

分类号

密级

硕士学位论文

题

目：生淀粉糖化酶的菌种选育及其应用性质的研究

英文并列题目：Selection of Raw-Starch Saccharifying Enzyme

Producing Strains and Application of the Enzyme

研 究 生：朱 蓓 专业：发酵工程

研 究 方 向：再生资源生物转化

导 师：章克昌教授

学位授予日期：95 年 月

无锡轻工业学院

地址：无锡市青山湾

年 月 日

摘 要

对本实验室自然分离得到的生淀粉酶产生菌进行纯化, 得到出发菌株1-1, 以紫外线、DMS和NTG对之进行诱变, 最终获得突变株N-Z4, 酶活由出发菌的31.2u/ml提高至60.1u/ml, 提高了92.6%。

初步确认该菌株属黑曲霉组的琉球种群, 暂命名为 *Asp. luchuensis* WUEC.N-Z4。

优化培养基后菌体产酶周期由5天缩短至4天, 酶活提高至67.6 u/ml。同时, 用豆饼粉水解液取代培养基中蛋白胨的试验取得成功, 这一结果为工业化生产提供了良好的前景。

以硫酸盐析和乙醇沉淀对发酵液进行提取, 分别获得了93.3%和90.2%的收率。酶的最适温度为55℃, 最适pH4.0。在30-60℃以及pH3.0-5.0, 酶活相对稳定。该酶的生淀粉糖化酶活力与普通糖化酶活力之比为3.1:1, 与该比值为1:50的普通糖化酶明显不同。

以30u/g的生淀粉糖化酶与220u/g的普通糖化酶协同作用于浓醪酒精发酵中的糖化过程, 终了酒度达13.0%(V/V), 淀粉利用率达85.6%, 效果优于只用250u/g普通糖化酶的发酵结果。

在初始pH4.5, 38℃的条件下将生淀粉糖化酶应用于玉米粉和木薯淀粉的生料酒酒精发酵实验获得成功。与使用普通糖化酶的结果相比, 缩短了发酵时间, 提高了酒度和淀粉利用率。其中玉米粉生料发酵结果: 发酵时间60hr, 酒度10.3%(V/V), 淀粉利用率87.9%。木薯淀粉生料发酵结果: 发酵时间90hr, 酒度10.5%(V/V), 淀粉利用率87.8%。

关键词: 生淀粉糖化酶 浓醪酒精发酵 生料酒酒精发酵

Abstract

The purified strain 1-1 was obtained after isolation of the microorganisms which produced raw-starch saccharifying enzyme(RSSE). Mutagenized by physical and chemical ways, mutant N-Z4 was obtained, with the yield of RSSE increasing from 31.2 u/ml to 60.1u/ml.

After classification, mutant N-Z4 was considered belonged to *Aspergillus luchuensis* group. So it was named *Asp. luchuensis*. WUEC. N-Z4 temporarily.

The effects of the cultural conditions and medium components on the enzyme production were investigated. Under the optimum cultural conditions, the enzyme activity of culture supernatant against raw-starch reached a maximum of 67.6u/ml after 4 days of incubation at 31℃. Soybean cake powder hydrolyzate was found to be a possible substitute for polypepton in medium.

Two ways of purification were tested: salting-out by ammonium sulfate and ethanol precipitation. The recovery was 93.3% and 90.2%, respectively. The optimum pH and temperature for raw-starch digestion was found to be 4.0 and 55℃. The enzyme was stable between pH3.0-5.0.

The ratio of RSSE activity to glucoamylase activity of the crude enzyme and commercial glucoamylase was 3.1:1 and 1:50, respectively, which indicated the difference of the source of two enzymes.

When 30u/g RSSE and 220u/g glucoamylase were added during saccharification in high-gravity ethanol fermentation,

good results were obtained. Ethanol concentration reached 13.0%(V/V) and starch utilization rate was 85.6%.

At the same time, RSSE was used in alcoholic fermentation of corn and cassava without cooking. In contrast with glucoamylase, ethanol concentration and starch utilization rate were higher, while fermentation time was shortened for the RSSE added raw-starch ethanol fermentation.

The result of raw-corn-powder ethanol fermentation is:
Ethanol Concentration: 10.3% . starch Utilization Rate: 87.9%.
Fermentation Time: 60hr.

The result of raw-cassava-starch ethanol fermentation is:
Ethanol Concentration: 10.5% . Starch Utilization Rate: 87.8%.
Fermentation Time: 90hr.

Keywords: raw-starch saccharifying enzyme(RSSE)
high-gravity ethanol fermentation
raw-starch ethanol fermentation

目 录

中文摘要

英文摘要

前言	1
一 菌种选育	5
(一) 材料与方法	5
(二) 结果和讨论	10
1 原种的纯化	10
2 初筛方法的确立	11
3 紫外线诱变结果	11
4 硫酸二甲酯诱变结果	12
5 亚硝基胍诱变结果	14
6 诱变谱系	15
二 菌种鉴定	16
(一) 材料和方法	16
(二) 结果和讨论	16
三 发酵工艺条件的探讨	19
(一) 材料和方法	19
(二) 结果和讨论	21
1 发酵培养基的优化	21
2 工艺条件的探讨	29
3 发酵动力学曲线	30
四 酶的提取和基本性质的研究	32
(一) 材料和方法	32
(二) 结果和讨论	33
1 酶的提取	33

2 酶的基本性质的研究	34
五 生淀粉糖化酶应用性质的研究	37
(一) 材料和方法	37
(二) 结果和讨论	40
1 生淀粉糖化酶在浓醪酒精发酵中的作用研究	40
2 生淀粉糖化酶应用于淀粉原料的生料酒精发酵的研究	45
结论	52
存在的问题与展望	54
参考文献	55
致谢	57

前 言

工业上利用淀粉原料生产酒精的过程中,原料蒸煮是一个重要步骤。淀粉是植物体内的储备物质,常以颗粒状态储存于细胞之中,受着植物组织与细胞壁的保护,既不能溶于水,也不易和淀粉水解酶接触,为了使植物组织破坏,使淀粉释出,工业上首先用机械加工的办法使原料粉碎,增加原料受热面积,有利于淀粉颗粒的吸水膨胀和糊化。磨碎后的粉状原料,吸水后在高温高压下进行蒸煮,其目的是使植物组织和细胞彻底破裂,使原料内含的淀粉颗粒,由于吸水膨胀而破坏,淀粉颗粒变成溶解状态的糊液,从而有利于糖化剂中的淀粉酶把溶解的淀粉转化为可发酵性糖。

淀粉是一种亲水胶体,当淀粉与水接触,水就渗透薄膜而进入到淀粉颗粒里面,淀粉颗粒吸水而发生膨胀现象。当温度升至60-80℃时,淀粉颗粒体积已膨胀到50-100倍,此时各分子之间联系削弱,淀粉开始解体,这就是淀粉的糊化,当温度逐渐升高到120℃时,支链淀粉开始溶解,温度达到135℃以上,淀粉完全液化,植物细胞壁也部分破坏。然后再经吹醪,由于压力发生变化,醪液发生绝对膨胀,产生大量二次蒸汽使细胞彻底破裂,植物组织才能完全碎解,形成完全均一的醪液。

这种进行高温高压蒸煮的传统工艺,虽然能使淀粉充分糊化、液化,但也有其不利的一面,蒸煮的能耗很大,约占蒸汽总量的30-35%,在蒸煮过程中,原料中的一些可发酵性物质,会受到破坏,另外由于醪液粘度大,无法进行浓醪发酵。

本世纪70年代初发生的石油危机使得原油价格暴涨,严重影响了以原油为主要能源的西方国家经济的发展。西方的各国政府意识到以石油作为唯一能源是危险的和不可靠的,因为它总有一天会在地球上消失,于是他们大量投资进行新能源的开发和研究。酒精作为最有希

以原油为主要能源的西方国家经济的发展。西方的各国政府意识到以石油作为唯一能源是危险的和不可靠的,因为它总有一天会在地球上消失,于是他们大量投资进行新能源的开发和研究。酒精作为最有希望全部或部分代替石油的候选者之一,得到了各国科学家们的重视。发酵酒精要能成为可再生的资源,尚需解决一系列的问题,而减少酒精生产的能量投入,即降低酒精生产的能量消耗是首先要解决的主要课题。

酒精生产过程中,能耗最大的两个工序是蒸煮工序和蒸馏工序。所以,酒精生产节约能耗的目标就集中在原料蒸煮和发酵醪的蒸馏上。根据国内的情况,蒸煮工段所消耗的蒸汽占整个生产过程蒸汽消耗的25-30%。如果能采用某种新的生产工艺,将这部分蒸汽消耗全部或大部分节省下来,对减少酒精生产过程的能量投入将起到重要作用。低温蒸煮与生料酒精发酵工艺的意义就在于此。

大约30年以前,Yamasaki等就有关于生料酒精发酵工艺的报道^[14],他们在实验室中以甘薯为原料,实现了不经蒸煮而用黑曲霉淀粉酶进行发酵的过程,然而中试时无法解决染菌的问题。1963年Yamasaki等人又在实验室中以玉米等为原料,实现了不经蒸煮的酒精发酵^[14]。1979年以来Ueda等人使用黑曲霉淀粉酶,通过对醪液进行酸化,醪液透析,真空蒸馏等手段,详尽地研究了生料酒精发酵工艺^[18]。近年来,这个领域的研究更是引起了国内外学者的广泛兴趣。

生淀粉发酵在节能方面无疑是最为理想的,但是到目前为止,国内外真正在工业生产上采用的还不多,糖化酶用量大或需要添加其他辅助酶制剂,污染危险性大等是该工艺的主要弱点。低温蒸煮工艺虽然在节能效果上较生料酒精发酵工艺略差,但它解决了后者目前尚存在的一些问题,所以从综合经济效益上反而比生料酒精发酵更好,而且它可以成功地应用于各种原料的酒精发酵过程,它应该是当前我国酒精厂普遍采用的有效节能新工艺。

由本实验室研究的低温蒸煮工艺,已在国内许多厂家得以推广。

该工艺的优势在于：1 发酵效率高；2 低温蒸煮在 80-85℃ 进行，而工厂的循环废水已达 60℃，如用它来拌料，则所需加热蒸汽量很少；3 浓醪发酵时不能对原料进行高温蒸煮，这个问题可在低温蒸煮中得以解决；4 可以实行酒糟粗滤液全回流工艺。

采用酒精浓醪发酵工艺是发展酒精工业的又一有效途径，上海市工业微生物研究所的陈薇芳等人进行了生玉米粉浓醪酒精发酵新工艺的研究^[30]，他们应用 *Asp. awamori*32 和 *Sac. cerevisiae*59-1 菌种成功地进行了 500 立升罐的生玉米粉浓醪酒精发酵，发酵时间为 100 小时，发酵终了酒度达 13.5%-14.5%(V/V)，淀粉利用率为 86%。浓醪酒精发酵工艺具有设备利用率高、能耗低、成本低的优点，但必须解决配料浓度高带来的困难：醪液粘度大、蒸煮时易产生焦糖等。低温蒸煮则是解决这些困难的好方法。

鉴于生料酒酒精发酵工艺和低温蒸煮工艺的优势，生淀粉糖化酶的研究也就被各国学者加以重视。生淀粉糖化酶是可作用于经破碎而未经蒸煮的淀粉原料，将其分解为单糖或寡糖的糖化酶。在低温蒸煮工艺中，协同使用生淀粉糖化酶和普通糖化酶可解决蒸煮不彻底的问题，在接种酵母的生淀粉醪液中加入生淀粉糖化酶边糖化边发酵，实现生料酒酒精发酵，是对酒精传统生产工艺的变革，有着深远的意义和良好的发展前景。

在生淀粉糖化酶的研究方面，国内外学者也做了不少工作，1994 年 Balls 和 Schwimmt 用一种含猪胰腺提取物和在小麦麸曲上生长的 *Aspergillus oryzae* 的混合物，迅速降解了小麦、玉米和土豆淀粉^[22]。Shinsaku Hayashida^[25]等人也曾对 *Asp. awamori* var *kawachi* 产生的生淀粉酶进行了研究。中科院微生物研究所的谢舜珍等人从土壤及腐烂的淀粉质样品中分离到了 190 株霉菌，由其中筛选到降解生淀粉能力较强的三株菌^[2]，经纸层析鉴定，三株菌降解生淀粉的产物均为葡萄糖。

本课题是在本实验室自然分离得到一株生淀粉糖化酶产生菌的基

础上进行的,本论文的任务在于:

1 高产菌株的选育工作:将产酶在 28u/ml-29u/ml 的原菌种,进行纯化,然后以各种物理、化学手段对之进行诱变,用 α -RS 平板和生粉底物平板进行筛选,并辅以纯化、分离手段,希望获得高产菌株。

2 菌种鉴定:对所获菌株进行初步鉴定。

3 发酵工艺条件的探讨:在获得诱变后的突变株后,寻找更合理也更有利于产酶的培养基配方和培养条件,希望进一步提高酶活力,同时希望配方中的成分成本低,有工业化生产的可能。

4 酶的提取和基本性质的研究:在实验室条件下,对发酵液进行提取,寻找合适的提取条件,并研究酶的最适温度,最适 pH 等基本性质。然后将其与普通糖化酶比较,讨论酶组成的不同。

5 酶的应用性质的研究:将生淀粉糖化酶应用于酒精浓醪发酵工艺和生料酒精发酵工艺,观察分析实际应用效果,同时对发酵条件进行探索。

一 菌种选育

(一) 材料和方法

1. 材料

1.1 菌种 本实验室提供的出发菌 1-1

1.2 主要药品

青霉素	注射用	山东齐鲁制药厂
链霉素	注射用	华北制药厂
去氧胆酸钠		上海试剂二厂
制霉菌素		浙江绍兴制药厂
硫酸二甲酯		上海金山化工厂
亚硝基胍		FLUKA
酵母膏		上海酵母厂
琼脂粉		日本进口分装
牛肉膏		成都华西生化制品厂
聚蛋白胍	生化试剂	上海东海制药厂
Tween-80	化学纯	宜兴市第二化学试剂厂
常温 α -淀粉酶		无锡星达生物工程公司
玉米粉		无锡星达生物工程公司提供
生粉	食用	江苏国营句容特种淀粉厂
其他化学药品皆为 AR 级		

1.3 主要试剂

(1) DNS 试剂

(2) 0.1M HAC-NaAC 缓冲液 pH4.0

(3) 0.1M NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液 pH7.2

(4) 0.1M NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液 pH6.0

1.4 仪器设备

TH-CB-40 超净工作台

无锡具空气净化设备厂

电热恒温培养箱	连云港医疗器械设备厂
电热恒温水浴锅	江苏省医疗器械厂
旋转式摇床	中科院武汉科学仪器厂
721分光光度计	上海第三仪器厂
手提式高压蒸汽灭菌锅	无锡第二医疗器械厂
80-2型离心沉降器	上海手术器械厂
Sk-1快速混匀器	江苏金坛国华仪器厂
TN型托盘式扭力天平	上海第二天平仪器厂
冷冻离心机	日本日立
pHs-3c型酸度计	上海雷磁仪器厂

1.5 培养基和培养条件

1.5.1 斜面培养基与培养条件：马铃薯琼脂斜面，28-29℃ 斜面培养2-3天。

1.3.2 摇瓶培养基与培养条件

去皮去胚玉米 5.7% 聚蛋白胨 3% NH_4NO_3 0.18% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% Tween-80 0.1% 0.1MPa 灭菌30min。

用接种铲从试管斜面挖一块带培养基的菌落直接接入摇瓶培养基中，摇瓶培养基体积为70ml，31℃，100rpm，摇瓶培养5天。

1.5.3 普通平板培养基与培养条件

采用马铃薯培养基 28-29℃ 培养1-2天

1.5.4 筛选培养基与培养条件

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.14% KH_2PO_4 0.2% CaCl_2 0.03% 尿素 0.03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% α -RS 0.5% 琼脂 1.5% 微量元素溶液0.1ml 自然pH 0.1MPa灭菌30min

微量元素溶液组成(g/100ml): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 CoCl_2 0.2 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.16 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.14

28-29℃ 培养3-4天

2 实验方法

2.1 去氧胆酸钠浓度的确定

以常规的稀释分离法,将一定量的孢子悬浮液涂布于添加了不同浓度去氧胆酸钠的普通平板培养基上,观察生长情况,确定适宜的抑制菌丝蔓延的浓度。培养条件:28-29℃ 温箱培养2-3天。

2.2 初筛方法的确定

2.2.1 抗 α -淀粉酶淀粉(α -amylase-resistant starch,简称 α -RS)的制备

称取200克精制玉米淀粉,加1000ml2mM的 CaCl_2 和1000IU的细菌 α -淀粉酶,在80℃水浴中液化糊化;冷却后,再加入1000IU的 α -淀粉酶,55℃水浴中保温3hr,冷冻离心,8000rpm,15min,用蒸馏水洗涤三次,收集沉淀,冷冻干燥后备用。

2.2.2 α -RS筛选平板和底物平板的制备

筛选培养基灭菌后,冷却至55℃-60℃时,每个平皿中倒入15ml培养基,加盖后轻轻摇动培养皿,使培养基均匀分布,待凝后即成 α -RS筛选平板。

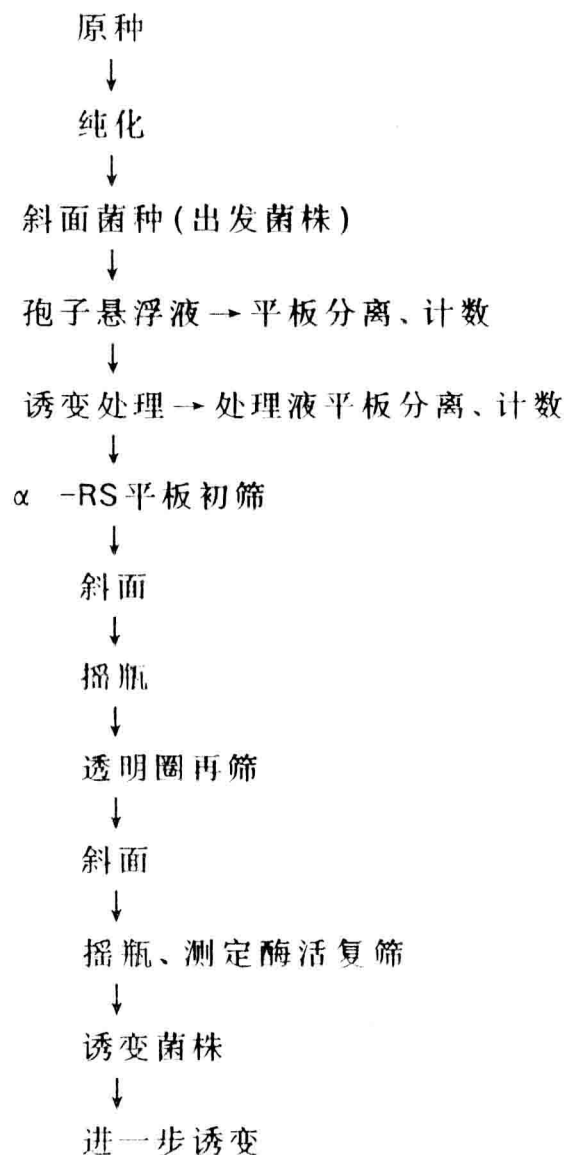
在三角瓶中加入水和2%的琼脂粉,0.1MPa压力下灭菌20min,冷却至55℃左右时,迅速加入青霉素(4u/ml),链霉素(5u/ml),制霉菌素(1ug/ml)以及2%底物生粉(精制生玉米淀粉),摇匀后等体积倒入大小相同的平皿中,使平皿中培养基凝固后厚薄一致,即成底物平板。

2.2.3 初筛方法

处理后的孢子悬浮液以一定的稀释度稀释,将稀释液0.5ml涂布于 α -RS筛选平板,置于28-29℃培养箱中培养至单菌落形成,挑取透明圈直径/菌落直径较大者至斜面,28-29℃培养三天,然后对挑得的菌株进行摇瓶培养5天,发酵液恢复体积后过滤,备用。把直径相同(7mm)的钢圈灭菌后置于底物平板上,吸取0.1ml酶液于底物平板上的钢圈中,于40℃培养箱中放置12hr,选择透明圈直径比对照(出发菌株酶液)透明圈直径大者进入复筛。

复筛仍以摇瓶培养和酶活测定方式进行。

2.3 诱变育种步骤



2.4 紫外线诱变方法

以生理盐水配制单孢子悬浮液 → 5ml 置于 9cm 培养皿中, 放入一无菌磁力搅拌棒 → 在磁力搅拌器上, 15W 紫外灯下 30cm 处照射不同时间 → 稀释分离 → 28-29℃ 温箱培养至形成单菌落 → 挑取透明圈直径/菌落直径比对照大的菌落至斜面培养 3 天 → 摇瓶培养 5 天 → 底物平板再筛 → 挑取透明圈比对照大者进入复筛。

2.5 硫酸二甲酯 (DMS) 诱变方法

以 pH7.2 的磷酸缓冲液配制单孢子悬浮液 → 加入 DMS 醇液至不同浓度 → 30℃, 200rpm, 摇床处理不同时间 → 稀释法中止反应 → 稀释分离 → 28-29℃ 温箱培养至单菌落形成 → 初筛、复筛方法同紫外线诱变。

2.6 亚硝基胍 (NTG) 诱变方法

以 pH6.0 的磷酸缓冲液配制单孢子悬浮液 → 加入 NTG 至不同浓度 → 其余同 DMS 诱变。

2.7 各种缓冲液的配制^[6]

2.8 生淀粉糖化酶 (Row Starch Saccharifying Enzyme, 简称 RSSE) 的酶活测定方法。

2.8.1 DNS 试剂的配制^[6]

2.8.2 DNS 试剂的标定^[6]

2.8.3 酶活测定步骤

发酶液恢复体积, 过滤后以 pH4.0 的 HAC-NaAc 缓冲液稀释至一定倍数, 取 1 ml 加入 20 ml 小试管中, 作反应管, 另取 1 ml 加入另一 20 ml 小试管中, 作对照管, 40℃ 水浴预热 5 min 后, 在反应管中加入同样预热过的生玉米淀粉悬浮液 (混匀) 1ml, 40℃ 水浴保温 30min, 每隔 5 min 摇匀一次, 30min 时立即在对照管中加入 1ml 保温的生玉米淀粉悬浮液, 将反应管与对照管同时在 3000rpm 离心 5min, 然后用移液枪吸取 1ml 上清液于相应的比色管中, 管中加入 1.5ml DNS 和 1ml 蒸馏水, 沸水浴加热 5min, 立即用冷水冷却至室温, 以蒸馏水定容至 25ml, 以 721 分光光度计在 520nm 比色。酶反应实际生成的糖是反应管与对照管中还原糖之差。

2.8.4 酶活单位定义^[19]

在 40℃、pH4.0 条件下, 1hr 水解生玉米淀粉产生 1mg 还原糖 (葡萄糖计) 的酶量定义为 1 个活性单位, 计算公式为:

$$\text{酶活单位 (u/ml)} = k \times n \times \Delta OD \times 4$$

K —— 葡萄糖标准曲线的斜率

n —— 稀释倍数

$$4 = \frac{1\text{hr}}{0.5\text{hr}} \times \frac{2\text{ml(反应体系)}}{1\text{ml(参加测定还原糖的上清液体积)}}$$

(二) 结果和讨论

诱变育种是用物理和化学等因素使诱变对象细胞内的遗传物质发生变化,引起突变,并通过筛选获得符合要求的变异菌株的一种育种方法。本实验室自然分离得到一株生淀粉酶产生菌,其产酶单位在28u/ml-29u/ml,为提高产酶能力,获得比较理想的变异株,对其进行了紫外线诱变、DMS诱变和NTG诱变,把每次诱变后有一定程度提高的菌株作为出发菌株,再进一步诱变,从而对优良的产酶性状进行有目的的积累。

1 原种的纯化

已获得菌株并非由单孢子繁殖形成,必须进行分离纯化后,再进行诱变处理,否则在变异时不同的孢子变异形态不一致,传代后将导致高产菌株数量减少,产量降低。为避免菌丝蔓延不利于单菌落的挑取,在培养基中添加抑制剂去氧胆酸钠。

表1 添加去氧胆酸钠后菌落的生长情况

浓度 (%)	生 长 情 况
0	菌丝蔓延,平皿中布满孢子
0.006	菌落上长出孢子,菌丝仍蔓延
0.008	平皿中有白色菌落,面积小,无孢子
0.01	无任何菌落

故而在培养基中添加0.008%的去氧胆酸钠,挑取单菌落到斜面,获得产酶单位五次传代稳定在3.12U/ml的菌株,作为出发菌,命名为1-1。

2 初筛方法的确立

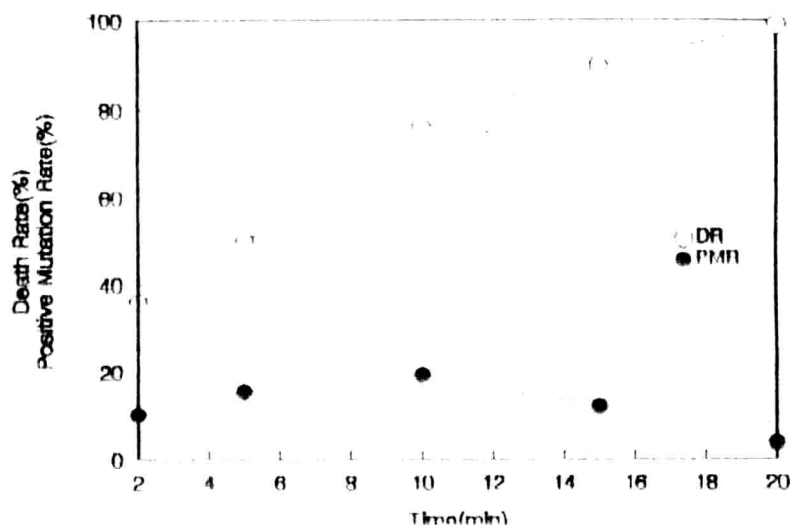
α -RS,即抗 α -淀粉酶淀粉,是一种在结构上介于短链糊精和类脂之间的螺旋状聚合物,不溶于水,很难被 α -淀粉酶降解。其主要结构特征是 α -1,6键所占比例大,能作用于 α -RS的酶,往往可以降解生淀粉^[3]。在筛选培养基中以 α -RS为唯一碳源,可根据菌落透明圈直径与菌落直径的比值,初步判断菌株产酶能力的高低,挑取单菌落至斜面。Bergmann^[3]和中科院微生物所^[2]都用此法筛选得到了降解生淀粉能力较强的菌株,总体来讲,透明圈法简单适用,可以大大减少初筛的工作量。

考虑到每次挑出的菌落较多,测酶活工作量大,因此利用生粉底物平板作为初筛的第二种筛子,观察钢圈周围透明圈的大小,比较不同菌株发酵液的酶活高低,这种方法较前者更准确,总体说来,透明圈大,对应的酶活就高,用底物生粉平板进行第二步初筛是比较有效的。

3 紫外线诱变结果

紫外线强度单位为尔格/毫米²,但在实际工作中,测定比较困难,常以紫外照射的致死时间或杀菌率作为相对剂量单位。

紫外灯功率15W,照射距离30cm时,照射时间与致死率及相应的正突变率如图所示。



DR 死亡率 PMR 正突变率

图1 U.V 剂量与变异的关系