

食品用米曲霉 α -淀粉酶的制备

孔显良 王俊英 姜丽萍

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 突变株 6-193 麦麸固体培养物酶的浸出, 采用自来水或 pH 4.6—5.0 的缓冲液在室温至 50℃ 之间浸泡 1—2 小时较好。用截流分子量 10000 的中空纤维超滤柱过滤即得高活力的浓缩酶液, 制成食品用酶制剂, 收率 90%。制备粉剂时, 酒精沉淀总收率为 55.2%, 丙酮沉淀总收率高达 94.1%, 冷冻干燥总收率达 87.6%。

关键词 α -淀粉酶; 米曲霉; 酶制备

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) α -淀粉酶是一种开发较早的酶制剂, 但发展不快。近年来为了实现啤酒和麦芽糖浆生产中淀粉的水解, 越来越多的人对米曲霉 α -淀粉酶感兴趣^[1]。该酶在国内尚未商品生产。为使酶制剂工业加快发展, 品种齐全, 前文曾报道^[2,3]产 α -淀粉酶菌株的筛选和酶的纯化及性质的研究; 本文报道该酶的制备。

材料和方法

(一) 菌种

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 8856 菌株系本所齐祖同先生等提供, 经紫外线诱变后, 获得了变异株 6-193 号。

(二) 培养基

试管斜面培养采用察氏 (Czapek) 琼脂培养基。麦麸固体培养基采用粗麦麸 5g, 加水 6ml (含 1% 尿素), 搅拌均匀后, 1kg/cm² 灭菌 30min, 冷却后备用。

(三) 仪器及化学试剂

中空纤维超滤柱 (天津纺织工学院膜分离工程研究所); J₂-21 高速冷冻离心机 (Beckman)。

丙酮, 乙醇 (含 95%) 均为北京化工厂产品, 分析纯。可溶性淀粉, 浙江省菱湖化工试剂厂产品。

(四) 分析方法

酶活力测定, 根据国家标准局发布的方法

进行^[4]。1ml 酶液于 60℃、pH4.8 条件下, 1 小时液化 1g 可溶性淀粉为 1 个酶活力单位。

结果和讨论

(一) α -淀粉酶粗酶液的制备

1. 不同种子来源对酶活力的影响: 采用斜面培养菌块和摇瓶培养液两种种子分别接种在麦麸固体培养基上, 经 30℃ 培养 2 天半, 浸泡出酶液测定酶活力。从表 1 结果看出, 摇瓶培养液接种的酶活力略高于菌块接种, 可能由于液体接种的接触面比较均匀, 生长较整齐, 有利于酶的产生。

表 1 不同种子来源对酶活力的影响

种子来源		酶活力 (u/g)
斜面培养菌块接种	1	757.9
	2	600.0
	3	696.8
	平均	684.9
摇瓶培养液接种	1	696.8
	2	675.0
	3	785.5
	平均	719.1

2. 麸曲浸泡时间和温度对浸出酶活力的影响: 麸曲培养好后, 采用不同温度浸泡不同时间取样测定。表 2 表明, 室温至 50℃ 浸泡 1—2

* 本工作在试验过程中徐家立副研究员提供方便和帮助, 特此致谢。

小时为宜；超过 50℃，在 60℃ 浸泡，酶活力基本上全部失活。

表 2 麸曲浸泡时间和温度对浸出酶活力的影响

酶活力 (u/ml)	温度 (℃)	时间 (min)				
		室温	30	37	50	60
0		17				
30		23	23	24	25	3
60		25	25	25	27	0
120		26	27	28	28	0
180		26	28	28	28	0

3. 不同 pH 对浸出酶活力的影响：不同 pH 缓冲液浸泡麸曲，以自来水作对照，结果表明（表 3），以 pH4.6、5.0 和自来水较好，pH5.5 的酶活力较差。所以一般只需采用自来水浸泡即可。

表 3 不同 pH 缓冲液对浸出酶活力的影响*

pH	自来水	4.0	4.6	5.0	5.5
相对酶活力	100	82.2	101.9	97.4	71.1

* 37℃ 浸泡 1 小时。

(二) 食品用酶制剂的制备

1. 超过滤浓缩试验：取麸曲浸泡液经高速冷冻离心，取一定体积上清液并测定酶活力。然后通过中空纤维超滤柱超滤，截流分子量为 10000，待体积浓缩到一定程度之后，取浓缩液和废液测定酶活力。几次重复试验，废液的酶活力基本上为 0，说明此超滤柱的截流分子量适合此酶液超滤，柱本身也无渗漏现象。但最后遗留在柱中的酶液，无法全部压出，因此对收率稍有影响。3 次超滤浓缩收率的平均数为 90.5%（表 4），浓缩倍数与收率不相关。根据酶液活力的需要可以浓缩 20 多倍，每毫升酶活力能达 1000 多单位。

2. 酒精沉淀试验：酒精分段沉淀的用量比为 1:1.2 至 1:3.0，分段沉淀均在冰浴中进行。每段经高速冷冻离心后加适当填充物索取沉淀物。由表 5 看出，酒精用量以 1:2.4 的酶活力最高，净酶粉活力达 24187u/g，总收率为 55.2%。

3. 丙酮沉淀试验：丙酮分段沉淀的用量比为 1:0.8 至 1:2.0，沉淀操作均在冰浴中进行。每段经高速冷冻离心后加适当填充物刮取沉淀物。表 6 示明，丙酮用量比以 1:1.2 的酶活力收率最高，净酶粉活力能达到 23576u/g，总收

表 4 超过滤浓缩试验

批号	浸泡酶液			超滤后酶液			浓缩倍数 (倍)	收率 (%)
	酶活力 (u/ml)	体积 (ml)	总活力 (u)	酶活力 (u/ml)	体积 (ml)	总活力 (u)		
1	65	1450	94250	461	181	83405	8	88.5
2	43	3850	165550	768	200	153600	19	92.8
3	40	4350	174000	436	360	156960	12.1	90.2
平均收率								90.5

表 5 酒精分段沉淀结果

分段号	酒精量比	填充物量 (g)	酶粉量 (g)	分段总酶活 (u)	分段收率 (%)	净酶粉	
						重量 (g)	酶活力 (u/g)
1	1:1.2	2	2.5884	2485	3.85	0.5884	4223
2	1:1.8	1	2.5396	26760	41.5	1.5396	17381
3	1:2.4	0.5	0.7405	5817	9.0	0.2405	24187
4	1:3.0	0	0.0548	526	0.8	0.0548	9600

注：1. 酶液量 150ml，总酶活力 64500 单位。

2. 酶粉总活力 35588 单位，总收率 55.2%。

表6 丙酮分段沉淀结果

分段号	丙酮加量比	填充物量 (g)	酶粉量 (g)	分段总酶活 (u)	分段收率 (%)	净酶粉	
						重量 (g)	酶活力 (u/g)
1	1:0.8	1	1.8980	3769	6.1	0.8980	4197
2	1:1.2	2	4.1977	51812	84.0	2.1977	23576
3	1:1.6	1	1.2585	2416	3.9	0.2585	9346
4	1:2.0	0.0170	0.0565	0	0	0.0395	0

注: 1. 酶液量 150ml, 总酶活力 61650 单位。

2. 酶粉总活力 57997 单位, 总收率 94.1%。

表7 冷冻干燥试验结果

批次	酶液			填充物重量 (g)	酶粉			收率 (%)
	活力 (u/ml)	体积 (ml)	总活力 (u)		活力 (u/g)	重量 (g)	总活力 (u)	
1	417	150	62550	3	7448	7.2185	53763	86.0
2	417	50	20850	2	5023	3.6984	18577	89.1
平均收率								87.6

率高达 94.1%。丙酮用量 1:2.0 时已经没有活力, 所以在生产时丙酮的用量以 1:1.6 即可。

4. 硫酸铵沉淀试验: 参见文献[3]。

5. 冷冻干燥试验: 取一定量经超滤浓缩后的酶液, 加入适当填充物, 放在容器中冷冻干燥, 酶粉称重并测其活力。结果表明, 浓缩酶液经冷冻干燥后平均收率达 87.6% (表 7)。

米曲霉 6-193 麦麸固体培养物的 α -淀粉酶活力高达 600u/g 以上, 根据各使用单位的需要, 可以直接使用或浸泡酶液使用。如果认为体积过大, 运输不便, 可以超滤浓缩减少体积,

提高质量。也可采用酒精、丙酮沉淀或冷冻干燥的方法制备成粉状食品用酶制剂, 适用于各类食品添加剂、淀粉加工、啤酒工业以及医药等方面^[4]。

参 考 文 献

1. Bhella R S et al.: *Can. J. Microbiol.* 31 (2):149--153, 1985.
2. 孔显良等: 微生物学通报, 15(2): 52-54, 1988.
3. 孔显良等: 微生物学报, 31(4): 274--280, 1991.
4. 国家标准局颁布, GB8275-87, 1988-02-01 实施。
5. 徐跃等: 应用微生物, 3: 18-20, 1989.