

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 87106754.4

[51]Int.Cl⁵

C12N 9/26

[45]授权公告日 1994 年 9 月 28 日

[24]颁证日 94.7.5

[21]申请号 87106754.4

[22]申请日 87.10.6

[30]优先权

[32]86.10.6 [33]JP[31]236147/86

[73]专利权人 株式会社日立制作所

地址 日本东京

[72]发明人 石田昌彦 芳贺良一

西村勇作 佐藤雅美

C12N 9/34

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

C12P 19/08

代理人 全 菁 吴大建

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 淀粉酶的分离精制方法,所用的吸附剂及
分离精制装置

[57]摘要

具有分支链的多聚葡萄糖经分子间及/或分子内的
交联处理得到的交联多聚葡萄糖,或葡萄糖的 α -
1,4 结合均低聚物经分子间交联处理得到的交联均低
聚物能选择性地吸附葡糖淀粉酶和 β -淀粉酶,由于
使用三元交联高分子物质,能将葡糖淀粉酶和 β -淀
粉酶极其有效地分离精制。

权利要求书

1. 微生物衍生的葡萄糖淀粉酶及微生物衍生的 β -淀粉酶的分离和精制方法, 该方法包括以下步骤:

将含有微生物衍生的葡萄糖淀粉酶和/或微生物衍生的 β -淀粉酶的粗酶水溶液与三维、交联的高分子物质接触; 该高分子物质是在碱性条件下使用表卤醇通过其中的羟基使具有聚合度为2—6的 α -1, 4结合的葡萄糖均低聚物进行分子间交联而获得; 或者是在碱性条件下使用表卤醇通过其中的羟基使具有预先用淀粉酶处理通过水解其中的 α -1, 4-结合而使分支链缩短的支链的糖原或支链淀粉进行分子间和/或分子内交联而获得; 从而吸附微生物衍生的葡萄糖淀粉酶和/或微生物衍生的 β -淀粉酶;

通过相互之间不同的亲和力将吸附有微生物衍生的葡萄糖淀粉酶和/或微生物衍生的 β -淀粉酶的三维、交联的高分子物质的水合凝胶与上述溶液分离;

使上述水合凝胶与浓度至少为0.5M的弱碱性含盐水溶液接触, 使上述吸附的淀粉酶解吸; 以及回收微生物衍生的葡萄糖淀粉酶和微生物衍生的 β -淀粉酶。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述的粗酶水溶液含有作为污染物的 α -淀粉酶。

本发明提出淀粉酶的分离精制方法及其所用的吸附剂和分离精制装置, 特别是关于用交联多聚葡萄糖或交联均低聚物高选择性的吸附葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶的淀粉酶分离精制方法及装置。

现在, 工业上是用 α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶或 β -淀粉酶对淀粉进行加水分解的方法生产葡萄糖、异构化糖和麦芽糖的。

这样, 葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶对于从淀粉中生产有用的低分子性甜味料, 则非常有用。

通常情况, 酶是由生成酶的微生物、即酶的产生菌, 经过液体培养制造的。作为研究用试剂的酶, 是由盐析法和离子交换色谱电泳法相组合, 通过复杂的分离精制过程, 加以部分精制或高度精制而被应用。

与此对比, 工业用的酶制剂, 则是由培养滤液不经任何处理而加以浓缩的浓缩液或其干燥的粉末, 或者经过分离精制之后所得到的浓缩液或其干燥粉末而制取。

但是, 在培养滤液的浓缩液和粗干燥品中, 由于含有培养液中所含有的多量令人讨厌的臭味成分和着色成分, 所以在分离精制作为目的物的反应生成物时, 最后必须要把这些成分除去。另外, 在培养滤液中多半还都含有蛋白分解酶类。在除淀粉酶之外还含有蛋白分解酶类的培养滤液等的粗酶溶液中, 于精制过程中及目的反应进行时, 由于蛋白分解酶的作用, 淀粉酶也常常被分解而失去活性, 因此在利用淀粉酶等的酶反应生产有用物质时, 就必须除去这些成为不利因素的不纯物质。这样, 就给后续的反应生成物的分离精制工序增加了很大的负担。

应用一般性的精制方法, 如已知的盐析法和液体色谱法, 只能限于作到部分浓缩, 要想提高分离的精度, 就须要改变一些操作条件, 例如沉淀剂的种类、浓度、pH、充填剂的种类、吸附剂及解吸剂的种类, 须要经过把这些条件加以组合搭配的复杂过程。

不仅如此, 操作中还须添加多量的作为沉淀剂或作为溶出剂的盐, 而在进入到下一步工序时, 还必须进行脱盐操作。此外, 在这些个精制过程中还要产生盐浓度高达10%的BOD废液, 这也须要进行处理, 而且这一处理步骤相当复杂。

鉴于以上原因, 由这些复杂工序所构成的人们所熟知的精制方法, 自然就被局限于专门进行研究的试剂等方面了。

尤其是对被认为难以精制的葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶, 由于酶的起源不同, 不同酶的分子构造也有所差异, 尽管如此, 如果开发出具有高选择性、高效性的吸附剂的话, 便能够从培养滤液中将上述两种酶按同一等级进行高纯度的浓缩分离。

本发明者们, 着眼于早已知晓的、以直链淀粉为吸附剂的吸附法作为 α -淀粉酶的精制方法(直链淀粉—是葡萄糖的直链状聚合物, 分子量10~40万, 葡萄糖聚合数为 $5 \times 10^2 \sim 2 \times 10^3$), 并将这种方法试用于葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶的精制。

但是, 与精制 α -淀粉酶相比较, 其吸附容量只有千分之一以下, 非常之低, 很显然, 以淀粉作

为吸附剂的这种众所周知的方法,对于葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶的精制是没有实用意义的。

本发明之目的是提供:从除葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶之外还含有多种多样不纯物的酶含有液中,对作为目的物的淀粉酶具有高选择性、高吸附性的吸附剂。

本发明之其它目的是提供:在和葡萄糖淀粉酶或 β -淀粉酶的水溶液接触之后,就和这些淀粉酶形成复合体而变为不溶于水的凝胶,从而能非常容易地分离精制葡萄糖淀粉酶或 β -淀粉酶的吸附剂。

本发明之再其它目的是提供:具有高选择性、能高效性吸附分离葡萄糖淀粉酶或 β -淀粉酶的新规交联多聚葡萄糖和新规交联均低聚物。

本发明之再其它目的是提供:交联多聚葡萄糖及交联均低聚物的制造方法。

未发明之再其它目的是提供:从除葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶之外尚含有多种多样不纯物的酶含有液中,为了高选择性高效性的吸附分离目的淀粉酶而用交联多聚葡萄糖或交联均低聚物分离精制淀粉酶的方法。

本发明之再其它目的是提供:使对葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶两者之一或两者进行选择性的吸附的新规吸附剂和酶含有液相接触,根据目的的不同,吸附分离两种酶中的一种或两者的淀粉酶的分离精制方法。

本发明之再其它目的提供:使吸附剂吸附的葡萄糖淀粉酶及 β -淀粉酶容易解吸的方法。

本发明之再其它目的是提供:具有高选择性高效性地吸附分离葡萄糖淀粉酶及 β -淀粉酶的淀粉酶分离精制装置。

本发明的再其它目的和优点:阅读以下记载便明了。

本发明的第一方面是:通过使具有分支链的多聚葡萄糖的分子间和/或分子内交联化,得到三维交联高分子物质(交联多聚葡萄糖)。

本发明的第二方面是:通过使葡萄糖的 α -1, 4结合的均低聚物的分子间交联化,得到三维交联高分子物质(交联均低聚物)。

本发明的第三方面是:以包括三项工序为特征的淀粉酶的分离精制方法。

第一项工序是:使含有葡萄糖淀粉酶及 β -淀粉

酶中的一种或两者的粗酶水溶液,与有分支链的多聚葡萄糖分子间和/或分子内交联化所得到的三维高分子物质、或与将葡萄糖的 α -1, 4结合的均低聚物经分子间交联化所得到的三维交联高分子物质的任何一种或两者相接触,吸附葡萄糖淀粉酶及 β -淀粉酶中的一种或两者。

第二项工序是把已吸附酶的三维交联高分子物质的水合凝胶与液体加以分离。

第三项工序是:使该水合凝胶和弱碱性水溶液, 0.5M 以上浓度的盐水溶液以及弱碱性并含有盐的水溶液中的任何一种相接触,以使吸附的酶解吸。

本发明的第四方面是:有分支链的多聚葡萄糖或葡萄糖的 α -1, 4结合的均低聚物,在60℃下对水的溶解度至0.01%以下为止的交联处理交联多聚葡萄糖或交联均低聚物的制造方法。

本发明的第五方面是:淀粉酶的分离精制装置。该装置的特征是由两个槽相联结所构成,一个是为了使含有葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶之一或两者的粗酶水溶液进入的菌体去除培养液贮槽;另一个是为了使有分支链的多聚葡萄糖进行分子间和/或分子内交联化得到的交联多聚葡萄糖或葡萄糖的 α -1, 4结合的均低聚物与粗酶水溶液接触的淀粉酶吸附槽。

图例的简单说明:

第1图示出应用交联剂表卤醇(epihalogenhydrin)所得之交联多聚葡萄糖的代表性构造单位的例子。

第2图和第3图示出应用交联剂表卤醇。

所得之交联均低聚物的代表性构造单位的例子。

第4图示出分离精制葡萄糖淀粉酶或 β -淀粉酶使用的装置;用悬浮混合方法使吸附剂和菌体去除培养液相接触的装置。

图5图示出用充填柱使吸附剂和菌体去除培养液相接触进行淀粉酶分离精制的装置。

图6图示出用流动层使吸附剂和菌体去除培养液相接触进行淀粉酶分离精制的装置。

图例的详细说明:

以下展示本发明所用之理想的吸附剂。

(a)葡萄糖一是在由 β -1, 4-结合而聚合的主链上,以非还原性葡萄糖残基作为开放末端,而且

具有由葡萄糖 α -1, 4 结合而聚合的分支链的分支多聚葡萄糖, 是以相当于分支点的支链中的葡萄糖残基占分子中全葡萄糖残基数的 5% 以上的分支度, 由 α -1, 6 结合而分支的分支多聚葡萄糖进行分子间和 / 或分子内交联化所获得的三维交联高分子物质(交联多聚葡萄糖)。

分支链的平均聚合度为 2~50, 以 2~20 为好。

将表卤醇(epihalgenhydrin)作为交联剂使用的该物质的代表性构造单位的例子, 示于第 1 图。

(b)交联化前的(a)所记载的分支多聚葡萄糖, 在淀粉酶类、特别是葡萄糖淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -淀粉酶的作用下, 使分支链的葡萄糖的平均聚合度在 2 以上 6 以下, 用这种短链化的分支多聚葡萄糖的交联化所得到的三维交联高分子物质(交联多聚葡萄糖)。

在第 1 图中, 这样的交联多聚葡萄糖, e 及 f 相当于 0~4。

(c)葡萄糖分子为 2~50, 通过 α -1, 4 结合, 使直线状聚合的均低聚物进行分子间交联化所获得的三维高分子物质(交联均低聚物)。

将表卤醇作为交联剂使用的该物质的代表性构造单位之例, 示于第 2 图及第 3 图。

本发明所用的吸附剂, 由于不能吸附 α -淀粉酶, 所以能够把葡萄糖淀粉酶及 / 或 β -淀粉酶和 α -淀粉酶分离开。

通过本发明用的吸附剂交联多聚葡萄糖的分支链, 或制造交联低聚物用的低聚物的链长的调节, 而能将葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶相互分开。即将分支链或均低聚物的链长缩短, 也就是通过使交联多聚葡萄糖的分支链的葡萄糖的平均聚合度成为 2~6、最好为 2~4 以下, 或通过使制造交联低聚物用的均低聚物的葡萄糖的平均聚合度成为 2~6、最好为 2~4 以下。这样, 对 β -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶二者, 则能选择性的吸附后者。

在此所用的交联多聚葡萄糖以淀粉酶短链化的糖原的交联多聚葡萄糖为好。交联均低聚物, 则以麦芽糖、麦芽三糖等的交联均低聚物为理想。另外, 如果将分支链或链长延长, 即:如果用分支链的平均聚合度 4~50、最好是 4~20 的交联多聚葡萄糖、或平均聚合度 4~50、最好是 4~20 的均低聚物所获得的交联均低聚物的话, 则对葡萄糖淀粉酶和 β -

淀粉酶两者均能吸附。这里所用的吸附剂, 以糖原的交联多聚葡萄糖、或麦芽四糖, 麦芽六糖的交联均低聚物为好。

在弱碱性水溶液、或 0.5M 以上浓度的盐水溶液、或弱碱性并含有盐水的水溶液中, 吸附剂能更容易地吸附葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶。

葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶的吸附和解吸的操作温度, 以在冰点以上而又不引起加水分解反应的温度范围内进行最为理想。

这是因为, 本发明所用的吸附剂中具有接受葡萄糖淀粉酶、 β -淀粉酶或粗酶液中含有的其它的葡聚糖酶加水分解作用的结构; 还由于粗酶液中含有令人担心的蛋白酶, 所以必须要考虑到葡萄糖淀粉酶、 β -淀粉酶目的酶的分解及对热的稳定性问题。

对含有淀粉酶类的粗酶液, 经过不同种类吸附剂接连进行的吸脱操作, 便能把各种淀粉酶分别加以分离。

例如, 以含有 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶的粗酶液作为试料液, 首先, 以带有平均聚合度 2~6、最好是 2~4 以下的分支链的交联化多聚葡萄糖、或者由平均聚合度 2~6、最好是 2~4 以下的均低聚物所获得的交联均低聚物作为吸附剂, 使其选择性地吸附葡萄糖淀粉酶; 对含有非吸附成分的残液, 通过使其与带有平均聚合度 4~50、最好是 4~20 分支链的交联多聚葡萄糖、或者与由平均聚合度 4~50、最好是 4~20 的均低聚物所获得的交联均低聚物相接触而把 β -淀粉酶吸附; 把最后的残液作为 α -淀粉酶含有液加以分离, 或者用人们熟知的淀粉吸附法使之和淀粉相接触, 进而吸附分离出 α -淀粉酶。如果使各柱状物在弱碱性水溶液等中能解吸吸附的酶, 则能将三种酶各自分别加以分离精制。

或者还可以, 以含有 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶的粗酶液作为试料液, 用平均聚合度 4~50、最好是 4~20 分支链的交联多聚葡萄糖、或用由聚合度 4~50、最好是 4~20 的均低聚物所获得的交联均低聚物作为吸附剂, 使之选择性地吸附葡萄糖淀粉酶及 β -淀粉酶, 进而对所得到的葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶, 再用前面所说的只选择性吸附葡萄糖淀粉酶的吸附剂吸附该酶, 如此便可将葡萄糖淀粉酶与 β -淀粉酶加以分离。

或者还可以用前面所说的只吸附葡萄糖淀粉酶的吸附剂处理含有葡萄糖淀粉酶及其它淀粉酶的试料液。也可以从试料液中单独把葡萄糖淀粉酶分离出来。

或者还可以用前面所说的吸附葡萄糖淀粉酶及 β -淀粉酶的吸附剂处理含有葡萄糖淀粉酶、 β -淀粉酶以及其它淀粉的试料液。

这样就可以从试料液中把葡萄糖淀粉酶及 β -淀粉酶分离出来。

关于吸附剂和粗酶液的接触,可用形成分批式混合床、流动层、充填层、充填层的任何一种形态所用的方法和装置。

葡萄糖淀粉酶及 β -淀粉酶是本发明的对象酶,如果是在本酶的分类范围之内,对其起源生物并无特别的限制。

例如起源于曲霉属和根霉菌属的丝状菌,酵母菌属的酵母,细菌属的细菌的 β -淀粉酶,均可适用。另外,起源于曲霉属和根霉菌属的丝状菌、酵母菌属的酵母、细菌属及梭状芽胞杆菌属的细菌葡萄糖淀粉酶,亦均适用。

制造本发明吸附剂的原料多聚葡萄糖(α -葡聚糖),应用的是高分支的葡聚糖。其分支的程度,如果能用相当于分支点的葡萄糖残基占分子中的葡萄糖残基总数的5%以上者,颇为理想。更为理想的分支度是5~35%。若是含有15%以上分支点的 α -葡聚糖就更为合适。这样,作为天然 α -葡聚糖之例者,可举出糖原和高分支型的支链淀粉。对这些糖原和高分支型支链淀粉的起源生物也没有特别的限制。无论动物起源的还是微生物起源的糖原,都可应用。

另外,这些 α -葡聚糖也不仅限于上面所说的从天然原料中所分离出来的,也可以应用把分支链经过酶的处理而短链化的加工的 α -葡聚糖。关于 α -葡聚糖短链化的处理,最好应用前面所说的葡萄糖淀粉酶、 β -淀粉酶或 α -淀粉酶。这些酶的种类也没有特别的限制。处理时的反应条件,应根据基质 α -葡聚糖的种类、浓度等的不同,适当加以选择;分支链的葡萄糖的聚合数,须适当调节,限制在2以上6以下的范围。

α -葡聚糖的分支度不足5%时,葡萄糖淀粉酶的吸附容量低,所以没有实用意义。

作为制造本发明的吸附剂交联均低聚物的原料

的均低聚物(低聚糖),最好用葡萄糖分子是 α -1,4结合的直线状聚合的、聚合数2~50的低聚糖。这种低聚糖,无论是单一成分或是混合物均可应用。但是,如果想要相对的选择性吸附 β -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶中的一种时,最好是选择聚合度不同的低聚糖。此类低聚糖可列举出:麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽六糖等。

上述的均低聚物(低聚糖)或多聚葡萄糖(α -葡聚糖)的交联方法,没有特殊的限制,但是其交联的程度,如果能在吸附 β -淀粉酶或葡萄糖淀粉酶时,作为所用之温度在冰点以上60℃以下、最好是在60℃对100克的水使得本发明吸附剂的溶解度在0.01克以下进行分子间和/或分子内交联,是相当好的。

这样,通过交联处理调制的本发明的吸附剂,便是水合性凝胶或固体。

另外,将交联处理的吸附剂放在60℃水中浸渍一天后形成的水合凝胶,其对吸附剂的重量比,从凝胶的机械强度和吸附部位的密度方面出发,以3~50为好。

交联反应及其条件,根据 α -葡聚糖或低聚糖的种类,浓度、酶吸附时的使用条件、适当加以选择。作为反应,例如可以用表氯醇等的表卤醇,在葡萄糖残基的OH基之间进行交联来完成。作为表卤醇,则以表氯醇最为实用。用表卤醇时,其添加量,以原料 α -葡聚糖或低聚糖溶液的0.5~3倍为合适。原料中的 α -葡聚糖或低聚糖的浓度,以至少在1%以上为宜。交联反应要在有碱存在的情况下进行,碱以用苛性钠、苛性钾等强碱为好,其浓度以对1N以上的表卤醇的卤,含有等当量以上的碱为好。温度是在30℃以上进行。根据温度、碱的浓度来适当的选择反应时间,60℃时,需要30分钟以上。在反应过程中,当表卤醇层和水层接触时,随着凝胶的生成,液体的粘性上升,为此需要进行搅拌。

淀粉酶被吸附剂吸附及解吸时的液性条件,根据目的酶、粗酶液中不纯物的组成和吸附剂的特性以及目的等,进行适当的选择,一般在以下条件时便可实施。

吸附在pH3.0~7.5的范围内进行。解吸剂溶液的pH值最好在7.6以上,从酶的稳定性来考虑,一般应在9.0以下的弱碱性中进行。另外,对

群吸用的盐溶液的盐的种类没有特别的限制。可以从中性盐、弱酸性盐、弱碱性盐中适当选择应用之。最便于使用的盐是氯化钠和氯化钾。解吸时所用的盐溶液，也可以和弱碱性并用。盐溶液的盐浓度，根据所要分离精制的酶的特性、盐的种类、溶液的 pH 值等而有所不同。一般在 0.5M 以上的状态下进行操作。3M 以上的盐浓度，从以后的脱盐操作和酶的失活以及易于发生盐析等方面来看，是没有实用性的。

其次，关于本发明的方法及分离精制装置的结构，用第 4~6 图的流程说明之。

在第 4 图的装置中，把生成葡萄糖淀粉酶和 β -淀粉酶之一或二者的酶生产菌，放在培养槽 2 进行培养，获得培养液 1。培养条件要根据菌的特性、酶生产的目的，适当选择。培养结束后，含有淀粉酶类的培养液 1，经过输送管道 3，贮存在贮槽 4。接之，用离心分离等的固液分离装置，将菌体浆液 10 和菌体去除培养液 12 加以分离。含有淀粉酶的菌体去除培养液 12 经过输送管道 8，贮存在贮槽 13。将菌体去除液 12 导入于淀粉酶吸附槽 16，能选择性吸附淀粉酶中作为分离对象淀粉酶的、在贮槽 19 中的本发明的吸附剂 18，经过管道 17 添加到吸附槽 16。在规定的条件下混合，使之与固液接触。接触时的液性，例如 pH 值、温度、盐浓度等，与前面所说的范围相同，并结合所吸附淀粉酶的种类，适当加以选择。在本图情况下，接触是在已为众知的搅拌方法下，例如用搅拌翼进行机械搅拌进行。关于槽内温度，应在不引起葡萄糖 α -1, 4 结合及 α -1, 6 结合的酶发生加水分解反应的低温域下进行。关于吸附时间，也要如同前面所说的那样，适当加以选择。吸附完了的淀粉酶用吸附剂—菌体去除培养液混合物 15，导入于固液分离装置 21。在该处，吸附淀粉酶的吸附剂和液体分离，接之用洗涤水 22 洗涤清除粘着的液体。将获得的淀粉酶吸附—洗涤处理吸附剂 25，输送到解吸槽 30。把淀粉酶清除培养液及洗涤废液 46 经管道 24 贮存在贮槽 45。使淀粉酶吸附—洗涤处理吸附剂与解吸剂溶液 26 相接触，以解吸吸附的淀粉酶。解吸的吸附剂—解吸剂溶液混合物 29，再次用固液分离装置 32 使固液分离。使分离过的淀粉酶解吸之后的吸附剂 36 与淀粉酶解吸液 35 分离。淀粉酶群吸液贮存在贮槽 38。根据

需要，将其导入脱盐装置 40 内，以便对解吸剂溶液中的盐类及碱性成分进行脱盐。将含有脱盐处理过的淀粉酶的溶液，用浓缩干燥装置 43 分离为合宜的浓缩液或干燥粉末。

图中:5 为培养液贮槽，6 为培养液输送管道，7 为固液分离装置，9 为菌体浆液输送管，11 为菌体浆液贮槽，14 为菌体去除培养液输送管道，20 为淀粉酶用吸附剂—菌体去除培养液混合物输送管道，23 为洗涤水，27 为吸附剂溶液贮槽，28 为解吸剂溶液输送管道，31 为吸附剂—解吸剂溶液混合物送管道，33 为淀粉酶解吸完的吸附剂输送管道，34 为淀粉酶解吸液输送管道，37 为淀粉酶解吸完的吸附剂贮槽，39 为淀粉酶解吸液输送管道，41 为脱盐用离子交换本体，42 为脱盐处理淀粉酶溶液，44 为浓缩淀粉酶。

或者象第 5 图的流程图所表示的那样，使第 4 图的吸附剂和菌体去除培养液之间接触的悬浮混合的方法，可用充填有吸附剂 115 的充填柱施行。首先，将菌体去除培养液 112 经过输送管道 114 送到淀粉酶吸附塔 116 内，用充填在塔内的吸附剂 115 把淀粉酶吸附。其次，洗涤水 119 经管道 117 通到吸附塔 116 进行洗涤，将洗涤废液 126 贮存在贮槽 27 中。然后，将解吸剂溶液 122 经过管道 23 导入吸附塔 116，使之解吸淀粉酶。含有淀粉酶的淀粉酶解吸液 130，和第 4 图的情况相同，按照需要进行脱盐、浓缩、干燥。

图中:118 为洗涤水贮槽，120 为淀粉酶去除培养液输送管道，121 为解吸剂溶液贮槽，124 为洗涤废液输送管道，125 为淀粉酶解吸液输送管道，128 为淀粉酶去除培养液，129 为淀粉酶去除培养液贮槽，131 为淀粉酶解吸液贮槽，132 为淀粉酶解吸液输送管道，133 为脱盐用离子交换体，134 为脱盐装置，135 为脱盐处理淀粉溶液输送管道，136 为浓缩干燥装置，137 为浓缩干燥淀粉酶。

第 6 图作为第 4 图悬浮混合的另一方法，用流动层进行吸附。将菌体去除培养液 12 导入流动层型淀粉酶吸附槽 217 内，通过从空气压缩机 121 供给加压空气，使之流动化，同时与吸附剂接触，接触后的流程与第 4 图相同。

图中:215 为淀粉酶用吸附剂贮槽，216 为淀粉酶用吸附输送管道，218 为淀粉酶用吸附剂—菌体去除培养液混合物，219 为菌体去除培养液输送管

道, 220 为空气输送管道, 222 为洗涤水贮槽, 223 为洗涤水, 224 为洗涤水输送管道, 225 为淀粉酶用吸附剂—菌体去除培养混合物输送管道, 226 为固液分离装置, 227 为淀粉酶去除培养液及洗涤废液用输送管道, 228 为淀粉酶吸附—洗涤处理吸附剂输送管道, 229 为淀粉酶去除培养液及洗涤废液贮槽, 230 为淀粉酶去除培养液及洗涤液, 231 为吸附溶液, 232 为解吸剂溶液贮槽, 233 为吸附剂—解吸剂溶液混合物, 234 为解吸槽, 235 为吸附剂—解吸剂混合物输送管道, 236 为淀粉酶解吸液输送管道, 237 为淀粉酶解吸液, 238 为淀粉酶解吸液贮槽, 239 为淀粉酶解吸液输送管道, 240 为脱盐装置, 241 为脱盐用离子交换体, 242 为脱盐处理淀粉酶输送管道, 243 为浓缩干燥装置, 244 为浓缩干燥淀粉酶。

在本发明的淀粉酶的分离精制方法装置中, 作为吸附剂是分支链长度可调的交联多聚葡萄糖, 或者是主链长度可调的交联均低聚物, 即吸附剂的分支链或主链的长度, 根据想要分离精制的淀粉酶进行调节, 采用的是在分子间和 / 或分子内交联化不溶于水的吸附剂。因此, 从含有培养滤液等的多种多样有机性、无机性不纯物以及其它种类酶的溶液中, 通过仅仅对淀粉酶的吸附及解吸, 能很容易地浓缩精制所要求的淀粉酶。这样, 淀粉酶的精制过程也可大为简化。

以下通过本发明的实施例进一步作详细介绍。

实施例 1

应用糖原交联物分离精制 β -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶。

用大肠菌的糖原(由原料溶液的摩尔浓度和渗透压测定的化学分析结果估算出的分子量 4×10^5 , 由这些分析数据估算的分支度为 25%)的干燥粉末 10 克, 加水 90 毫升, 边搅拌边在 70°C 下加热, 使之溶解成为粘性液体。在其中添加 6N 的苛性钠 33 毫升, 把它倒入带有搅拌器和回流冷却器的 500 毫升的反应烧瓶中。接之, 加入表氯醇 140 毫升, 以每分钟 20 转的转速反复进行搅拌, 在 50°C 下加热 5 小时。反应終了后, 内容物冷却至室温, 滤出下部水层中的凝胶化物。在此凝胶状物中添加乙醇 50 毫升, 搅拌后加以过滤, 回收凝胶状物。向回收的凝胶中再加入 50 毫升乙醇, 再次悬浮, 再次过滤, 回收凝胶状物。本操作过程尚须重复三

次。接之, 加蒸馏水 50 毫升悬浮、过滤。重复三次之后, 再次在 50 毫升的乙醇中弥散, 然后过滤, 待凝状物干燥后加以粉碎, 如此获得白色粉末 9.2 克。

本粉末在 60°C 水中的溶解度为 100 克水 0.002 克以下。将本粉末放在 60°C 水中浸渍一天后的水合凝胶对本粉末的重量比为 11.5。

将米曲霉(*Aspergillus orizea*)IFO-4176 培养滤液 40 毫升(含 α -淀粉酶 0.50 单位 / 毫升, β -淀粉酶 0.98 单位 / 毫升, 葡萄糖淀粉 1.30 单位 / 毫升)放在 6°C 下冷却, 添加上述的吸附末 0.2 克, 以 5 转 / 分混合 2 分钟使之接触。将其滤过, 测定滤液中的 α -淀粉酶活性、 β -淀粉酶活性、葡萄糖淀粉酶活性。

上清液中的 α -淀粉酶为 0.5 单位 / 毫升、 β -淀粉酶为 0.02 单位 / 毫升、葡萄糖淀粉酶为 0.01 单位 / 毫升。

上述吸附剂吸附的酶量, 按和吸附剂接触之前的酶浓度减去接触之后的酶浓度所得的值计算之。计算的结果是存在于培养滤液中的 α -淀粉酶实际上没有被吸附, β -淀粉酶的 98%(38.4 单位)、葡萄糖淀粉酶的 99%(51.6 单位)被吸附。

接着, 把吸附上述酶的吸附剂放入 20 毫升的容器中, 添加用苛性钠调节 pH 为 8 的液体 4 毫升, 以 5rpm 搅拌使之接触 2 分钟, 再用每分钟 3000 转的转速离心分离 5 分钟, 吸附剂则与上清液分离。进而给吸附剂加水 2 毫升进行悬浮, 再次以每分钟 3000 转的转速离心分离 5 分钟, 则洗涤液和吸附剂进行固液分离。以上所得的上清液和洗涤液合并得酶解吸液 6 毫升。

对上述酶脱吸液的酶浓度测定结果, 未检出 α -淀粉酶, β -淀粉酶为 6.40 单位 / 毫升, 葡萄糖淀粉酶为 8.60 单位 / 毫升; 各自的回收量按各酶在脱吸液中的浓度乘以液量 6 毫升计算, 则 α -淀粉酶为 0 单位, β -淀粉酶为 38.4 单位, 葡萄糖淀粉酶为 51.6 单位。这样, 在原液中存在的酶, 用本实施例的吸附解吸可回收, α -淀粉酶为 0%, β -淀粉酶为 98%, 葡萄糖淀粉酶为 99%。另外, 在本液中未检出蛋白酶活性, 亦未见着色或发臭。而且本液中的有机物量、无机物量, 相对于原液中的含有量各减少至 1.1%、1.0%。

据上, 可以把原液中的 β -淀粉酶和葡萄糖淀

粉酶浓缩至 5 倍左右、并得以精制。

实施例 2

用糖原交联分离精制 β -淀粉酶及葡萄糖淀粉酶。

取实施例 1 调制的糖原交联化物 0.5 克充填 $10\phi \times 70\text{mm}$ 的柱。

以与实施例 1 所用相同组的米曲霉 IFO-4176 培养滤液 80 毫升，在温度 6°C 下以流速 3 毫升/分通过该柱。然后收集柱滤液，测定液中的酶浓度。

结果， α -淀粉酶为 0.5 单位/毫升， β -淀粉酶为 0.03 单位/毫升，葡萄糖淀粉酶为 0.01 单位。

上述吸附剂吸附的酶量，按与吸附剂接触之前的酶浓度减去接触之后的酶浓度所得的值计算之。其结果， α -淀粉酶为 0 单位， β -淀粉酶为 76 单位，葡萄糖淀粉酶为 103.2 单位。这样，存在于培养滤液中的 α -淀粉酶未被吸附， β -淀粉酶被吸附 97%，葡萄糖淀粉酶被吸附 99%。

接着，用 4 毫升水通过上述之柱，以便洗净。再用以苛性钠调整 pH 为 8.0 的液体 15 毫升、在 6°C 下按流速 0.5 毫升/分，通过已洗净之柱。接之用 5 毫升水通过，回收洗净液。上述之流下液和洗净液合并，则获得酶脱吸液 20 毫升。

本液中酶浓度测定的结果， α -淀粉酶未被检出， β -淀粉酶为 12.5 单位/毫升，葡萄糖淀粉酶为 16.9 单位/毫升。各自的回收量，按各酶的脱吸液浓度乘以液量 20 毫升计算。这样，各回收量分别为： α -淀粉酶 0 单位， β -淀粉酶 76 单位，葡萄糖淀粉酶 10 单位。即在原液中所存在的酶当中， α -淀粉酶的回收率为 0， β -淀粉酶可回收 97%，葡萄糖淀粉酶可回收 96%。

另外，在本液中未检出蛋白酶活性，亦未见着色或着臭。而且本液中的有机物量及无机物量，相对于原液中的含量各减少至 1.1%、1.0%。

据上，可以把原液中的 β -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶浓缩至 4 倍左右、并得以精制。

实施例 3

用糖原交联物分离精制 β -淀粉酶及葡萄糖淀粉酶。

取牛肝脏糖原(由原料溶液的摩尔浓度和渗透测定的化学分析结果估算出的分子量 4×10^5 ，由

这些分析数据估算的分支度 27%)的干燥粉末 10 克，加水 90 毫升，边搅拌边在 70°C 下加热溶解，得粘性液体。向该液体中加 4N 的苛性钾 33 毫升，将其倒入带有搅拌机和回流冷却器的 500 毫升的反应烧瓶中。接之加表氯醇 140 毫升，以每分钟 20 转的转速反复搅拌，在 50°C 下加热 5 小时。

反应終了后，把内容物冷却至室温，滤出下部水层中的凝胶状物。在该凝胶物中加乙醇 50 毫升，搅拌后进行过滤，回收凝胶状物。把回收的凝胶再放在 50 毫升的乙醇中进行再次悬浮，进行过滤回收凝胶状物。本操作须再重复三次。接之在 50 毫升蒸馏水中悬浮，再过滤。本操作反复三次之后，再次放在 50 毫升乙醇中进行弥散。再加以过滤，待凝胶状物干燥后加以粉碎，得白色粉末 9.3 克。

本粉末在 60°C 水中的溶解度为 100 克水 0.003 克以下。将本粉末放在 60°C 水中浸渍一天后的水合凝胶对本粉末的重量比为 12.3。

为观察本粉末对葡萄糖淀粉酶的吸附性，进行以下实验。

取米曲霉 IFO-4176 的培养滤液 40 毫升(含 α -淀粉酶 0.50 单位/毫升， β -淀粉酶 0.98 单位/毫升，葡萄糖淀粉 1.30 单位/毫升)，冷却至 6°C ，加上述吸附剂粉末 0.2 克，以每分钟 5 转的转速混合 2 分钟以便互相接触。通过底部装有滤过器的柱($10\phi \times 50\text{mm}$)进行过滤，测定滤液中的 α -淀粉酶活性、葡萄糖淀粉酶活性。

结果，上清液中的 α -淀粉酶为 0.50 单位/毫升， β -淀粉酶为 0.03 单位，葡萄糖淀粉酶为 0.02 单位/毫升。

上述吸附剂吸附的酶量，按和吸附剂接触之前的酶浓度减去接触之后的酶浓度所得的值计算之。结果，培养滤液中存在的 α -淀粉实际上未被吸附， β -淀粉酶被吸收 97%(0.95 单位/毫升)，葡萄糖淀粉被吸收 98%(1.28 单位/毫升)。

接着，以 0.5M 的氯化钠水溶液(pH7.0)流过吸附上述酶的吸附剂的柱，并回收溶出液。其后，用 2 毫升水再流过该柱，这样，洗涤柱的洗涤液和前面的溶出液合并，获得酶解吸液 6 毫升。

上述酶脱吸液的酶浓度测定结果，未检出 α -淀粉酶， β -淀粉酶为 6.2 单位/毫升，葡萄糖淀

粉酶为 8.6 单位/毫升。各自的回收量按各酶的脱吸液中浓度乘以回收量 6 毫升计算。 α -淀粉酶为 0 单位。 β -淀粉酶为 37.2 单位。葡萄糖淀粉酶为 51.2 单位。从而, 存在于原液中的酶, 通过本实施例的吸附、解吸, α -淀粉酶的回收为 0%, β -淀粉酶的回收为 95%, 葡萄糖淀粉酶的回收为 96%。另外; 在本液中未检出蛋白酶活性, 亦未见着色、着臭。并且本液中的有机物量、无机物量相对于原液中的含有量分别减少至 1.0%、1.1%。

据上, 可以把原液中的 β -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶浓缩至 5 倍左右, 并得以精制。

实施例 4

用糖原交联物分离精制 β -淀粉酶及葡萄糖淀粉酶。

取牡 贝的糖原(由原料溶液的摩尔浓度和渗透压测定的化学分析结果估算出的分子量 4×10^5 , 由这些分析数据估算的分支度 25%)的干燥粉末 10 克, 加水 90 毫升, 边搅拌边在 70℃ 下加热溶解为粘性液体。

向该液中 6N 的苛性钠 33 毫升, 将该液倒入带有搅拌机和回流冷器的 500 毫升的反应烧瓶内。接之加入表氯醇 140 毫升, 以每分钟 15 转的转速反复搅拌, 在 50℃ 下加热 5 小时。

反应终了后, 将内容物冷却至室温, 滤出下部水层中的凝胶化物。在此凝胶化物中加乙醇 50 毫升, 搅拌后进行过滤, 回收凝胶状物。把回收的凝胶再放在 50 毫升乙醇中进行悬浮, 经过滤回收凝胶状物。

本操作尚须反复三次。然后在 50 毫升蒸馏水中悬浮, 进行滤别。反复三次之后, 再次在 50 毫升乙醇中进行弥散。接之加以过滤, 待凝胶状物干燥后粉碎之, 获得白色粉末 9.1 克。

本粉末在 60℃ 水中的溶解度为 100 克水 0.001 克以下。将本粉末放在 60℃ 水中浸渍一天后的水合凝胶对本粉末的重量比为 10.8。

为观察本粉末对葡萄糖淀粉酶的吸附性, 接之进行以下实验。

取米曲霉 IFO-4176 的培养滤液 40 毫升(含 α -淀粉酶 0.50 单位/毫升, β -淀粉酶 0.98 单位/毫升, 葡萄糖淀粉酶 1.30 单位/毫升), 冷却至 6℃, 之后倒入流动层型吸附槽内。本槽具有这样一个结构, 即在外筒($\phi 28\text{mm} \times 100\text{mm}$)中的通气

管($\phi 15\text{mm} \times 70\text{mm}$)内藏有液流动化用空气注入喷嘴(内径 1mm)。接之添加上述吸附粉末 0.2 克, 以 0.5 厘米/秒的空塔速度注入空气, 使槽内液流动 25 分钟, 以促进相互接触。内容液经附有过滤器的柱($10\phi \times 50\text{mm}$)进行过滤, 测定滤液中的 α -淀粉酶活性、葡萄糖淀粉酶活性。

上清液中的 α -淀粉酶为 0.50 单位/毫升, β -淀粉酶为 0.04 单位/毫升, 葡萄糖淀粉酶为 0.03 单位/毫升。

上述吸附剂吸附的酶量, 按与吸附剂接触之前的酶浓度减去接触之后的酶浓度所得的值计算。其结果, 存在于培养滤液中的 α -淀粉酶实际上未被吸附, α -淀粉酶被吸附 96%(0.94 单位/毫升), 葡萄糖淀粉酶被吸附 98%(1.27 单位)。

接之, 以 0.5M 的氯化钠水溶液(pH7.0)流于吸附上述酶的吸附剂的柱, 然后回收溶出液。其后再以 2 毫升水流于该柱洗涤该柱, 洗涤液与溶出液合并, 获得酶解吸液 6 毫升。

上述酶脱吸液的酶浓度测定结果, 未检出 α -淀粉酶, β -淀粉酶为 6.2 单位/毫升, 葡萄糖淀粉酶为 8.4 单位/毫升。各自的回收量按各酶的脱吸液中浓度乘以回收液量 6 毫升求出, α -淀粉酶为 0 单位, β -淀粉酶为 37.4 单位, 葡萄糖淀粉酶为 50.1 单位。从而, 原液中存在的酶, 通过本实施例的吸附、解吸, α -淀粉酶的回收为 0%, β -淀粉酶的回收为 95%, 葡萄糖淀粉酶的回收为 96%。另外在本液中未检出蛋白酶活性, 亦未见着色、着臭。而且本液中的有机物量和无机物量相对于原液中的含有量分别减少至 1.2% 和 1.1%。

据上, 原液中的 β -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶被浓缩至 5 倍左右, 并得以精制。

实施例 5

用经过葡萄糖淀粉酶处理的糖原分离精制 β -淀粉酶及葡萄糖淀粉酶。

用大肠菌的糖原(由原料溶液的摩尔浓度和渗透压测定的化学分析结果, 估算出的分子量 4×10^5 , 由这些分析数据估算的分支度为 25%)的干燥粉末 5 克, 加 0.05M 醋酸钠缓冲液(pH5.0)95 毫升, 边搅拌边在 70℃ 下加热溶解。将其冷却到 50℃, 从中取出 30 毫升, 添加来源于米曲霉(*Aspergillus oryzae* IFO-4176)的葡萄糖淀粉酶 10 单位的溶解液 2 毫升, 保持在 40℃ 条件下。

测定 2 小时后葡萄糖的生成量, 结果是相对于供试糖原分子的葡萄糖残基数已达到约 30%。该时的分子量为 6×10 。

将本液充填于玻璃纸管内, 对 10℃ 的水 5 升渗析 10 小时。将内容液冻结干燥, 获得白色粉末 0.9 克。

向粉末中加水 10 毫升, 边搅拌边在 70℃ 下加热溶解为粘性液体。接着加 6N 的苛性钠 33 毫升, 将液体倒入带有搅拌机和回流冷却器的 200 毫升的反应烧瓶内。然后加表氯醇 100 毫升, 以每分钟 20 转的转速充分搅拌, 在 70℃ 下加热 5 小时。

反应終了后, 把内容物冷却至室温, 滤出下部水层中的凝胶化物。在凝胶化物中加乙醇 50 毫升, 搅拌之后滤过, 回收凝胶状物。把回收的凝胶状物再次放在 50 毫升乙醇中进行悬浮, 滤过之后回收凝胶状物。本操作尚须反复三次。接之在 50 毫升蒸馏水中悬浮, 进行过滤。本操作重复进行三次之后, 再次在 50 毫升乙醇中进行弥散。然后过滤, 待凝胶状物干燥后加以粉碎, 获得白色粉末 0.7 克。

本粉末在 60℃ 水中的溶解度为 100 克水 0.001 克。本粉末放在 60℃ 水中浸渍一天后的水合凝胶对本粉末的重量比为 1.32。经过对本粉末非还原末端基的测定, 分支链的平均聚合度为 4.2。为了观察本粉末对葡萄糖淀粉酶的吸附性, 接着要进行以下实验。

将米曲霉 IFO-4176 培养滤液 40 毫升(含 α -淀粉酶 0.50 单位/毫升, β -淀粉酶 0.98 单位/毫升, 葡萄糖淀粉酶 1.30 单位/毫升)下冷却至 6℃, 加上述吸附剂粉末 0.2 克, 以每分钟 5 转的转速混合 2 分钟, 使相互充分接触。内容液经底部装有滤过器的柱(10φ × 50mm)进行过滤, 测定滤液中 α -淀粉酶活性、葡萄糖淀粉酶活性。

上清液中的 α -淀粉酶为 0.50 单位/毫升, β -淀粉酶为 0.50 单位/毫升, 葡萄糖淀粉酶为 0.01 单位/毫升。上述吸附剂吸附的酶量, 按和吸附剂接触之前的酶浓度减去和吸附剂接触后的酶浓度所得的值计算。结果, 存在于培养滤液中的 α -淀粉酶实际上未被吸收, β -淀粉酶被吸收 51%(0.48 单位/毫升), 葡萄糖淀粉酶被吸收 99%(1.29 单位)。

接之, 用以苛性钠溶液调整 pH 为 7.5 的 0.5M 的氯化钠水溶液(pH7.0)流于吸附上述酶的吸附剂的柱, 并回收溶出液。其后以 2 毫升水洗涤柱。洗涤液和溶出液合并, 得酶解吸液 6 毫升。

上述酶脱离液的酶浓度的测定结果, 未检出 α -淀粉酶, β -淀粉酶为 3.1 单位/毫升, 葡萄糖淀粉酶为 8.5 单位/毫升。各自的回收量按各酶的脱吸液中浓度乘以回收液量 6 毫升求出, α -淀粉酶为 0 单位, β -淀粉酶为 20 单位, 葡萄糖淀粉酶为 51.0 单位。从而, 原液中存在的酶, 经过用本实施例的吸脱, 各自的回收率为: α -淀粉酶 0%, β -淀粉酶 51.0%, 葡萄糖淀粉酶 98%。另外, 在本液中未检出蛋白酶活性, 亦未见着色、着臭。而且, 本液中的有机物量和无机物量, 相对于原液中的含有量各减少至 0.9% 和 1.1%。

据上, 原液中的 β -淀粉酶被浓缩至 3.4 倍左右, 葡萄糖淀粉酶被浓缩至 5 倍左右, 且得以精制。

实施例 6

使用麦芽糖交联物分离精制葡萄糖淀粉酶

在 10g 麦芽糖中加 90ml 水, 加热至 50℃ 溶解。将其中加 3N 的氢氧化钠 33ml, 将它放入装有搅拌机和回流冷却器的 500ml 反应烧瓶中。然后添加 140ml 的表氯醇, 一边以 20rpm 搅拌, 一边在 70℃ 加热 15 小时。

反应结束后将内容物冷却至室温, 并滤去下部水层中的凝胶。在该胶状物中添加 50ml 乙醇, 搅拌后过滤并回收胶状物。将回收的凝胶再次放在 50ml 乙醇中悬浊, 过滤后再回收胶状物。将本操作再重复 3 次。然后在 50ml 的蒸馏水中悬浮并过滤。将本操作重复 3 次后再次在 50ml 乙醇中分散。将其过滤并使胶状物干燥, 然后粉碎制得 9.4g 白色粉末。

本粉末在 60℃ 水中的溶解度为对于 100g 水溶解 0.002g 以下。将该粉末放在 60℃ 水中浸渍 1 日后的水合凝胶对该粉末的重量比为 14.0。

另一方面, 将米曲霉 IFO-4176 培养滤液 200ml(每 ml 中含 α -淀粉酶 0.50 单位, β -淀粉酶 0.98 单位)冷却至 6℃, 并添加 0.2g 的上述吸附剂粉末、在 5rpm 下搅拌 2 分钟。将其过滤得到 20ml 滤液。测定过滤中的 α -淀粉酶活性、 β -淀粉酶活性、葡萄糖淀粉酶活性。

上澄清液中的 α -淀粉酶为 0.97 单位/ml, 葡糖淀粉酶为 0.01 单位/ml.

上述吸附剂所吸附的酶量计算是从吸附剂接触前的酶浓度中减去接触后的酶浓度所得之值. 其结果是培养液中吸附剂上吸附的 α -淀粉酶为 0 单位/ml, β -淀粉酶为 0.015 单位/ml, γ -淀粉酶为 1.29 单位/ml. 因此, 培养液中存在的 α -淀粉酶的 0%, β -淀粉酶的 1%、葡糖淀粉酶的 99% 被吸附.

以下, 将吸附了上述酶的吸附剂放入 20ml 的容器内, 添加用氢氧化钠调至 pH 为 8 的液体 4ml, 在 5rpm 下搅拌使之接触 2 分钟. 将它以 3000rpm 离心分离 5 分钟, 分离成吸附剂和上澄清液. 继而在吸附剂中加 2ml 水使之悬浮, 再次以 3000rpm 离心分离 5 分钟, 固液分离成洗涤液和吸附剂. 将上述制得上澄清液与洗涤液混合, 即得到 6ml 酶解吸液.

测定上述酶脱吸液的酶浓度, 其结果为: α -淀粉酶 0 单位/ml, β -淀粉酶 0.65 单位/ml, 葡糖淀粉酶 4.25 单位/ml. 因此可回收 α -淀粉酶 0 单位(回收率 0%), β -淀粉酶 3.9 单位(2%)葡糖淀粉酶 25.5 单位(98%).

本液中未检测出蛋白酶活性, 也没发现着色发臭现象. 而且, 本液中的有机物及无机物量, 相对于原液中的含量分别减少至 1.5%, 1.4%. 用上述方法可将原液中的葡糖淀粉酶选择性地浓缩到 3 倍左右并能精制.

实施例 7

使用麦芽糖交联物分离精制葡糖淀粉酶

在 10g 的麦芽糖中添加 80ml 水, 加热至 50℃ 溶解. 在其中添加 33ml 氢氧化钠, 并将它放入装有搅拌机和回流冷却器的反应烧瓶中. 然后加 140ml 的表氯醇, 边以 20rpm 搅拌, 边在 80℃ 下加热 6 小时.

待反应结束后将内容物冷却至室温, 将下部水层中的凝胶物滤出. 在该胶状物中添加 50ml 乙醇、搅拌后过滤并回收胶状物.

将回收的凝胶再次放入 50ml 乙醇中悬浮, 过滤并回收胶状物. 将本操作再重复 3 次. 然后在 50ml 蒸馏水中悬浮, 滤出.

将本操作反复三次后再次在 50ml 的乙醇中分散. 将它过滤, 将胶状物干燥后粉碎, 得到 18.1g

的白色粉末.

该粉末在 60℃ 中的溶解度为对 100g 的水可溶解 0.003g 以下. 继而, 将该粉末放在 60℃ 水中浸渍 1 日后的水合胶对本粉末的重量比为 14.0.

另一方面, 将米曲霉 IFO-4176 的培养滤液 20ml(每 ml 含有 α -淀粉酶 0.5 单位, β -淀粉酶 0.98 单位, 葡糖淀粉酶 1.30 单位)冷却至 6℃, 添加上述吸附粉末 0.2g, 以 5rpm 搅拌 2 分钟. 将其过滤, 测定滤液中的 α -淀粉酶活性, β -淀粉酶活性, 葡糖淀粉酶活性.

测定上澄清液中的各种酶的活性. 上澄清液中的 α -淀粉酶为 0.50 单位/ml, β -淀粉酶为 0.88 单位/ml, 葡糖淀粉酶为 0.01 单位/ml.

上述吸附剂所吸附的酶量计算是从与吸附剂接触前的酶浓度中减去接触后的酶浓度所得之值. 其结果是培养液中被吸附的 α -淀粉酶为 0 单位/ml, β -淀粉酶为 0.12 单位/ml, 葡糖淀粉酶为 1.29 单位/ml—培养液.

因此, 培养液中存在的 α -淀粉酶完全不被吸收, 而 β -淀粉酶的 12.0%, 葡糖淀粉酶的 99% 被吸收.

然后将吸附有上述酶的吸附剂放入 20ml 的容器内, 添加用氢氧化钠调至 pH8 的液体 4ml, 以 5rpm 搅拌使之接触 2 分钟. 将其以 3000rpm, 进行离心分离 5 分钟, 分离成吸附剂和上澄清液. 然后在吸附剂中加 2ml 水使之悬浮, 再次以 3000rpm 进行离心分离 5 分钟, 固液分离成洗涤液和吸附剂. 将上述得到的上澄清液和洗净液混合, 得到 6ml 酶解吸液.

测定上述酶脱吸液的酶浓度, 其结果为: α -淀粉酶 0 单位/ml, β -淀粉酶 0.35 单位/ml、葡糖淀粉酶 4.14 单位/ml. 因此, 能回收 α -淀粉酶 0 单位(回收率 0%), β -淀粉酶 2.1 单位(10.7%)、葡糖淀粉酶 24.8 单位(95%).

而且, 在本溶液内未检测出蛋白酶活性, 也没发现着色、发臭现象. 本溶液中的有机物量和无机物量, 相对于原液中的含量分别减至 1.4%, 1.2%.

根据上述方法, 可将原液中的葡糖淀粉酶选择性地浓缩至 3.2 倍, 而且能精制.

实施例 8

使用麦芽三糖交联物分离精制葡糖淀粉酶

在 10g 麦芽三糖中添加 80ml 水, 加热至 50℃ 使之溶解。在其中添加 4N 氢氧化钠 33ml, 并将它放入装有搅拌机和回流冷却器的 500ml 的反应烧瓶中。

然后添加 140ml 的表氯醇, 一边以 20rpm 搅拌, 一边在 80℃ 下加热 6 小时。

待反应结束后将内容物冷却至室温, 将下部水层中的凝胶状物滤去。在该胶状物中加 50ml 的乙醇, 搅拌后过滤并回收胶状物。

将回收的凝胶再次在乙醇中悬浮, 过滤后回收胶状物。将本操作再重复 3 次。然后悬浮在 50ml 蒸馏水中, 再滤出。

将本操作重复 3 次后再次分散在 50ml 乙醇中。将其过滤, 将胶状物干燥后粉碎, 得到白色粉末 9.7g。

本粉末在 60℃ 水中的溶解度是对 100g 水可溶解 0.002g 以下。继而将本粉末放入 60℃ 水中浸渍 1 日后的水合胶对本粉末的重量比为 14.8。

另一方面, 将米曲霉 IMF4076 的培养液 20ml(每 ml 含有 α -淀粉酶 0.50 单位, β -淀粉酶 0.98 单位, 葡糖淀粉酶 1.30 单位)冷却至 6℃, 添加上述吸附粉末 0.2g, 以 5rpm 搅拌 2 分钟。将其过滤, 测定滤液中的 α -淀粉酶活性、 β -淀粉酶活性, 葡糖淀粉酶活性。

测定上澄清液中的各种酶活性。上澄清液中的 α -淀粉酶为 0.50 单位/ml, β -淀粉酶为 0.64 单位/ml, 葡糖淀粉酶为 0.03 单位/ml。

上述吸附剂上吸附的酶量计算是从吸附剂接触前的酶浓度中减去接触后的酶浓度所得之值。

其结果是吸附剂所吸附的 α -淀粉酶为 0 单位/ml, β -淀粉酶为 0.34 单位/ml, 葡糖淀粉酶 1.27 单位/ml—培养滤液。

因此, 培养滤液中存在的 α -淀粉酶完全不被吸附, β -淀粉酶的 35%, 葡糖淀粉酶的 98% 被吸附。

然后, 将吸附有上述酶的吸附剂放入 20ml 的容器中, 添加用氢氧化钠调至 pH8.2 的溶液 4ml, 以 5rpm 搅拌使之接触 2 分钟。将它以 3000rpm 进行离心分离 5 分钟, 分离成吸附剂和上澄清液。继而在吸附中加 2ml 水使之悬浮, 再次以 3000rpm 进行离心分离 5 分钟, 固液分离成洗净液和吸附剂。将上述得到的上澄清液和洗净液混

合, 得到酶解吸液 6ml。

测定上述酶解吸液的酶浓度, 其结果是 α -淀粉酶 0 单位/ml, β -淀粉酶 1.05 单位/ml, 葡糖淀粉酶 4.16 单位/ml。因此能回收 α -淀粉酶 0 单位(回收率 0%)、 β -淀粉酶 6.27 单位(32%)、葡糖淀粉酶 25.0 单位(96%)。

此外, 本液中未检测出蛋白酶活性, 也没发现着色、发臭现象。而且, 本液中的有机物量及无机物量, 相对于原液中的含量分别减到 1.7%, 1.2%。

根据上述方法, 可将原液中的葡糖淀粉酶选择性地浓缩至 3.2 倍左右, 而且能精制。

实施例 9

使用麦芽四糖交联物分离精制 β -淀粉酶及葡糖淀粉酶

1g 麦芽四糖中加 8ml 水, 加热至 50℃ 使之溶解。在其中添加 4N 氢氧化钠 33ml, 并将它放入装有搅拌机和回流冷却器的 200ml 的反应烧瓶中。

然后添加 15ml 的表氯醇, 一边以 20rpm 搅拌, 一边在 80℃ 下加热 6 小时。

反应结束后将内容物冷却至室温, 将下部水层中的胶状物滤出。在该胶状物中添加乙醇 50ml, 搅拌后过滤并回收胶状物。

将回收到的凝胶再次悬浮在 50ml 的乙醇中, 过滤并回收胶状物。将本操作再重复 3 次。然后悬浮在 50ml 的蒸馏水中, 并滤出。

将本操作重复 3 次后, 再次分散在 50ml 乙醇中。将它过滤, 并将胶状物干燥后粉碎, 得到白色粉末 0.90g。

本粉末在 60℃ 水中的溶解度是对 100g 的水可溶解 0.001g 以下。继而将本粉末放入水中浸渍 1 日后的水合胶对本粉末的重量比是 13.4。

另一方面, 将米曲霉 IMF-4076 的培养滤液 20ml(每 ml 含 α -淀粉酶 0.50 单位, β -淀粉酶 0.98 单位, 葡糖淀粉酶 1.30 单位)冷却至 6℃, 并添加上述吸附粉末 0.2g, 以 5rpm 搅拌 5 分钟。

将它过滤, 测定滤液中的 α -淀粉酶活性, β -淀粉酶活性、葡糖淀粉酶活性。

上澄清液中的 α -淀粉酶为 0.5 单位/ml, β -淀粉酶为 0.29 单位/ml, 葡糖淀粉酶 0.03 单位/ml。

上述吸附剂上吸附的酶量计算是从与吸附剂接触前的酶浓度中减去接触后的酶浓度所得之值。

其结果是培养滤液中被吸附剂吸附的 α -淀粉酶为 0 单位/ml, β -淀粉酶为 0.69 单位/ml, 葡糖淀粉酶为 1.27 单位/ml—培养滤液。

因此, 培养滤液中存在的 α -淀粉酶完全不被吸附, β -淀粉酶的 70%, 葡糖淀粉酶的 98% 被吸附。

然后将吸附有上述酶的吸附剂放入 20ml 容器中, 添加用氢氧化钠调至 pH8.2 的溶液 4ml, 以 5rpm 搅拌使之接触 2 分钟。将它以 3000rpm 进行离心分离 5 分钟, 分离成吸附剂和上澄清液。继而在吸附剂中加 2ml 水使之悬浮, 再次以 3000rpm 进行离心分离 5 分钟, 并固液分离成洗净液和吸附剂。将上述得到的上澄清液和洗净液混合, 得到酶脱吸液 6ml。

测定上述酶脱吸液的酶浓度, 其结果是: α -淀粉酶 0 单位/ml, β -淀粉酶 1.31 单位/ml, 葡糖淀粉酶 2.06 单位/ml。因此, 能够回收 α -淀粉酶 0 单位(回收率 0%), β -淀粉酶 7.84 单位(40.0%), 葡糖淀粉酶 12.35 单位(95%)。

此外, 本液中未检测出蛋白酶活性, 也没发现着色、发臭现象。而且, 本液中的有机物量及无机物量, 相对于原液中的含量减少至 1.7%、1.3%。

根据上述方法, 可将原液中的葡糖淀粉酶选择性地浓缩至 9.5 倍左右, 而且能精制。

实施例 10

用麦芽六糖交联物分离精制 β -淀粉酶及葡糖淀粉酶

在 10g 麦芽六糖中添加 90ml, 加热至 50℃ 使之溶解。在其中添加 4N 的氢氧化钠 33ml, 并将它放入装有搅拌机和回流冷却器的 200ml 反应烧瓶中。

然后加 150ml 的表氯醇, 一边以 20rpm 搅拌, 一边在 80℃ 下加热 6 小时。

反应结束后, 将内容物冷却至室温, 将下部水层中的胶状物滤出。在该胶状物中添加 50ml 乙醇, 搅拌后过滤并回收胶状物。

将回收的凝胶再次在 50ml 乙醇中悬浮, 过滤并回收胶状物。将本操作再重复 3 次, 然后悬浮在 50ml 蒸馏水中, 并滤出。

将本操作重复 3 次后, 再次分散在 50ml 乙醇

中, 将其过滤, 胶状物干燥粉碎, 得到白色粉末 9.7g。

该粉末在 60℃ 水中的溶解度为相对于 100g 水可溶解 0.001g 以下。继而将该粉末放在 60℃ 水中浸渍 1 日后的水合胶对该粉末的重量比为 13.5。

另一方面, 将米曲霉 IMF-4076 的培养滤液 20ml(每 ml 含 α 淀粉酶 0.5 单位, β -淀粉酶 0.98 单位, 葡糖淀粉酶 1.30 单位)冷却至 6℃, 以 5rpm 搅拌 2 分钟。

将它过滤, 并测定滤液中的 α -淀粉酶活性、 β -淀粉酶活性、葡糖淀粉酶活性。

上澄清液中的 α -淀粉酶为 0.50 单位/ml, β -淀粉酶为 0.20 单位/ml, 葡糖淀粉酶为 0.03 单位/ml。

上述吸附剂上吸附的酶量计算, 是从与吸附剂接触前的酶浓度中减去接触后的酶浓度所得之值。其结果是: 被吸附剂吸附的 α -淀粉酶为 0 单位/ml, β -淀粉酶为 0.88 单位/ml 葡糖淀粉酶为 1.27 单位/ml—培养滤液。

因此, 培养中存在的 α -淀粉酶不被吸附, β -淀粉酶的 90%, 葡糖淀粉酶的 98% 被吸附。

然后将吸附有上述酶的吸附剂放入 20ml 的容器中, 并添加用氢氧化钠调至 pH8.2 的溶液 4ml, 以 5ml 搅拌并使之接触 2 分钟。将它以 3000rpm 进行离心分离 5 分钟, 分离成吸附剂和上澄清液。继而在吸附剂中加 2ml 水使之悬浮, 再次以 3000rpm 进行离心分离 5 分钟, 并固液分离成洗净液和吸附剂。将上述得到的上澄清液和洗净液混合, 得到酶脱吸液 6ml。

测定上述酶脱吸液的酶浓度, 其结果是: α -淀粉酶 0 单位/ml, β -淀粉酶 25.5 单位/ml, 葡糖淀粉酶 41.7 单位/ml。因此, 可回收 α -淀粉酶 0 单位(回收率 0%)、 β -淀粉酶 15.3 单位(78.0%)、葡糖淀粉酶 25.0 单位(96.0%)。

此外, 本溶液中未检出蛋白酶活性, 也没发现着色、发臭现象。而且, 本液中的有机物及无机物量, 相对于原液中的含有量, 分别减少至 1.8%、1.9%。

用上述方法, 可将原液中的葡糖淀粉酶选择性地浓缩至 19.2 倍左右, 而且能精制。

以下, 用公知的直链淀粉(马铃薯起源)作为 α -淀粉酶的吸附剂代替本发明用的吸附剂, 以 α -

淀粉酶及葡糖淀粉酶的吸附实验作为对照例进行实施。

对照例 1

使用直链淀粉分离精制葡糖淀粉酶及 β -淀粉酶

将实施例同组的米曲霉 IFO-4176 的培养液 40ml(其中含有 α -淀粉酶 0.50 单位/ml, β -淀粉酶 0.98 单位/ml, 葡糖淀粉酶 1.30 单位/ml)冷却至 6℃, 添加 0.2g 淀粉粉末, 以 5rpm 混合 2 分钟使之接触。将它过滤并测定滤液中的 α -淀粉酶活性葡糖淀粉酶活性。

上澄清液中的 α -淀粉酶为 0.02 单位/ml, β -淀粉酶为 0.96 单位/ml, 葡糖淀粉酶为 1.29 单位/ml。上述淀粉粉末上吸附的酶量计算, 是从与淀粉接触前的酶浓度中减去接触后的酶浓度所得之值。其结果是:培养滤液中存在的 α 淀粉酶的 96%(0.48 单位/ml), β -淀粉酶的 2%(0.02 单位/ml)被吸附, 葡糖淀粉酶被吸附 1%(0.01 单位/ml), 这样, 除 α -淀粉酶以外, 其它的实际都不被吸附。

对照例 2

使用盐析和色谱分离法分离精制 β -淀粉及葡糖淀粉

米曲霉 IFO-4176 的培养液 40ml 中(含有 α -淀粉酶 20 单位、0.5 单位/ml, β -淀粉酶 39 单位 0.98 单位/ml、葡糖淀粉酶 52 单位、1, 3 单位/ml), 6℃下一边搅拌一边少量添加硫酸铵, 使终浓度为 12%(W/W), 搅拌 30 分钟。将本溶液以 3000rpm 进行离心分离 5 分钟, 并沉降以除去没有酶活性的杂质沉淀。将上澄清液作为酶部分回收。在该上清液中再按 35%(W/W)添加硫酸铵, 使上述 3 种酶沉淀。将沉淀进行离心分离并回收。沉淀中的活性: α -淀粉酶为 7.5 单位, β -淀粉酶为 7.2 单位, 葡糖淀粉酶为 17 单位。离心过的上清液中再添加硫酸铵并形成接近硫酸铵的溶解度的 40% 溶液, 而生成的沉淀中未发现酶活性, 呈溶解状态, 用盐析生成的沉淀不能回收。

然后将上述沉淀溶解在 5ml 水中, 使它吸附在二乙氨基乙基纤维素柱上($\phi 10 \times 70$ mm), 将 0.05M 三氨基甲烷盐酸盐缓冲液 pH6.0 中的食盐浓度以直线斜度提升至 0-1M, 用该缓冲液将酶溶出。将含有三种酶的溶出液以 150ml 为一份均分

之, 测定液中酶活性。 α -淀粉酶 4.8 单位, β -淀粉酶 9.8 单位, 葡糖淀粉酶 11.3 单位。因此原液中存在的酶, 根据本对照例的精制操作, 可以回收的酶活性量为 α -淀粉酶是 24%, β -淀粉酶是 25%, 葡糖淀粉酶是 19%。没发现有着色、发臭现象。液中的高分子有机物量分别相对于原液中的含量, 减少到 3.5%。盐浓度增加至 7.2 倍。精制酶液的各种酶浓度分别为原液中各种酶的 1/16(α -淀粉酶)、1/15(β -淀粉酶)、1/20(葡糖淀粉酶)。

实施例 11

使用以葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶处理过的糖原交联物分离精制葡糖淀粉酶

在 5g 大肠菌糖原(由原料溶液的摩尔浓度和渗透压测定的化学分析结果估算出的分子量 4×10^5 , 由这些分析数据估算的分支度 25%)的干燥粉末中添加 0.05M 醋酸钠缓冲液(pH5.0)95ml, 边搅拌边加热至 70℃使之溶解。将其冷却至 50℃, 其中取出 30ml, 并添加溶解了 50 单位米曲霉起源的 α -淀粉酶和 200 单位的葡糖淀粉酶的混合溶液 2ml, 保持在 50℃。

测定 2 小时后的葡萄糖生成量, 其结果是大约为供试糖原分子的葡萄糖残基数的 70%。此时的分子量为 1×10^5 。

将该溶液填充在渗析用玻璃纸管中, 对 8℃的水 51 渗析 17 小时, 将渗析处理过的管内内容物冻结干燥, 得到白色粉末 0.85%g。该粉末的分支链的平均聚合度为 3.5。

在其中添加水 10ml, 边搅拌边加热至 70℃使之溶解成为有粘性的溶液。然后添加 6N 的氢氧化钠 35ml, 将它放入装有搅拌机和回流冷却器的 200ml 反应烧瓶中。随后添加 150ml 的表氯醇, 边以 20rpm 搅拌边在 70℃下加热 2 小时。

反应结束后, 将内容物冷却至室温, 滤出下部水层中的凝胶。

该凝胶中加 50ml 乙醇, 搅拌后过滤并回收胶状物。将回收凝胶再次在 50ml 乙醇中悬浮, 过滤并回收胶状物。将本操作重复 3 次。然后在 50ml 蒸馏水中悬浮并滤出。将本操作重复 3 次后, 再次分散在 60ml 乙醇中。将其过滤并使胶状物干燥后粉碎, 得白色粉末 0.7g。

该粉末在 60℃水中的溶解度为对 100g 水可溶

解 0.001g 以下。继而将该粉末放入 60℃ 水中浸渍 1 日后的水合凝胶对该粉末的重量比为 14.1。根据该粉末的非还原末端基的测定，其分支链的平均聚合度是 2.9。然后，为了判明该粉末对葡糖淀粉酶的吸附性，进行了以下实验。

将米曲霉-4176 的培养滤液 40ml(含 α -淀粉酶 0.50 单位/ml, β -淀粉酶 0.98 单位/ml, 葡糖淀粉酶 1.3 单位/ml)冷却至 6℃, 添加上述吸附剂粉末 0.2g, 在 5rpm 下混合 2 分钟使之接触。用底部装有过滤器的柱子(10 ϕ × 50mm)将内容物过滤, 测定滤液中的 α -淀粉酶活性, β -淀粉酶活性及葡糖淀粉酶活性。

滤液中的 α -淀粉酶、 β -淀粉酶, 葡糖淀粉酶的活性分别为 0.5 单位/ml、0.06 单位/ml, 0.013 单位/ml。上述吸附剂上吸附的酶量计算是从与吸附剂接触前的酶浓度中减去接触后的酶浓度所得之值。其结果是, 培养液中存在的 α -淀粉酶实质上不被吸附, β -淀粉酶的 3.1%(0.95 单位/ml)、葡糖淀粉酶的 98%(0.013 单位/ml)被吸附。然后在吸附有上述酶的吸附剂柱中, 通入用氢氧化钠溶液调至 pH7.5 的 5M 氯化钠水溶液, 回收流出液, 随后通水 2ml, 冲洗柱子并将洗净液和上述溶出液混合则得到酶解吸液 6ml。

测定上述酶脱吸液的酶浓度, 其结果是未检测出 α -淀粉酶, β -淀粉酶为 1.4 单位/ml, 葡糖淀粉酶为 8.42 单位/ml。各自的回收量为各种酶在脱吸液中的浓度乘以回收液量 6ml, 其结果是 α -淀粉酶为 0 单位、 β -淀粉酶为 8.5 单位, 葡糖淀粉酶为 50.0 单位。因此原液中存在的酶, 通过本实施例的吸附、脱吸则可回收 α -淀粉酶 0%、 β -淀粉酶 3.6%、葡糖淀粉酶 91.0%。而且, 该溶液中未检测出蛋白酶活性, 没发现着色, 发臭现象。该液中的有机物量、无机物量, 相对于原液中的含量分别减少至 0.86%、1.1%。由于使用本吸附剂, 能进行选择性的分离、使 β -淀粉酶和 α -淀粉酶进入滤液, 而葡糖淀粉酶在吸附剂的溶出液中。而且, 溶出液中, 葡糖淀粉酶相对于原液浓缩至 6.5 倍, 而 β -淀粉酶却稀释成 1/2.5。

图. 1

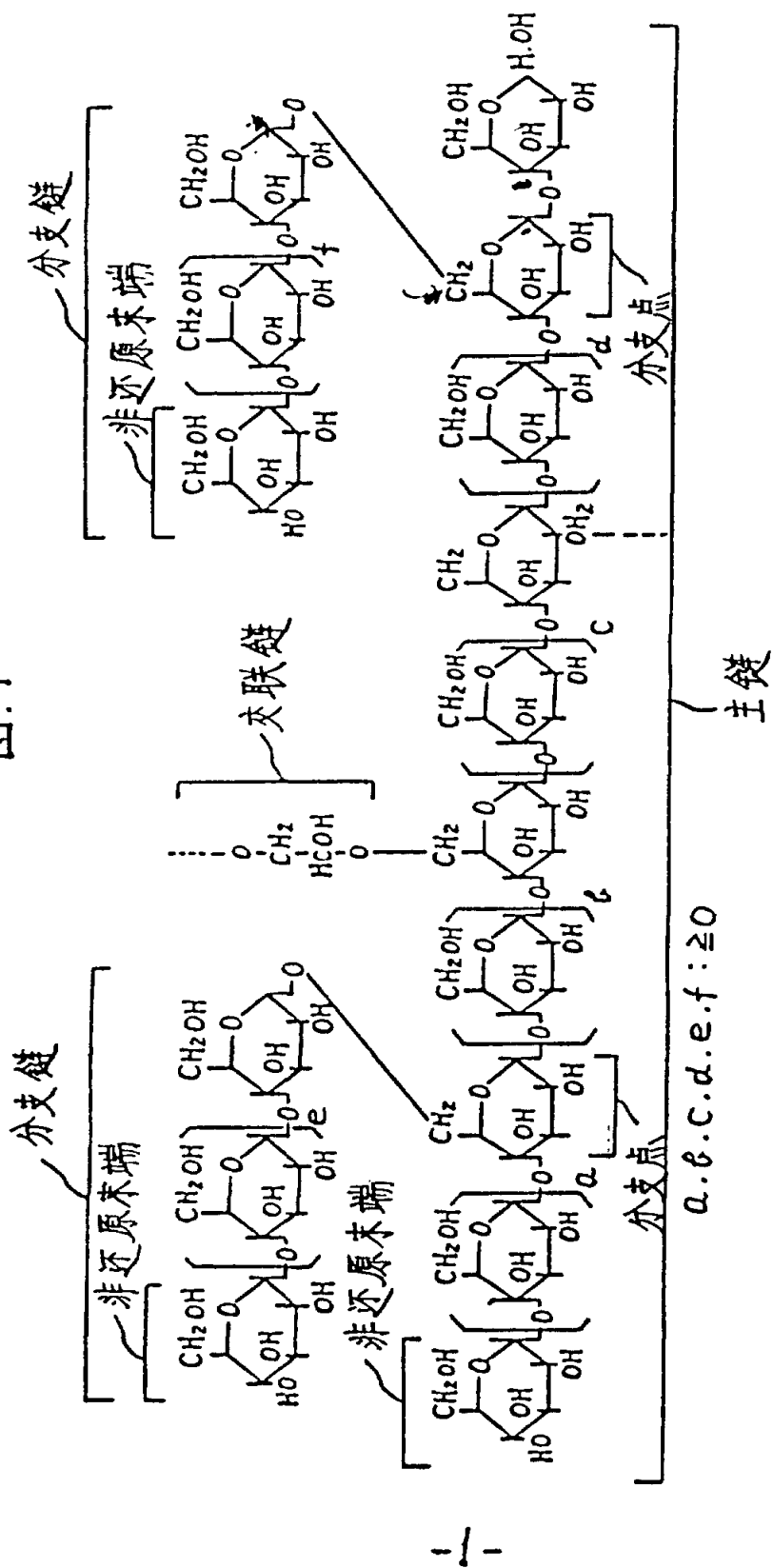


图. 2

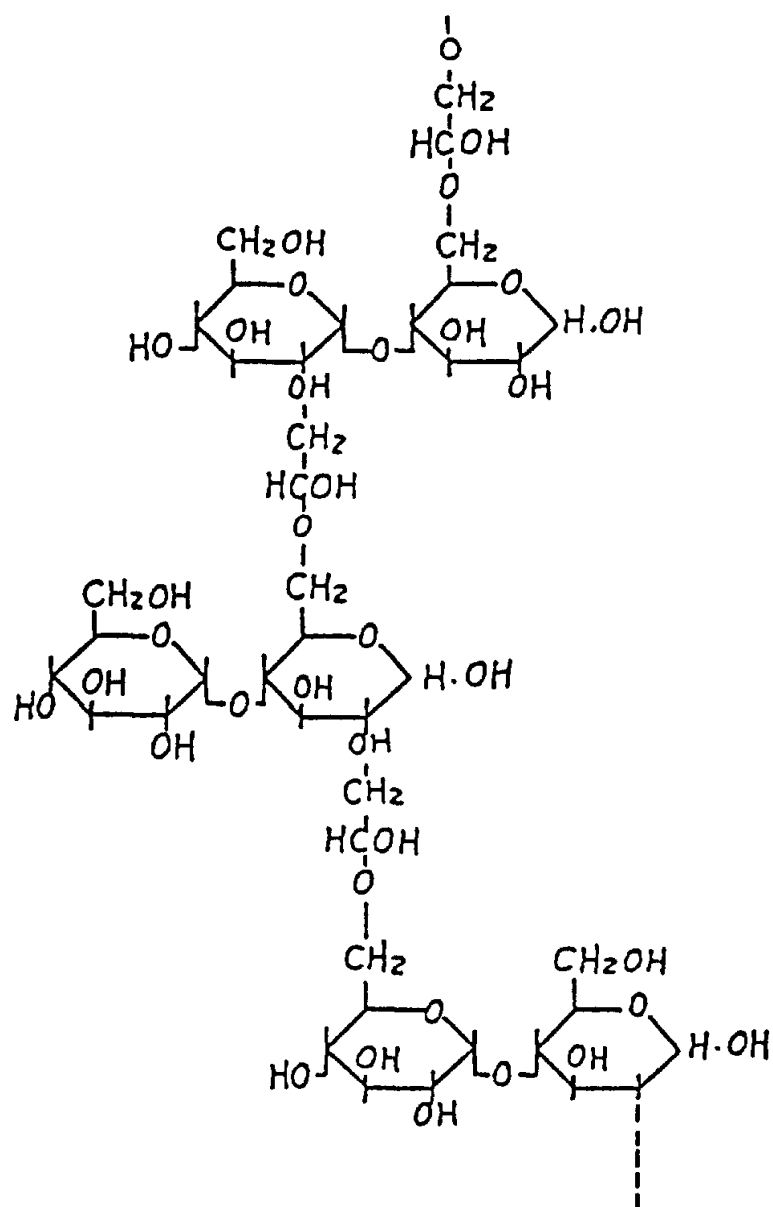
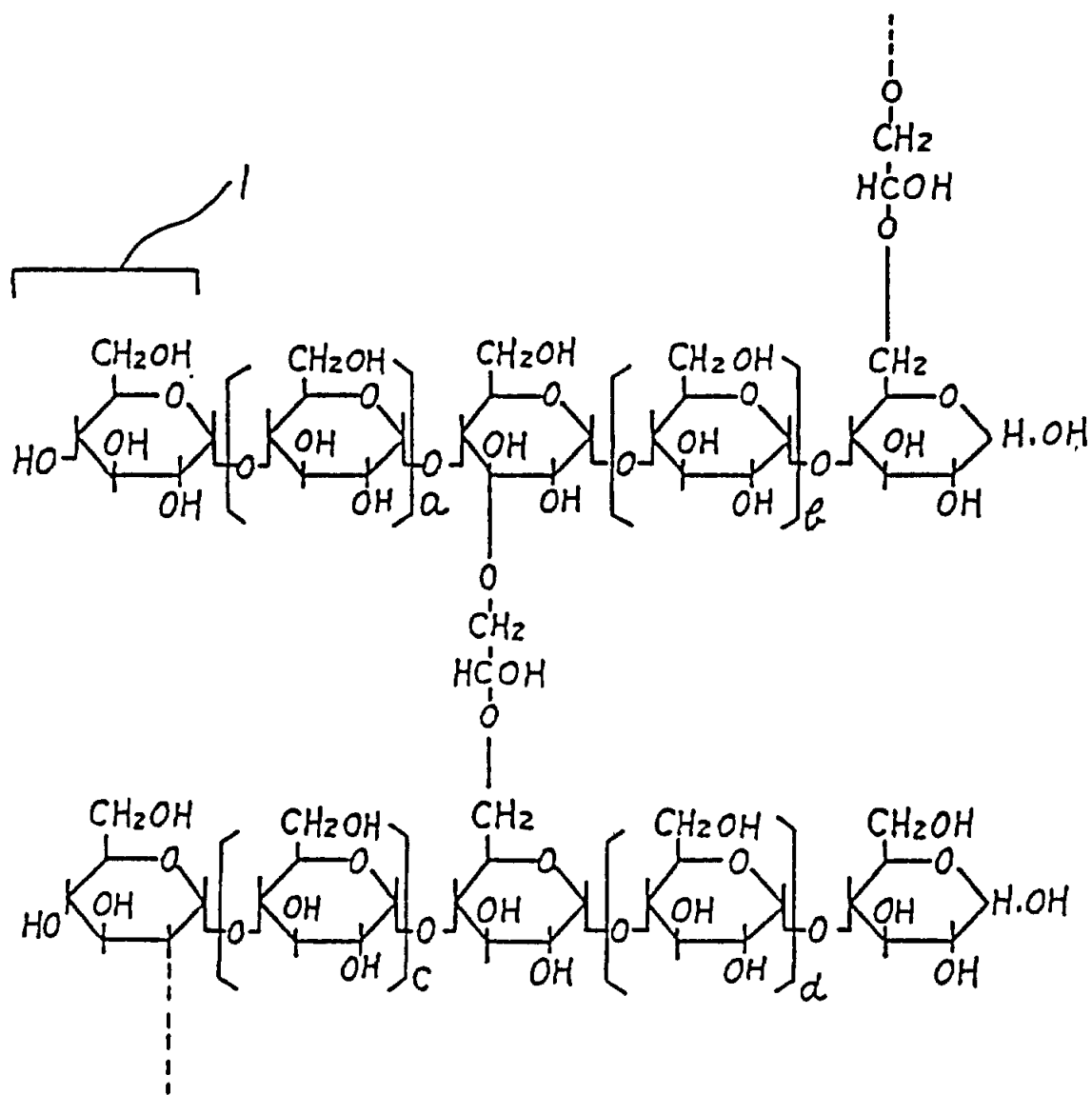


图. 3



$$2 \geq (a + b) = (c + d) \geq 0$$

图. 4

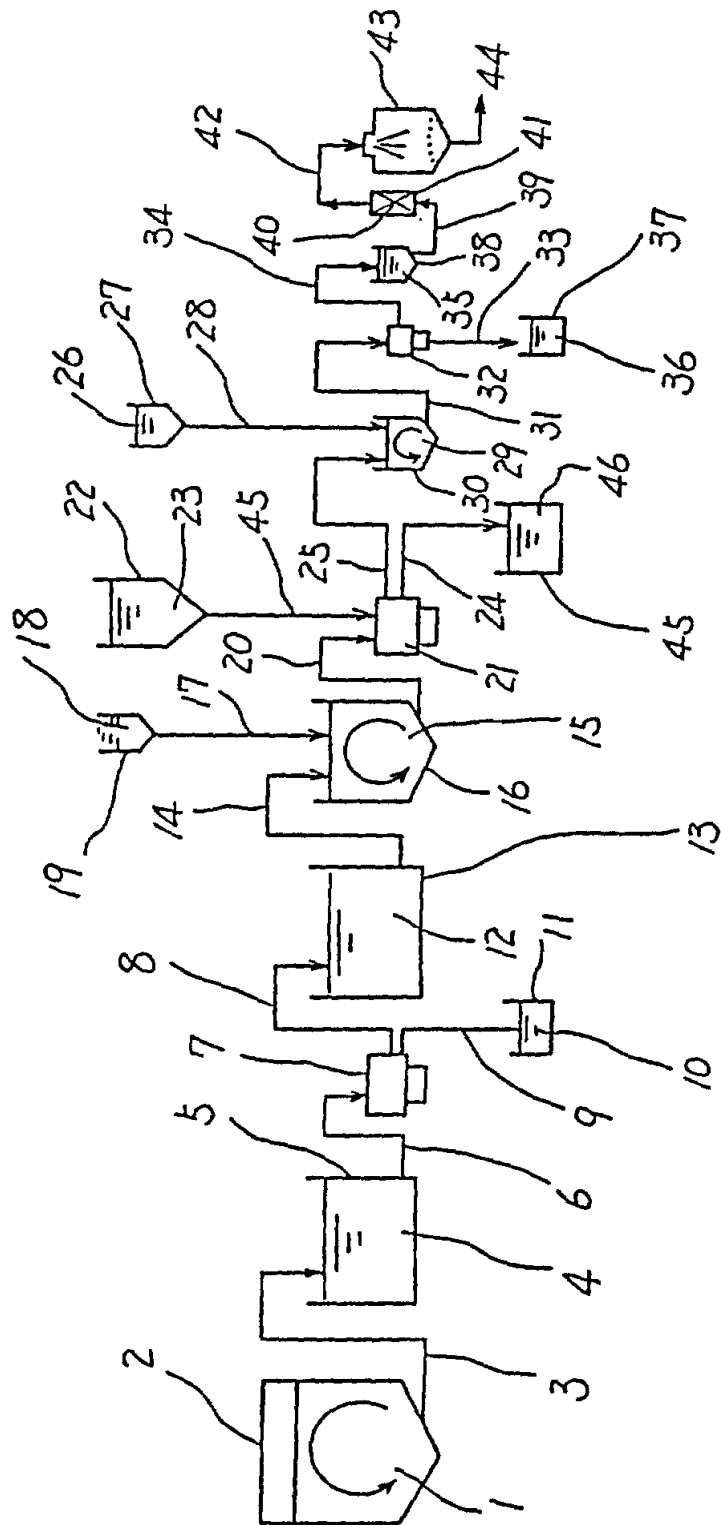


图.5

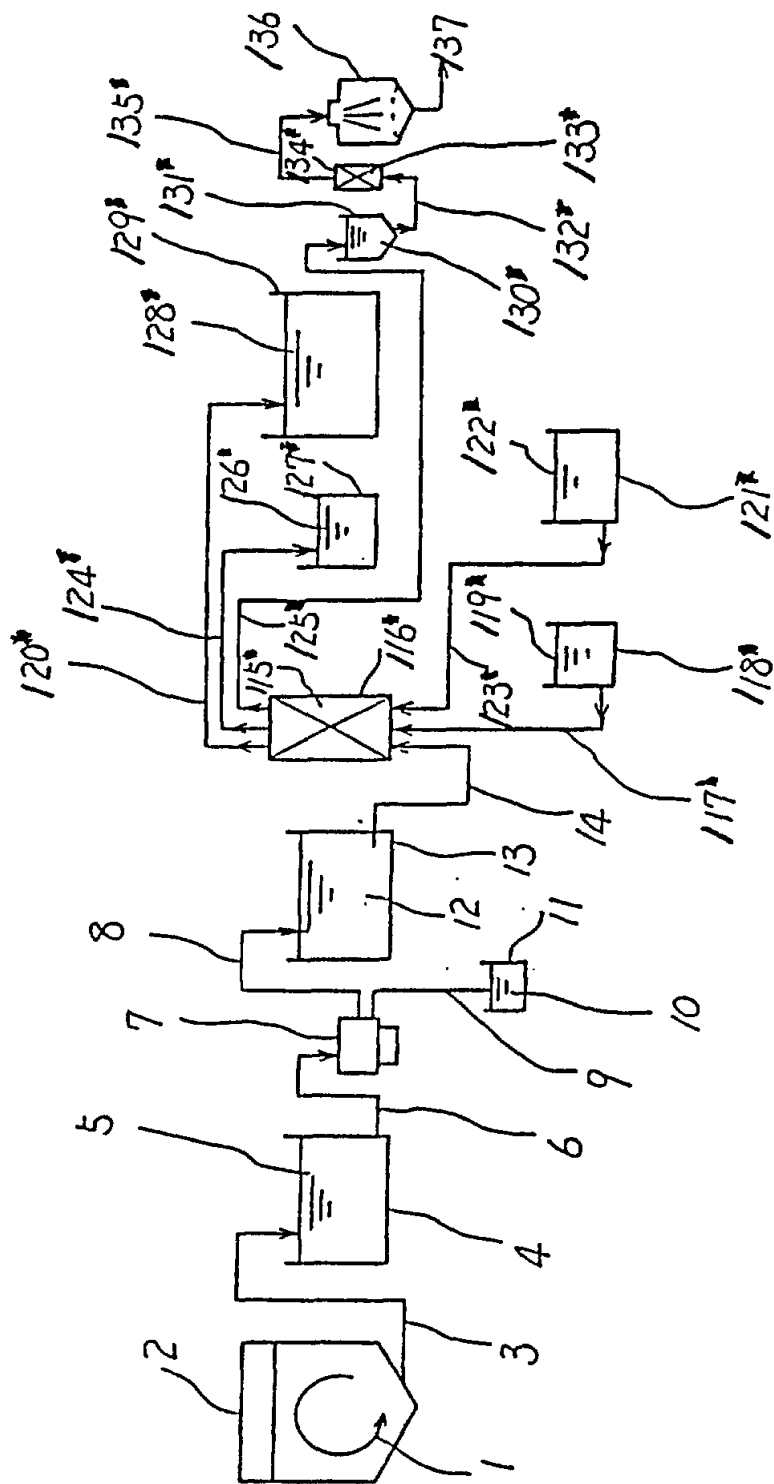


图. 6.

