

产生葡萄糖淀粉酶的红曲霉的筛选及其发酵条件的研究

何秉旺 郭君菁 方一澄 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

筛选出了红曲霉 AS 3.976 (*Monascus scrorubescens*) 和 AS 3.978 (*Monascus* sp.) 作为液体培养生产葡萄糖淀粉酶的优良菌种, 并找出了适合的培养基及培养条件。在含玉米粉 3%、豆饼粉 1.5% (pH 4.5) 的培养基中, 于 30—35°C 培养 72 小时, 每毫升培养液的滤液酶活力可达 260 单位。酶作用的最适温度为 50°C, 最适 pH 为 4.5, 每克干淀粉用酶量 0.5 毫升, 糖化 32% (w/w) 的浓淀粉液化液, 经 40 小时, 葡萄糖值可达 99 以上。

利用霉菌的糖化型淀粉酶 (即葡萄糖淀粉酶 Glucoamylase, EC 3.2.1.3) 水解淀粉生产葡萄糖的工艺较旧的酸水解法有很多优点: 水解率高, 能节约粮食, 降低成本, 提高产品质量。日本于 1960 年将全国的葡萄糖生产改用酶法, 当时是用根霉 (*Rhizopus*) 固体曲^[1]。其后, 欧美采用黑曲霉类 (*Asp. niger*; *Asp. phoenicis*), 液体深层培养生产葡萄糖淀粉酶^[2,3]。日本也采用黑曲霉类^[4] (*Asp. awamori*) 及拟内孢霉^[5] (*Endomycopsis*) 的液体培养法, 对根霉的液体培养也进行了研究^[6]。

乐华爱等于 1966 年研究了固体曲根霉糖化酶^[7]。后来, 我们进行了根霉液体培养条件的研究, 并与上海溶剂厂合作, 进行了利用酶糖化杂粮粉制造甲叉丁二酸的试验。为了寻找适于液体培养的产生葡萄糖淀粉酶活力强的菌种, 我们又筛选了一批糖化力高的黑曲霉, 但因转移葡萄糖苷酶含量高, 对制造葡萄糖不利。

考虑到我国福建、台湾等省一向利用红曲制酒, 李钟庆等曾测定了很多种红曲固体曲的糖化力^[8]。在此基础上, 我们从红曲霉中筛选了液体培养糖化力高的菌种,

并进行了液体培养条件的研究。

材料和方法

一、菌种

由我所保藏组供给。根据过去固体培养测定结果, 选糖化力较高的红曲霉共 95 株。

二、斜面种子培养

取麦芽汁斜面培养基, 在无菌条件下接种, 置 34°C 温箱中培养 4—6 天。

三、三角瓶液体培养基

①玉米粉培养基: 玉米粉 3%、豆饼粉 1.5%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 用 HCl 调 pH 4.5—5.0; ②胚芽饼培养基: 玉米胚芽饼粉 3%、豆饼粉 1%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, 其它无机盐同上, pH 4.5—5.0; 试验结果未注明均用②培养基。

四、培养条件

于 200 毫升三角瓶中加液体培养基 40 毫升, 加棉塞在 15 磅蒸汽压下灭菌 30 分钟, 冷却后在无菌条件下接种; 在旋转式摇床 (180 转/分) 上 30°C 振荡培养 72 小时, 过滤去掉菌丝体, 即为酶液。

五、葡萄糖淀粉酶活力的测定

本文 1973 年 2 月 8 日收到。

于 10 毫升带塞试管中依次加入 2% 可溶性淀粉液 5 毫升, 0.2M pH 4.5 的醋酸缓冲液 2 毫升, 蒸馏水 2 毫升(或 2.5 毫升), 在 50°C 恒温水浴中预热 5 分钟, 加酶液 1 毫升(或 0.5 毫升), 使总体积为 10 毫升, 保温 30 分钟, 立即取出置沸水中煮 10 分钟, 冷却, 取反应液 2 毫升, 于 50 毫升带塞三角瓶中, 依次加入 0.1N 的碘液 5 毫升, 0.15N 的 NaOH 液 5 毫升, 放在 20—25°C 暗处反应 15—20 分钟, 加 2N 的 H₂SO₄ 1 毫升, 用标准 0.05N 的 Na₂S₂O₃ 溶液滴定^[9]。同时取 5 毫升碘液(0.1N 碘液稀释 100 倍), 加 1 毫升反应液, 观察碘色反应。

在上述条件下, 酶水解 1% 可溶性淀粉, 每小时产生 1 毫克葡萄糖为 1 个酶活力单位。为方便起见, 直接用消耗的标准 0.05N 的 Na₂S₂O₃ 溶液的毫升数表示。

六、转移葡萄糖苷酶存在的测定

于 10 毫升带塞的试管中加 20% 的麦芽糖液 5 毫升, 0.1M pH 4.5 的醋酸缓冲液 3 毫升, 酶液 2 毫升, 在 50°C 恒温水浴中保温 24 (或 48) 小时; 然后用纸层析方法检查, 如果有异麦芽糖及潘糖出现, 就表示有转移葡萄糖苷酶的存在。

层析扩展剂为正丁醇: 吡啶: 水 = 6: 4: 3

(v/v) 上行 1—2 次。显色剂为苯胺-二苯胺^[10]。

用黑曲霉 AS 3.758 (泡盛曲霉 *Aspergillus awamori*) 酶液作用于麦芽糖形成产物中的异麦芽糖及潘糖作为纸层析对照样品。

实验结果

一、菌种的筛选

结果列入表 1。从中可以看出, 95 株菌中产酶活力在 3.0 以上的所占比例是相当大的; 玉米粉和胚芽饼粉培养基相比, 对 60 株菌复筛, 酶活力在 3.0 以上的分别有 55 株和 16 株, 产红色素的菌株分别为 42 和 29 株, 说明用玉米粉培养基产酶活力较高, 产红色素菌株也较多。

菌株产红色素对工业生产不利。依据碘色反应深, 产酶活力高, 又不产红色素的原则, 我们反复筛选得到五株较好的红曲霉(表 2)。其中以 AS 3.976 (*Monascus serorubescens*) 和 AS 3.978 (*Monascus* sp.) 为最好。下面的实验用这两株菌进行。

表 1 95 株红曲霉的筛选结果

试验菌株数	培养基	酶活力 (0.05N Na ₂ S ₂ O ₃ 毫升数)			酶液颜色	
		1—2	2—2.9	3.0 以上*	红	无色
95	玉米粉培养基	7	33	55	76	19
66	玉米粉培养基	3	2	55	42	18
	胚芽饼粉培养基	1	43	16	29	31

* 3.0 毫升相当 135 单位/毫升酶液。

表 2 五株红曲霉优良菌株的比较

菌号	菌名	试验次数 (I)	酶活力在 3.0 以上的次数 (II)	平均酶活力	II/I
3.567	<i>Monascus</i> sp.	25	17	3.07	0.68
3.921	<i>Monascus anka</i>	17	4	2.84	0.24
3.976	<i>Monascus serorubescens</i>	26	20	3.09	0.77
3.978	<i>Monascus</i> sp.	26	19	3.10	0.73
3.2636	<i>Monascus anka</i>	22	15	3.00	0.68

二、红曲霉的培养条件

1. 最适培养时间: 在不同培养时间取样测定酶活力和 pH 的结果(表 3)指出, 培养 72 小时产酶活力最高。

表 3 红曲霉的最适培养时间

培养时间 (小时)	48	72	96	114
酶活力	1.45	2.90	2.70	2.75
pH 值	5.8—6.4	6.4—7.0	7.8—8.0	8.2—8.5

2. 最适培养温度: 红曲霉分别在 28、30 和 37°C 培养, 酶活力分别为 2.70、2.83 和 2.85。从结果看差别虽然不大, 但比较起来还是在 30 和 37°C 培养酶活力较高。

3. 起始 pH 对产酶的影响: 在制备培养基时用 HCl 调成不同 pH, 培养后测定酶活力及 pH。结果(表 4)指出, 在所测定的范围内起始 pH 对产酶影响不很大, 在 pH 3.8 产酶活力稍高。

表 4 起始 pH 对菌产酶的影响

起始 pH	3.0	3.8	4.4	4.8	6.0
酶活力	2.9	3.10	2.83	2.83	2.83
培养后的 pH	6.7	7.0	7.2	7.2	7.7

4. 通气量对产酶的影响: 在 500 毫升三角瓶中加入不同体积的培养基, 经培养后测定其酶活力。结果(表 5)表明, 随着培养体积的增加, 通气量逐减, 酶活力也随之下降, 可见通气量高对产酶有利。

表 5 通气量与产酶活力的关系

培养基体积 (毫升)	50	100	150	200
酶活力 (两次平均值)	3.05	2.90	2.85	2.75

5. 不同碳源对产酶活力的影响: 培养基为 NH_4NO_3 0.3%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 再加上 2% 的不同碳源, 用 HCl 调 pH 4.4, 培养, 测定其酶活力和 pH。

表 6 碳源对红曲霉生长和产酶的影响

碳源种类	生长情况	酶活力	pH
葡萄糖	块状有絮, 量少, 深黄色	0.35	4
麦芽糖	同上, 生长稍多	0.30	4
蔗糖	同上, 黄色稍浅	0.20	4
乳糖	极微	0.93	5—6
糊精	块状有絮, 深黄色	0.45	5—6

由结果(表 6)看出, 红曲霉利用这几种碳源产酶活力都很低, 生长也较差, 麦芽糖通常不够纯, 所以生长稍好, 乳糖不能被利用。

6. 不同氮源的比较: 培养基的基本成分为: 马铃薯淀粉 2%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 另外分别加入表内的不同氮源, 用 HCl 调 pH 4.4, 培养, 测定酶活力。结果(表 7)表明, 红曲霉在加豆饼粉的培养基上生长良好, 酶活力也最高。加其它的氮源一般生长不好, 酶活力也很低, 特别差的是用无机盐作为氮源。从菌体颜色看, 不同氮源对色素的产生影响较大。

表 7 用不同氮源培养红曲霉产酶的比较

氮源种类	含量(%)	酶活力	pH	菌体生长情况
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.4	0.55	2—3	菌丝体绒球状
NaNO_3	0.5	0.92	5—6	菌丝体块状, 深红色
NH_4NO_3	0.3	0.40	3	菌丝体絮状, 生长少, 黄色
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	0.2	0.88	6—7	菌丝体絮状及块状
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.4	1.43	5.0	菌丝体块状, 小球, 粉红色
蛋白胨	0.5	1.75	4—5	菌丝体块状, 小球, 微黄色
豆饼粉	0.8	2.05	5.0	菌丝体块状, 粉红色

7. 以玉米粉、胚芽饼粉为碳源, 配加不

同氮源的试验：培养基含玉米粉（或胚芽饼粉）3%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%，自然 pH，另加表内不同的氮源，测得结果见表 8。

表 8 不同氮源及其用量对产酶的影响

碳 源		氮 源		酶活力	pH
种类	含 量 (%)	种 类	含 量 (%)		
玉 米 粉	3	豆 饼 粉	0.5	2.25	5—6
		豆 饼 粉	1.0	3.0	7
		豆 饼 粉	1.5	3.2	6.7
		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2	0.35	3
		NaNO_3	0.2	2.30	7
胚 芽 饼 粉	3	豆 饼 粉	0.5	2.53	8
		豆 饼 粉	1.0	2.68	8
		豆 饼 粉	1.5	2.93	7.7
		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2	2.15	7
		NaNO_3	0.2	2.13	7

由表 8 的试验结果看出，因玉米粉含氮量较低，加上上述氮源对酶的产量影响较大，最终 pH 均稍低，其中以加 1.5% 豆饼粉产酶活力最高，终 pH 6.7，酶液也较清；胚芽饼粉，加上上述氮源时酶活力一般稍低，差别也较小，终 pH 高，酶液混浊不清，不便使用。

8. 玉米粉与胚芽饼粉的配比试验：考虑到胚芽饼粉含氮量较丰富，能否代替豆饼粉作氮源，故进行这个试验。结果见表 9。

表 9 玉米粉与胚芽饼粉的配比

玉米粉 (%)	胚芽饼粉 (%)	酶活力	碘色反应	pH	酶液清浊
1	4	2.90	紫红	5.7—7.7	混浊
2	3	3.03	浅红	6.2—6.4	稍混浊
3	2	3.0	极浅红	5.8	清
4	1	2.75	浅红	5.4	极清

表 9 中的结果表明，玉米粉与胚芽饼粉之比以 2 比 3 或 3 比 2 产酶活力较高。随玉米粉的含量增加，pH 明显下降，酶液逐渐变清，碘色反应颜色变浅。特别值得指出的是，在本试验中，碘色反应与酶活力高低没有相关性。看来玉米粉培养基有利于 α -淀粉酶的形成。

以玉米粉为主要原料，配合不同量的豆饼粉和胚芽饼粉的测定结果（表 10）表明，玉米粉同时配合豆饼粉和胚芽饼粉，产酶活力较高，但缺点是酶液混浊。

表 10 三种原料配比试验结果

玉米粉 (%)	豆 饼 粉 (%)	胚芽饼粉 (%)	酶活力	pH
2	1.0	0.5	3.05	5.7—7.7
2	0.5	1.0	3.05	7.2—7.7
3	1.0	0.5	3.13	6.4—7.0
3	0.5	1.0	3.08	5.1—5.4
3	1.0	1.0	3.23	6.7

三、培养基的简化和代用原料的试验

在进行扩大试验以前，考虑到不同地区和不同季节原料的来源问题，我们还进行了简化培养基和代用原料的试验，以降低生产成本。

1. 减少磷酸盐和镁盐的用量：过去的配方 KH_2PO_4 占 0.2%，约为培养基成本的一半。多次试验证明，减少无机盐（磷、镁）

表 11 培养基中不加镁磷的试验结果

序 号	培养基	AS 3.976 酶活力	AS 3.978 酶活力	备 注
I	完全	2.65	2.60	为两次平均值
	缺磷镁	2.60	2.65	
II	完全	2.81		为四次平均值
	缺磷镁	2.83		
III	完全	2.75	2.72	为九次平均值
	缺磷镁	2.73	2.74	

用量对酶活力无显著影响,甚至培养基中不加磷酸盐和镁盐对产酶活力也无影响(表 11)。但这是用北京自来水试验,含无机盐量较高。其它地区自来水含无机盐有高低,使用前须进行具体测定。

2. 豆饼粉的代用品: 以麸皮、米糠、红曲霉的干菌丝体(上海溶剂厂进行红曲大罐发酵时滤出的菌丝体,烤干,有香味)代替豆饼粉进行了试验。对十九种含量配方的培养液测定酶活力的结果指出,以 3% 麸皮、3% 的米糠、2.5% 的红曲霉干菌丝体代替 1.5% 的豆饼粉,酶活力均很高,分别为 2.90、2.70 和 2.90。

3. 玉米粉的代用品: 培养基中加入 3% 的白薯粉或木薯粉代替玉米粉的试验结果指出,因白薯粉及木薯粉含氮量低,需要配合 3% 的豆饼粉或 3% 的红曲霉干菌丝体,酶活力一般可达 2.65。

四、红曲霉葡萄糖淀粉酶的性质

1. 最适温度: 以 1% 可溶性淀粉为底物,在不同温度下保温 30 分钟,取样测定酶活力,结果(表 12)表明,红曲霉糖化酶最适反应温度在 45—50℃ 之间,温度越低碘色反应颜色越浅。可见 α-淀粉酶在低温时作用较强。

表 12 酶的最适作用温度

反应温度(°C)	酶活力	碘色反应
30	2.05	无色
35	2.50	无色
40	2.60	无色
45	2.90	无色
50	2.90	无色
55	2.85	极浅红
60	2.45	浅紫
65	2.35	深紫
70	1.10	深紫

2. 糖化的最适 pH: 用 0.2M 的醋酸缓冲液调 pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5; 用 0.2M 的磷酸缓冲液调 pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5; 分别测

定了 AS 3.976 和 AS 3.978 两株菌的酶活力。试验结果(图 1)表明,红曲霉糖化酶水解淀粉的最适 pH 在 4.5—5.0 之间; 在 pH 6.5 处有一个不太明显的小峰,可能是 α-淀粉酶作用的最适 pH。

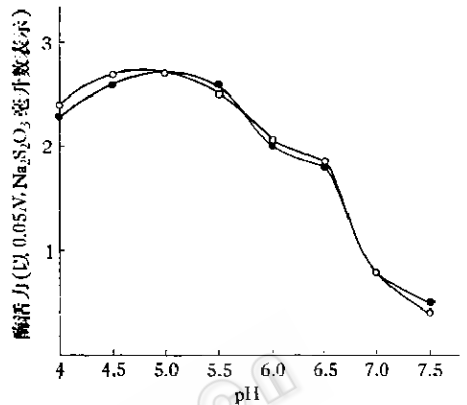


图 1 红曲霉糖化酶的最适 pH

●—● AS 3.976, ○—○ AS 3.978

3. 酶对热的稳定性试验: 将红曲霉酶液各 10 毫放入带塞的试管中,于 45、50、55 和 60℃ 恒温水浴中保温,在不同时间取样测定酶活力,从结果(图 2)看出,经不同温度处理后,酶活力都有不同程度地下降。在 45℃ 处理 6 小时酶活力降为原酶的 85%; 经 50℃ 处理 6 小时酶活力降至 34.6%; 在 55℃ 处理 2 小时酶活力只剩下 12.8%; 60℃ 处理 1 小时酶活力就只剩下 12.1%。

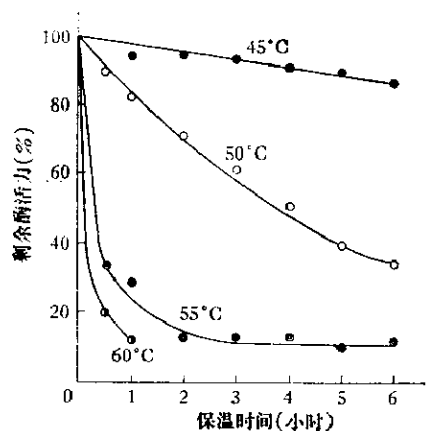


图 2 酶对热的稳定性

4. 转移葡萄糖苷酶的测定：如果酶液中混杂着转移葡萄糖苷酶，淀粉水解产物中将出现异麦芽糖、潘糖等副产物，这对原料的有效利用和产品质量都是不利的，为此对产葡萄糖淀粉酶活力比较高的红曲霉 (AS 3.978)、黑曲霉 (AS 3.758) 和根霉 (AS 3.2676) 进行了产生转移葡萄糖苷酶性能的比较。

从纸层析图谱 (图 3) 可以看出，黑曲霉样品在 12 小时就出现多量异麦芽糖，并且随时间延长其量也逐渐增加，而红曲霉样品在 48 小时才出现极微量的异麦芽糖，证明红曲霉产转移葡萄糖苷酶的活力比黑曲霉低得多。根霉 (AS 3.2676) 则不产转移葡萄糖苷酶。

5. 葡萄糖为底物的逆合成作用：于 10 毫升带塞试管中加 40% 的葡萄糖液 4 毫升，0.2M pH 4.5 的醋酸缓冲液 0.5 毫升以及相同酶活力的酶液 1 毫升，50°C 保温，

反应不同时间取样，进行纸层析。

试验结果 (图 4) 表明，根霉 (AS 3.2676) 的葡萄糖逆合成作用极不明显，仅有极微量的寡糖色斑；红曲霉 (AS 3.978) 具有明显的葡萄糖逆合成作用，24 小时后出现寡糖斑点，但比黑曲霉 (AS 3.758) 的逆合成作用弱得多。黑曲霉 7 小时的样品中就出现了明显的寡糖斑点，并且随时间的延长寡糖量也随之增加。

6. 糖化试验：2% 的可溶性淀粉液 50 毫升 (含 0.5M pH 4.5 的醋酸缓冲液 5 毫升) 加酶液 1 毫升，50°C 保温，糖化 40 小时，淀粉分解率达 99.4%，碘色反应无色。同时对糖化产物进行纸层析 (图 5)。

从图 5 结果看出，红曲霉 (AS 3.978) 糖化淀粉的产物除葡萄糖外无其它寡糖的色斑痕迹。但是当对浓玉米淀粉液化液 (32% W/W) 糖化时，产物中则出现微量寡糖，不过比黑曲霉糖化产物中的寡糖量

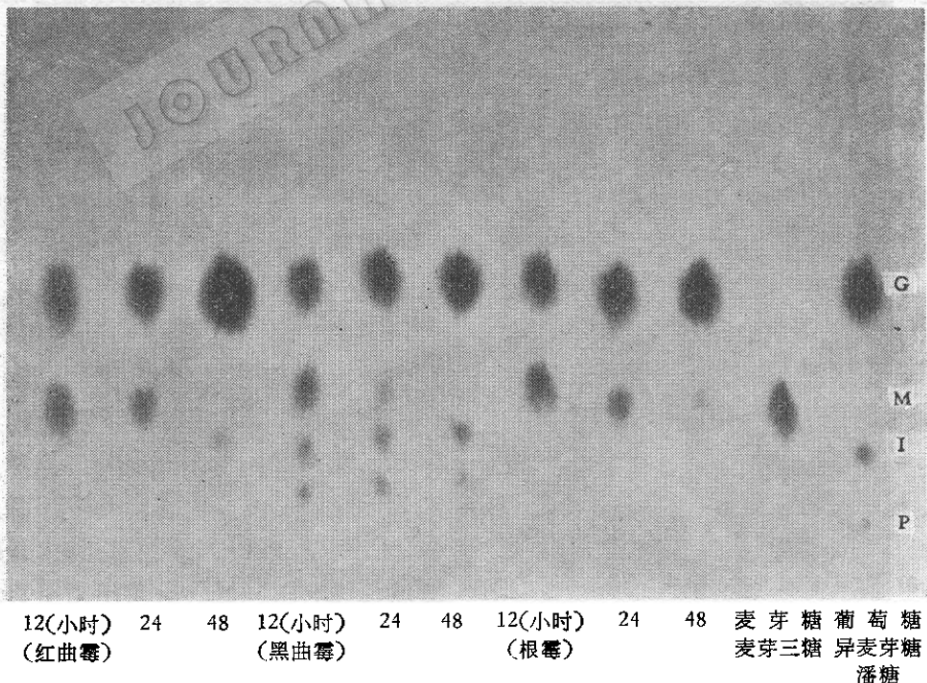


图 3 转移葡萄糖苷酶纸层析图谱

底物：20% 麦芽糖

G: 葡萄糖 M: 麦芽糖 I: 异麦芽糖 P: 潘糖

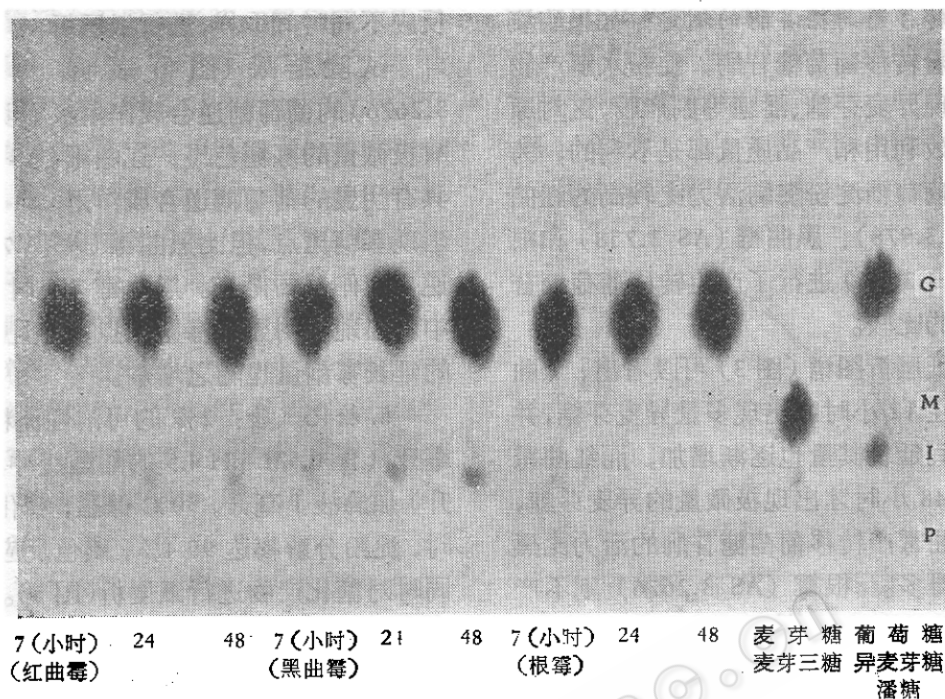


图4 葡萄糖的逆合作用层析谱
底物: 葡萄糖
G: 葡萄糖; M: 麦芽糖; I: 异麦芽糖; P: 潘糖

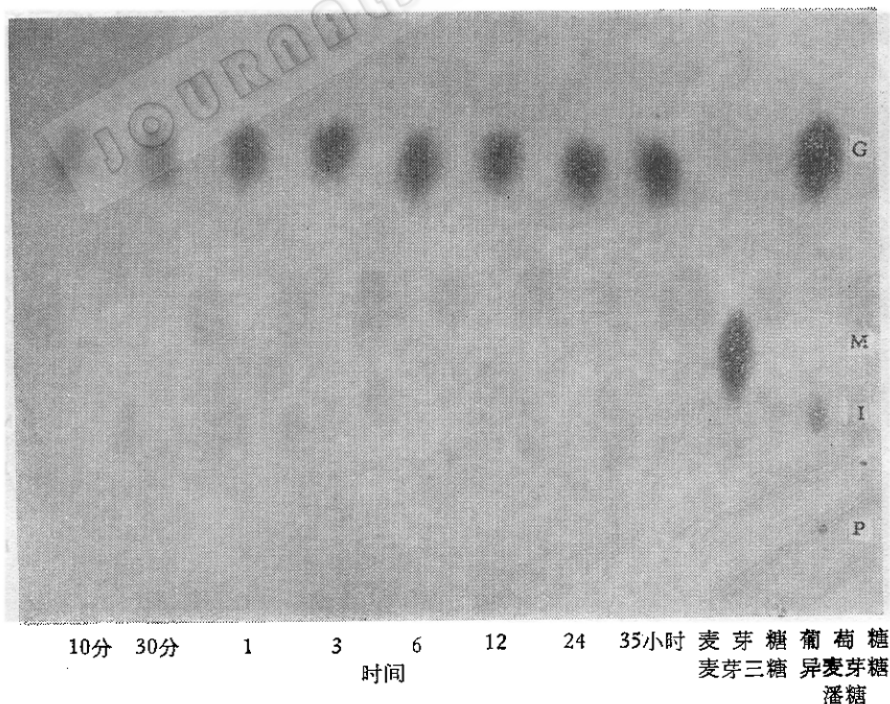


图5 红曲霉 (AS 3.978) 对2%淀粉糖化产物纸层析谱
底物: 2%淀粉
G: 葡萄糖; M: 麦芽糖; I: 异麦芽糖; P: 潘糖

少得多。由此可见，红曲霉糖化淀粉的产物是比较纯的。

取浓度为 32.15% (w/w) 玉米淀粉液化液，用盐酸调 pH 4.5，每克干淀粉加 0.5 毫升酶液（酶活力为 2.78），于 50℃ 保温，分别在 24、32、36、40 小时取糖化样品测定，四次试验结果，葡萄糖值平均分别为 95.95、97.81、98.51 和 99.34。说明红曲霉酶液糖化效率较高。

讨论及结论

关于糖化力测定方法问题。测定酶活力，一般应该在活力—时间曲线的直线范围内计算，我们曾作过加酶量及反应时间的试验，加酶量在 0.1—0.25 毫升（发酵液），时间在 10 分钟内，酶活力的变化成直线关系。本文所采用的方法，加酶量为 0.5—1.0 毫升，反应时间为 30 分钟。这是因为有 α -淀粉酶的存在干扰糖化力的测定，特别是用次亚碘酸法测定还原糖时，糊精的每个末端还原基均有还原力，所以表现出初速度特别快。我们过去曾经比较过不同种的曲霉淀粉酶体系的糖化曲线以及纯化的 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶的糖化曲线^[1]，知道 α -淀粉酶的曲线开始上升很快，碘色消失极快，达到一定糖化程度后即不再上升。葡萄糖淀粉酶则与之相反，开始上升较慢，但一直持续上升，直至超过 α -淀粉酶的曲线，淀粉完全被转化为葡萄糖为止。若根据初速度计算， α -淀粉酶的活力显然高于葡萄糖淀粉酶的活力，从而实际上筛选不到糖化力强的菌株。所以选择加酶量大、反应时间较长的测定结果，这样才能真正找出糖化力强的菌株。当然在加酶过量时（如 1 毫升）测出的酶活力往往偏低，所以后来改用 0.5 毫升；这样测出的结果比用 1 毫升测出的酶活力单位要高，但是在同样条件下互相比较这种方法是适

用的。

关于红曲霉淀粉酶的研究报道很少。北原等^[2]指出，由于红曲霉生长缓慢，所以未引起人们的注意。他们比较了十二种红曲霉的淀粉酶组成，根据其淀粉酶和所谓“麦芽糖酶”的活力高低分为 4 组。第一组，两种酶活力均高；第二组，淀粉酶活力高，麦芽糖酶活力低；第三组，与第二组正好相反；第四组，两种酶活力均低。北原等并未指出其实用意义。李钟庆等比较了红曲霉的 5 群的糊精化酶，糖化酶和麦芽糖酶的活力，与北原等的结果大体相同^[3]。1961 年福本等^[4]为了寻找糖化力强的菌种，曾比较研究了各种类型的菌，筛选了红曲霉和链孢霉等菌种，他们认为要找到比根霉更好的菌种是相当困难的。他们选出的红曲霉液体培养滤液每毫升酶活力最高为 9.22 单位，其测定条件与我们现在所用的基本相同，不同的只是在 40℃ 保温，以生成 10 毫克葡萄糖为 1 个酶活力单位，所以 9.22 单位相当我们的 92.2 单位（当然，由于温度较低，实际上应比此值要高一些）。福本等并指出红曲霉的淀粉酶分解淀粉只能达到 80% 以下。

我们选出来的红曲霉的液体培养液每毫升酶活力可达 260 单位；浓淀粉的糖化试验，葡萄糖纯度可达 99% 以上。在本工作的基础上，我们与生产单位合作进行了中间工业试验，证明红曲霉是一个有价值的葡萄糖淀粉酶生产菌，可用于酶法制葡萄糖工业。

参 考 资 料

- [1] Suzuki, Shigeo: *Die Stärke*, 16:285—293, 1964.
- [2] Liggett, R. W. et al.: U. S. Patent, 288—1115, 1959.
- [3] Barfoed, H.: *Die Stärke*, 19:2—8, 1967.
- [4] 佐藤友太郎：发酵协会志，19: 299—309, 1961.
- [5] 服部行彦、饭田茂次：特許公報，35—15438,

- 1960.
- [6] 渡部一穂、富金原孝: 发酵工学杂志, **41**: 493—498, 1963.
- [7] 乐华爱、谢玉梅、张树政、方心芳: 微生物学报, **12**: 187—193, 1966.
- [8] 李钟庆、朱丽钊、方心芳: 微生物学报, **11**: 488—492, 1965.
- [9] Willstätter and Schudel: In Browne and Zerban (Ed.) *Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis*, 3rd Ed. p. 896, John Wiley & Sons. Inc. 1941.
- [10] Schwimmer, S. and Bevenue, A.: *Science*, **123**: 543—544, 1956.
- [11] 张树政、方一澄: 科学通报, 1957, 304—305.
- [12] 北原觉雄、村田卯一: 发酵工学杂志, **32**: 473—478, 1954.
- [13] 福本寿一郎等: 科学 & 工业, **35**: 412—422, 1961.

STUDIES ON THE SCREENING OF GLUCOAMYLASE PRODUCING STRAINS OF *MONASCUS* AND THEIR FERMENTATION CONDITIONS

HO BING-WANG, GUO JUN-JUN, FANG YI-CHENG

AND CHANG SHU-CHENG

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

Two strains of *Monascus* AS 3.976 (*M. Serorubecens*) and AS 3.978 have been selected for the production of large amount of glucoamylase (EC 3.2.1.3) by the submerged fermentation technique. The adequate cultural media and fermentation conditions have been established. After growing these organisms in shaking flasks containing 3% corn flour and 1.5% soybean cake meal (pH 4.5—5.0) at 30—

35°C for 72 hrs., the potency of the cultural filtrate was 260 units/ml. The optimum temperature for enzymic action is 50°C and the optimum pH is 4.5.

Saccharification of liquified starch solution (32% w/w) by this enzyme (with a ratio of 0.5 ml. filtrate to one gram starch) was kept at 50°C for 40 hrs. The resulting mixture gave a DE of above 99.