

根霉的研究*

V. 根霉麸麴的扩大培养和浓淀粉液的糖化

乐华爱 谢玉梅 陆东莱 方心芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文研究前报^[1]选出的根霉的扩大培养和麸麴浸液对浓淀粉液的糖化作用。

麴盘扩大培养时,水分越多糖化力越强,一般配比为麸皮:水=1:1.5。最适培养时间因菌而异,通常在 25—28℃ 温室培养 36—48 小时,使菌旺盛生长至成熟,糖化力已达高峰,即可升温干燥。

60% 或 30% 马铃薯淀粉的液化,采用细菌淀粉液化酶,30% 或 15% 浓淀粉液的糖化用根霉麸麴浸液,其转化率达 96.7%—99.1%,纸谱鉴定在后期为纯葡萄糖。

根据几方面性能的比较,这 3 株根霉各有特点。在最适的条件下, *Rhizopus japonicus* AS 3.849 的糖化速度最快,转化率最高,产品也最纯,但此菌培养条件要求严格。 *Rh. tonkinensis* AS 3.1175 在温度较低、湿度较小时,比其它菌生长略快。 *Rh. chinensis* AS 3.2746 虽然糖化力较前二者略低,但孢子特多,生长迅速,容易制麴,因而宜于工业应用。

为了用酶法制葡萄糖,我们选出了 3 株淀粉葡萄糖苷酶很强的根霉,将其酶性质进行了比较^[1]。本工作是将选出的 3 株根霉做进一步的研究,为葡萄糖等厂使用提供参考,本文报导实验室阶段固体培养根霉麴的扩大培养和浓淀粉液的糖化。

方 法

麴盘扩大培养 锥形瓶麸皮种子同前报^[1],只是培养好后倒出,包在纸内风干备用。麴盘扩大培养时,麸皮培养基水分用量,如无特殊说明则为麸皮:水 = 1:1.5,在压力 1 公斤/平方厘米下,灭菌 30 分钟。直接装盘法为麸皮冷至 40℃ 左右,按每盘 1 斤麸皮计算,直接分装入 53 × 28 × 4 厘米的木盘中,在 30℃ 左右时接种上述麸皮种子 0.3—0.5%,先在麴盘一端 1/6 处将种子拌匀,再撒在整个麴盘上搅匀,25—28℃ 恒温室内培养,并保持室内相对湿度为 70—90%。开始升温时每 2 小时记录品温、室温和相对湿度,升

温达 40—45℃ 时,倒盘、错盘或翻盘,使其不超过该菌的最高生长温度 (3.1175, 40℃; 3.849, 42℃; 3.2746, 45℃)。至 48 小时左右菌生长成熟。品温下降后,升高室温至 35℃ 使其干燥,即为风干麴。堆积法是将麸皮培养基冷到 30℃ 左右,按种 0.3—0.5% 的麸皮种子,堆放在锅内,25—28℃ 温室堆积培养 14 小时左右,刚刚开始升温时,按每份 1 斤分装在木盘内,其他操作同上。每瓶 5 克原料的根霉麴风干后实为 4 克,成麴率为 80%,所以麴盘扩大试验时也称风干麴 4 克,进行糖化力试验,即将风干麴 4 克磨碎加水 100 毫升,30℃ 浸提 1 小时,滤液即为酶液,按前报方法^[1]测定糖化力。

细菌淀粉液化酶的制备 用 200 毫升锥形瓶,每瓶装 50 毫升玉米胚芽粉培养基 (玉米胚芽粉 5%, 胚芽饼粉 1%, 黄豆饼粉 2.5%, 玉米粉 1.5%, pH 6.2), 在 1 公斤/平方厘米压力下灭

* 孙荣钦同志协助纸谱摄影,黎育沃同志曾参加部分工作,在此一并致谢。

本文 1965 年 11 月 8 日收到。

菌 30 分钟, 接种枯草菌 AS 1.210 (上海溶剂厂生产用, 菌原号为 BF7658), 27℃ 温室, 200 次/每分钟旋转摇床培养 3 天, 滤液即为细菌淀粉液化酶。

浓淀粉液的液化 称马铃薯淀粉 90 克, 加蒸馏水 135 毫升、搅匀, 加细菌淀粉液化酶 9 毫升 (酶效价为 53, 即每毫升培养液每小时能转化 53 克淀粉的酶液, 用料为原料重量的 1/10), 加沸水 135 毫升搅匀, 加热至 70℃, 维持 13 分钟, 遇碘呈紫红色, 再煮沸 2 分钟, 共 15 分钟, 冷至 20℃ 使总体积达 300 毫升, 此时为均匀透明的流动态, 用 3608-56 恩格勒粘度计测粘度, 在 1 公斤/平方厘米加压灭菌 30 分钟后仍为均匀的流动态, 即为 30% 马铃薯淀粉液化液。60% 马铃薯淀粉的液化液的制备为: 称马铃薯淀粉 150 克, 加蒸馏水 80 毫升, 并增加酶液用量为原料的 1/5, 其它操作同上。

浓淀粉液的糖化 用 25 毫升比色管, 加 30% 或 60% 的马铃薯淀粉液化液 10 毫升, 加 0.2M pH4.5 醋酸盐缓冲液 4 毫升、酶液 6 毫升、50℃ 糖化, 前 6 小时每小时取样 1 毫升, 以后在 18、24、48、72 小时各取样 1 毫升, 放沸水中煮沸, 稀释至 10 毫升, 取 3 或 1.5 毫升用次亚碘酸钠法定糖。

结 果

(一) 麴盘扩大培养试验

1. 水分对根霉麴的制造和糖化力的影响 为了解水分对根霉生长和糖化力的影响, 我们首先用 250 毫升锥形瓶, 加入 5 克麸皮和不同比例的水分 (麸皮: 水 = 1:0.5、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0), 在 1 公斤/平方厘米压力下, 灭菌 30 分钟, 接种根霉后在 30℃ 下培养, 每天记录生长情况, 结果, 水分越多, 生长越快而旺盛。其中 3.2746 对水分要求较低, 虽然也是水分多时生长较快、菌丛较高, 但在培养 4 天时都长得较好。3.1175 对水分要求略高, 以麸皮: 水为 1:1.5 和 1:2.0 者生长旺盛; 1:0.8 和 1:1 者生长略差; 1:0.5 和 1:0.6 者生长很弱。

3.849 对水分要求最高, 只有 1:2 者生长旺盛, 1:1.5 者尚可, 其他则生长很弱。根据 30℃ 培养 4 天的风干麴糖化力测定结果 (图 1), 可见水分与糖化力有很大的关系, 水分太少时活力显然很低, 其最适水分根据菌种不同而有差别。3.849 在生长方面对水分要求最高, 并且水分越多糖化力也越强。3.1175 和 3.2746 在生长方面对水分要求较低, 则以 1:1 左右时最好, 水分再多, 糖化力反而略微下降, 这一点与生长情况不一致, 可能是菌太老时酶活力有所降低之故。

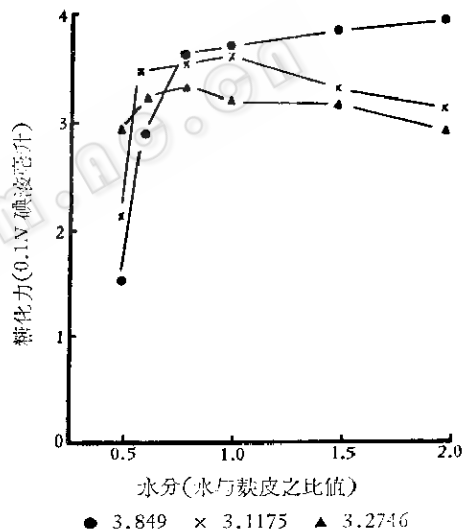


图 1 锥形瓶培养水分对根霉糖化力的影响

锥形瓶内水分试验的结果, 给我们表示出了一定的趋势, 但在麴盘扩大培养时条件与锥形瓶不可能完全一样, 所以还需要在麴盘条件下, 再试验水分与菌的生长和糖化力的关系。根据品温变化和菌丛生长情况看来, 在扩大培养时, 3 个菌都是水分越多生长越快, 升温也越高。培养 40 小时后风干麴糖化力测定结果 (图 2), 表明 3 菌都是水分越多, 糖化力越强, 这一点与锥形瓶的试验结果不完全一致, 可能是因为麴盘培养时, 空气接触面大, 水分易损失的缘故。3.1175 和 3.2746 在水分为 1.0—

2.0 时,糖化力差别不大,而 3.849 则差别悬殊,这再一次证明了 3.849 对水分要求是较高的。

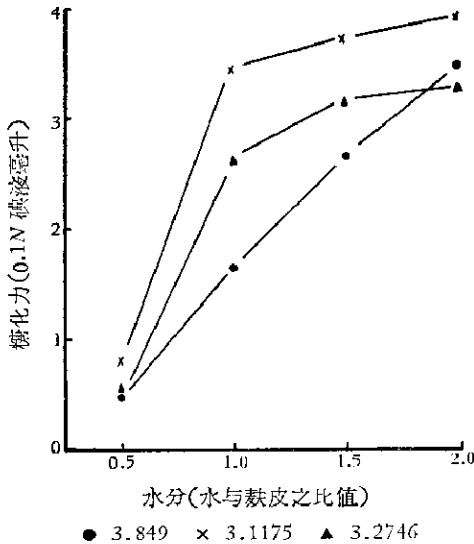


图2 叠盘培养时水分对根霉糖化力的影响

2. 直接装盘法和堆积法的比较 由于水分太多,易于污染杂菌,而且麸皮不易松散,所以采用 1:1.5 的水分。分为直接装盘法和堆积法,尽量保持室内湿度较大,使水分不易损失,并不断观察其升温 and 生长

情况与糖化力的关系。一般在 14—16 小时开始升温; 24 小时左右温度达到最高峰;在升温达高峰时菌的生长显著旺盛,菌丛很快布满全盘; 40 小时左右达到成熟,其中 3.2746 和 3.1175 成熟较快, 3.849 略慢。堆积法比直接装盘法略快,尤以 3.2746 最显著(图 3、图 4)。图 5、图 6 表示糖化力测定结果, 3 菌在 24 小时以前糖化力直线上升,此后则上升较缓慢,这与菌在 24 小时左右突然迅速生长相一致。3.849 培养时间越长,糖化力越强, 3.2746 和 3.1175 在 40 小时以后糖化力变化就不大了。直接装盘法和堆积法糖化力差别不大,只是 3.2746 在堆积法初期,糖化力较直接装盘法略高,这也和生长情况一致。根据以上结果看来,最适培养时间因菌而异,通常可在 25—28℃ 温室培养 36—48 小时,使菌旺盛生长至成熟,此时糖化力已达高峰,即可升温干燥。

(二) 浓淀粉液的糖化

根霉对低浓度的淀粉液(1%),能迅速分解为葡萄糖,除因有大量的淀粉葡萄糖

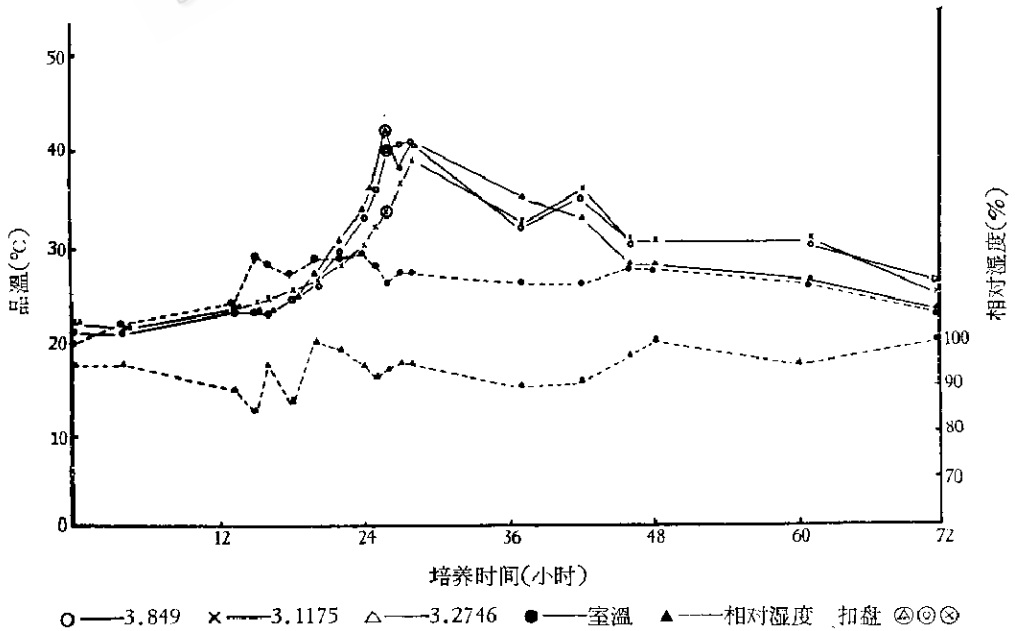


图3 直接装盘法培养期间品温变化情况

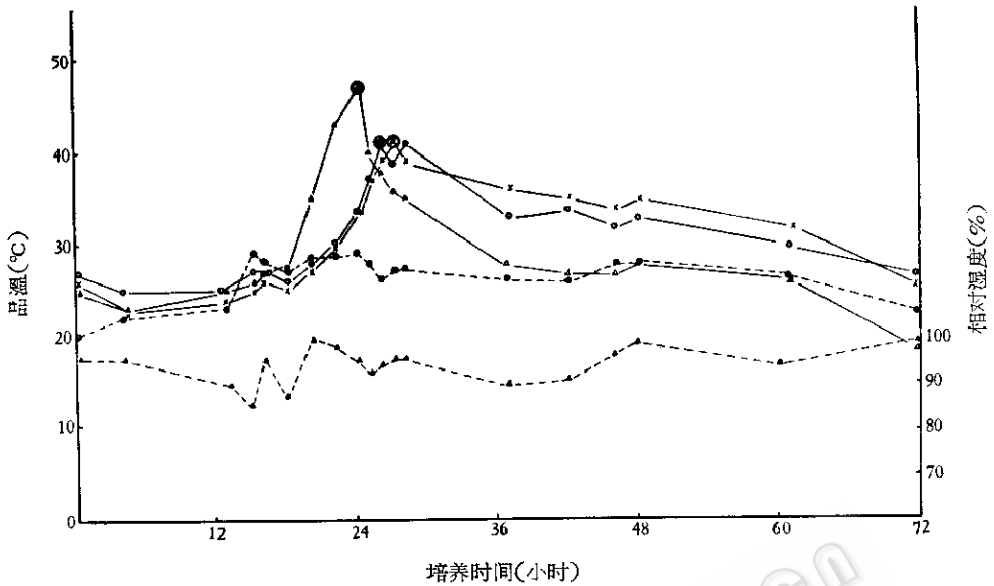


图4 堆积法培养期间品温变化情况

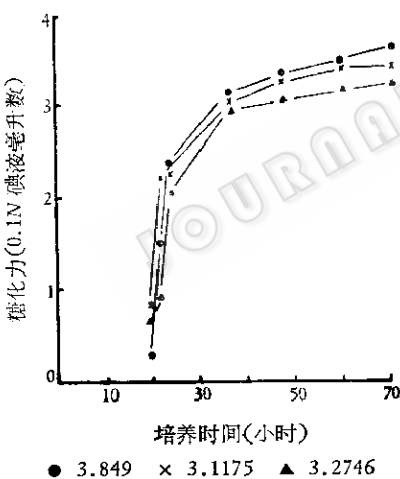


图5 直接装盘法培养时间和糖化力的关系

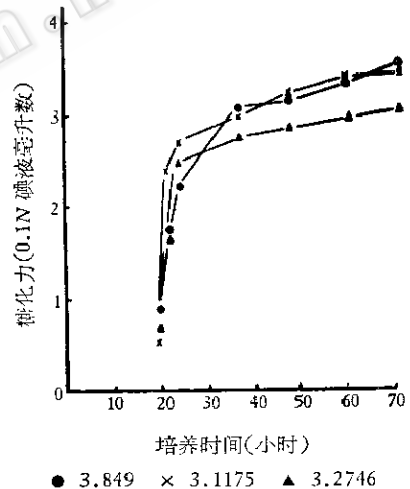


图6 堆积法培养时间与糖化力的关系

苷酶外,也因为有不同量的 α -淀粉酶协助之故。但对高浓度的淀粉液,则因根霉的 α -淀粉酶活性较弱,而达不到迅速液化的目的。所以要使浓淀粉糖化,首先要进行浓淀粉的液化。

我们采用上海溶剂厂的细菌淀粉液化酶生产用菌,用该厂的副产品玉米胚芽粉培养基和陈希浩等试验的适宜培养基,用摇床培养法进行了比较,用上海溶剂厂的

测定方法¹⁾,结果以玉米胚芽粉培养基,27℃摇床培养3天者最好(表1)。用此酶价为53的酶液,使约30%和约60%的浓淀粉液化,酶液用量分别为原料重量的1/10或1/5,将细菌培养液加入未糊化的淀粉中,按方法中所述操作,使糊化和液化同时进行,可以不通过粘稠的固态阶段,最后

1) 上海溶剂厂:细菌淀粉酶技术鉴定报告书,1964。

表 1 培养基对枯草菌 AS 1.210 淀粉液化酶的影响

培养基	培养时间 (天)	酶 价*
玉米胚芽粉	2	26
	3	53
3%豆饼粉+5%麸皮	2	19
	3	19

* 酶价=每毫升培养液每小时能转化的淀粉克数。

成透明的流动态,遇碘呈紫红色,恩格勒相对粘度分别为 1.470 和 4.019。

根霉麸麴浸液糖化 15% 或 30% 的马铃薯淀粉液化液,同时用酸水解法测其总糖量,实际分别含糖 14.63% 或 27.65%,

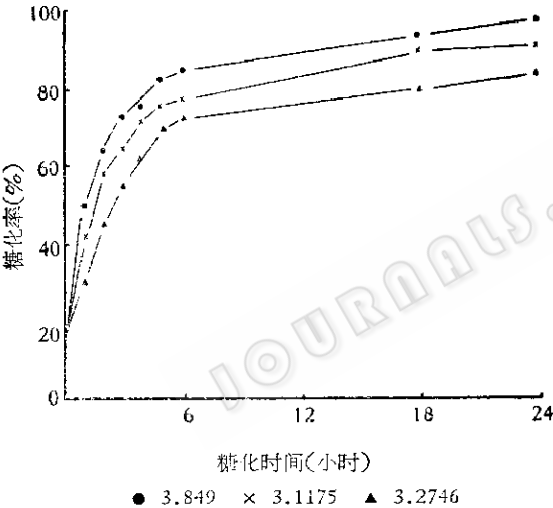


图 7 15%马铃薯淀粉糖化结果

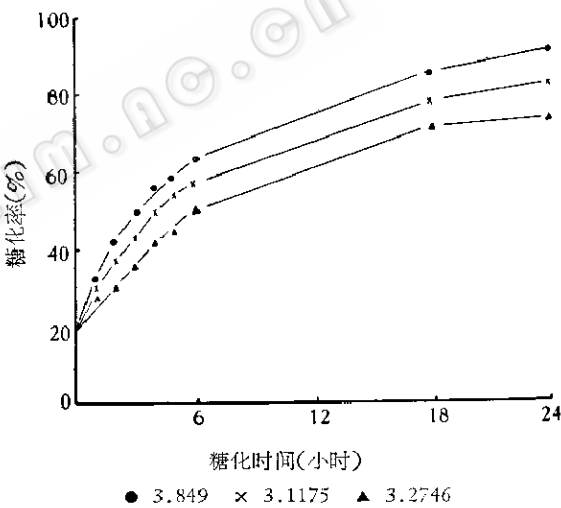


图 8 30%马铃薯淀粉糖化结果

表 2 3 种根霉对浓淀粉液的糖化结果(糖化率)

淀粉浓度 (%)	糖 化 时 间 (小时)	<i>Rh. japonicus</i> 3.849	<i>Rh. tonkinensis</i> 3.1175	<i>Rh. chinensis</i> 3.2746
15	6	85.2	76.9	71.8
	18	94.0	94.5	88.2
	24	97.5	95.4	93.4
	48	97.1	97.4	96.4
	72	99.1	97.4	94.4
30	6	63.0	57.0	50.0
	18	85.6	78.1	71.6
	24	90.1	82.5	73.4
	48	94.5	91.2	88.9
	72	96.7	92.5	92.3

$\frac{\text{酶糖化的总糖量}}{\text{酸水解的总糖量}} \times 100 = \text{糖化率}$ 。就 3 种根霉的糖化速度而论, 3.849 最快, 3.1175 次之, 3.2746 初速度较慢, 但在后期逐渐赶上。3.849 的最高糖化率分别达 99.1 和 96.7% (图 7、8 和表 2)。根据纸谱分析结果, 在糖化初期, 产物中除了绝大部分是葡萄糖外, 还有微量的麦芽糖和一个未知点, 它可能是麦芽三糖, 但很快就消失了。15% 淀粉在糖化 6 小时以后, 3 菌的麦芽糖都消失(图 9a、b、c)。30% 淀粉的糖化, 3.849 和 3.1175 在 18 小时以后, 3.2746 在 24 小时以后, 麦芽糖消失, 终产物为纸谱

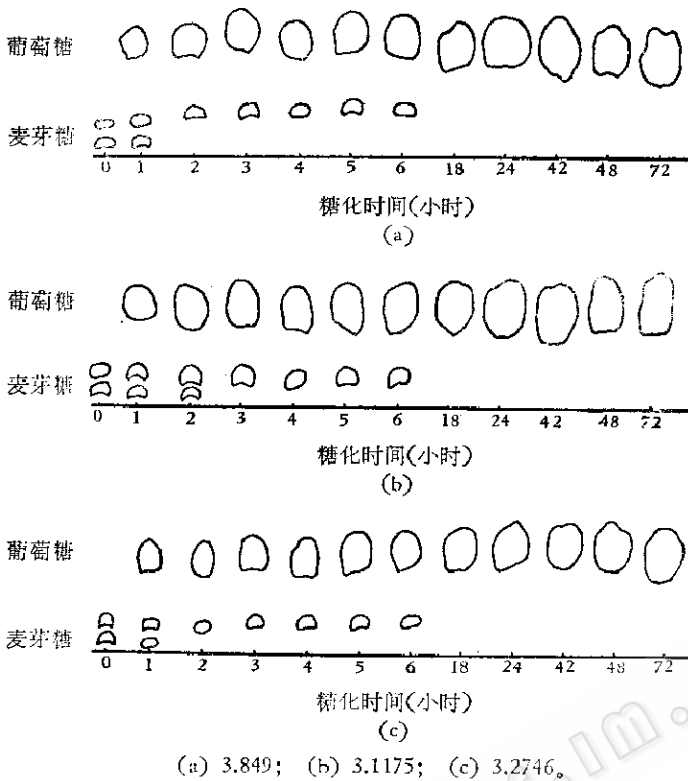


图9 15% 马铃薯淀粉糖化产物纸谱分析结果

纯的葡萄糖, 3.2746 在时间久时有聚合的倾向, 是否为糖苷转移酶的作用, 尚待进一步研究。

讨 论

小麴酿酒在我国有悠久历史, 根霉麴酿酒已在贵州等省推广应用^[2], 酿酒根霉麴在制造时水分用量仅 70—80%, 菌生长较差, 刚一结饼即成麴。而我们现在做根霉麴淀粉酶糖化试验, 在麴盘扩大时, 水分越多(至少 150%)越好, 而且需要使菌丛旺盛生长至成熟, 酶活力才强。这一点与酿酒根霉麴不同, 这也许是由于前者是做种子, 后者是提取酶, 其要求不同之故。但是这一点是值得提出的, 因为一般往往

以酿酒制麴操作进行。

在制麴过程中, 48 或 60 小时以后会出现污染现象, 其中主要的污染菌为链孢霉和黄麴霉, 所以应尽量注意防止它们的侵入。在菌成熟时就应该降低湿度, 提高温度, 立即进行干燥。

与前报^[1]结果综合起来看, 我们所选出的这 3 株不同种的根霉, 各有其优缺点。 *Rh. japonicus* AS 3.849 麴松散, 易干燥粉碎, 培养时间长时糖化力最强, 其优点是浓淀粉转化率最高和产品最纯, 其缺点是对水分要求最高以及时间久时易污染。 *Rh. tonkinensis* AS 3.1175 对水分要求不高, 水分少, 湿度小, 培养时间短时, 它的糖化力最高, 但此麴结成大

块, 弄碎干燥较麻烦, 糖化最适温度狭窄, 对高温耐力差, 糖化时控制温度必须非常严格。 *Rh. chinensis* AS 3.2746 虽然糖化力较前二者略低, 初速度较慢, 但它对水分要求很低, 孢子多, 易于繁殖, 生长迅速, 作麴容易, 不易污染, 而且其酶耐热, 稳定性较强, 是宜于工业应用的一个菌。具体应用时, 可根据生产条件的不同, 采用不同菌种。

参 考 文 献

- [1] 乐华爱、谢玉梅、张树政、方心芳: 微生物学报, 12: 185—191, 1966。
- [2] 周伍刚: 糖化麴, 172, 中国财经出版社, 1964。

STUDIES ON THE *RHIZOPUS*V. THE ENLARGED SCALE PREPARATIONS OF *RHIZOPUS* BRAN KOJI AND THE SACCHARIFICATION OF THICK STARCH LIQUORS BY THE KOJI EXTRACTS

YUE HUA-AL, HSIEH YUE-MEI, LU TUNG-LAI AND FANG SIN-FANG

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking)

The purpose of this study was to find out the proper conditions for the enlarged scale preparations of the *Rhizopus* bran koji by solid mash culture with the selected *Rhizopus* strains mentioned in the previous report and to examine the saccharification of the thick starch liquors by the koji extracts.

When trays were used to prepare koji on the an enlarged scale, the increase of moisture content tended to increase the saccharifying power of the koji extracts. Generally, a ratio of bran to water 1:1.5 by weight was suitable to use. The optimum culture time, however, varied with strains. Usually while maintaining a temperature of 25—28°C in the preparation room a culture time of 36—48 hours would be sufficient to allow the organisms to grow to maturity and the saccharifying power of the enzymes to reach the maximum, then the temperature should be raised to dry the product.

Thirty per cent or 60% potato starch was used to be liquefied by *Bacillus* amylase, and 15% or

30% starch liquors were saccharified by *Rhizopus* koji extracts. A conversion of 96.7—99% of the starch used was obtained. The final product in the saccharified solution was identified as pure glucose by paper chromatography.

Each *Rhizopus* strain had its special qualities. If superior production equipments were at one's disposal, *Rh. japonicus* AS 3.849 was the best, for it had both the fastest saccharifying rate and the highest conversion of starch, and yielded the purest product. But it demanded much stricter culture conditions. *Rh. tonkinensis* AS 3.1175 could grow at a faster rate than the other strains at a lower temperature and a lesser moisture content and was more resistant to contamination by other microbes. *Rh. chinensis* AS 3.2746 had more abundant spores, grew fast and was convenient for bran koji preparation and hence more suitable for industrial application.