

生淀粉降解酶菌株的选育和酒精发酵试验

陈佩华 李朝季

(杭州大学生物系) (杭州酒厂)

摘要 从样品中分离到 128 株菌,从中选育到一株分解甘薯生淀粉能力强的 45 号黑曲霉菌株。以此菌株为出发菌株经过紫外线、氯化锂多次复合处理,得到 154 号突变株,其降解甘薯生淀粉酶活力为 219.4u/g,比出发菌株提高 49.7%。用于甘薯生淀粉糖化、酒精发酵,出酒率为 36.3%,接近传统工艺。

关键词 生淀粉降解酶;选育;酒精发酵

在淀粉质原料的传统酒精发酵中,原料的蒸煮占酒精生产总能耗的 40% 左右。为了节能、节水、简化工艺和缩短生产周期,生淀粉糖化和酒精发酵的研究已成为酒精生产中的重要课题^[1-2]。研究的焦点是选育生淀粉降解酶活性强的菌株,本文报道这方面的部分研究工作。

材料和方法

(一) 样品来源

从杭州酒厂曲池中的麸曲 (AS 3.4309)、曲房空气、霉烂甘薯片、拌料池边生甘薯醪、废醪池边的废醪共采集 17 份样品。

(二) 抗 α -淀粉酶淀粉 (简称 α -RS) 的制备^[3]

小麦淀粉来源于杭州粮站。 α -淀粉酶粗制品是无锡酶制剂厂产品。

(三) 培养基

1. 筛选培养基 (%): α -RS 0.5, NH_4NO_3 0.1, K_2HPO_4 0.14, CaCl_2 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, 酵母膏 0.01, 琼脂 2.0, pH5.0, $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 灭菌 20 分钟,冷却后补加氯霉素 0.005。

2. 产酶麸曲培养基: 麸曲:水 = 1:1.2, $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 灭菌 30 分钟。

(四) 降解生淀粉酶菌株的分离和筛选

将采集的样品用无菌水制成菌悬液,按常规的稀释分离法分离,30℃ 培养 3 天后,以菌落周围出现的透明圈大小作为产酶菌株的初筛指标,以生淀粉糖化酶活力高低作为复筛指

标。

(五) 生淀粉酶活力的测定方法

取相当于绝干麸曲 10g,加 70 毫升 40℃ 蒸馏水 20 毫升, pH3.5, 0.5mol/L 柠檬酸缓冲液,于 40℃ 水浴中缓慢搅拌保温 1 小时后过滤得酶液。酶活力测定见文献^[2]。

酶活力单位定义为 1 克麸曲、1 小时降解生淀粉释放 1 毫克葡萄糖的酶量。

结果与讨论

(一) 菌株的分离和自然选育

1. 分离: 根据 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶共存对生淀粉的降解有协同作用的原理^[4],使用了抗 α -淀粉酶淀粉 (α -RS) 为专一性底物的筛选培养基,绝大多数细菌、放线菌和不能利用 α -RS 底物的真菌首先被淘汰,从而大大地减少了菌株筛选的工作量,只有那些能分解 α -RS 底物的真菌才能长成菌落。共分离到 128 株菌,其中曲霉属 88 株,根霉属 28 株,毛霉属 8 株,细菌、放线菌各 2 株。

2. 筛选: 根据 Veda 等人报告^[5]黑曲霉有较强的糖化生淀粉的能力,我们从 128 株菌中选育 7 株透明圈较大的黑曲霉菌株作为复筛菌株,接入产酶麸曲培养基中,30℃ 培养 42 小时即为麸曲,制成酶液分别测定其生淀粉酶活力。由表 1 可见,用 α -RS 作为筛选生淀粉降解酶菌株的专一性底物,以透明圈大小作为初筛指标基本上是可行的。经过多次复筛,其中 45 号

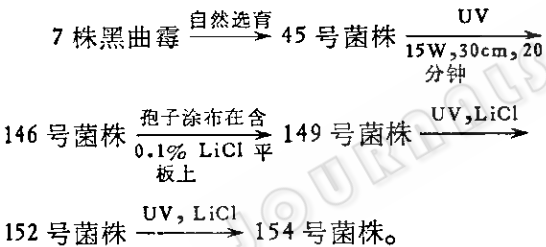
表 1 7株黑曲霉菌株产酶情况

菌株编号	透明圈直径 (cm)	三次复测酶活力 (u/g)			平均酶活力 (u/g)
3	2.5	146.2	141.2	137.0	141.6
5	2.4	144.1	143.7	140.6	142.8
45	2.4	146.6	148.3	144.9	146.6
53	2.2	142.3	140.4	137.7	140.1
64	2.1	142.4	140.7	138.2	140.4
87	2.0	128.2	126.7	129.1	128.0
121	2.0	132.3	133.4	135.0	133.6

菌株降解生淀粉的能力最强，而且产酶也较稳定。

(二) 154 号突变株的选育程序

为了进一步提高酶活力，以 45 号菌株作为出发菌株，按微生物诱变育种的常规方法^[6]，经过紫外线、氯化锂多次复合诱变处理，选育到一株生淀粉降解酶活力更强的 154 号菌株，其酶活力平均为 219.4u/g，比 45 号出发菌株提高 49.7%。选育程序如下：



(三) 154 号突变株的形态特征

将 154 号突变株与出发菌株 45 号分别接入察氏培养基平板上，30℃ 培养 5 天后进行对比观察，其结果见表 2。154 号突变株产生的孢子数量少，在生产中不利于扩大培养。我们在

察氏培养基中加入 20% 麸皮煮沸液取代蒸馏水，孢子产生的数量明显增多。

(四) 生淀粉的降解动态曲线

在 3 只 500ml 三角瓶中，分别加入玉米淀粉、甘薯淀粉、大米淀粉各 5 克，水 70ml、pH 3.5、0.5mol/L 柠檬酸缓冲液 50ml 和 0.5ml 甲苯混合均匀后，置于 40℃ 水浴中，待温度平衡后，各加酶液 25ml，40℃ 搅拌水解 24 小时，定时取样测定其糖化率，结果见图 1。由图 1 可知，154 号菌株的酶液降解生淀粉活力大小的顺序是玉米淀粉、大米淀粉、甘薯淀粉，这与前人的报告是一致的。

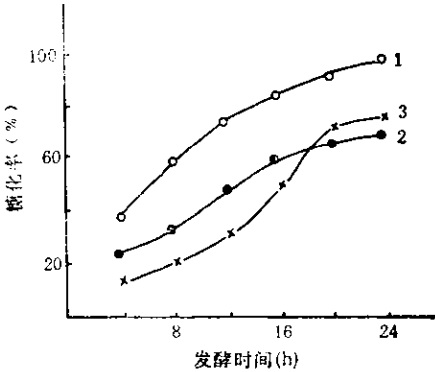


图 1 生淀粉的降解动态曲线
1. 玉米淀粉 2. 甘薯淀粉 3. 大米淀粉

(五) 甘薯生淀粉的酒精发酵试验

在 1000ml 三角瓶中，加 200 克甘薯粉，用 0.02% 焦硫酸 ($K_2S_2O_8$) 溶液拌料，加酶量 100 u/g 甘薯粉。原料与水之比为 1:3.5，接种 K 氏酵母 (1×10^8 /ml) 量为醪体积的 10%，混匀后于 $30 \pm 1^\circ C$ 进行酒精发酵试验。由表 3 结果

表 2 154 号突变株与出发菌株的形态比较

菌株	154 号菌株	45 号菌株
项目		
菌落直径 (cm)	0.7—1.0	0.8—1.5
菌落形态	中央隆起，有不规则皱褶正面为深咖啡色，背面由黄转为棕红色	中央隆起，有放射状皱褶，正面为咖啡色，背面为浅棕色
孢子生长情况	孢子形成需 5—6 天，数量少，每个小梗上着生 2—3 个孢子	孢子数量多，每个小梗上着生 3—7 个孢子，3—4 天孢子形成

表 3 甘薯生淀粉的酒精发酵试验

	发酵时间 (h)					
	48	72	96	120	144	168
酵母细胞生长情况	健壮, 出芽率达 25%, 死亡率 1.3%	正常, 出芽率为 12%, 死亡率为 8%	出芽率为 5%, 死亡率为 15%	出芽率为 0 死亡率为 28%	死亡率上升为 50%左右	死亡率高达 80%
活酵母细胞数 (1×10^6 个/ml)	0.62	0.98	0.8	0.78	0.40	0.15
醪液中酒度 (%, V/V, 20℃)	4.2	7.6	8.8	9.5	10.1	10.6
95% 酒精量 (g/100 g 原料)	14.4	26.0	30.1	32.5	34.6	36.3
总糖(%)	—	7.2	5.4	3.8	2.9	1.2

注: 酒度、总糖测定见文献^[1]

可知, 154 号突变株糖化甘薯生淀粉的能力较强, 发酵结束后总糖为 1.2%, 原料出酒率为 36.3%, 比出发菌株提高 23.5%, 达到了传统发酵水平。但由于对甘薯生淀粉的糖化速度较慢, 限制了酵母菌的繁殖速度和发酵速度, 使发酵周期延长至 7 天, 这是一个急需解决的问题。

(六) 缩短甘薯生淀粉酒精发酵周期的试验

我们用 60—70℃ 的酒精蒸馏的冷却水浸

甘薯粉约 30 分钟, 加酶糖化 60 分钟, 待温度降至 30℃ 左右采用流加方式接种酵母, 接种量由 10% 增加至 12%。在发酵中采用分段控温法, 即接种后 24 小时以前温度控制在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$; 以后发酵温度提高到 $33 \pm 1^\circ\text{C}$, 其它条件同(五)。发酵周期由 7 天缩短为 4 天, 达到传统发酵的水平, 结果见图 2。用 70℃ 左右的水拌料有利于淀粉粒的吸水膨胀, 加速了生淀粉糖化酶和甘薯中固有的 β -淀粉酶的糖化速度, 使酵母菌一开始就得到充足的营养和氧气, 在短期内得到大量健壮的酵母细胞, 为缩短甘薯生淀粉酒精发酵奠定了物质基础。

参 考 文 献

1. Matsumoto N et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 46(6): 1549—1558, 1982.
2. 方善康等: 食品与发酵工业, 2: 13, 1988.
3. Bergmann FW: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27(5/6): 443—446, 1988.
4. 曾作进: 应用微生物 3: 25—27, 1988.
5. Ueda S and Y Koba: *J. Ferment. Technol.* 58(3): 237—242, 1980.
6. 章名春: 工业微生物诱变育种, 第 108—109, 科学出版社, 北京, 1984 年.
7. 胡翊明等: 酒精生产分析检验, 第 162 页, 第 135 页, 轻工业出版社, 北京, 1983 年.

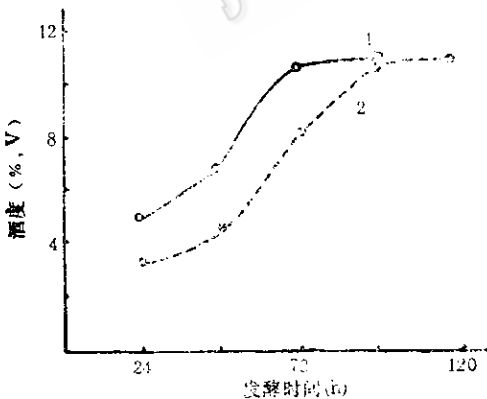


图 2 酒量生成曲线

1. 传统发酵, 2. 生淀粉发酵