

# 产 $\alpha$ -淀粉酶的米曲霉菌株筛选及产酶条件的研究

孔显良 左 静\* 孙曾美 齐祖同

(中国科学院微生物研究所,北京)

**摘要** 从 51 株米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 中筛选到 5 株产  $\alpha$ -淀粉酶活力较高的菌株,对其中的 5037 号菌株进行了产酶条件的试验:最适培养温度为 30—33℃,时间为 2.5 天,3 天以后酶活力开始下降;pH3.5—6.0 之间对产酶活力影响均不大;外加碳源以糊精和瓜干粉较好,其中玉米粉加量以 5% 最好;外加氮源中  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  和尿素等对酶的形成有促进作用; $\text{NH}_4\text{Cl}$  抑制酶的形成。在最适产酶条件下,酶活力平均达 438.8u/ml。

**关键词** 米曲霉;筛选; $\alpha$ -淀粉酶;产酶条件

米曲霉的利用在我国有悠久历史,古代的酒曲“黄衣、黄蒸”中主要的微生物就是米曲霉。1898 年日本高峰让吉用米曲霉制得 Taka-diastase,在工业和医药上应用极广<sup>[1]</sup>。50 年代我国曾对米曲霉产酶进行过研究<sup>[2,3]</sup>,后来很少有人进行这方面的工作。丹麦、美国、日本等国已用米曲霉生产出真菌  $\alpha$ -淀粉酶制剂。但国内还没有此产品。为适应食品,医药,淀粉加工,啤酒工业等的发展,有必要开展这方面的工作。本文报道米曲霉产  $\alpha$ -淀粉酶菌株的筛选和产酶条件的研究。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌种

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 51 株,系由本所真菌室和保藏室提供。菌种在 30℃ 培养 5 天备用。

### (二) 培养基

试管斜面培养,采用查氏 (Czapek) 斜面琼脂培养基。

固体发酵培养基:采用麸皮经筛,取较粗部分 100g,加水 120ml (含有 0.5% 尿素),调匀后分装在 250ml 三角瓶中。

### (三) 酶液的制备

基础培养基经 1 kg/cm<sup>2</sup> 高压蒸汽灭菌 30 分钟,凉后接种,30℃ 温箱中培养,16 小时摇动一次,40 小时后将三角瓶内培养物翻动倒

置,培养 2.5 天后取出。

培养物加 50ml 蒸馏水捣碎,再加水 50ml,摇匀,放在 37℃ 温箱中浸泡 3 小时,取出用棉花过滤即成粗酶液。

### (四) 酶活力测定方法

采用轻工部部颁标准<sup>[4]</sup>: $\alpha$ -淀粉酶活力测定用碘色反应法。1ml 酶液于 60℃,pH 为 4.8 条件下,1 小时液化 1g 可溶性淀粉为 1 个酶活力单位。本试验以克干曲产生的酶活力表示。

### (五) 试剂

可溶性淀粉:浙江菱湖化工试剂厂生产。当天使用时配制。

## 结 果

### (一) 菌株的筛选

在基础培养基上,30℃,培养 3 天,测定酶活力。结果见表 1。在 51 株菌中有 5 株菌的

表 1 51 株米曲霉的  $\alpha$ -淀粉酶测定结果

酶活力(u/g)	菌 株 数
200 以上	5
151—200	3
101—150	7
100 以下	36

\* 北京大学生物系应用生化专业四年级学生。  
姜丽萍同志参加部分工作;保藏室从北海同志提供部分菌种。

酶活力较高。考虑到发酵时间短、孢子颜色浅的因素,采用 5037 号菌作进一步研究。

## (二) 产 $\alpha$ -淀粉酶的条件

### 1. 培养时间对产酶活力的影响

培养过程中每隔 12 小时取样测定酶活力,结果见表 2。从表 2 中看出培养 2.5 天,产酶活力最高,3 天以后酶活力开始下降。

表 2 培养时间对产酶活力的影响

时间(天)	酶活力(u/g)	时间(天)	酶活力(u/g)
2.0	191.5	4.0	152.0
2.5	206.1	4.5	135.2
3.0	183.7	5.0	99.1
3.5	168.3		

### 2. 温度对产酶活力的影响

于不同温度下进行培养试验,由图 1 可见,该菌产酶适宜温度范围为 28—35℃,最适温度为 30—33℃。

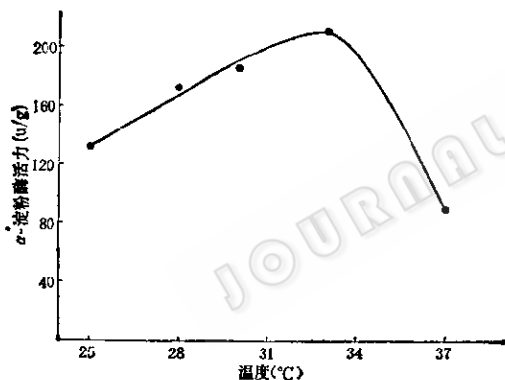


图 1 不同培养温度对产酶活力的影响

### 3. 起始 pH 对产酶活力的影响

将培养基溶液用盐酸和氢氧化钠溶液调 pH,用 pH 计精确测出 pH 值,培养后测酶活力,表 3 表明:该菌产酶 pH 适宜范围为 3.5—6.0,但要求不严格,可选用自然 pH。

### 4. 不同含水量对产酶活力的影响

将 10g 麸皮分装在 250ml 三角瓶中,配制含 0.5% 的尿素溶液,分别加入 6、8、10、12、14、16ml 拌匀后,灭菌,接种,培养 2.5 天,测其酶活力(表 4),含水量 50.0—58.3% 较好,以

表 3 起始 pH 对产酶活力的影响

pH	酶活力(u/g)	pH	酶活力(u/g)
3.0	148.6	5.5	154.5
3.5	160.1	6.0	151.7
4.0	169.3	6.5	142.3
4.5	162.6	7.0	140.0
5.0	158.5		

表 4 不同含水量对产酶活力的影响

加水量(ml)	含水量(%)	酶活力(u/g)	加水量(ml)	含水量(%)	酶活力(u/g)
6	37.5	121.3	12	54.5	191.4
8	44.4	173.7	14	58.3	187.6
10	50.0	183.8	16	61.5	172.8

54.5% 酶活力最高。

### 5. 不同碳源对产酶活力的影响

在基础培养基中加入不同碳源,培养后的产酶活力见表 5,结果表明:适量添加这几种物质均在不同程度上对产酶有促进作用。顺序是:糊精>瓜干粉>葡萄糖>乳糖>玉米粉>麦芽糖>可溶性淀粉。其中以糊精为最佳。

表 5 不同碳源对产酶活力的影响

碳源	占固形物量(%)	酶活力(u/g)	碳源	占固形物量(%)	酶活力(u/g)
可溶性淀粉	5	182.0	葡萄糖	0.5	220.9
玉米粉	5	187.8	麦芽糖	0.5	184.7
瓜干粉	5	222.1	乳糖	0.5	193.1
糊精	5	244.2	对照	0	155.5

### 6. 玉米粉加量对产酶活力的影响

为适合生产上的应用,采用在基础培养基中加入不同量的玉米粉作为补充碳源,培养后测定酶活力,当玉米粉加量为 0.5g 时酶活力最高(表 6)。

表 6 玉米粉不同加量对产酶活力的影响

玉米粉加量(g)	酶活力(u/g)	玉米粉加量(g)	酶活力(u/g)
0	155.5	1.0	187.1
0.1	190.9	1.5	183.6
0.5	205.1	2.0	178.8

### 7. 各种氮源对产酶活力的影响

基础培养基中加入不同氮源,浓度均为

1%。NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、尿素、酵母膏、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、聚脲能促进酶的形成，NH<sub>4</sub>Cl 能抑制酶的形成。对于该菌，NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 和尿素是好的氮源，酶活力最高(表 7)。

表 7 各种氮源对产酶活力的影响

氮源	酶活力 (u/g)	氮源	酶活力 (u/g)
NH <sub>4</sub> Cl	67.9	尿素	172.2
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	174.7	蛋白脲	136.7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	156.0	酵母膏	163.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	114.0	聚脲	143.7
NaNO <sub>3</sub>	149.4	对照	140.6

### 8. 不同尿素浓度对产酶活力的影响

取 10g 麸皮，分装在 250ml 三角瓶中，配不同浓度的尿素溶液，均加入 12ml，灭菌，接种后培养 2.5 天，测其酶活力。表 8 结果表明：尿素最适浓度为 1%。

表 8 不同尿素浓度对产酶活力的影响

尿素浓度 (%)	酶活力 (u/g)	尿素浓度 (%)	酶活力 (u/g)
0	185.9	1.5	195.1
0.5	208.6	2.0	194.2
1	233.3		

### 9. 豆饼粉不同含量对产酶活力的影响

在基础培养基中加入不同含量的豆饼粉作为补充氮源，培养后测定酶活力。当豆饼粉含量为固形物的 1% 时，酶活力最高(表 9)。

表 9 豆饼粉不同含量对产酶活力的影响

占固形物量 (%)	酶活力 (u/g)	占固形物量 (%)	酶活力 (u/g)
0.0	129.3	1.0	183.0
0.1	166.1	1.5	176.9
0.5	175.5	2.0	168.5

### 10. 最佳产酶条件试验

取 9.5g 麸皮，加 0.5g 糊精，分装在 250ml 三角瓶中，加入 12ml 水，其中尿素浓度为 1%，再加入 0.1g 豆饼粉，拌匀后灭菌。接种后在 30℃ 下培养 2.5 天后取出，测定酶活力。五批

试验结果见表 10。平均酶活力为 438.8 u/ml。

表 10 综合最佳条件的产酶活力

批 次	酶活力 (u/ml)
1	450.0
2	411.4
3	514.0
4	407.5
5	411.0
平均	438.8

## 讨 论

$\alpha$ -淀粉酶是产量大、用途广的酶制剂品种之一，我国目前仅有枯草杆菌  $\alpha$ -淀粉酶的单一品种，影响某些行业的应用。本实验采用米曲霉筛选产  $\alpha$ -淀粉酶的菌株，开始时采用液体发酵，酶活力不高，改用固体麦麸培养基，活力增加十几倍，这同 Meyrath<sup>[5]</sup> 和 Ramesh<sup>[6]</sup> 的报道是一致的。Kunda 等<sup>[7]</sup>认为淀粉对所有种类的霉菌都是最好的碳源。麦麸可提供淀粉及高含氮化合物以及高浓度磷酸盐以及多种维生素。Murota 等<sup>[8]</sup>报道尿素、硫酸铵也是较好的氮源。本实验筛选的米曲霉 5037 号菌株在麸皮固体培养基中添加适量碳、氮源， $\alpha$ -淀粉酶活力平均可达 438.8u/ml，此菌株经进一步试验，有希望投入生产。

## 参 考 文 献

- [1] 张树政主编：酶制剂工业(下册)，第 456 页，科学出版社，北京，1984。
- [2] 陈陶声：化学世界，10：433—439，1957。
- [3] 张树政等：科学通报，10：304，1957。
- [4] 轻工业部颁标准(试行)，QB746-747-80，1981。
- [5] Meyrath, J. et al.: in "Enzymes in Food Processing", ed. By Reed, G., Academic Press, 276—293, 1974.
- [6] Ramesh, M. V. and B. K. Lonsane: *Biotechnology Letters*, 9(5): 323—328, 1987.
- [7] Kunda, A. K. et al.: 发酵协会会志，51: 142, 1973。
- [8] Murota, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 31: 179 1953.