

各种红曲霉不同类型淀粉酶活性的比较*

李鍾慶 朱丽釗 方心芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

1954年北原觉雄等^[1]按不同类型淀粉酶活性将红曲霉(*Monascus*)分为四种类型: I. 淀粉酶(Amylase)麦芽糖酶(Maltase)的活性都强; II. 淀粉酶活性强, 麦芽糖酶活性弱; III. 淀粉酶活性弱, 麦芽糖酶活性强; IV. 两种酶的活性都弱。就其结果来看, *M. purpureus* Went、*M. anka* Sato、*M. albidus* Sato 等属于第一种类型; *M. ruber* van Tieghem、*M. albidus* var. *glaber* Sato 等属于第二种类型; *M. araneosus* Sato、*M. pilosus* Sato 等属于第三种类型; *M. fuliginosus* Sato 属于第四种类型。这个结果若能用来区分物种则很有意义, 但是他们试验的菌株不多, 是否能作为定论, 尚需探讨。本文试图探讨红曲霉的不同类型淀粉酶活性能否作为这群菌的分类参考依据。

材 料 和 方 法

(一) 菌种 将我们搜集到的红曲霉, 依据一些形态和生理特征, 区分为5群, 即

M. purpureus-anka 群: AS 3.551、3.782、3.914、3.917、3.920、3.927、3.988、3.989、3.992、3.993、3.2636、3.2666;

M. ruber 群: AS 3.549、3.887、3.897、3.2078、3.2080、3.1097;

M. serorubescens 群: AS 3.555、3.893、3.916;

M. albidus 群: AS 3.552、3.559、3.560、3.568、3.570、3.883、3.890、3.2638;

M. fuliginosus 群: AS 3.569、3.572、3.2652、3.2085、3.2118、3.2160、3.1869。

(二) 酶液的制备 取5克麸皮装入250毫升锥形瓶中, 加1%乳酸液7.5毫升, 15磅灭菌30分钟。接种后置35℃恒温箱中培养5天。取出后加蒸馏水95毫升, 搅拌均匀, 于30℃浸提3小时, 用脱脂棉过滤, 即得5%酶液。

(三) 糊精化酶的测定 取2%可溶性淀粉液(每100毫升中含0.2M醋酸缓冲液10毫升, pH 4.5)5毫升, 加酶液5毫升, 于55℃保温, 每隔30分钟取1毫升混合液注入容有5毫升1/1000N碘液的试管中。观察其颜色的改变情况, 并以分析纯的糊精加碘后生成的颜色作参考。按由蓝色到紫红色变化的程度, 分别记为“-”(黑蓝色), “+”(蓝色略带紫), “++”(蓝紫色), “+++”(红紫色), “++++”(紫红色)等表示糊精化酶活性的强弱。连续观察3小时。

(四) 糖化力的测定 酶液和可溶性淀粉液同前。取后者10毫升, 加醋酸缓冲液(pH 4.5)1毫升, 酶液2毫升, 于55℃糖化1小时。加0.5N NaOH 2毫升以停止酶作用, 加水至20毫升, 用Willstat-ter 次亚碘酸法测定总糖量(以葡萄糖计)。并用纸层析法检查糖的种类。

(五) 麦芽糖酶的测定

酶解 取1%麦芽糖(纸谱纯)溶液12.5毫升入一25毫升比色管中, 加磷酸盐缓冲液(pH 4.6)2

* 王大相先生校阅文稿提出宝贵意见, 特此致谢。

本文1965年6月15日收到。

毫升,酶液(见前)1毫升,于55℃水解1小时,置沸水浴中煮沸10分钟以停止酶作用,冷却,加水至25毫升(以麦芽糖计为0.5%)。用纸层析法测定各菌株的酶液分解麦芽糖后有无葡萄糖产生。

测糖 利用少孢酵母菌 [*Sacch. exiguus* (Reess) Hansen] AS 2.520 发酵法* 测定葡萄糖^[2,3]。取培养48小时的新鲜酵母(水洗3次,离心去水)0.5克入一150毫升锥形瓶中,加入酶解后的麦芽糖液25毫升,摇匀后松松加塞,置30℃恒温箱中发酵酶解液中的葡萄糖。每小时摇动一次,4小时后取出,离心,去酵母细胞,再用纸层析法测定有无葡萄糖残留。

用快速分析法测定还原糖^[4]。以0.1%麦芽糖作为标准液,测定酶解及发酵后残留的麦芽糖量。按下式计算麦芽糖酶单位(MU):

$$MU = 100 - 100 \frac{A - a^{**}}{B}$$

(六) 紙上层析 (1) 溶剂: 正丁醇:醋酸:水=4:1:5。(2) 显色剂: 邻苯二甲酸1.63克溶于100毫升饱和水的正丁醇中,加苯胺0.93克。

結 果 和 討 論

(一) 不同类型红曲霉的淀粉酶水解淀粉后经纸上层析证实都以葡萄糖为最终产物,

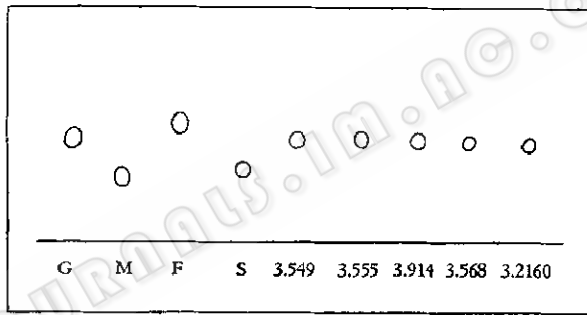


图1 不同类型红曲霉淀粉糖化液的纸上层析结果(绘出部分样品,其他结果相同省略)
图中阿拉伯号码示R_F值; G 葡萄糖; M 麦芽糖; F 果糖; S 蔗糖(下同)等已知样品作对照。

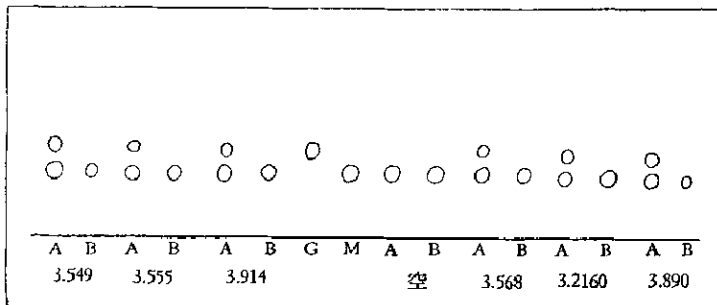


图2 麦芽糖液经酶解及少孢酵母发酵后分别取样纸上层析结果(绘出部分样品,其他结果相同省略)
A 酶解后样品; B 酶解及发酵后样品; 空 A 不加酶液同样条件水解样品; 空 B 空 A 加酵母发酵后样品。

* 该菌只发酵葡萄糖,对麦芽糖无作用。
** A = 滴定10毫升菲林液所需标准麦芽糖液的毫升数;
B = 加入菲林液中的酶解及发酵后麦芽糖液的毫升数;
a = 加入B液后滴定10毫升菲林液还需标准麦芽糖液的量。

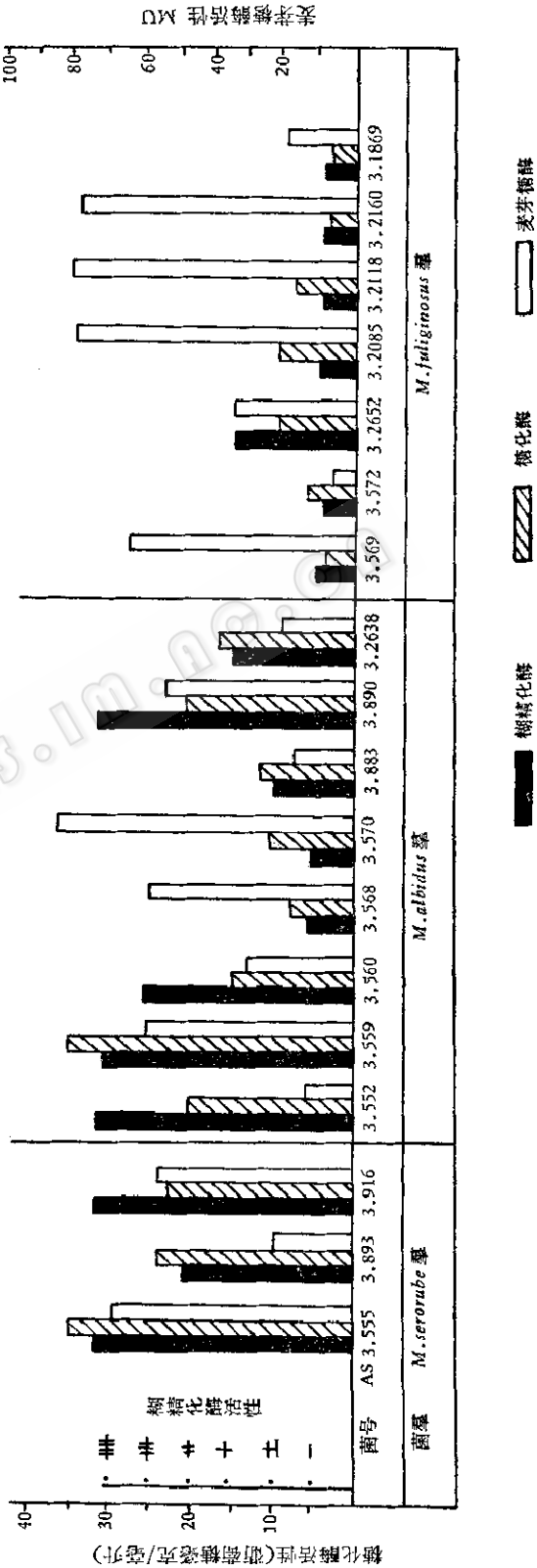
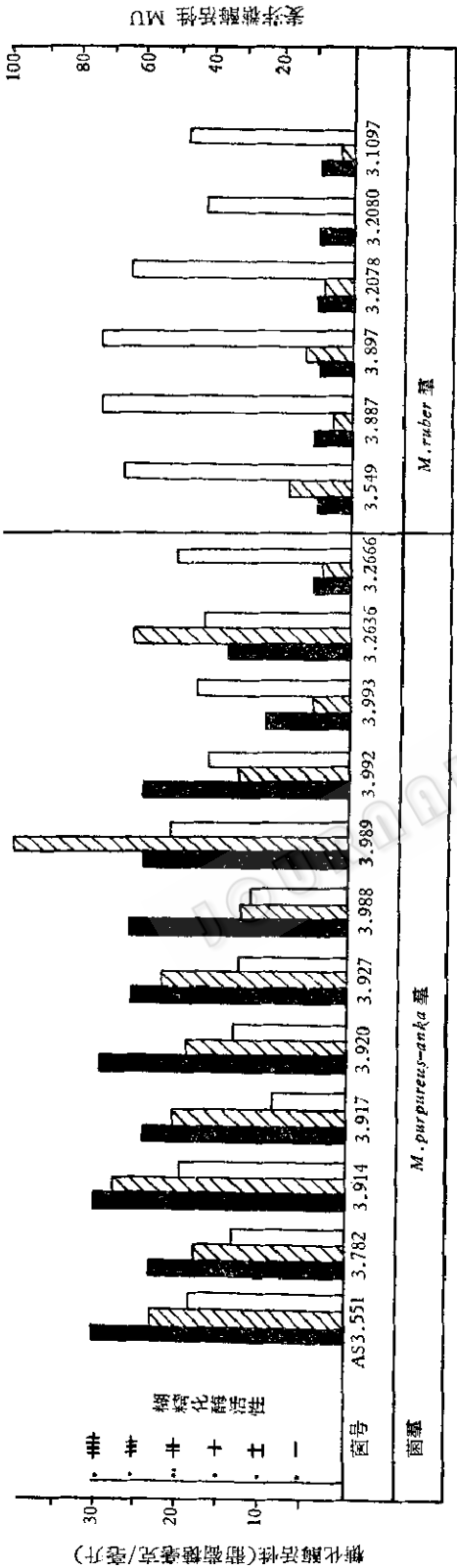


图 3 红曲霉各羣淀粉酶等活性的比较

见图 1。

(二) 不同类型红曲霉都产生麦芽糖酶, 即水解麦芽糖后都形成葡萄糖, 见图 2 中 A 项。经酶解后再由少孢酵母菌发酵可除去葡萄糖, 见图 2 中 B 项。

(三) 不同类群红曲霉的糊精化酶、糖化酶、麦芽糖酶活性测定的结果及其关系见图 3。由图 3 可以看出这三类酶活性与种群有关, 如 *M. purpureus-anka* 群、*M. serorubercens* 群菌株的糊精化酶和糖化酶大都很强; *M. ruber*、*M. fuliginosus* 群菌株的这两种酶都较弱, 并且各株菌的这两种酶活性强弱呈现了一致性, 但其麦芽糖酶却大都较强。以上结果表明酶活力与种群间有较密切关系, 可作为鉴定种群的参考特征。

我们的观察和北原觉雄等的结果比较, 有一部分一致: 即 *M. purpureus-anka* 群淀粉酶和麦芽糖酶都强。有差别的是我们所测定的 *M. fuliginosus* 群和 *M. ruber* 群麦芽糖酶大都较强。

(四) 就纸层析糖化液和麦芽糖酶解及发酵后溶液的结果来看, 红曲霉都有糊精化酶、糖化酶、麦芽糖酶。有的菌株, 例如 *M. ruber*、*M. fuliginosus* 群, 糊精化能力糖化力都很弱, 但麦芽糖酶活力很强, 因而可能是在这三种酶协同作用下分解淀粉形成了葡萄糖。

(五) 我国红曲中大都都是 *M. purpureus*、*M. anka*^[5,6], 这两种菌糖化力都强, 所以我国台湾、福建、浙江等地以红曲作酿酒用的糖化剂是正确的。在生产上欲获得糊精化力、糖化力强的红曲霉, 从 *M. purpureus-anka* 群筛选菌株, 可能事半功倍。

参 考 文 献

- [1] 北原觉雄, 村田卯一: 发酵工学杂志, **32**: 473—478, 1954。
- [2] Schultz, A. S., Fisher, R. A., Atkin, Lawrence and Frey, C. N.: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **15**: 496—498, 1943。
- [3] Pan, S. C., L. W. Nicholson and Daul Kolachov: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **25**: 231—236, 1953。
- [4] 沈巩辨: 化学世界, **10**: 344, 1955。
- [5] Went, F. A. F. C.: *Ann. Des Sci. Nat. Bot.* **8**: 1—18, 1895。
- [6] 中泽亮沼, 佐藤喜吉: 日本农艺化学会志, **6**: 352, 1930。

COMPARISON OF AMYLOLYTIC ACTIVITIES OF VARIOUS TYPES OF GENUS *MONASCUS*

LI ZHONG-QING, ZHU LI-ZHAO AND FANG SIN-FANG

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking)

The amylolytic activities of five species-groups, including 36 strains, of *Monascus* were examined.

According to the data of enzyme-analysis, the activities of both α - and β -amylase of *Monascus* were related to the species groups. The activities of the groups of *M. purpureus-anka* and *M. serorubescens* were strong, but those of the groups of *M. ruber* and *M. fuliginosus* were weak.

From the taxonomic point of view, the results of our studies were found to be corresponding partly with those of Kakuo Kitahara and Uichi Murata, who grouped *Monascus* according to their enzymatic activities. Both investigations indicated that the activities of amylase and maltase were strong in *M. purpureus-anka* group. But we found that the maltase activities of groups of *M. fuliginosus* and *M. ruber* were quite high, even higher than that of *M. purpureus-anka*.

By means of paper chromatography, we found α -amylase, β -amylase and maltase present in all strains of *Monascus*. Therefore the glucose produced seemed to be the total actions of these three types of enzymes.

M. purpureus and *M. anka* are predominant organisms in Chinese red rice and their amylolytic power are sufficiently strong. That the Chinese red rice has been utilized as saccharifying agent for manufacturing reddish liqueur in provinces Taiwan, Fukien and Chekieang for a long time is indeed very reasonable.