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1。

培养基 III: 培养基 II 中加琼脂 20g、 $\text{CaCO}_3$  25g, 以水补足至 1L。

3. 0.06M pH5.6 磷酸盐缓冲液。

0.1M pH7.0 磷酸盐缓冲液。

0.1N 氢氧化钠、0.1N 盐酸溶液及酚酞指示剂。

4. 旋转蒸发器;显微熔点测定仪;983 G 红外光谱仪(日本 Waters 公司);MBF-III-10 型多参数玻璃发酵罐(华东化工学院)。

### (二) 试验方法

#### 1. 菌种筛选

①用稀释分离法,从采集的 400 多份样品中用培养基 I 分离黑曲霉菌株。

②初筛:将分离到的黑曲霉菌株接种到用培养基 III 倒的平板上,于 30℃ 培养 3 天。因为具葡萄糖氧化酶的菌体会在生长中将培养基中的葡萄糖转化为酸并扩散到培养基中,与其中的  $\text{CaCO}_3$  作用,产生透明圈。选出其中透明圈大的菌株供复筛。

③复筛:用 250ml 三角瓶装 50ml 培养基 II,灭菌后接入初筛过的黑曲霉菌种,于箱式摇瓶机上摇瓶培养 30 小时(30℃)。然后用酸碱滴定法测定每瓶中的产酸量。每菌株接种三瓶。最后选出一株产酸最多的菌株供进一步诱变。

④ GOD 活力测定方法:采用酸碱滴定法测各菌株的酶活<sup>[1]</sup>。以一定量的菌丝代替酶液作 GOD 的酶源。

#### 2. 诱变方法

①紫外线处理:取 10ml 孢子悬液置于直径 90mm 的培养皿中,用紫外线照射 10—40 分钟,照射距离为 200mm。处理后的孢子悬液经稀释分离进行筛选。

② $\gamma$ -射线诱变:用 30℃ 培养三天的菌种斜面进行  $\gamma$ -射线辐射,辐射剂量为 6 万和 12 万伦琴。将处理后的斜面制成孢子悬液后进行分离筛选。

③硫酸二乙酯处理:从培养三天的菌种斜面上用 0.1M pH 7.0 的磷酸盐缓冲液将其孢子洗下,制成孢子浓度约为  $10^6$  个/ml 的孢子悬液。取 20ml 这种孢子悬液加 0.2ml DES,充分振荡 40 分钟后用 0.5ml 25% 的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  中止反应。

#### 3. 菌株 UCD 69 最适培养条件的选择

UCD 69 菌株的最适培养条件是通过正交试验确定的<sup>[4]</sup>。首先凭经验,用  $L_{27}(3^3)$  正交表安排了碳、氮源种类及其用量;  $\text{Ca}^{++}$  浓度;硫酸镁用量、接种量等因素的一组试验,接着又用  $L_9(3^1)$  正交表安排了通气量(以每三角瓶中装培养液的体积表示)、种龄、碳氮比及接种量四因素的一组试验。在前两组试验的基础上,经方差分析试验数据,将几个对指标值(菌体酶活及重量)影响显著的因素进一步再用正交表  $L_{27}(3^3)$  安排一组试验,从而确定各显著因子的最佳水平,即得其最佳培养基。而后再确定其合适的培养时间即可得出最佳培养条件。

### (三) 产葡萄糖酸- $\delta$ -内酯试验方法

1. 菌丝培养:按上面得出的最佳培养条件在旋转摇床上将菌丝培养好,滤出洗净后备发酵用。

2. 发酵生产试验:在发酵罐中装入 8 升 5% 的葡萄糖溶液,按发酵液重的 5% 接入菌丝进行发酵试验(发酵液比重视作 1g/ml)。发酵条件为:搅拌速度,200r/min;温度,30℃;通气量,0.83V/V/m;罐压,0.5kg/cm<sup>2</sup>。发酵过程中用直接滴定法<sup>[5]</sup>监测发酵液中还原糖含量,至 95% 以上的还原糖转化后即终止发酵过程。滤去菌丝后用旋转蒸发器将发酵液浓缩、冷却结晶后,用无水酒精将结晶洗涤几次并

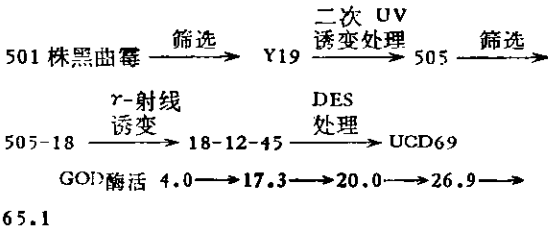
干燥即得白色粉状结晶产品。

3. 产品鉴定：用感官检验、熔点测定及产品的红外光谱图相结合对产品进行鉴定。

## 结果与讨论

### (一) UCD 69 菌株的选育程序

从采集的 400 多份样品中分离到黑曲霉菌株 501 株，经反复筛选及诱变选育等一系列过程后，得到一株 GOD 酶活高的 UCD 69 菌株。选育过程如下：



### (二) UCD 69 菌株最佳培养条件

培养基 (g/l)：蔗糖 100，蛋白胨 1， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1， $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.4，加水至 1 升。

通气量：每 500ml 三角瓶中装 100ml 培养基。

接种量：每三角瓶中接  $2-3 \times 10^6$  个孢子。

培养温度：30℃，培养时间：32 小时左右。

在该条件下培养的菌丝生长快、GOD 酶活高且菌丝量也较多。下表 1 为培养 30 小时的 UCD 69 菌丝对照表。

表 1 两种培养基上 UCD 69 菌丝酶活等比较

|         | 菌体酶活<br>(u/g) | 菌丝量<br>(g/瓶) | 菌体颜色 |
|---------|---------------|--------------|------|
| 培养基 II  | 20.8          | 1.25         | 黄    |
| 最佳培养条件下 | 53.1          | 2.28         | 淡黄   |

由表中可见，最佳培养条件下培养的菌丝较原培养基要好。

关于培养基中的  $\text{Ca}^{++}$  浓度对菌丝产 GOD 酶及酶活力的促进作用早有记载<sup>[2]</sup>。但本试验

中，不论  $\text{Ca}^{++}$  浓度多大，对 UCD 69 菌株菌丝的生长和产 GOD 酶均有不利影响。

培养基中  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  的量一般要求控制在较低的浓度<sup>[7]</sup>。本试验结果表明，仅用少量的  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  即可，而  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  不论用量多少，都有不利作用。

### (三) 菌体 GOD 酶活与培养时间的关系

由于摇瓶培养的菌丝是用来发酵葡萄糖生产 GDL 的，因此要求培养出的菌丝具有高的酶活力而不仅仅是较多的菌丝量。经测定在最佳培养条件下培养 24—42 小时的菌体的 GOD 酶活力后，得到菌体 GOD 酶活和培养时间的关系曲线 (图 1)。

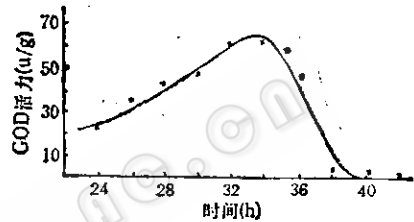


图 1 菌体 GOD 酶活-培养时间曲线

从图 1 中可看出，培养 32—34 小时的菌体可用于发酵，此时菌丝内 GOD 活力最高。这点与有关专利的报道有所不同<sup>[2,7]</sup>。

### (四) 发酵结果及产物鉴定

1. 从图 2 中可以看出，发酵初，发酵液的 pH 值下降很快，2 小时内便降至 pH 3.0 以下，此时还原糖的转化率仅为 40% 左右；而 30 小时后则 95% 以上的还原糖被转化，即发酵液中大部分的还原糖是在 pH 3.0 以下的环境中转化的，这说明 UCD 69 菌的 GOD 具有较强的耐低 pH 环境能力。

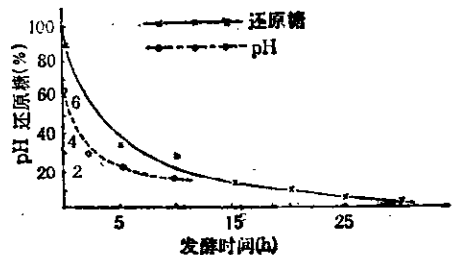


图 2 发酵过程中 pH 值、还原糖变化曲线

同时由于本试验的发酵液中仅含有葡萄糖而无其他营养物,因此菌丝在发酵过程中不会再生长,也就没有什么代谢废物排泄到发酵液中,所以发酵液含杂少,产物的提取大为方便,产品的纯度高,而且产物收率也高。据报道,用化学法从葡萄糖酸钙生产葡萄糖酸- $\delta$ -内酯,从葡萄糖酸中结晶出 GDL 时,两次结晶收率为 53—57%<sup>[6]</sup>。而本试验中直接从发酵液一次结晶, GDL 收率就可达发酵初葡萄糖用量的 50%,相比之下产物收率还是较高的。

## 2. 本试验产品的外观、口感均与进口产品

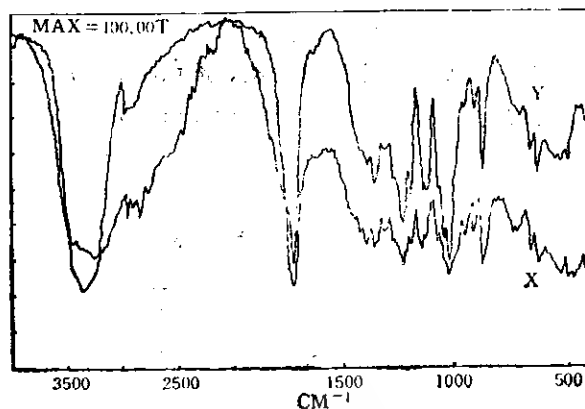


图 3 本试验产品(Y)与进口产品(X)的红外光谱图

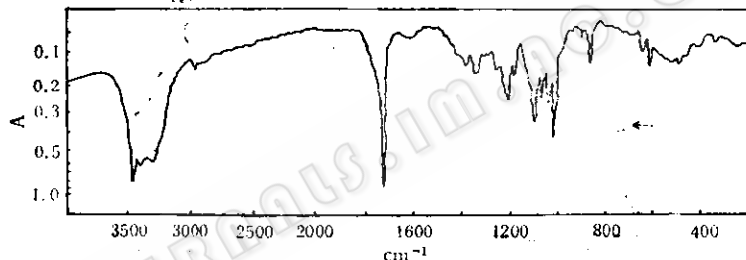


图 4 葡萄糖酸- $\delta$ -内酯标准红外光谱图

相同;其熔点为 152—153°C (分解点),也和文献报道值一致。从其红外光谱图(图 3)也可看出,与 GDL 的标准红外光谱图(图 4)极为吻合。与进口产品的红外光谱图比较,说明本试验产品纯度更高。

3. 由于本试验是直接用菌丝发酵葡萄糖来生产 GDL,不象一般方法要先生产葡萄糖酸钙或其它盐,因而具有发酵生产工艺简单、产物提取方便等明显的优点。这从图 5 中更可一目了然。

## 参 考 文 献

- [1] 编户条二等: 公开特许公报, 昭 55-40606, 1980。
- [2] 中井卫等: 公开特许公报, 昭 57-08793, 1982
- [3] 张树政主编: 酶制剂工业, p671-692, 科学出版社, 1984 年。
- [4] 北京大学数学力学系概率统计组: 正交设计法, 石油化学工业出版社, 1976 年。
- [5] 中山大学生物系生化微生物学教研室: 生化技术导论, p24-25, 人民教育出版社, 1978 年。
- [6] 初立家: 大连化工, 4: 4—9, 1983。
- [7] Herbert J. Hatcher, US Patent, 3669,840.