

# 枯草杆菌 $\alpha$ -淀粉酶的生产

陆 家 生

(无锡酶制剂厂, 无锡)

$\alpha$ -淀粉酶是在酒精、酿造、制药、制糖和纺织工业上应用广泛的酶种,也是目前国内外应用最广、产量最大的酶种之一。

$\alpha$ -淀粉酶可由微生物发酵产生,也可由植物和动物提取。目前工业生产上都以微生物发酵法为主进行大规模生产  $\alpha$ -淀粉酶。我国从1965年开始应用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BF-7658 生产  $\alpha$ -淀粉酶,当时仅无锡酶制剂厂独家生产,年产量为10.22吨。现在国内生产酶制剂的厂家已发展到120多个,其中约有40—50%的工厂生产  $\alpha$ -淀粉酶。总产量约为7000多吨。近年来,国外生产耐热性  $\alpha$ -淀粉酶发展较快,已从嗜热真菌、高温放线菌、特别是从嗜热细菌(嗜热脂肪芽孢杆菌 *B. stearothermophilus* 和地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* 等)中分离得到了耐高温的  $\alpha$ -淀粉酶菌种<sup>[1]</sup>。但就国内而言,虽已开展了耐高温  $\alpha$ -淀粉酶的研究工作,目前仍以枯草杆菌菌株生产  $\alpha$ -淀粉酶。本文就国内外枯草杆菌  $\alpha$ -淀粉酶的生产作一简要综述。

## (一) 发酵生产

### 1. 菌种

由于菌种易于退化和遭受噬菌体感染而降低产  $\alpha$ -淀粉酶能力,因此要不断开展菌种筛选和诱变育种工作。在提高  $\alpha$ -淀粉酶活力中应

用最广泛而有效的诱变剂有:紫外线(UV)、X射线和 $\gamma$ 射线、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)、甲基磺酸乙酯(EMS)等。此外还有DNA转化方法。

Bunji 等将  $\alpha$ -淀粉酶活力只有10u/ml的野生型原始菌株6160经MNNG处理和DNA转化的反复诱变,最后获得的一支抗环丝氨酸的新菌株T2N26,酶活力达到了16000u/ml。新菌株T2N26含有六个或六个以上遗传因子控制酶的形式<sup>[2]</sup>。Andreeva 等将枯草杆菌103菌株的孢子悬浮液经50℃加热30分钟处理后,酶合成速度提高了2—2.7倍<sup>[3]</sup>。Septer 等用亚硝基胍和甲基磺酸乙酯诱变处理枯草杆菌菌株,获得了高产胞外  $\alpha$ -淀粉酶和 $\beta$ -葡聚糖酶的新菌株<sup>[4]</sup>。东条敬等从野生型原始菌株6160,通过DNA转化和突变,获得新菌株2633,  $\alpha$ -淀粉酶活力从10u/ml增加至40000—50000u/ml。 $\alpha$ -淀粉酶活力是用兰值法测定的<sup>[5]</sup>。无锡酶制剂厂等以枯草杆菌06-11为出发菌株,经热处理、UV照射、亚硝基胍处理反复交叉进行和 $\text{Co}^{60}$ - $\gamma$ 射线照射,获得11-12号新菌株,经车间生产扩试,提高了  $\alpha$ -淀粉酶活力约30%。进一步以甲基磺酸乙酯处理11-12号菌株,得到了新菌株209。在摇瓶试验中,新菌株209比原始生产菌株06-11提高了发酵单位30%左

表1 枯草杆菌  $\alpha$ -淀粉酶发酵培养基组份、培养条件及结果

配方	发酵培养基组份(%)	培养条件及结果
1	小麦粉 2, 淀粉 2, 黄豆粉 1.5, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2.25—2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02, 葡萄糖或蔗糖或麦芽糖或乳糖 0.5—2	在 30℃, 培养 70h, 摇瓶发酵以乳糖乳最佳, 麦芽糖次之, 葡萄糖最差 <sup>[11]</sup>
2	利用工业副产品: 碳源为废糖蜜 3, 氮源为酒糟酵母粉 3.5	在 30—35℃, pH 5.5—8.0 有最高酶活力 <sup>[12]</sup>
3	小麦粉 3.5 大麦粉 3.5, 淀粉 2, 大豆粉 2.5, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2.5, $\text{KCl}$ 0.15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08	谷类和淀粉先用 $\alpha$ -淀粉酶进行部分液化, 培养 32h, $\alpha$ -淀粉酶活力达到 10000 u/ml <sup>[13]</sup>
4	可溶性淀粉 10, 肉汁 1, 聚蛋白胨 2, 酵母膏 0.4, $\text{NaCl}$ 0.4	2 L 发酵罐装培养基 1 L, 通气量 3 L/min, 转速 800 r/min, 新菌株 2633 在 72 h 产 $\alpha$ -淀粉酶 40000—50000 u/ml <sup>[14]</sup>
5	用 IMETB 49 菌株生产低蛋白酶的 $\alpha$ -淀粉酶: 小麦粉 2, 淀粉 2, 小麦下脚料 0.3, 黄豆粉 1.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5, $\text{KCl}$ 0.15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05	培养 34h, $\alpha$ -淀粉酶活力 4000 u/ml, 含酪氨酸 1—2 u/ml <sup>[15]</sup>
6	土豆淀粉废液提取的土豆蛋白质 2.95, 麦芽糊精 3.75, $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 0.3	35℃ 培养 67h, $\alpha$ -淀粉酶活力 1300 u/ml, 如用等量黄豆饼粉代土豆蛋白质, 酶活力为 700 u/ml <sup>[16]</sup>
7	糖化淀粉 3, 黄豆饼粉 5, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1	37℃ 摇瓶培养 2 天, 枯草杆菌 Y08 $\alpha$ -淀粉酶活力 1500 u/ml <sup>[17]</sup>
8	淀粉 10, 肉汁 1, 酵母膏 0.4, 聚蛋白胨 2, $\text{NaCl}$ 0.4	分别接种由抗环丝氨酸的突变体新菌株 CS 108、TM23、630T、和 T <sub>1</sub> N26, 在 30℃ 通气培养 48h, $\alpha$ -淀粉酶活力分别为 50 1200、7000 和 16000 u/ml <sup>[18]</sup>
9	土豆淀粉 6, 黄豆饼粉 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{CaCl}_2$ 0.07	接入菌株 IAM 1522, 静态培养 25h, 然后加入 1 mM 鸟苷, 继续培养 72h, $\alpha$ -淀粉酶活力为 2050 u/ml, 未加鸟苷的为 1326 u/ml <sup>[19]</sup>
10	大麦芽汁 (干重 72.7%) 0.9—1.0 或饲料酵母水解产物 0.4—0.6, 可代替玉米浆 (干重 30%) 1.2	不影响 $\alpha$ -淀粉酶产量 <sup>[19]</sup>
11	脱脂大米糠 10, 玉米浆 1.5, 过磷酸盐 0.1	接种量 1%, 通气量 1 v.v.m., 在 30℃ 和初 pH 7.0 时经 72h 发酵后, $\alpha$ -淀粉酶活力为 10000 u/ml <sup>[20]</sup>

右,而在车间(10吨和20吨罐)扩试中,发酵单位提高了一倍<sup>[6]</sup>。高定华等用X射线和 $\gamma$ 射线处理枯草杆菌 BF-7658 菌株,获得正结果变种的增值分别为46.3%和21.6%<sup>[7]</sup>。又先后用X、 $\gamma$ -射线,氮氛激光处理,获得高产变异菌株 K211,在500 L罐一级发酵, $\alpha$ -淀粉酶活力达315 u/ml,5000 L罐二级发酵,酶活力达420 u/ml,在23吨发酵罐上,酶活力平均达430 u/ml,最高达500 u/ml。何继春等以枯草杆菌 209 菌株为出发菌株,经UV照射和亚硝基胍复合诱变处理,获得了高产新菌株 8a5,在摇瓶试验中,比原菌株 209,  $\alpha$ -淀粉酶活力提高了17—

35%;中型试验和生产规模试验, $\alpha$ -淀粉酶活力平均分别达到了529 u/ml和505 u/ml<sup>[8-9]</sup>。国内酶活力均根据《工业用液化型淀粉酶、蛋白酶质量标准测定方法》测定。

总之诱变育种仍是今后国内外获得高产菌株的主要方法之一。一般以物理因素和化学因素交叉进行为好,最好选用抗药性菌株,如抗衣霉素突变株,可使细胞膜结构通透性改善;抗利福平突变株可延迟发酵孢子形成,均可能提高酶产量。诱变剂剂量,以前倾向大剂量和高死亡率,现在改用低或适中剂量;实践证明,正变率在低或适中剂量较多。DNA转化的重组技

术,国内已开始研究,也已取得一定成绩。关于细胞融合,国内也开始研究,但对提高酶活,国内外尚无进展。

## 2. 发酵培养基和发酵过程控制

目前国内枯草杆菌  $\alpha$ -淀粉酶生产的发酵培养基主要成份为玉米粉和黄豆饼粉,固形物总量在 15—18% (包括补料)。Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4%, NH<sub>4</sub>Cl 和 CaCl<sub>2</sub> 为酌量。

国外粗料玉米粉均经精加工成淀粉后使用,或用淀粉的各级水解产物如糊精、麦芽糖和葡萄糖,还有用蔗糖和乳糖作碳源。

国外常用蛋白胨、玉米浆、黄豆(饼)粉和酵母膏等作为有机氮源;铵盐作为无机氮源。在细菌  $\alpha$ -淀粉酶生产中,总氮量的 40% 左右转变成了  $\alpha$ -淀粉酶蛋白<sup>[10]</sup>。

国外文献报道的枯草杆菌  $\alpha$ -淀粉酶发酵培养基配方、培养条件及结果择要摘录于表 1。

枯草杆菌 NRRL 3411 与地衣芽孢杆菌 NRRL 1001 和淀粉液化芽孢杆菌相比,在摇瓶发酵中具有最高  $\alpha$ -淀粉酶产率。蛋白胨是最理想氮源, $\alpha$ -淀粉酶形成的最适 pH 值、温度和周期分别为 6.5—7.5、40℃ 和 5 天<sup>[21]</sup>。

枯草杆菌  $\alpha$ -淀粉酶工业生产中,菌丝浓度在指数生长期(18—36h)明显增长,并在 39—42h 保持常数,然后出现下降期和细胞自溶。 $\alpha$ -淀粉酶的有效合成时间在 17—45h,放罐单位为 3000u/ml。纯种培养,产量最高<sup>[22]</sup>。

枯草杆菌 VTT192 在发酵指数生长期结束时,若将通风量从 1v v m 下降至 0.375 和 0.2v v m 时, $\alpha$ -淀粉酶活力分别提高 140u/ml (9.4%) 和 650u/ml (44%),同时可以看到 pH 值稍有下降。然而若将通风量从 1v v m 下降至 0.1v v m 时,酶产量明显下降, pH 值跌至 6.0,然后逐渐上升<sup>[23]</sup>。

各种氨基酸作唯一氮源对  $\alpha$ -淀粉酶生产的影响,其中 L-天冬酰胺、L-组氨酸和 DL-丝氨酸能刺激 C-1  $\alpha$ -淀粉酶生成,而 L-半胱氨酸和 L-胱氨酸和甘氨酸有抑制作用。甘氨酸浓度达 2—3% 时,会使生长和酶合成全部停止。加入刺激性氨基酸可抵消酶合成的抑制因

素。如蛋氨酸在抵消甘氨酸引起的酶合成抑制方面是极有效的<sup>[24]</sup>。

## (二) 枯草杆菌 $\alpha$ -淀粉酶的纯化和提取

目前国内工业用  $\alpha$ -淀粉酶,是将发酵液加硫酸铵,使  $\alpha$ -淀粉酶连同菌丝体等一起析出,经过滤、干燥和粉碎,即得工业用  $\alpha$ -淀粉酶酶粉,也有将发酵液加稳定剂后,直接喷雾干燥制工业用酶粉。后一方法由于严重污染环境,在市内基本已被禁止使用。食品工业用  $\alpha$ -淀粉酶,国内采用工艺,先是加絮凝剂使菌体蛋白尽量沉淀,经板框过滤后,滤液通过真空浓缩或超滤浓缩,下面可分两条路线进行,一是浓缩液加吸附剂(通常用淀粉或变性淀粉);二是浓缩液加酒精或丙酮进行溶析,然后经过滤、干燥和磨粉,均能得到食品工业用  $\alpha$ -淀粉酶。

由于发酵液直接盐析,要耗用大量硫酸铵,而且产品中含有大量菌体。因此如将除去菌体蛋白的发酵滤液在真空下于 45—50℃ 浓缩至原体积三分之一,或通过超滤浓缩至原体积三分之一,然后用 60% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 进行盐析,高速离心机(转数约 5000r/min)分离,收集沉淀物,在真空、室温下干燥<sup>[25]</sup>。

将发酵滤液经超滤浓缩至  $\alpha$ -淀粉酶纯度达 45900u/g,在重量为 7055 磅、干物质含量 19% 的超滤浓缩液中,加入淀粉 400 磅、Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 525 磅,混合液在空气进口温度 120—180℃、出口温度 68—85℃ 下进行喷雾干燥<sup>[26]</sup>。

有人试验,在发酵滤液的浓缩液中,加入变性淀粉,连续振摇 3h,进行静态吸附,分离并干燥,产率  $\leq$  83%。最适酶活在 pH 6.0 和温度 55—60℃, Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 是最佳稳定剂<sup>[27]</sup>。

Friedhelm 等报道,将最初  $\alpha$ -淀粉酶滤液通过透析和/或超滤,接着进行热处理,就可制得一种稳定的高浓度的液体酶制剂。例如将酶溶液以流速 25—30L/h·m<sup>2</sup>,进行超滤浓缩至原体积的 1/10,90% 水及相等量可溶性低分子量物质被除去,超滤收率大约为 90—95%。然后放至真空迴转式蒸发器中进行浓缩,最终体积为原体积的 1/40,产率大于 90%。上述酶制剂在室温下可稳定几个月,不需加稳定剂,适于

食品和饮料工业使用<sup>[28]</sup>。

枯草杆菌  $\alpha$ -淀粉酶发酵液难于进行固液分离,通常要加絮凝剂,使悬浮的菌体和溶解的大分子化合物通过微粒之间形成的“桥接”,使微粒凝聚。目前国内选用聚丙烯酰胺、海藻酸钠、氯化钙加磷酸氢二钠、碱式氯化铝等单一或复合使用,均有良好絮凝作用。

### 参 考 文 献

- [1] Kindle, K. L.: *Appl. Biochem. and Biotech.*, 8: 153—170, 1983.
- [2] Bunji, M. et al.: *Proc. Jpn. Acad.*, Ser. B 54(8), 435—439, 1978.
- [3] Andreeva, M. A. et al.: *Fermentn. Spirt. Prom-st.*, 2: 32—35, 1981.
- [4] Septer, W. et al.: *Abh. Akad. Wiss. DDR, Abt. Math., Naturwiss., Tech.*, 123—136, 1981.
- [5] 东条敬等: *农化*, 57(9): 717—724, 1983.
- [6] 无锡酶制剂厂等: *遗传学报*, 3(3): 216—223, 1976.
- [7] 高定华等: *上海科技大学学报*, 1: 51—55, 1982.
- [8] 何继春等: *微生物学通报*, 13(2): 61—64, 1986.
- [9] 何继春等: *微生物学通报*, 13(5): 203—206, 1986.
- [10] 山本武彦: *淀粉科学*, 32(2): 99—106, 1985.

- [11] Reiner, G. et al.: *Ger. (East) DD.* 161; 181, 1985.
- [12] Ali, M.: *Doga. Bilim Derg.*, Seri B, 9(2): 128—134, 1985.
- [13] Johann, H. et al.: *Ger. (East) DD.* 153: 647, 1983.
- [14] Johann, H. et al.: *Ger. (East) DD.* 157: 265, 1982.
- [15] Michel, H. et al.: *Fr.* 2, 496, 689, 1982.
- [16] Juichiro, F. et al.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 8110029.
- [17] Bunji, M.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 8034047.
- [18] Akihiro, Y. et al.: *Jpn. Kokai*, 77: 136, 1988.
- [19] Spokient, A. et al.: *Proizvod. Primen. Mikrobiu Ferma. Prep.*, 3: 96—104, 1976.
- [20] Abdel-Akher, M. et al.: *Chem. Abt.*, 80: 35799W, 1974.
- [21] Valdeavella, C. V. et al.: *Bull. Philipp. Biochem. Soc.*, 4(1—2): 45—55, 1981.
- [22] Stapcinskiene, E. et al.: *Fermentn. Spirt. Prom-st.*, 8: 16—17, 1981.
- [23] Markkanen, P. H. et al.: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 25: 863—865 1975.
- [24] Gupta, V. K. et al.: *J. Res. (Punjab Agric. Univ.)* 17(2): 192—198 1980.
- [25] Hwang Pautsung: *Taiwan Sugar*, 20(5): 189—192, 1973.
- [26] Neubeck, C. E.: *US* 4,233,405, 1980.
- [27] Dzhevakhia, G. Y. et al.: *Fermentn. Spirt. Prom-st.*, 5: 28—31, 1977.
- [28] Friedhelm, P. et al.: *Ger. (East) DD.* 200 210 1000.