

α-淀粉酶的研究及应用

孔显良 王俊英

(中国科学院微生物研究所,北京)

淀粉酶是水解淀粉的酶类,广泛存在于动植物和微生物中。它是最早用于工业生产并迄今仍是用途最广、产量最大的酶制剂产品之一。

早在1915年法国 Boiden 等开始由枯草杆菌生产细菌淀粉酶,并在工业上用于纺织品退浆。1959年,日本采用淀粉酶和糖化酶进行淀粉的液化和糖化,确定了酶法制造葡萄糖糖浆的工艺。1973年高温淀粉酶投入生产,从此,淀粉酶的生产又进入了一个新的阶段。

产生 α-淀粉酶的微生物 主要种类及其性质

α-淀粉酶在动物、植物、微生物中均能产生,但大量生产主要还是靠微生物发酵。微生物中许多种类均能产生 α-淀粉酶。其有关的属有: *Bacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Thermomonospora*, *Acinetobacter*, *Thermophile*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium* 等。Buchanan 等描述了 *Bacillus* 属 48 个种中有 32 个已报道能产生 α-淀粉酶^[1]。世界许多国家都以枯草杆菌 (*B. subtilis*) 生产的细菌淀粉酶和米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 生产的真菌淀粉酶为主要产品。近年来不少科学家已转向耐热 α-淀粉酶、酸性 α-淀粉酶和碱性 α-淀粉酶的研究。主要产酶微生物的种类见表 1。

从 50 年代开始就有人研究耐热 α-淀粉酶,并有过不少报道,他们都采用高温菌为材料,由于培养基成份价格昂贵,培养条件严格,产酶量少等原因,均未能实现生产。自 1973 年 Madsen 等^[2]报道了采用常温地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 产生一种新的耐热 α-淀粉酶,在高温 110℃ 液化淀粉。开始突破了耐热 α-淀粉酶

表 1 产三种类型的 α-淀粉酶的微生物种类和特性

菌种	最适 pH	最适温度 (°C)
耐热 α-淀粉酶		
<i>Thermomonospora curvata</i>	5.5—6.0	65
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	5.9—7.0	70
<i>Thermophile V-2</i>	6.0—7.2	80
<i>B. stearothermophilus</i>	6.5—8.0	90
<i>B. licheniformis</i>	5.0—9.0	90
<i>B. coagulans</i>		90
<i>B. subtilis</i>	5.0—7.0	90
<i>B. caldolyticus</i>	5.4	90
酸性 α-淀粉酶		
<i>B. acidocaldarius</i> 104-1A	4.5	60—63
<i>B. acidocaldarius</i> 101	3.5	75
<i>B. subtilis</i>	2.0	70
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	4.0	50
碱性 α-淀粉酶		
<i>B. alkalophilus</i>	9.2	51
<i>B. No. A-40-2</i>	10.5	50—55
<i>B. sp.</i>	9.0—11.5	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	8.0	40

的工作,并投入工业生产。Medda 等^[3]报告了二株新菌株地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*),凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*) 在碱性 pH 条件下产生耐热 α-淀粉酶,在 91℃ 能维持稳定 1 小时,最适 pH 为 9.5。

最近, Grueninger^[4]从污泥中分离到一株产耐热 α-淀粉酶的嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*) 的亚种,在 3 或 4 种复合成份的培养基中(像蛋白胨、大豆粉和麦芽提取物等)产生较高的酶活力。该酶最适温度是 80℃,在 95℃ 2 小时酶活性失活 50%。然而在有底物淀粉存在时,活性能保持 3 小时以上。淀粉分解产物主要是麦芽三糖、麦芽糖和少量葡萄糖。

Godfrey^[5]总结了市场上三种 α-淀粉酶耐热性的比较如图 1。地衣芽孢杆菌 (*B. licheni-*

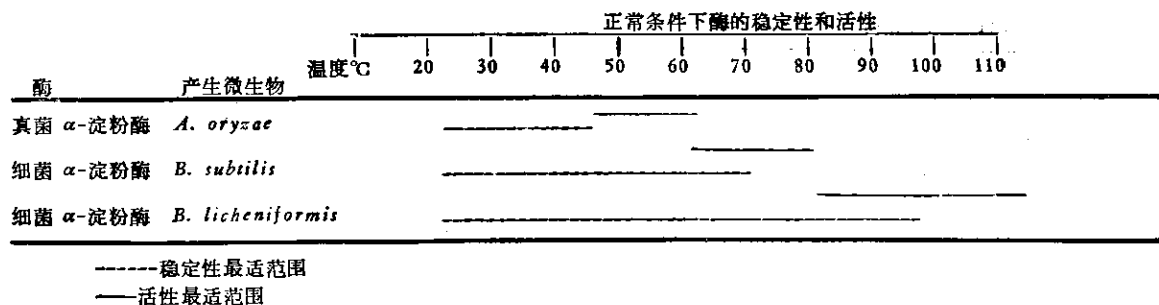


图1 三种工业用 α -淀粉酶最适温度范围^[1]

fromis) α -淀粉酶耐热性最好, 枯草杆菌 (*B. subtilis*) α -淀粉酶次之, 米曲霉 (*Asp. oryzae*) α -淀粉酶最差。

Madsen 等^[2]还叙述了耐热 α -淀粉酶同常温 α -淀粉酶的性质比较结果, 显示出耐热 α -淀粉酶具有显著的优越性。地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 产生的 α -淀粉酶作用的最适温度是 92°C, 而解淀粉芽孢杆菌 (*B. amylolique faciens*) 产生的 α -淀粉酶作用的最适温度仅为 70°C。在 30—40% 淀粉浓度时, 使用地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶在短时期反应温度能达 110°C。而解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶操作的最高温度是 85—90°C。在 37°C 最适 pH5.7 时, 这二种酶的活力大体相当, 在 60°C 地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的活力大约提高 15%, 在 95°C 酶活力显著提高。但是解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶在此条件下极不稳定, 活力大大下降。

钙对酶稳定性的影响。在 70°C 使用地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶加 3.4ppm 氯化钙即能达到完全稳定, 而对解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶加 54ppm 氯化钙也极不稳定。

由于耐热 α -淀粉酶具有热稳定性的特点, 在有关工业中具有高度的重要性。

Bacillus 属的少数种在碱性培养基中分泌碱性 α -淀粉酶。它们的最适 pH 在 9.2—10.5 之间, 但大多数在 40°C 以上酶活力很快下降。而地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 的 α -淀粉酶对 pH 适应范围较广。

Ingle^[6]叙述了耐酸性 (pH4.0—5.0) α -淀粉酶的获得将会对葡萄糖生产带来极大的好处。郑大声^[7]采用黑曲霉, 在摇瓶中酶生成的

最适 pH 为 4.0, 其耐酸 α -淀粉酶的生成比不耐酸 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶为晚, 固体培养时, 用麸皮添加盐酸, 耐酸性 α -淀粉酶的生成比液体培养基的摇瓶培养好得多。

高产菌株的选育

在工业生产中使用的菌种, 最初都是从自然环境中分离得到的。这些菌种的特性决定于它们基因的总和。许多年来, 人们为改变菌株特性, 主要通过物理、化学等诱变剂, 引起基因组发生突变, 使某些不利于生产的特性消失, 由此筛选出理想的菌株, 以提高产量。事实上, 只要基因发生新的组合, 就会由基因重组而产生新的特性, 为遗传变异提供良好的机会。近年来, 随着生物工程的迅猛发展, 人们主要采用转导、转化和基因克隆等方法, 以达到选育高产菌株的目的, 并得到重大进展。

(一) 诱变育种

这种方法具有速度快、收效大、方法简便等优点, 一直是发酵工业中重要的方法之一。

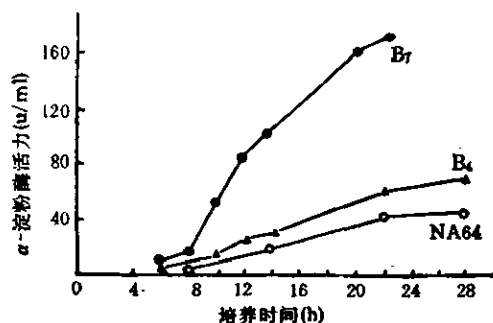
由于对菌株不断地选育改良, 目前工业上所用菌种产生 α -淀粉酶的能力已大大提高。Outtrup 等^[8]以 ATCC9789 为出发菌株, 经 γ -射线, NTG 以及 UV 反复 7 次诱变, 结果得到了 α -淀粉酶产量为原菌株 25 倍的突变株 (见表 2)。

Sasaki 等^[9]指出, 由 *B. subtilis* NA64 菌株分离到对衣霉素有抗性的 *B.* 菌株, 使 α -淀粉酶的产量提高了 5 倍 (见图 2)。

Kazumasa^[10]在用 NTG 处理 *B. subtilis* 6160 时得到抗环丝氨酸突变株 C108 和抗氨

表2 地衣芽孢杆菌高产突变株的选育^[4]

菌株	α -淀粉酶活力 (KNU/ml)	诱变剂	存活率 (%)
ATCC9789	0.41	γ -射线	0.01
突变株 1	0.55	NTG	10.0
-2	1.40	NTG	10.0
-3	3.7	UV	0.05
-4	4.3	NTG	10.0
-5	5.5	NTG	10.0
-6	6.8	NTG	10.0
-7	10.9		

图2 抗衣霉素菌株 B_r 和 B_4 与原始菌株 NA_{64} 产 α -淀粉酶的比较^[4]

卞青霉素突变株 A2, α -淀粉酶产量分别是原出发菌株的 5 倍和 6 倍。后来,苏联也有报道,利用 UV 诱变得到的突变株,在添加氨基酸和维生素的培养条件下,与原菌株比较, α -淀粉酶产量可增加 21.6 倍。可见,采用诱变育种的方法是行之有效的。但是也有一定局限性和缺点,如多次使用同一诱变剂时,可能发生平顶效应,使其效果降低,工作量大,费力费时并带有一定的盲目性。

(二) 遗传物质转导和转化

早在 1963 年,有人曾作过 α -淀粉酶基因转导的研究,他们使枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) K 菌株的 α -淀粉酶缺陷型感染上带有 α -淀粉酶基因的 Sp_{10} 噬菌体,从而获得产 α -淀粉酶的转导株。人们还指出噬菌体 PBSI 对枯草芽孢杆菌的感染,是由于该菌存在具有运动性的鞭毛,而且发现对 PBSI 具有抗性的所有菌株都缺乏运动能力。通过电子显微镜观察证明,有抗性的菌株没有鞭毛。鞭毛的有无,受 Amy

B 基因的控制。关口顺一^[14] 也证明,凡具有 Amy B 基因的所有菌株都对 PBSI 有抗性。

Yuki^[12] 通过转化实验,研究了控制 α -淀粉酶的基因转化,他选用了生产 α -淀粉酶能力高的枯草芽孢杆菌 1088 菌株作为 DNA 供体菌,以 α -淀粉酶产量低的 168 菌株作受体菌,进行转化,发现菌株控制 α -淀粉酶生产能力的基因和 α -淀粉酶的结构基因 (amy E) 紧密地连锁在一起,该基因称作 amy H。Yamagucki 等^[13] 研究指出,将带有 amy R 标记的纳豆芽孢杆菌 (*B. natto*) 1212 菌株通过转化引入枯草芽孢杆菌 Marburg 菌株中,则受体菌株的胞外 α -淀粉酶产量提高约 5 倍。又将 α -淀粉酶活性高而耐热性差的纳豆芽孢杆菌的 DNA 转入耐热强而酶活性低的枯草杆菌 Marburg,结果使后者的遗传性状改变, α -淀粉酶产量提高了 14 倍,基因 amy R 和 amy H 一样,与 α -淀粉酶结构基因相邻。

关口顺一等^[11] 使用与 Marburg 菌株不同起源的枯草芽孢杆菌 IF03215 菌株进行转化研究,发现控制 α -淀粉酶产量的基因和 α -淀粉酶结构基因 (amy A) 连锁。枯草芽孢杆菌 IF03215 菌株与 168 菌株相比, α -淀粉酶的产量比为 1:20,用 3215 菌株作为供体菌,用 168 菌株作为受体菌进行转化,分离得到转化株,并对转化株的产量及电泳进行了研究,结果表明,确实存在着控制 α -淀粉酶产量的基因 (amy p),该基因和 α -淀粉酶的结构基因 (amy A) 相连锁 (见图 3)。

由图 3 可以看出,枯草芽孢杆菌产胞外 α -淀粉酶的基因能调节基因 amy R, amy H, amy B, Pap, tmr 以及 Socu 等,其中 amy R, amy H 是产 α -淀粉酶特定的调节基因,tmr 具有抗衣霉素 (tunicamycin) 以及高产淀粉酶的特性。同时 amy R, amy H 和 tmr 与 α -淀粉酶的结构基因 amyE, amyA 位点非常接近。Pap, amyB, Socu 均属多效性 (pleiotropic) 基因,这些突变的菌株不仅高产胞外 α -淀粉酶,而且中性蛋白酶和碱性蛋白酶都增高。

枯草杆菌产生的 α -淀粉酶大部分在培养

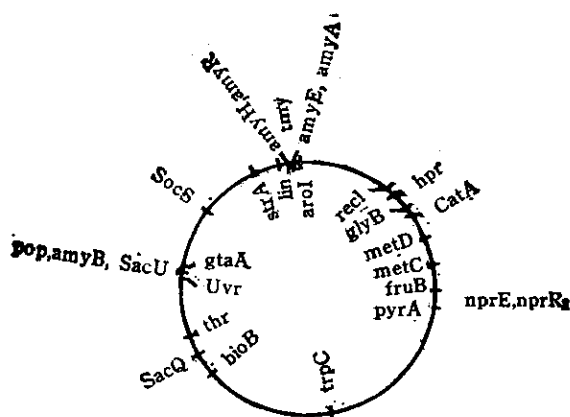


图3 枯草杆菌的基因修改了位置连锁图^[11]

影响胞外酶合成的基因位于圆的外侧，参考基因标记位于圆的内侧。nprE, aprE, 和 tmr 在基因图上的距离尚未报道过，在本图中标绘出近似的位置。遗传上基因标记的名称和注解如下：amyA 和 amyE 为 α -淀粉酶的结构基因；amyH 和 amyR 为 α -淀粉酶的调节基因；amyB, Pap, SacU 和 SacQ 为多效性基因；Cat A 和 Hpr 为控制蛋白酶高产能力的基因；SacS 为果聚糖蔗糖酶和胞内蔗糖酶调节基因，tmr 对衣霉素抗性和蛋白酶高产基因；nprE 为中性蛋白酶的结构基因；npr R₂ 为中性蛋白酶的调节基因；aro I 为莽草酸脱氢酶缺陷；bioB 为生物素合成酶缺陷；fruB 为 1-磷酸果糖激酶缺陷；glyB 为需甘氨酸；gtaA 为 UDP 葡萄糖-聚甘油-磷酸酯葡萄糖基转移酶缺陷；lin 对林肯霉素抗性；met C 和 met D 为需甲硫氨酸；pyr A 为需嘧啶；recI 重组缺陷；thr 为需苏氨酸；trpC 为需色氨酸；uvr 对紫外线辐射敏感。

液中，少量在细胞里。可以认为，在这种胞外酶的产生中，至少有两套重要的调节系统，一套是有关 α -淀粉酶的结构基因 (amy E) 的转录和翻译的调节系统，另一套是将已合成的和正在合成的 α -淀粉酶肽键通过细胞膜和细胞壁分泌到培养液中的调节系统。把有利的遗传因

子通过 DNA 转化和诱变方法相结合，逐步导入枯草芽孢杆菌，就有可能得到高产胞外 α -淀粉酶菌株。在这方面，Kazumasa 等^[10]作出了出色的成绩。他们用枯草芽孢杆菌 6160 菌株经 NTG 诱变得得到抗 D-环丝氨酸高产突变株 C108 和抗氨基青霉素突变株 A2，将这些菌株的 DNA 转化到含有各种调节基因的同菌株所衍生的受体菌株中去，在各种基因的协同作用下得到 630T2 菌株，再经 NTG 诱变获得了在含有淀粉的培养基上 α -淀粉酶水解圈很大的 T₂N₂₆ 菌株， α -淀粉酶产量比亲株 6160 提高 1500—2000 倍 (见图 4)。可见用 DNA 转化和诱变的方法结合利用其协同效果，可以分离到 α -淀粉酶的高产和超高产菌株。

(三) 遗传工程方法

将给体的 DNA 提取出来，用限制性内切酶切成小片段，再用 DNA 连接酶拼接到运载体 DNA 分子上，生成人工 DNA，运载体是病毒或质粒，再通过转导或转化导入宿主细胞，使重组体克隆和表达。

1979 年，Nomura 等^[14]作了将遗传工程方法应用于 α -淀粉酶育种工作的报道，他们将 amy E 克隆到枯草芽孢杆菌中，得到的转化株有 α -淀粉酶活力。Palva 等^[15]把解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) α -淀粉酶基因克隆到枯草芽孢杆菌中，使用 pUB110 作为运载体，选出了抗卡那霉素的转化株，其 α -淀粉酶活力比其原始的野生型菌株高 500 倍。他们推测这是由有效的 α -淀粉酶启动子和质粒拷贝数增加而引起的。Meilenz^[16]报道了将耐热的嗜热脂

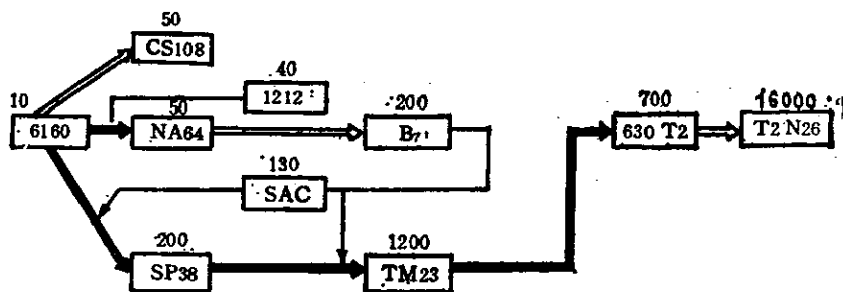


图4 枯草杆菌 α -淀粉酶产量逐步增长图解^[17]

白箭头表示由于突变引起的变化；黑箭头表示基因重组引起的变化；指向黑箭头的线箭头表示基因的转化；方框上方数字为酶活力，方框内为菌株号

芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*) 的基因克隆到大肠杆菌 (*E. coli*) 中,而后再转到枯草芽孢杆菌中去,虽然没有报道产酶水平,但已申请到专利。1983 年, Wollweber 报道^[17]将地衣芽孢杆菌耐热的 α -淀粉酶的基因克隆到枯草芽孢杆菌中。克隆的 DNA 片段显示了与地衣芽孢杆菌 DNA 杂交的特性。重组体产生的 α -淀粉酶血清和特有的地衣芽孢杆菌抗体起反应,证明了克隆的基因物是 α -淀粉酶基因。

最近 Henahan^[18]又把地衣芽孢杆菌耐热 α -淀粉酶基因克隆到枯草芽孢杆菌中,重组株产生的酶在 93℃ 是稳定的。重组的第一步是分离纯化由地衣芽孢杆菌获得的高温 α -淀粉酶基因,而后用限制性内切酶 *EcoRI* 降解 DNA,再将其克隆到质粒 pBD64 上,得到的重组质粒再转移到枯草芽孢杆菌 α -淀粉酶的突变株上,产酶的菌落用碘色反应在含有淀粉的培养基上检测。枯草芽孢杆菌重组体的基因再同样被引入生产菌株,与原始重组株比较, α -淀粉酶的产量提高了 7—10 倍,并且已经广泛地应用在食品和制酒工业上。

α -淀粉酶的主要用途

不同性质的 α -淀粉酶具有不同的用途,耐热性 α -淀粉酶,由于使用时温度提高,液化很完全,用酶量少,操作比较容易,适用于棉布退浆,酶法生产葡萄糖以及石油压裂液处理等。米曲霉 α -淀粉酶耐热性差,可用于面包工业。黑曲霉酸性 α -淀粉酶,适用于消化药物制造。糖化型细菌淀粉酶因产物具有较多的麦芽糖,可以制造低 DE 值糖浆。

现就有关 α -淀粉酶的主要用途列于表 3。

由于用途广泛,在市场上 α -淀粉酶是产量最大的工业酶类之一^[19]。除了已经普遍应用的以外,在有关日用化工产品中添加 α -淀粉酶能增加作用效果。在淀粉加工上用 α -淀粉酶制造各种改性淀粉,为在食品、化工、造纸、建筑材料粘合剂等工业上开辟新的用途。

应用 α -淀粉酶提高饲料加工质量。将玉

米粉添加 α -淀粉酶 (pH5—7) 在 70—90℃ 液化后, DE 值为 1—6, 在 100—200℃ 加压蒸煮 5—90 分钟,再行喷雾干燥,贮备使用。奶牛饲料加工后的饲料产奶增加。

表 3 α -淀粉酶的主要用途

类 别	用 途
淀粉加工	制造葡萄糖 制造葡萄糖糖浆 制造饴糖 制造各种改性淀粉 制造各种糊精 制造各种浆糊、粘着剂
酿造发酵工业	酒精原料液化 啤酒原料液化 发酵原料液化
纺织品工业	各类织物退浆
食品工业	* 制作面包及其他食品的前处理
医药工业	消化剂
饲料工业	饲料加工
果汁蔬菜加工	果汁制造, 蔬菜加工
其他	清洗剂、香料加工、造纸、石油压裂液以及建筑材料等

* 为真菌 α -淀粉酶。

数十年来,为了提高 α -淀粉酶产量,人们选育了生产菌株,研究了产 α -淀粉酶的发酵条件,无机盐对 α -淀粉酶活性的影响,表面活性剂对产酶的促进作用以及 α -淀粉酶的除臭、产品稳定性等工作,使 α -淀粉酶工业化生产和提纯日趋成熟,成为大规模商品化生产最早的酶类之一。尤其在育种方面,随着微生物遗传学的发展,学者们初步搞清了产 α -淀粉酶的基因,探讨了有关转导、转化和基因克隆等方法,到 1982 年已经申请了专利,1984 年初枯草芽孢杆菌重组体的基因已引入生产菌株,使 α -淀粉酶产量提高了 7—10 倍,并且已经应用于食品和制酒工业,给选育高产 α -淀粉酶菌株开创了新的途径。

70 年代始,高温 α -淀粉酶和耐酸碱 α -淀

粉酶相继出现,特别是前者,更加开辟了广泛应用的前景,使 α -淀粉酶研究进入了一个新的阶段。

参 考 文 献

- [1] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th edn. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1974.
- [2] Madsen, G. B. *et al.*: *Die starke*, **25**: 304—308, 1973.
- [3] Medda, S. and A. K. Chandra: *J. Appl. Bacteriol.*, **48**: 47—58, 1980.
- [4] Grueniger, H. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**: 414—421, 1984.
- [5] Godfrey, T. and J. Roichelt: *Industrial Enzymology*, Macmillan Publishers Ltd. p. 61, 1983.
- [6] Ingle, M. B. and R. J. Erickson: *Bacterial α -Amylase in "Advances in Applied Microbiology"*, Edited by D. Perlman **24**: 257—278, 1978.
- [7] 郑大声: *发酵工学*, **53**: 272, 1975.
- [8] Outtrup, H. and K. Aunstrup: *Proceedings of the First Intersectional Congress of IAMS* pp. 204—209, 1975.
- [9] Sasaki, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **70**: 125, 1976.
- [10] Kazumasa, H.: *Agric Biol. Chem.*, **11**: 2343, 1979.
- [11] 关口顺一: *发酵工学会志*, **56**: 227—237, 1978.
- [12] Yuki, S.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **31**: 182, 1968.
- [13] Yamaguchi, K. *et al.*: *J. Bact.*, **119**: 410—416, 1974.
- [14] Nomura, S. *et al.*: *Agric Biol. Chem.*, **43**: 2637, 1979.
- [15] Palva, I. *et al.*: *Gene*, **15**: 43, 1981.
- [16] Meilenz, J. R.: *Newswatch*, Jan., 18, 1982.
- [17] Wollweber, K.L.: *Practical Biotechnol.*, **3**: 13, 1983.
- [18] Henahan, J.: *Biotechnology*, **2**: 112, 1984.
- [19] Aundrop, K.: In *"Biotechnology and Fungal Differentiation"* (J. Meyrath and J. D. Bulock, eds.) pp. 157—171, Academic Press, New York, 1977.