



(12) 发明专利申请公开说明书

C12P 19/14
// (C12P 19/14
C12R 1:11)

(11) C N 85 1 04505 A

C N 85 1 04505A

(43) 公开日 1987年3月11日

(21) 申请号 85 1 04505

(22) 申请日 85.7.30

(71) 申请人 C P C 公司

地 址 美国新泽西州07632恩格尔伍德·克利
福斯邮政信箱8000国际广场

(72) 发明人 马丽一亨里特·戴维德 豪斯特·冈瑟
琼-克劳德德特鲁斯蒂姆伯格

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
代理部

代理人 辛敏忠 顾伯棣

(54) 发明名称 酶转化的方法

(57) 摘要

本发明有关一种酶转化方法，特别是来源于巨大芽胞杆菌具有 α -淀粉酶活性的酶把诸如淀粉，不完全水解的淀粉等多糖转化为葡萄糖，或该酶与葡萄糖淀粉酶共同使用完成这种转化的方法。

242/87102856/02

1. 一种把多糖转化为单糖或一种或多种低分子量多糖的酶转化方法，其特征在于多糖在PH 4.5—8.0范围内和酶接触，这种酶是从巨大芽胞杆菌中得到的，它显示 α -淀粉酶的活性。

2. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于所说的巨大芽胞杆菌是NCIB No. 11568菌株。

3. 根据权利要求1所述方法，其特征在于所说的多糖是淀粉，淀粉的不完全水解产物，支链淀粉或环糊精。

4. 根据权利要求1所述方法，其特征在于巨大芽胞杆菌的这种酶和葡萄糖淀粉酶一起用来将淀粉或淀粉水解产物转化为葡萄糖浆。

5. 根据权利要求1所述方法，其特征在于所说的淀粉水解物是麦芽糖糊精或一种液化的淀粉。

6. 根据权利要求4所述方法，其特征在于反应温度为40—65°C，最好是50°—60°C。

7. 根据权利要求4所述方法，其特征在于PH是4.5—5.5，最好是5.0。

8. 根据权利要求5所述方法，其特征在于麦芽糖糊精中含有溶解的固体物为20—40%（重量比），最好是25—35%。

9. 根据权利要求4所述方法，其特征在于所用的葡萄糖淀粉酶是0.05%—0.40%，最好是0.10—0.20%（这是据干物质计算的重量百分比）。

10. 根据权利要求1所述方法，其特征在于从巨大芽胞杆菌得到的酶的用量为0.1—2.0单位/克干物质。

11. 根据权利要求1或2所述方法，其特征在于，巨大芽胞杆菌的这种酶与有酒精混浊现象的葡萄糖浆接触，使混浊度降低了。

1 1。根据权利要求 1 或 2 所述方法，其特征在于，巨大芽胞杆菌的这种酶与有酒精混浊现象的葡萄糖浆接触时，使混浊度降低了。

酶转化的方法

本发明是关于一种酶转化的方法，特别是应用显示 α -淀粉酶活性的酶对诸如淀粉或不完全水解的淀粉等多糖进行酶的转化作用。

淀粉酶是一类重要的糖酶，并且有广泛的工业用途。其特点是能够水解淀粉化合物中的D-葡萄糖等键。商业上它主要用在淀粉加工技术。淀粉为分子量相当大的多糖，可以被 α -淀粉酶水解产生含有多达10个单糖的低分子量多糖。因此，这种酶也被称作“液化酶”，这是由于它通过裂解淀粉分子为液体，形成淀粉悬液或浓淀粉糊。其它的淀粉酶催化不同的水解反应，例如， β -淀粉酶催化淀粉、糖元或糊精分子的水解作用，水解出一分子的麦芽糖，而葡萄糖淀粉酶则催化由多糖或寡糖的非还原性末端移去葡萄糖。

显示 α -淀粉酶活性的酶可以从很多天然来源中得到，例如：从霉菌，真菌和细菌。不同有机体来源的酶，虽然都有 α -淀粉酶活性，一般能够催化 α -淀粉酶所催化的水解反应，但其作用条件，特别是温度，PH值常常并不相同。在工业实用上，这种差异可能很重要。

在我们欧州专利81300578.2中，我们特别叙述了用遗传工程技术得到微生物生产具有淀粉酶活性的酶的方法。在该专利中谈到了许多微生物可提供遗传工程微生物生产多种有淀粉酶活性酶的编码基因。专利81300578.2揭示的这些供体微生物的一种是巨大芽胞杆菌 (*Bacillus megaterium*) 虽然没有描述这种微生物所生产的酶，其性质与欧州专利所生产的淀粉酶活性有所不同。然而，我们已经发现，从巨大芽胞杆菌得到的有淀粉酶活性的该酶具有特殊性质，从而它在某些工业生产上有其特殊应用。

本发明包括一种将多糖转化为单糖或多种低分子量多糖的方法，条件为：PH值范围为4.5—8，用来源于芽胞杆菌显示有 α -淀粉酶活性的酶。

巨大芽胞杆菌最好是来自贮存号为NCIB N. 11568的菌株。

用于本发明方法的酶可以催化不同成分的多糖转化。因此，虽然它主要在商业上用于使淀粉或淀粉的不完全水解物转化成单糖或低分子量的多糖，它也催化支链淀粉的转化，其产物几乎完全是三糖，即6- α -葡萄糖基麦芽糖。巨大芽胞杆菌的酶与其它具有 α -淀粉酶活性的酶不同，它还能催化环糊精，最终水解成含有大量葡萄糖，麦芽糖和麦芽三糖等产物。

当用于淀粉加工时，来源于巨大芽胞杆菌具有淀粉酶活性的酶可以有效地用于淀粉酶催化的通常的水解反应，例如：生产液化淀粉。然而该酶最主要的用途是用于淀粉或淀粉水解产物生产葡萄糖浆的过程，而此水解反应是由葡萄糖淀粉酶催化的，我们发现可以选择巨大芽胞杆菌的酶和葡萄糖淀粉酶同时并在同一介质中使用的条件。特别是可将巨大芽胞杆菌中具 α -淀粉酶活性的酶加入到常规的糖化反应中，该反应的原料是麦芽糖糊精或液化淀粉。而水解酶是葡萄糖淀粉酶。它们共同使用具有下列意想不到的优点。

(1) 用一定量的葡萄糖淀粉酶，可以缩短糖化时间，或在一定的糖化时间内可减少葡萄糖淀粉酶的用量。

(2) 用高浓度的溶解固体作反应原料（高达重量百分比浓度110%或更高）可得到同样葡萄糖浓度的产物。从标准的原料或稍微增加溶解固体的原料可以产生葡萄糖浓度增高的产物（增加了重量百分比0.5—1%）和低分子量的寡聚物CDP_n降低到0.2%，这里DP代表“葡萄糖多聚物”而n代表多聚物中葡萄糖单位的数目。

(3) 下文要提到的“酒精浊度”降低了。“酒精浊度”表示多糖中寡聚物的含量。

上述方法中葡萄糖淀粉酶和巨大芽胞杆菌的酶共同使用时，较好的温度范围是 40°C — 65°C ，最好是在 55°C — 60°C 间。较好的PH范围为4.5—5.5，最好的PH值大约为5。一般来说PH值越低所用的温度也越低。反之亦然。麦芽糊精原料可含20%—40%的溶解固体，最好含25—35%溶解固体。葡萄糖淀粉酶合适用量为0.05—0.40%，最适用量为0.10—0.20%，这个百分数是基于干物质计算的。巨大芽胞杆菌的酶合适用量为0.02—1.0。单位/克，最适用量为0.1—2.0单位/克干物质。得到的产物可含96%以上的葡萄糖，较好的产物含97%以上葡萄糖，最好情况下可达97.5%以上。

酶工艺学上常以单位/克干物质来表示巨大芽胞杆菌中有淀粉酶活性酶的浓度，这里因为酶样品显示的活性可能不同，取决诸如它们的纯度等等。特定样品的活性是通过PHADEBAS 试验测定的，即用商业上可购到的一套试剂及器械，它是基于在有严格控制情况下光学测定酶所释放的一种染料的强度。如果该酶的活性完全未知，则首先将样品用水稀释成一系列不同浓度的稀释液，然而用下述方法，在一定试验条件下测定其染料的光密度，从而可测定其酶含量。然后再与空白对照比较重复这个浓度的测定。

详细地说，将200微升稀释的酶样品放入试管中并与4毫升缓冲液混合，对照管盛有200微升无离子水和4毫升缓冲液。缓冲液含20毫克分子醋酸钠和2毫克分子的氯化钙把PH调至5。每个样品中加入一片PHADEBAS，搅拌10秒钟，然后移放在不断搅动的 55°C 水浴中15分钟。PHADEBAS片含有一种染料和缓冲两种缓冲系统混在一起，使试验的最终PH达到6.3。

15分钟后，加入1毫升0.5克分子氢氧化钠以中止反应，搅动样品，然后在大约 $1500 \times g$ 下离心5分钟，再过滤。用1厘米光路的比色杯盛无离子水为对照，在620毫微米处测定其消光度，样品消光度减去对照的消光度。从PHAD E B A S标准曲线中测得的淀粉酶活性单位是以单位/升表示之。然后这个以单位/升表示的值可以换算为单位/克干物质。

巨大芽胞杆菌的该酶除了用于生产高葡萄糖浆外，还可以用来改善所得到的这种糖浆的质量。特别是当在上述PH和温度条件下，葡萄糖淀粉酶和巨大芽胞杆菌的该酶结合使用时，可降低糖浆的“酒精浊度”通过再用离子交换树脂处理以致完全消除酒精浊度。

本发明将进一步引用下列例子来说明。

所用仪器包括一系列恒温水浴，装在摇床上的圆底烧瓶。一般来说原料包括含0.02克分子醋酸钠的起稳定PH作用的缓冲液配制的500毫升麦芽糖糊精液，溶液还含钙离子80毫克/升（氯化钙）。开始用醋酸调节反应液的PH，再把酶加入初反应液。每天两次用PH计测量以控制反应的PH值，如果PH降低则加氢氧化钠来调节。每24小时取出100毫升样品，加热煮沸30分钟使酶变性，然后过滤。滤液中葡萄糖含量可用高压液相色谱测定，再进行酒精浊度试验。

“酒精浊度”通过下列步骤测定：

(1) 把样品放在100毫升的烧瓶中，使其中含0.91克溶解的固体（通过折射仪测定）。

(2) 加无离子水使水量为3.39克。

(3) 加27毫升99.8%的乙醇。

(4) 搅动并加热煮沸9—10分钟。

(5) 用自来水冷却,

(6) 用4厘米的比色杯, 在578毫微米测定其光密度。

例中应用的葡萄糖淀粉酶是由 Miles — Kali 化学公司提供的 OPTIDEX L 150 (OPTIDEX 是商标)。

例 1

来源巨大芽胞杆菌 NCIB NO. 11568 具有 α -淀粉酶活性的酶对于葡萄糖淀粉酶催化 18DE 麦芽糊精水解成葡萄糖的影响。

培养液含有以重量计浓度为25%溶解的固体物, 反应温度保持在 55°C。通常在 PH 4.2 条件下, 单用葡萄糖淀粉酶进行了水解作用加入巨大芽胞杆菌酶后, PH 增高到 5.0。下面表 1 为 48 小时之后所得的葡萄糖产量

表 1

葡萄糖淀粉酶 重量%	巨大芽胞杆菌酶 单位/克	葡萄糖产量 重量%
0.10	—	95.0
0.14	—	95.9
0.10	1.5	96.6
0.13	1.5	96.8

例 2

在反应液中增加溶解固体物时，巨大芽孢杆菌 N C I B N O . 1 1 5 6 8 的 α -淀粉酶对于葡萄糖淀粉酶催化 1 8 D E 麦芽糖糊精水解成葡萄糖的影响。

在 6 0 °C 和 P H 5 的条件下所进行的水解作用。葡萄糖淀粉酶的加入量为 0. 0 7 5 % (重量) 巨大芽孢杆菌酶为 1. 5 单位/克，结果见表 2

表 2

% (重量比) 溶解的固体物	时间 (小时)	葡萄糖产量 %重量
1 5	4 8	9 5. 6
1 5	9 6	9 7. 9
2 5	4 8	9 4. 0
2 5	9 6	9 7. 0
3 5	4 8	9 1. 6
3 5	9 6	9 5. 7

例 3

在 60° 和改变葡萄糖淀粉酶浓度时，巨大芽胞杆菌 N C I B No. 11568 的 α -淀粉酶对葡萄糖淀粉酶催化 18 D E 麦芽糊精水解成淀粉糖的影响。

反应液含有以重量计为 25% 的溶解固体物，P H 为 5，巨大芽胞杆菌酶的浓度为 1.5 单位/克。反应 72 小时之后，结果如表 3 所示

表 3

葡萄糖淀粉酶 重量%	葡萄糖产量 重量%
---------------	--------------

0.10

97.2

0.08

96.9

0.05

93.1

例 4

在 55°C 与不同 P H 值时，来源于巨大芽胞杆菌 N C I B No. 11568 具有 α -淀粉酶活性的酶对于葡萄糖淀粉酶催化 12 D E 麦芽糊精水解的影响。

在这一系列实验中，所用的缓冲液是 0.1 M 醋酸钠，葡萄糖淀粉酶的浓度为 0.15% 重量，而巨大芽胞杆菌酶为 1.5 单位/克。48 小时后的结果如下面表 4。

P H	葡萄糖产量重量 %
4.6	96.0
4.8	96.6
5.0	96.8
5.2	96.4
5.4	96.1

例 5

在 55 °C, P H 为 5.0 并改变葡萄糖淀粉酶量和巨大芽孢杆菌酶量时, 巨大芽孢杆菌 N C I B No. 11568 具有 α -淀粉酶活性的酶对于葡萄糖淀粉酶催化 I S D E 麦芽糊精水解的影响。

结果如下表 5 所示

表 5

葡萄糖淀粉酶 量%	0.10	0.075	0.05	0.04	0.03

巨大芽胞 杆菌酶 单位/克	0.75	1.5	0.75	1.5	1.5	3.0	6.0	6.0
时 间 (小时)	72	72	96	96	96	96	96	96
葡萄糖 产量 重量%	97.1	97.0	97.5	97.3	97.3	96.7	95.8	93.1

例 6

巨大芽胞杆菌 NCIB NO 11568 来源具有 α -淀粉酶活性的酶对 α -环状糊精的水解作用的影响。

反应液含有 15% 溶解的固体物，和不同浓度的巨大芽胞杆菌，反应保持在 60°C 和 PH 6 的条件下进行 240 小时后，其结果如下面表 6 所示，

表 6

巨大芽胞杆菌酶的浓度	单位/克	葡萄糖产量	重量%
15		44.8	
30		77.7	

例 7

应用商业上可购到的 α -淀粉酶与葡萄糖淀粉酶结合的比较实验，除了培养液含 3.2% 溶解的固体物外，其余反应条件均与例 1 相同。96 小时后的结果如表 7 所示并证明因而（它与来源于巨大芽胞杆菌具有 α -淀粉酶活性的酶不同）商品 α -淀粉酶对葡萄糖淀粉酶水化作用不起促进作用，即使在 96 小时之后亦如此。

	葡萄糖淀粉酶 0.18%重量	外加重量 0.18% 葡萄糖淀粉酶	
		A	B
产物中葡萄糖 重量%	93.7	93.6	94.3
酒精浊度	0.240	0.490	0.043

A = 5.6 单位/克 商业可购得的 α -淀粉酶

B = 1.5 单位/克 巨大芽胞杆菌 N C I B No. 11568
的 α -淀粉酶

例 8

葡萄糖淀粉酶催化水解的产物葡萄糖浆含有95.8%葡萄糖(重量计)和浊度为1.550的酒精。

样品分成两部分,在55°C和PH为5.0条件下用a,(巨大芽胞杆菌NCIB 具有 α -淀粉酶活性的酶 NO. 11568)及b,(商品 α -淀粉酶)分别处理试验结果见表8

表 8

	巨大芽胞杆菌具有 α -淀粉酶活性的酶			商品 α -淀粉酶	
	0.25u/g	0.5u/g	0.075u/g	0.15u/g	0.3u/g
葡萄糖	95.5	95.3	95.7	95.5	95.3
酒精浊度	0.176	0.045	1.410	1.380	1.240

$u/g = \text{单位/克}$

例 9

把一种含有 5% (重量计) 溶解固体的支链淀粉液在 55°C, PH 5.6 下用 50 单位/g 的来源于巨大芽胞杆菌 N C I B No. 11568 菌株的 α -淀粉酶干物质处理 24 小时。98% 的支链淀粉被转化为 6- α -葡萄糖基麦芽糖。