科技动态

β-淀粉酶的国外研究动态

何 秉 旺

（中国科学院微生物研究所，北京）

β-淀粉酶（EC 3.2.1.2.α-1，4-葡萄糖苷键麦芽糖水解酶），最早发现于高等植物中[1-3]，在大麦、小麦、甘薯和大豆中含量较丰富；多用于饴糖和酿酒工业。

近年来，国外科技工作者从微生物中筛选产 β-淀粉酶的菌种，以代替植物来源的 β-淀粉酶，用来生产麦芽糖和啤酒。多粘芽孢杆菌（*Bacillus polymyxa*）[4]，巨大芽孢杆菌（*B. megaterium*）[5]，蜡状芽孢杆菌（*B. cereus*）[6-8]和假单胞菌（*Pseudomonas* sp. BQ_6）[9]均产生 β-淀粉酶。有关 β-淀粉酶纯化和性质的研究也有很多报道[10-11]。由于所筛选的原始菌种产酶活力较低，很多学者用物理和化学的方法诱变菌种以提高 β-淀粉酶的活力[12,13]，也有些通过发酵条件提高产酶活力的[14]。这方面的研究工作，国外以日本神户大学浙家龙教授的工作最为突出[15]。他以蜡状芽孢杆菌 BQ10 为出发菌株，通过诱变，其产酶活力提高 200 倍，酶活力高达 3600u/ml。据认为这样的产酶活力离工业生产要求距离还较大。日本的高崎义幸也选到了一株蜡状芽孢杆菌蕈状变种（*B. cereus* var. *mycoides*），这株菌不仅能产较高的 β-淀粉酶，同时还能产茁霉多糖酶。

为了配合 β-淀粉酶水解淀粉时能产生高纯度的麦芽糖，很多科学工作者对水解淀粉 α-1，6-葡萄糖苷键的异淀粉酶（isoamylasse）[16]和茁霉多糖酶（pullulanase）[17-19]的研究给以了很大的注意。用复合酶水解淀粉可以产生麦芽糖 90% 以上。使淀粉糖工业增添了新的生命力。

与此同时，国外开始选育产麦芽寡糖酶菌种的研究，其水解淀粉的产物为麦芽三糖到麦芽六糖[20]。据报道，麦芽寡糖具有溶解度大，吸湿性小、不易发生褐变、可塑性好、容易消化吸收等特点；由于这些寡糖本身甜度小，因此，可用作食品甜味调节剂、增量剂等食品的原料；也可用来作药剂、化学原料等；为淀粉糖工业又打开了一条新路。

微生物 β-淀粉酶的纯化及性质

（一）β-淀粉酶的纯化

一般是将培养好的酶液用冷冻高速离心机离心，去掉发酵液中的菌体细胞和培养基中的残渣，取离心上清酶液，作为提纯的材料。提纯的具体方法简述于下。

1. 淀粉吸附：将上述酶的清液按比例与淀粉混合，在冰箱中搅拌过夜，然后用过滤法收集沉淀，同时用蒸馏水冲洗，再用 10% 的麦芽糖溶液洗脱，收集洗脱液。

2. 硫酸铵分部沉淀：按酶液体积加入固体硫酸铵（低温下搅拌加入），一般加量为 20—50% 饱和度，用冷冻离心法收集沉淀的酶蛋白；然后将收集的酶蛋白用 0.05 mol/L（pH 6.0）的醋酸缓冲液（含有 5×10^{-4}mol/L 的半胱氨酸）中溶解，并用同一缓冲液透析脱盐。

3. Sephadex G-100 柱层析：将上述脱盐后的酶液，加入 SephadexG-100 柱，用 0.05mol/L pH6.0 醋酸缓冲液（含有 5×10^{-4}mol/L 的半胱氨酸）平衡，并用同样缓冲液洗提，洗提酶液经 SephadexG-25 柱浓缩脱盐后备用。

表 1 各类微生物的 β-淀粉酶性质的比较

项目＼菌名	多粘芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡状芽孢杆菌	环状芽孢杆菌（*B. circulans*）	假单孢菌	链霉菌（*streptomyces* sp.）
温度（℃）	40	50	40	40	50	50
pH	6.8	6.5	7.0	7.0	7.0	5.0
分子量	44000	36000	63000	53000	37000	35000

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

4. CM-Sephadex C-50 柱层析： 经凝胶分子筛 Sephadex G-100 纯化并脱盐浓缩的酶液，再上 CM-SephadexC-50 离子交换柱，用一个线性的 NaCl 梯度洗脱，得到纯化酶液，经透析脱盐后冷干。经上述几步纯化的酶蛋白用(圆盘)凝胶电泳确定单一环带，表明了该酶蛋白的均一性。

(二) β-淀粉酶的性质

1. *Bacillus cereus* 产生的 β-淀粉酶纯化后，酶的最适 pH 为7，pH 稳定范围是 6—9；最适反应温度 40—50℃，热稳定性较差，60℃ 处理 10 分钟酶活力只剩余 10% 左右。β-淀粉酶米氏常数 Km 值对可溶性淀粉为 0.4%；酶的分子量在 35,000—63,000 之间。现将各类微生物的β-淀粉酶性质比较列于表1。

2. 1983 年日本的新家龙等首先报道了蜡状芽孢杆菌不同菌株的β-淀粉酶酶蛋白的氨基酸组份的分析。

3. 金属离子对 β-淀粉酶活力的影响： 通过几种菌的纯化后的 β-淀粉酶，在反应过程中添加各种金属离子的试验，均未看到对酶有激活作用，然而 β-淀粉酶却被 Cu^{2+}，Hg^{2+} Ag^{+} 和 Fe^{2+} 等所抑制。 P-氯汞基苯 (P-CMB) 对 β-淀粉酶有强烈抑制作用；但不被 DTNB 所抑制；被 P-CMB 抑制后的 β-淀粉酶加入半胱氨酸可以恢复 β-淀粉酶的酶活力。

4. β-淀粉酶的底物特异性： β-淀粉酶对直链淀粉，支链淀粉、糖原和一般淀粉的水解，最初的产物只有麦芽糖，其水解率分别为 100%，52%，31% 和 57%。β-淀粉酶水解麦芽四糖产生两个分子的麦芽糖；水解麦芽糖五糖，产生麦芽糖和麦芽三糖；麦芽三糖被水解生成麦芽糖和葡萄糖，但速度却慢得多；β-淀粉酶不能水解麦芽糖中的 α-1，4-葡萄糖苷键。

5. β-淀粉酶水解淀粉的方式： β-淀粉酶水解淀粉是从淀粉分子的非还原性末端水解相隔的 α-1，4-葡萄糖苷键，产生 β-旋光性的麦芽糖，它不能水解淀粉分子的 α-1，6-葡萄糖苷键，也不能越过此键，遇此键水解停止；β-淀粉酶属于外酶型，水解淀粉只能从淀粉分子的尾端进行，不能从淀粉分子的内部进行。

通过用示踪水 $^{18}H_2O$ 的研究，水解过程中，糖苷键 $C_1—O—C_4$ 是 $C_1—O$ 键断裂，而不是 $O—C_4$ 键断裂；这种情况与 α-淀粉酶和葡萄糖淀粉酶的水解相同。

6. 淀粉液化不同 DE 值对 β-淀粉酶水解产物组份的影响：以土豆淀粉为原料，用 α-淀粉酶液化不同 DE值，然后加入 β-淀粉酶和脱支酶(异淀粉酶)水解后分析产物组份，结果见表 2。

从表 2 可以看出，不经 α-淀粉酶处理的淀粉，经 β-淀粉酶水解后得到最高的麦芽糖。随底物 DE 值的增加，麦芽糖的含量逐渐下降，而麦芽三糖的生成量则随之增加。这是 β-淀粉酶在应用中值得注意的问题。

表 2 淀粉液化 DE 值对水解产物组分的影响

液化液 DE 值	葡萄糖%	麦芽糖%	麦芽三糖%	低聚糖%
0.00	0.1	95.0	2.0	2.9
1.46	0.0	89.8	5.1	5.1
2.38	0.2	87.1	7.8	4.9
5.81	0.5	85.0	10.9	3.6
8.05	1.3	80.8	14.4	3.5
12.6	1.4	74.4	18.0	6.2
14.0	1.6	71.8	20.9	5.7
19.6	1.7	66.3	23.4	7.6
25.5	4.2	65.2	24.0	6.6
31.8	7.1	61.2	25.6	6.3

7. 由于 β-淀粉酶具有不能水解淀粉分子中的 α-1,6-葡萄糖苷键的特性，又由于一般淀粉中含支链淀粉 (Amylopectin)约占 80% 左右，所以只用 β-淀粉酶水解淀粉是不能得到含 60% 以上麦芽糖的。欲达到此目的，必须加配合分解 α-1，6-葡萄糖苷键的酶(下称 α-1,6-糖苷酶)；α-1，6-糖苷酶在自然界有广泛的分布，并为许多科技工作者所阐明。对于分解 α-1,6-糖苷键的酶，由于其来源、底物特异性或研究者的命名不同而有各种名称。例如，动物来源的有：淀粉-1,6-葡萄糖苷酶 (Amylo-1,6-glucosidase)，低聚-1，6葡萄糖苷酶(oligo-1，6-glucosidase)和限制性糊精酶 (limit-dextrinase) 等名称。植物来源的有 R-酶，限制性糊精酶等；微生物来源的有异淀粉酶 (isoamylase)，茁霉多糖酶 (pullulanase)，糖精-1,6-葡萄糖苷酶和植物的 β-淀粉酶联合作用于淀粉，可以得到高含量麦芽糖。

8. 另有报道，蜡状芽孢杆菌变异株同时可以产生 β-淀粉酶和 α-1,6-葡萄糖苷酶，用于生产麦芽糖。从该菌的培养液中分离到 β-淀粉酶和 α-1，6-葡萄糖苷酶，并研究了其性质。这些酶都是由一种微生物产生的，由于它们本来就是使淀粉产生麦芽糖而形成的酶，因此，这两个酶的作用 pH 和作用温度完全一致，而且 pH 的稳定性和热稳定性等也极相似。具备同时作用淀粉生产麦芽糖的优良性质。

有报道说，该菌所产生的复合酶作用于淀粉时，首先是 β-淀粉酶作用直链淀粉或支链淀粉，从非还原性末端游离出 β-麦芽糖，到达支链淀粉的分支点 (α-1，6-葡萄糖苷键)附近时，再由 α-1,6-葡萄糖苷酶作用，切断分支点；此后再由 β-淀粉酶作用于 α-1,4-葡萄糖苷键，这两种酶相互交叉作用，最终使支链淀粉生成麦芽糖。

由蜡状芽孢杆菌变异菌产生的复合酶水解不同淀粉，得到麦芽糖的量均与以淀粉的液化的 DE 值有关，DE 值低，水解产物里含麦芽糖量高；DE 值高时，麦芽糖含量低 (表 3)。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 3 蜡状芽孢杆菌产生复合酶水解不同淀粉后产物的组份

淀粉种类	DE (液化液)	葡萄糖 (%)	麦芽糖 (%)	麦芽三糖 (%)	其它寡糖 (%)
玉米淀粉	1.8 6.8	0.8 0.9	88.1 78.9	5.6 14.9	3.5 5.3
土豆淀粉	1.7 7.3	0.6 0.9	87.3 77.5	6.1 15.4	6.0 6.2
山芋淀粉	1.2 7.3	0.9 1.6	87.5 74.1	7.2 17.5	4.4 6.8
小麦淀粉	2.3 11.0	1.1 1.3	85.3 73.0	9.2 19.3	4.4 6.4
珍珠米	1.6 8.3	0.6 1.2	87.3 75.8	6.1 17.4	6.0 5.6

表 3 说明用微生物产生的复合酶水解各种淀粉后的糖组份，DE 值在 2 以下的淀粉液化液，无论用何种淀粉，麦芽糖的含量均可达到 88% 左右。

9. 用固定化酶制造麦芽糖[21]。1978 年日本工业科学技术院的高崎义幸等人，将蜡状芽孢杆菌产生的 β-淀粉酶和茁霉多糖酶吸附固定在氧化铝载体上，并装成酶柱。固定化酶的收率达 75—80%。固定化酶的最适 pH 为 6.5—7.0，最适温度为 45—50℃，半衰期为 10—20 天。另有报道，将 β-淀粉酶用碳亚胺水溶液固定交联在惰性丙烯酰胺-丙烯酸共聚物上，其酶收率为 10%。总之，还需要进一步研究，对高纯度麦芽糖制造，低 DE 值液化液通过固定化酶是有困难的。

微生物产生 β-淀粉酶的发酵条件

国外许多学者报道了有关菌种产酶条件的研究，并有很多专利报道，但仍局限在试验室里，至今未见有中试规模发酵的报道。

试验所用培养基主要成份：氮源为牛肉汁、牛肉膏和多聚蛋白胨等；碳源为各种糖类和可溶性淀粉等，另加些钾盐及其它无机盐类。现举两例典型培养基成份如下：

(1) 2% 蛋白胨、0.5% 可溶性淀粉、0.3% K_2HPO_4、0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，pH7.0。

(2) 3% 多聚蛋白胨、3.0% 可溶性淀粉、0.5% KCl、0.5% NaCl，pH7.0。

(一) 碳源对产酶的影响

以 *B. cereus* var. *mycoides* 为例，以可溶性淀粉为碳源进行不同含量的试验，试验结果表明以 0.2—0.4% 含量的产酶最高，而后随可溶性淀粉量的增加，β-淀粉酶产量下降；但茁霉多糖酶的产量随碳源量的增加而上升。

(二) 氮源对产酶的影响

多方报道，有机氮源均高于无机氮源的产酶水平；不同的有机氮源其产酶水平差别也很大。一般认为以肉膏最好，其次是牛奶酪蛋白和多聚蛋白胨。

以肉膏和多聚蛋白胨为氮源时，试验证明随含量的增加其 β-淀粉酶产量而下降；而茁霉多糖霉的活力则上升。

(三) 金属离子对产酶的影响

有报道说，Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 能促进 β-淀粉酶的产生，Mn^{2+} 能显著的促进茁霉多糖酶的合成；最适含量(浓度)为 10^{-6}—10^{-3} mol/L。

产生麦芽寡糖酶的研究

1984 年日本工业技术研究院高崎义幸报道了产麦芽三糖以上的麦芽寡糖淀粉酶类，麦芽三糖至麦芽六糖产生酶的菌种的筛选，并报道了这些酶的性质及水解淀粉的糖化条件。作者认为产麦芽三糖以上的麦芽寡糖淀粉酶类，最初认为是外切型的淀粉酶，后来经过研究发现它们是内切型的淀粉酶，产生的寡糖为 α-型还发现产生的麦芽寡糖不是最终产物，随着酶量的增加或延长反应时间，它们可以进一步被水解成低分子的糖类。还认为生成麦芽三糖以上的淀粉酶类与糖化型和液化型淀粉酶相比，它们是有着更规律的分解方式的酶类；当然把它们和那些始终以外切式进行水解，终产物是葡萄糖和麦芽糖的葡糖糖化酶和 β-淀粉酶区别开来。

麦芽寡糖的含量随着葡萄糖聚合度的增大而下降。可是若有 α-1,6-葡萄糖苷酶共存进行反应时，麦芽三糖及麦芽六糖的含量比单独使用淀粉酶进行反应时要高。对于麦芽三糖以上的麦芽寡糖的生产，两酶合用大概也是一个重要手段。高崎义幸认为他所研究过的芽孢杆菌属细菌都同时具有 α-1，6-葡萄糖苷酶的生成能力，最适宜于用来生产从麦芽糖到麦芽六糖的所有糖类。各淀粉酶类的来源及其性质列于表 4 中。

总之，由于麦芽糖具有甜味、温和、易溶于水、吸湿性小，对热较稳定及难以着色等优点，因此在食品工业上是用途广泛的糖类。另据报道说，麦芽糖作为医用注射糖时，病人的血糖值不会升高，因此可以作大量营养补加糖用于手术后的营养补充糖质输液。另外，还原性麦芽糖 maltital 具有超过砂糖的甜味，代谢困难，据说可以用作特定饮食 (diet) 的甜味剂。

近些年，人们对甜味的爱好有从强甜味转移到温和甜味或低热量的趋势，而作为新的甜味剂引伸出来的麦芽糖和还原性麦芽糖是可以适应这一趋势需要的。还有学者说，现今所用蔗糖、果糖浆、饴糖及葡萄糖浆将被高麦芽糖浆和麦芽糖所代替，这样可以大大改善食品，饮料风味；使食品更新换代成新型食品。如此，β-淀粉酶的生产会有更大、更快的发展，它是具有潜力和前途的酶种。在啤酒工业上部分代替大麦芽用来生产啤酒，其 β-淀粉酶的用量更为可观；所以 β-淀粉酶

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 4 生成葡萄糖及麦芽寡糖的淀粉酶类的来源及性质

生成的糖名	酶的来源	最适 pH	最适温度(℃)	糖的构型	含量(%)
葡萄糖	*Aspergillus niger*	4.5	55—60	β	92—94
	Rhizopus sp.				
麦芽糖	植物	5—6	50—60	β	50—60
	Bacillus sp.	6—7	50—60	β	50—60
麦芽三糖	*Streptomyces griseus*	5.6—6	45	α	56
	Bacillus sp.	6.0—6.5	50	α	55—60
麦芽四糖	*Ps. stutzeri*	8.0	47	α	55
麦芽五糖	*B. licheniformis*	5—8	76		333*
麦芽四、五糖	*B. circulans*	6.7—7.5	50	α	33.4(G-4) 20—30(G-5)
麦芽六糖	*A. aerogenes*	6.8	50	α	30
	B. circulans	8.0	60	α	30—35

* 底物为直链淀粉。

在食品工业和啤酒工业的发展上，在改善产品质量和风味，节约原粮方面具有很大的发展前途。

参 考 文 献

1. Balls A K et al.: *J. Biol. Chem.*, **163**: 571, 1946.
2. Shinke R et al.: *Ageic. Biol. Chem.*, **35**(7): 1381—1390, 1971.
3. Shinke R et al.: *Ageic. Biol. Chem.*, **35**(7): 1391—1397, 1971.
4. Robyt J et al.: *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, **104**: 338—345, 1964.
5. Higashihara M and S. Okada.: *Agric. Biol. Chem.*, **38**(5): 1023—1029, 1974.
6. Takasaki Y et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**(8): 1515—1522, 1976.
7. Shinke R et al.: *J. Ferment. Technol.*, **53**: 687—692, 1975.
8. Shinke R et al.: *J. Ferment. Technol.*, **53**: 698—702, 1975.
9. Takasaki Y et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**(8): 1523—1530, 1976.
10. Shinke R et al.: *J. Ferment. Technol.*, **53**: 693—697, 1975.
11. Nanmori T et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **47**(5): 941—947, 1983.
12. Shinke R et al.: *J. Ferment. Technol.*, **55**: 110—113, 1977.
13. Shinke Rr et al.: *J. Ferment. Technol.*, **55**: 102—109, 1977.
14. Yamane T et al.: *J. Ferment. Technol.*, **55**: 233—242, 1977.
15. Shinke R et al.: *J. Ferment. Technol.*, **57**: 53—55, 1979.
16. Harada T et al.: *App. Microbiol.*, **16**: 1439, 1968.
17. Ueda S et al.: *J. Ferment. Technol.*, **49**: 552, 1971.
18. Norman B E.: *Starch*, **34**: 340, 1982.
19. Bender H et al.: *Biochem, Z.*, **334**: 79, 1961.
20. 高崎义幸: 发酵ょ工业, **41**(6): 19—31, 1983。
21. Solomon B: *Advances in Biochemical Engineering*,

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn