

# 微生物 $\beta$ -淀粉酶研究进展

王惠权 何秉旺

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

$\beta$ -淀粉酶(E C. 3. 2. 1. 2)不仅存在于高等植物中, 近几年还发现微生物能够产生 $\beta$ -淀粉酶。自1974年Higashihara<sup>[1]</sup>首次确定*Bacillus megaterium*胞外淀粉酶是 $\beta$ -淀粉酶以来, 相继发现了能够产生胞外 $\beta$ -淀粉酶的各种微生物。这些菌株主要属于芽孢杆菌属<sup>[2]</sup>。最近, 在一些放线菌中也有发现<sup>[3, 4]</sup>。

$\beta$ -淀粉酶能够水解淀粉生成高浓度麦芽糖糖浆, 还可以代替大麦芽用于啤酒的生产。微生物来源的 $\beta$ -淀粉酶不仅比植物 $\beta$ -淀粉酶有较高的耐热性, 而且还具有适于大规模工业化生产的优点。因此, 产 $\beta$ -淀粉酶的菌种选育及推

广应用在国内迅速展开。本文拟就微生物 $\beta$ -淀粉酶的研究进展及成果作一综述。

## 1 高产菌种的选育

从工业应用的目的出发, 提高菌种产酶活力是应用的基础。早期的工作主要集中在以各种物理化学手段诱变原始菌株, 其中较为典型的是shinke等<sup>[5-8]</sup>对*B. cereus* BQ10的诱变(表1)。

中科院微生物所以类似的方法<sup>[9, 10]</sup>获得变异株*B. cereus* M-153, 其活力比出发菌株提高

---

1992-08-25 收稿

了近300倍,菌株最终产酶活力最高达20000u/ml。除了诱变育种外,还探索了改变菌种发酵条件来提高酶活力<sup>[11-13]</sup>。

表1 各种诱变剂对 *B. cereus*BQ10 的诱变

菌株	诱变剂	酶活 (u/ml)	活力提高倍数	产酶量 ( $\mu\text{g/ml}$ )
BQ10	—	30	—	—
BQ10-SI	UV	300	10	23
BQ10-SIspc I	rifampin	1200	40	—
BQ10-SIspc I	UV	1200	40	115
BQ10-SIspc II	MNNG	6700	220	382

最近几年利用基因工程技术提高菌种的产酶能力,不仅使菌种的产酶量有较大的提高,而且能够改变酶的性质。这促进了研究工作将理论与实践的紧密结合,缩短了从探索研究到工业应用的时间,克服了传统育种方法的盲目性。

Mizukami 等用基因工程手段获得了 $\beta$ -淀粉酶高表达菌株<sup>[14]</sup>。

## 2 $\beta$ -淀粉酶的性质

与植物 $\beta$ -淀粉酶一样,微生物 $\beta$ -淀粉酶是从多糖的非还原末端顺次切割相隔的 $\alpha$ -1,4-糖苷键,产生 $\beta$ -旋光的麦芽糖以及 $\beta$ -极限糊精。不同来源的微生物 $\beta$ -淀粉酶的酶学及蛋白质特性也有较大差别(表2)。

血清学免疫反应揭示, $\beta$ -淀粉酶是以前体的形式存在<sup>[15]</sup>。用west-belt方法将 *B. cereus* 的 $\beta$ -淀粉酶抗血清与胞内蛋白作用后,在硝酸纤维薄膜上显有 $1.2 \times 10^5$ 的蛋白带,而且SDS-PAGE电泳胞内蛋白(经 $100^\circ\text{C}$ ,10分钟处理),亦有相应的蛋白带。成熟的 $\beta$ -淀粉酶分子量是 $5.8 \times 10^4$ ,说明这个蛋白不是 $\beta$ -淀粉酶的聚合体。Kawazu等在 *B. polymyxa* 的发酵过程中加入大量的各种蛋白酶抑制剂,在发酵液中确实找到了 $1.6 \times 10^5$ 的蛋白,它们能够和

表2 不同微生物来源的 $\beta$ -淀粉酶性质

菌种	<i>B. cereus</i>	<i>B. polymyxa</i>	<i>C. thermosulfurogenes</i>
分子量	$6.4 \times 10^4$	7.0, 5.8, $4.2 \times 10^4$	$5.5 \times 10^4$
最适pH	7.0	7.5	5.5
最适温度	40	45	75
等电点	8.3	8.35, 8.59	5.1
Kmc可溶性淀粉	0.4%	0.071mg/ml	1.68mg/ml
Cys残基数	1	3	7
PCMB抑制	+	+	+
N-末端顺序	Ala-Val-Asn-Gly-Lys-Gly-Met-Asn-Pro	Ala-Val-Ala-Asp-Asp-Phe-Gly-Ala-Ser-Val-Met-Gly-Pro	Ser-Ile-Ala-Pro-Asn-Phe-Lys-Val-Phe-Val-Met-Gly

$\beta$ -淀粉酶( $7.0 \times 10^4\text{Da}$ )的抗血清起沉淀反应<sup>[16]</sup>。以上实验说明,这些分子量大的蛋白是成熟的 $\beta$ -淀粉酶的前体,分泌到发酵液后迅速地被各种蛋白酶水解而成为成熟的 $\beta$ -淀粉酶。

微生物的 $\beta$ -淀粉酶与植物 $\beta$ -淀粉酶不同,主要在于微生物 $\beta$ -淀粉酶能够吸附于并水解生淀粉,但 $\beta$ -淀粉酶与微生物来源的 $\alpha$ -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶相比,其水解率是比较低的。

Saha等用PCMB处理微生物 $\beta$ -淀粉酶,使其失去催化活性。失活的酶仍然可以吸附于生淀粉上。这说明保持酶的活性和其吸附于生淀粉上的能力并不相关<sup>[17]</sup>。不同来源的 $\beta$ -淀粉酶对生淀粉的吸附能力并不完全相同。*C. thermosulfurogenes*产生的 $\beta$ -淀粉酶吸附能力不依赖于温度和pH;一旦被吸附,就会紧紧地吸附在生淀粉上,在许多条件下不被洗脱。而

*B. polymyxa* 产生的酶则会被含有 5mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的硼酸缓冲液洗脱<sup>[18]</sup>, *B. megaterium* 产生的酶很容易被 1% 的硫酸铵或 5% 的醋酸钙洗脱下来<sup>[19]</sup>。

### 3 β-淀粉酶的基因结构及功能

从 80 年代中末期至今, 微生物 β-淀粉酶的

研究正向基础理论和应用的纵深发展, 主要表现在对微生物 β-淀粉酶的基因结构、蛋白结构、结构与功能的关系以及产耐热 β-淀粉酶的研究。Uozumi 等发现, 在 *B. polymyxa* 的 β-淀粉酶氨基酸顺序中, 有三个和其它来源的 β-淀粉酶同源程度很高的保守序列<sup>[20]</sup>, 如图所示:

*B. polymyxa*: 77. IISTHKCGGNVGGDDCNIPSPW 98 159. GPSGELRYPSYYP 172

\* \*

319. LTFTCLEMSDS 329

\* \* \* \* \* \* \* \* \*

*C. thermosulfurogenes*: 77. IMSTHACGNVGDVNIPIPSW 98 159. GPSGELRYPSYNP 172

320. MTFTCLEMDDS 330

*Soybean*: 89. IMSFHQCGNVGDIVNIPIQW 110 182. GPAGELRYPSY-P 193

329LNFTCLEMRDS 349

*Barley*: 87. IMSFHQCGNVGDAVNIPIQW 108 180. GPAGMRYPSP-P 191

337. INFTCAEMRDL 347

在此保守序列中, 至少含有 2 个 Cys-残基, 且不论是植物来源的还是微生物来源的 β-淀粉酶都能被-SH 专一的修饰剂 PCMB 修饰而失活。这表明 Cys 的-SH 可能与 β-淀粉酶的活性有关。因此, Uozumi 等用点突变的方法改变 Cys 为不含-SH 的氨基酸, 获得了 *B. polymyxa* β-淀粉酶的突变体, 以此来推测 Cys 在蛋白质中的结构与功能<sup>[21]</sup>。他们分别用 Ser 代替 Cys83 和 Cys323, 用 Val 代替 Cys91, 还有全部 Cys 都被代替的 C-free。这种突变体蛋白质和野生型 β-淀粉酶用 IAEDANS 荧光标记游离的 Cys-SH, 经荧光猝灭和高压液相色谱分离各肽段, 分析各肽段的 N-末端顺序得出在野生型 β-淀粉酶的 Cys83 和 Cys91 之间形成了双键, 而 Cys323 是游离存在的结论。用-SH 修饰剂及动力学测定 Km/Kcat 各种突变蛋白, 得出 Cys 不是催化活力必需的氨基酸, 因为 C-free 突变蛋白仍然具有 β-淀粉酶活力, 只是其活力比野生型的低了 60 倍。Cys323S 突变体蛋白仍然保留有约 20% 的野生型 β-淀粉酶活力。但是, 不论是游离的 Cys 还是形成了二硫键的 Cys, 对于维持酶的正常活性都起了一

定的作用, 所有的突变体蛋白的活力比野生型的 β-淀粉酶至少降低了 5 倍。那么, 到底什么氨基酸是酶催化活性部位上的必需氨基酸呢? Uozumi 等<sup>[21]</sup>及 Isoda 等<sup>[22]</sup>用 α-EPG (2', 3'-epoxypropyl-α-D-Glucopyranoside) 抑制了 β-淀粉酶的活力, 初步分析是<sup>163</sup>Glu 被修饰的缘故, 表明<sup>163</sup>Glu 可能是 β-淀粉酶活力的必需基团。

*B. polymyxa* 来源的 β-淀粉酶在基因结构上有一个突出的特点, 就是 β-淀粉酶基因与 α-淀粉酶基因嵌合在一起。在克隆出的 35588 个核苷酸序列中, 正中间的一段直接重复顺序将基因分成两部分, 在其 5' 端上游是编码 β-淀粉酶的, 在其 3' 端下游是编码 α-淀粉酶, 整个基因编码的 130KDa 的前体蛋白既具有 β-淀粉酶活性, 又具有 α-淀粉酶活性。它在发酵过程中被分泌时很快被蛋白酶水解, 在 β-淀粉酶的 C' 端不同位点切割, 形成 70、56、42KDa 的三种不同分子量的 β-淀粉酶, 同时还形成了 48KDa 的 α-淀粉酶。这就从根本上说明了 *B. polymyxa* β-淀粉酶的多型性问题。上述的基因结构中的直接重复序列的作用及一些反向重复

序列的作用仍然未搞清楚,有待于今后深入研究。

#### 4 $\beta$ -淀粉酶的应用

耐热淀粉酶在食品及饮料工业中有很大的应用价值。高温不仅可以增加淀粉的可溶性,而且可以防止杂菌的生长。这对于降低成本是十分有利的。目前,耐热的 $\beta$ -淀粉酶主要来源于细菌<sup>[23]</sup>和一些放线菌<sup>[3,4]</sup>。其中有较大应用前景的耐热 $\beta$ -淀粉酶来源于*C. thermosulfurogenes*,是由Hyun等从温泉中筛选出来的。该酶具有很高的耐热性,其最适作用温度是75℃。在含有5%淀粉的环境中,该酶能够耐80℃的高温。但耐热机制尚未阐明。但从氨基酸顺序中发现,其中含有的亲水氨基酸的比率和其它来源的 $\beta$ -淀粉酶相比是比较低的。可能是较多的疏水氨基酸增加了酶分子内部的疏水力,使之在水溶液中紧密堆积成热稳定的结构,就如*B. stearothermophilus*中的中性蛋白酶热稳定性改变一样。另一个较显著的特征就是该酶有7个Cys残基,而来源于*B. polymyxa*的 $\beta$ -淀粉酶则只有3个。二硫键的增加可能会使蛋白质的热稳定性有所增强,这种二硫键对蛋白质的热稳定作用在T<sub>1</sub>lysozyme和subtilisin BPN'工作中有所报道。

Hyun等<sup>[11]</sup>用诱变的方法。Nipkow等<sup>[12]</sup>用连续培养的方法提高菌种的产酶能力,结果和工业应用的要求有很大差距。而Mizukami等<sup>[14]</sup>用基因工程技术将*C. thermosulfurogenes* $\beta$ -淀粉酶基因克隆到*B. brevis*工程菌株中,取得了很好的结果。该工程菌的培养温度是37℃,产酶能力在培养6天内持续增长,然后才稳定在产酶的最高水平。此工程菌可望用于耐热 $\beta$ -淀粉酶的工业生产。

在国外,微生物 $\beta$ -淀粉酶的主要用途是生产高麦芽糖浆,已有许多专利文献报道<sup>[25-28]</sup>,其具体情况尚不得知。中科院微生物所将微生物 $\beta$ -淀粉酶制剂应用于代替部分大麦芽生产啤酒和生产高麦芽糖浆,已通过成果鉴定。

#### 参 考 文 献

- [1] Higashihara Masataka, *et al.* Agric Biol Chem. 1974, **38** (5): 1023-1029.
- [2] Fogarty W M, Kelly C T. Microbial Enzyme and Biotechnology 2nd Edition. Elsevier Science Publishers LTD, 1990.
- [3] Obi S K C, *et al.* Appl Environ Microbiol. 1984, **5**: 571-575.
- [4] 周蓓芸等. 生物化学与生物物理学报. 1990, **22**: (1): 95-98.
- [5] Shinke Ryu, *et al.* J Ferment Technol. 1977, **55** (2): 103-109.
- [6] Shinke Ryu, *et al.* J Ferment Technol. 1979, **57** (1): 53-55
- [7] Takashi, N *et al.* Agric Biol Chem. 1983, **47**: (3): 609-611.
- [8] Takashi, N *et al.* Appl Environ Microbiol. 1987, **4**: 768-771.
- [9] 何秉旺等. 微生物学报, 1980, **20** (4): 421-426.
- [10] 何秉旺等. 微生物学报, 1983, **23** (1): 75-83.
- [11] Hyun H H, *et al.* J Bacteriol. 1985, **12**: 1162-1170.
- [12] Nipkow A. APPL Environ Microbiol. 1989. **5**: 689-694.
- [13] Nipkow A. Biotechnol Bioeng 1989. **34**: 1075-1084.
- [14] Makato, M *et al.* J Ferment Bioeng. 1992, **73** (2): 112-115.
- [15] Takashi, N *et al.* Appl Microbiol Biotechnol. 1985. **21**: 383-389.
- [16] Tetsu, K *et al.* J Bacteriol. 1987, 1564-1570.
- [17] Saha B C *et al.* Enzyme Microb Technol. 1987, **7**: (10): 571-575.
- [18] Sawao, M *et al.* Agric Bio Chem. 1979, **43** (4): 719-762.
- [19] Masami, H *et al.* Agric Bio Chem. 1975, **39** (12): 2415-2416.
- [20] Nobuyuki, U *et al.* J Bacteriol. 1989, **1**: 375-382.
- [21] Nobuyuki U *et al.* Biochemistry. 1991, **30**: 4594-4599.
- [22] The Amylase Research Society of Japan. Handbook of Amylases and Related Enzyme. Pergamon Press. 1988.
- [23] Hyun H H, *et al.* Appl Environ Microbiol. 1985, **5**: 1162-1167.
- [24] Noriyuki K, *et al.* J Bacteriol. 1988, **12**: 5848-5854.
- [25] EP-112147. 1984, CPC. International Inc (CORP).
- [26] Michigan Biotech (MICH-). US. 4814267. 1986.
- [27] Agency of ZND Sci Tech (AGEN) J. 60186296, 1984.
- [28] NOVO Industry. A/S. (NOVO) E. P. 234858. 1986.