

根霉的研究

IV. 根霉淀粉葡萄糖苷酶的研究*

乐华爱 谢玉梅 张树政 方心芳

(中国科学院微生物研究所,北京)

本文研究根霉属内各种霉菌产生淀粉葡萄糖苷酶的情况及选择高活性的菌种。

我们由 150 株根霉中选择出 3 株淀粉葡萄糖苷酶很强的根霉,其名称和菌号为 *Rhizopus japonicus* AS 3.849 (日本根霉), *Rh. tonkinensis* AS 3.1175 (河内根霉)和 *Rh. chinensis* AS 3.2746 (中国根霉)。

酶作用的最适 pH 是 4.5—5.0, 最适温度因菌而异,一般以 50—55°C 最好,其中 3.2746 耐热性最强,稳定性最高。

根霉淀粉酶对原料的选择性不强,对 6 种不同的淀粉(可溶性淀粉、马铃薯、甘薯、玉米、大米和高粱),几乎都能全部水解成葡萄糖。

3 种根霉的性能,在很多方面都不相同,在一般条件下,3.849 糖化力最强,3.1175 次之,3.2746 糖化之初速度较低,而它的优点是生长迅速,酶的耐热性和稳定性强。

小曲酿酒在我国已有悠久的历史,其中起主要作用的是根霉,通常所说的霉菌糖化法(Amylo-process)制酒精也是用的根霉,日本人也曾有在酒精工业中应用曲霉和根霉混合的方法。近年来很多人对利用根霉淀粉酶制造葡萄糖很感兴趣,开展了很多的研究^[1-6],日本和美国在酶法由淀粉生产葡萄糖方面有一些专利^[7,8],并且有商品出售的淀粉酶制剂^[9]。现在我国生产的葡萄糖,都是用酸水解法,酸法需要耐酸、耐压的设备,而且所得糖化液中葡萄糖纯度不高,含寡糖较多,当葡萄糖浓度高时,又会分解成有色的羟甲基糠醛和复合成龙胆二糖,其味甚苦,影响葡萄糖的质量。若用酶糖化法制葡萄糖,不需耐酸、耐压设备,无苦味,带色生成物少,能应用高浓度的淀粉,葡萄糖纯度高,得率高。铃木繁男^[10]指出,酶水解法制葡萄糖是降低成

本、提高质量的有效方法。日本在 1960 年已全部改用酶法生产葡萄糖^[11]。在我国,酶法制葡萄糖若能投入生产,葡萄糖工业一定会得到迅速发展。本工作的目的是选择淀粉葡萄糖苷酶强的菌种,供葡萄糖生产,或为发酵工业制备原料。本文报导根霉固体培养法的选种和酶性质的研究结果。

材料和方法

菌株 筛选用的 150 株根霉,包括 22 个种,其中有国内外的优良菌种。供进一步研究的 3 株根霉中, *Rhizopus japonicus* AS 3.849 (日本根霉)和 *Rh. tonkinensis* AS 3.1175 (河内根霉)是我们自己分离鉴定的, *Rh. chinensis* AS 3.2746 (中

* 陆东莱同志协助制备数种淀粉,郑儒永同志供给部分根霉菌株,黎高沃同志曾参加部分工作,特此一并致谢。

本文 1965 年 11 月 8 日收到。

国根霉)是本所郑儒永同志供给的。

根霉麸曲的制备和酶液的浸提 250 毫升锥形瓶盛麸皮 5 克,加水 10 毫升搅匀,在压力 1 公斤/平方厘米下,灭菌 30 分钟,用马铃薯葡萄糖斜面的根霉接种,30°C 培养 4 天(2—2.5 天时翻身),取出加蒸馏水 90 毫升,30°C 水浴浸提 1 小时,其间每隔 15 分钟搅拌一次,取出用脱脂棉过滤,滤液即为酶液。

糖化力的测定 选种试验时,在 25 毫升比色管内,加入 2% 可溶性淀粉 10 毫升、0.2N pH5 醋酸盐缓冲液 5 毫升、水 4 毫升,55°C 预热后加入酶液 1 毫升,55°C 糖化 1 小时,取出放沸水中煮沸 15 分钟,吸取 5 毫升糖化液,用次亚碘酸钠法定糖,同前报^[12],糖化力以 5 毫升糖化液所消耗的 0.1N 碘液毫升数表示之。酶性质试验时,除另有说明外,均为 0.2N pH4.5 醋酸盐缓冲液,酶液用量 1 毫升,55°C 作用 1 小时。

糊精化力的测定 取上述糖化液 0.5 毫升,加入 2 毫升 0.001N 稀碘液中,观察其呈色反应。

纸谱分析 层析溶剂是正丁醇-醋酸-水 = 4:1:5^[13] 扩展 2 次。显色剂是茚二甲酸氢苯胺的正丁醇溶液^[14]。

结 果

(一) 菌种选择

能将淀粉水解成葡萄糖的微生物可分为四类^[5],其中梭菌尚未工业化,黑曲霉和拟内孢霉可以用深层培养法,但含有少量糖苷转移酶,而根霉不含糖苷转移酶,可将淀粉完全水解为葡萄糖。所以我们确定根霉作为筛选的材料。福本指出根霉的培养以固体为佳,深层培养法正在研究。而近年来日本在深层培养方面,已展开了广泛的研究,培养液酶活力的水平达到 5% 麸曲浸液^[4],每毫升培养液的效价比每克曲的效价还低很多^[6]。一般讲,深层培养较固体培养优越,但近来有通风制曲的方法,也能大量生产。根据我国目前情况,固体法易于实现,所以我们先从固体培养开始。

150 株根霉糖化力初步比较结果,可

区分为四类(表 1)。糖化力最强者有 *Rhizopus japonicus* 6 株, *Rh. chlamydosporus* 1 株, *Rh. tonkinensis* 2 株;较强者有 *Rh. tonkinensis* 17 株, *Rh. oryzae* 7 株, *Rh. chinensis* 2 株, *Rh. tritici* 2 株, *Rh. delemar* 1 株;糖化力中等的根霉有 91 株,其中 *Rh. oryzae* 21 株, *Rh. chinensis* 19 株, *Rh. tonkinensis* 17 株, *Rh. japonicus* 4 株, *Rh. delemar* 3 株, *Rh. javanicus* 2 株,其它不同种的根霉 25 株;糖化力弱的菌则属 *Rh. nigricans*, *Rh. reflexus* 和 *Rh. sexualis*。

表 1 150 株根霉糖化力比较

	最强(3.8—4.2) ¹⁾	较强(3.4—3.75)	中等(2.0—3.35)	弱(0.55—1.95)
菌株数	9	29	91	21
百分比(%)	6	19.3	60.7	14

1) 5 毫升糖化液相当 0.1N 碘液毫升数。

根据初筛结果,我们选出 20 株不同类型的糖化力较强的根霉,进行 3 次重复(表 2),并注意其生长情况,同时进行糖化液的纸谱分析。由于不同种的根霉对不同条件的适应性可能不同,所以首先选几个不同的种,作进一步的研究。根据生产上所需要的综合条件来衡量,我们认为 *Rh. japonicus* AS 3.849 糖化力最强而稳定,产品中除极微量的麦芽糖外,绝大部分是葡萄糖,是一个有希望的菌种; *Rh. tonkinensis* AS 3.1175 糖化力也相当强,斜面上和麸皮上孢子较多,产品也很纯; *Rh. chinensis* AS 3.2746 在所用的条件下,糖化力较前两菌差些,但加大酶液用量时,也能达到相当强的糖化力,它的优点是生长迅速,孢子特多,易于制曲。所以选出了这 3 株具有不同特点、不同种的根霉,来进行淀粉酶性质的研究。

(二) 酶性质的研究

根据糖化力比较等综合因素,我们选

表2 20株不同类型根霉糖化力比较

菌号	菌名	糖化力		
		第1次	第2次	第3次
3.849	<i>Rhizopus japonicus</i>	4.20	3.95	3.95
3.868	<i>Rh. japonicus</i>	4.15	3.95	3.90
3.2674	<i>Rh. chlamydosporus</i>	4.10	3.80	3.80
3.1175	<i>Rh. tonkinensis</i>	3.80	3.80	3.65
3.866	<i>Rh. tonkinensis</i>	3.65	3.70	3.67
3.272	<i>Rh. tonkinensis</i>	3.30	3.55	3.15
3.1263	<i>Rh. tonkinensis</i>	3.60	3.60	3.85
3.2746	<i>Rh. chinensis</i>	3.15	3.20	3.60
3.817	<i>Rh. chinensis</i>	3.50	3.40	3.30
3.1138	<i>Rh. chinensis</i>	2.50	2.75	3.20
3.2684	<i>Rh. cohnii</i>	3.15	2.90	3.00
3.2679	<i>Rh. cohnii</i>	3.15	3.10	3.25
3.2686	<i>Rh. microsporus</i>	2.90	3.00	2.90
3.946	<i>Rh. minimus</i>	2.70	2.50	2.70
3.1246	<i>Rh. oryzae</i>	3.35	3.60	3.40
3.5	<i>Rh. delemar</i>	3.35	3.55	3.45
3.1268	<i>Rh. tritici</i>	3.50	2.55	2.35
3.253	<i>Rh. tritici</i>	2.25	2.45	2.25
3.2667	<i>Rh. arrhizus</i>	3.20	3.15	3.20
3.254	<i>Rh. usarii</i>	2.65	2.55	2.60

出3株不同种的、糖化力强的根霉,进行酶性质的研究。

1. 温度对根霉淀粉酶活性的影响 此3种根霉的糖化力(图1),在50℃以前都随着温度的提高而提高,50℃以上则变化较大,显示出各菌的特点。3.1175最适温度为50—55℃,范围狭窄;3.849最适温度

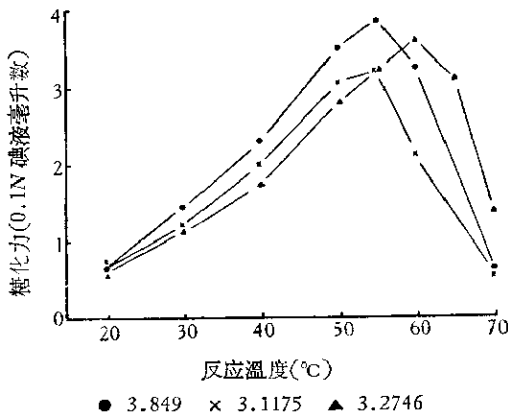


图1 温度对根霉淀粉酶活性的影响

为50—60℃,以55℃活性最强,而且此菌酶活力最高;3.2746适宜温度偏高,为55—65℃,可见其耐高温。关于糊精化力方面,3.849和3.1175在70℃时遇碘已呈蓝紫色或蓝色,而3.2746的糊精化酶也是比较耐高温的,70℃碘色反应为红色。

2. 根霉淀粉酶在不同温度时的稳定性 稳定性试验是pH4.5醋酸盐缓冲液加酶液,在不同温度下放置3、24和48小时后,加淀粉按常规测酶活性。此3菌在不同温度的稳定性有显著差别(图2a、b、c),3.1175的稳定性最差;3.849居中,与*Rh. javanicus* sp. 3^[4]的性能相似;3.2746的稳定性最强,在40℃以下维持48小时,丝毫没有失活,50℃维持3小时活力未被破坏,维持24或48小时还能残存80—70%的活力,这再一次的证明3.2746是一个耐高温的菌种。此酶对高温的稳定性有利于葡萄糖制造,各菌对温度的稳定范围比最适温度要低,这两点都是值得注意的。

3. pH对根霉淀粉酶活性的影响 不同pH的试验是采用柠檬酸盐缓冲液,此3菌的最适pH范围差异不大,适宜范围为pH4.0—5.5,均以pH4.5活力最强(图3)。

4. 根霉淀粉酶在不同pH时的稳定性 为了除去温度对稳定性的影响,不同pH的稳定性是在30℃处理24小时后按常规测定的。各菌在不同pH时稳定性在pH4—8之间变化不大,以3.849稳定范围最宽,在最适pH4.5时各菌酶活力几乎完全不被破坏(图4),可见其最适pH与pH稳定性二者是没有矛盾的。

5. 根霉淀粉酶作用动态 以1%可溶性淀粉为基质,试验结果指明,此3菌糊精化性能也不相同,3.1175糊精化力最强,3.849次之,3.2746红色糊精阶段维持的时间最长。因此糖化初速度以3.1175最

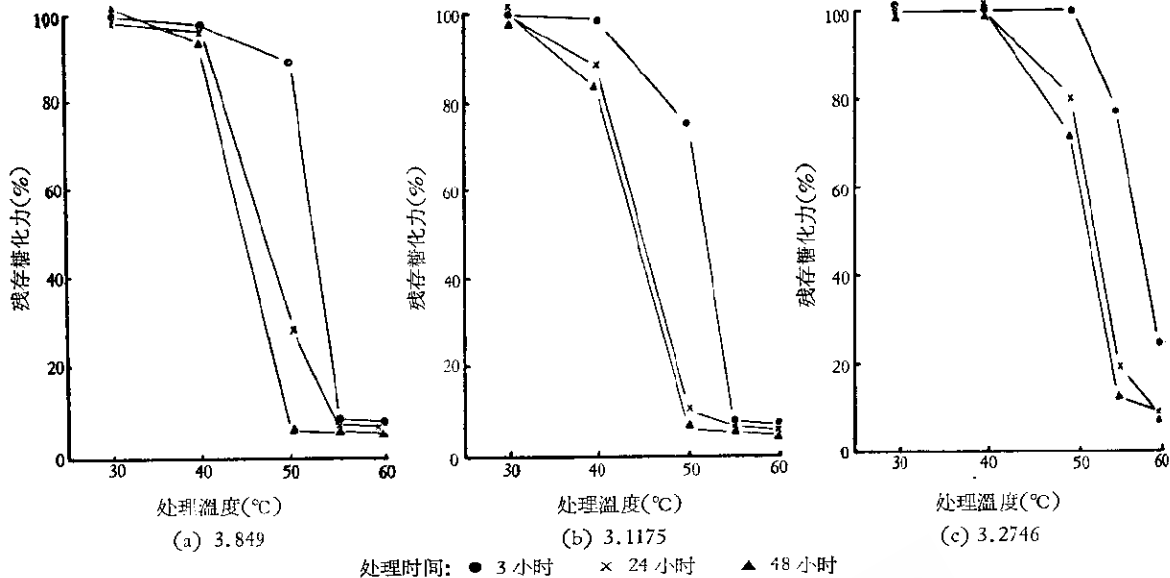


图2 根霉淀粉酶在不同温度的稳定性

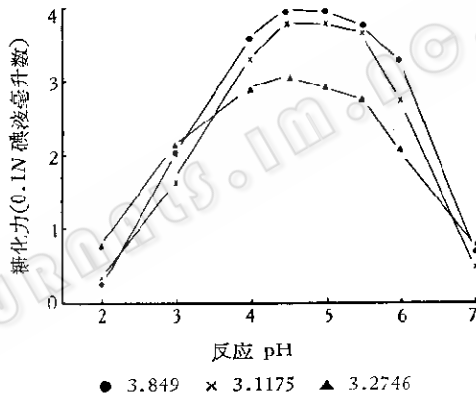


图3 pH 对根霉淀粉酶活力的影响

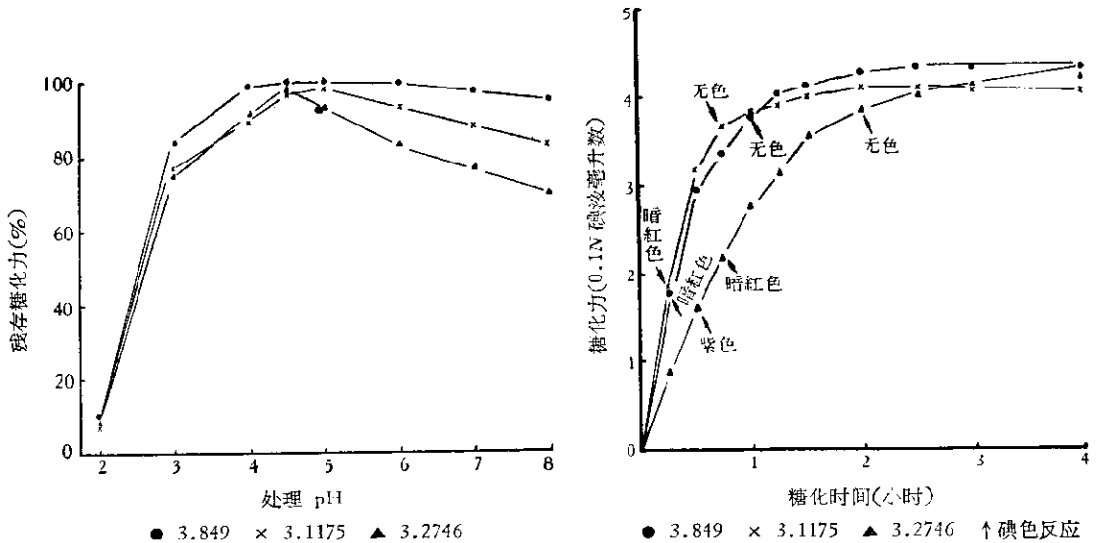


图4 根霉淀粉酶在不同 pH 的稳定性

快,但逐渐被 3.849 赶上并超过之。3.2746 糖化初速度最低,但最后也超过 3.1175,达到 3.849 的水平(图 5)。根据纸谱分析结果,证明在后期产物中,除有极微量的麦芽糖外,绝大部分是葡萄糖。配合电泳分析结果,确证此 3 菌主要是淀粉葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶。

6. 根霉淀粉酶对不同基质糖化力的比较 3 种根霉对 6 种不同淀粉基质(可溶性

淀粉、马铃薯淀粉、甘薯淀粉、玉米淀粉、大米淀粉、高粱淀粉)都能水解,但在最初 1 小时内,对大米淀粉的水解力略差,与 Phillips^[17] 的结果相符,时间久时各菌对各种原料的糖化结果大致相同(表 3),并经纸谱鉴定几乎全是葡萄糖,可见根霉淀粉葡萄糖苷酶对原料的选择性不强,应用范围广泛。

7. 酶液和风干曲的稳定性 酶液即麸

表 3 三种根霉淀粉酶对不同基质糖化力的比较

菌 种	糖化时间 (小时)	可溶性淀粉	马铃薯淀粉	甘薯淀粉	玉米淀粉	大米淀粉	高粱淀粉
<i>Rh. japonicus</i> 3.849	1	4.00	4.10	4.05	4.10	3.20	3.80
	4	4.40	4.35	4.50	4.40	4.15	4.40
<i>Rh. tonkinensis</i> 3.1175	1	3.95	3.95	3.95	3.70	3.55	3.85
	4	4.25	4.15	4.30	4.25	3.90	4.15
<i>Rh. chinensis</i> 3.2746	1	3.00	3.05	3.00	3.20	2.95	3.20
	4	4.40	4.65	4.55	4.25	4.15	4.25

曲浸液,加甲苯作防腐剂,贮存在冰箱内,连续测定 7 天(糖化时间改为 30 分钟),其酶活性很稳定,没有丝毫失活现象(表 4),这样,对大量的试验带来很大的方便。在生产上应用的是风干曲,为了解其贮存期

间酶的稳定性进行了贮存试验,结果说明:3.2746 的稳定性最强,贮存 1 个月后保留 100% 的酶活性,贮存两个月后比对照略低;3.849 和 3.1175 的稳定性略差,贮存两个月后只有对照 85% 的酶活力(表 5)。

表 4 贮存时间对酶液糖化力的影响

菌 种	贮 存 时 间 (天)				
	对 照	1	3	5	7
<i>Rh. japonicus</i> 3.849	2.90	2.90	2.85	2.90	2.90
<i>Rh. tonkinensis</i> 3.1175	3.30	3.35	3.40	3.35	3.30
<i>Rh. chinensis</i> 3.2746	1.60	1.65	1.60	1.60	1.60

表 5 贮存时间对风干曲糖化力的影响

贮存时间 (天)	菌 种					
	<i>Rh. japonicus</i> 3.849		<i>Rh. tonkinensis</i> 3.1175		<i>Rh. chinensis</i> 3.2746	
	糖化力	相对比	糖化力	相对比	糖化力	相对比
对照	3.50	100	3.35	100	2.00	100
30	3.26	93.1	3.20	95.5	2.00	100
60	3.00	85.7	2.85	85.0	1.92	96

討 論

Rhizopus delemar 和 *Rh. javanicus*, 在霉菌糖化法制酒精方面, 早已被认为是糖化力很强的生产用菌。Phillips^[17]研究了 *Rh. delemar* 由淀粉形成葡萄糖的酶, 把它叫做 gluc-amylase, 能将淀粉 100% 的水解成葡萄糖。渡部在研究 *Rhizopus* 属的糖化型淀粉酶时, 也选出活性最强的 *Rh. javanicus* sp. 3。我们筛选的 150 株根霉中, 也包括国内外的 5 株 *Rh. delemar* 和 2 株 *Rh. javanicus*, 但它们的糖化力大多属于中等, 只有 1 株 *Rh. delemar* 较强。我们选出的糖化力最强的根霉 *Rh. japonicus* 3.849 和 *Rh. tonkinensis* 3.1175, 比较强的 *Rh. delemar* 的酶活力要高。日本的糖化型淀粉酶制剂商品制造用菌为 *Rh. niveus*^[18], 根据山本义彦^[19]的分类, 它属 *Rh. chinensis* 群。所以我们在选种时也注意到这类菌, 在初筛时, 发现 *Rh. chinensis* 大多不是酶活力很强, 但同时又作了加大酶量 (2 毫升) 的比较, 发现 *Rh. chinensis* 在酶量大时活性也很强, 同时知道它生长快、易繁殖、生长时耐高温, 所以也就选了 1 株。

在酶性质的研究中, 也发现 *Rh. chinensis* 的性质和其它两菌不同, 其特点为耐高温、稳定性强, 这点可能与此菌生长最高温度偏高 (能在 45°C 生长) 有关。相应的 3.849 (生长温度范围 15—42°C) 和 3.1175 (生长温度范围 10—40°C) 的生长最高温度较低, 酶作用的最适温度也偏低, 是否为普遍规律有待进一步研究。

我们选出的这 3 株根霉的生长情况也不大相同, 在斜面上都是孢子长的比较多, 尤以 3.2746 孢子最多, 菌丛呈黑灰色。在

锥形瓶麸皮培养基上生长, 特征都有很大差别, 3.849 在 60 小时左右成熟时, 仅长些很短的白菌丝, 无孢子囊或很少, 但它有厚膜孢子也能繁殖; 3.1175 培养 2 天时长有 1.2—1.5 公分高的白菌丛, 以后逐渐长满黑色孢子囊。3.2746 繁殖最快, 1 天就长满白菌丝, 2 天长满孢子囊, 灰黑色菌丛高达 4 厘米。

参 考 文 献

- [1] 陈陶声: 化学世界, (5):195—199, 1963.
- [2] 佐藤友太郎: 食品工业 4:8, 1961.
- [3] 铃木英雄、中谷正、田边脩: 发酵协会志, 21:167—172, 1963.
- [4] 渡部一穗、富金厚孝: 发酵工学杂志, 41:493—498, 1963.
- [5] 渡部一穗、富金厚孝: 发酵工学杂志, 41:498—500, 1963.
- [6] Kim, S. H., Lee, S. R. and Jhon, N. S.: J. Korean, Agric. Chem. Soc., 3:9, 1962; Chem. Abstr., 58:8123, 1963.
- [7] Hayashibora I.: Japan, 10836'(63), July 1, Appl. Oct., 18, 1960.
- [8] Lenney, J. F. and Shively, L. R.: U. S. 3,039,936, June 19, 1962. Appl. June 7, 1960.
- [9] Miles Chemical Co.: Food Engineering, 33:102, 1961.
- [10] 铃木繁男: 粮食, 6:8—20, 1963.
- [11] Suzuki, S.: Die Stärke, (9):285—293, 1964.
- [12] 乐华爱、方心芳: 微生物学通讯 1:86—89, 151—168, 1959.
- [13] Partridge, S. M.: Biochem. J., 42:238—248, 1948.
- [14] Partridge, S. M.: Nature, 164:443, 1949.
- [15] 佐藤友太郎: 发酵协会志, 19:299—309, 1961.
- [16] 北原觉雄等: 蛋白质、核酸、酵素, 7:213—224, 1962.
- [17] Phillips, L. L. and Caldwell, M. L.: J. Amer. Chem. Soc., 73:3559—3563; 3563—3568, 1951.
- [18] 野本正雄: 蛋白质、核酸、酵素, 5:593—605, 1960.
- [19] Yamamoto, Y.: Jour. Fac. Agric. Hokkaido Imp. Univ. 28:1—327, 1930.

STUDIES ON THE *RHIZOPUS*

IV. THE AMYLOGLUCOSIDASES OF *RHIZOPUS*

YUE HUA-AI, HSIEH YUE-MEI, CHANG SHU-CHENG AND FANG SIN-FANG

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking*)

The purpose of this study was to find out the amyloglucosidase-producing abilities of the various species in the genus *Rhizopus* and to select out the strains which yielded comparatively powerful saccharifying enzymes.

Among 150 strains of *Rhizopus* studied, three strains giving excellent amyloglucosidases were obtained, they were: *Rh. japonicus* AS 3.849, *Rh. tonkinensis* AS 3.1175, and *Rh. Chinensis* AS 3.2746.

The optimum pH for these amyloglucosidases was found to be within 4.5 to 5.0. The optimum temperature varied with strains, generally, 50—55°C was the best. The enzyme from AS 3.2746 was

the most stable and heat-resistant.

The action of these enzymes was not specific on the sources of starch, for six different starches (soluble, potato, sweet potato, corn, rice and sorghum) could all be hydrolyzed to glucose.

The enzymes from these three *Rhizopus* species each with certain characteristic properties. In general, the saccharifying power of the amyloglucosidase from AS 3.849 was the best, and the next came that from AS 3.1175 while the enzyme from AS 3.2746 was the most stable and heat-resistant. Although the last one had the lowest primary saccharifying rate, but AS 3.2746 was a fast growing organism.