

[10] 中华人民共和国专利局

[11] 审定号 CN 1004492B



[12] 发明专利申请审定说明书

[21] 申请号 86100055

[51] Int.Cl⁴
C12N 9/96

[44] 审定公告日 1989 年 6 月 14 日

[22] 申请日 86.1.6

[30] 优先权

[32] 85.8.22[33] US[31] 768370

12N 9/28

[32] 85.1.31[33] US[31] 697036

[71] 申请人 迈尔斯公司

地 址 美国印第安纳州艾克哈特

[72] 发明人 蒙哥马利·柯蒂斯·杰里 谢奈 辛格利·埃里克·查尔斯

人 群

[54] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 刘元金

说明书页数: 5 附图页数: 1

[54] 发明名称 α -淀粉酶的热稳定性

[57] 摘要

本发明公开了增强微生物 α -淀粉酶热稳定性的方法。该方法包括在酶的水溶液中加入致稳量的亲水脂两性物。其中稳定化的 α -淀粉酶的配方及其在淀粉液化中的应用也包括在此发明的范围内。

权 利 要 求 书

1. 增强细菌 α -淀粉酶的热稳定性的方法, 其特征是在 α -淀粉酶水溶液中加入致微量的亲水脂两性物。

2. 根据权利要求1的方法, 其中 α -淀粉酶来自枯草杆菌、地衣形芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌, 或者凝结芽孢杆菌等生物。

3. 根据权利要求2的方法, 其中生物种是地衣形芽孢杆菌。

4. 根据权利要求1的方法, 其中亲水脂两性物的一般结构式是

X

(R)

这里, X是 COO^- , NH_2 , OH , SO_3^- , SO_3^+ , 或 CONH_2 , R是非极性部分。

5. 根据权利要求1的方法, 其中亲水脂两性物的化学结构式是 $\text{R}-\text{COO}^-$, R是含有2至14个碳原子的脂肪族或芳香族基团。

6. 根据权利要求5的方法, 其中R是甲基、乙基、正丙基或异丙基、正丁基或异丁基、苯基、或取代的苯基。

7. 根据权利要求5的方法, 其中将含有两性性(amphilio)的羧酸盐以它的金属盐形式加入到 α -淀粉酶的水溶液中。

8. 根据权利要求7的方法, 其中的金属是钠和钙。

9. 根据权利要求5的方法, 其中亲水脂两性物加到 α -淀粉酶水溶液中, 达到每摩尔 α -淀粉酶至少2.89摩尔羧酸盐的浓度, 为计算起见, α -淀粉酶的分子量为58,000道尔顿。

10. 根据权利要求1的方法, 其中亲水脂两性物是乙酸盐, 它加到 α -淀粉酶溶液中的浓度为每百万单位酶活力(以修正的Wohl-

gemuth单位表示)至少0.24克乙酸盐离子。

11. 细菌地衣形芽孢杆菌菌种在适当营养培养基上生长时,所产生的 α -淀粉酶水溶液的稳定化方法,其特征是包括在溶液中加入足够量碱金属的乙酸盐,乙酸盐离子的浓度达到每百万单位 α -淀粉酶活力(用修正的Nohlgemuth单位表示)至少0.24克乙酸盐的离子。

12. 根据权利要求11的方法,其中 α -淀粉酶在溶液中存在足够的量,每毫升提供170,000—180,000修正的WOHLGEMUTH单位。

13. 根据权利要求11的方法,其中碱金属是钠。

α -淀粉酶的热稳定化

本申请是1985年1月31日归档的美国专利申请号697036的补充部分。

使用热稳定的 α -淀粉酶作为淀粉液化时的稀释剂是糖类增甜物生产中的一项重要改进。淀粉基质的酶促液化减少了不想要的副产物的形成,并且可以将盐的使用量降低至符合要求,因为在最终的葡萄糖浆中,多量的盐份要用离子交换树脂来除去,会增加额外的生产费用。用酶(如 α -淀粉酶)在高温下液化淀粉,主要依靠这种酶的热稳定性,因为受热引起酶的不可逆变性。这种变性造成完全丧失生化催化活性。从嗜热微生物得到热稳定的 α -淀粉酶已经用于水解、液化淀粉,和/或把含淀粉物质转变成淀粉水解物。例如,美国专利3654081和3912590阐述了地衣形芽孢杆菌产生的热稳定 α -淀粉酶在高温下对淀粉的液化作用。

许多商业上得到的 α -淀粉酶产品来源于细菌,如枯草杆菌、地衣形芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌等。真菌的 α -淀粉酶在高温下液化淀粉的应用十分有限,因为一般认为它们不是热稳定的酶。

淀粉的酶促液化通常在高温下进行,以提高淀粉对酶促水解的敏感性。在液化过程优选采用的高温条件下,即使用热稳定的 α -淀粉酶,也会造成上述的生物催化活性的丧失。于是,把稳定剂加到酶里提高酶的热稳定性。Wallerstein已在英国专利905029中公开,通过把硫酸钙加到含淀粉的培养基中来增强淀粉的酶促高温糖

化作用。用钙离子提高 α -淀粉酶对热稳定性，已为本技术领域普遍接受，但仍有某些缺点，如上述加盐到淀粉中出现的问题等即是。

近来，美国专利3654081 中已公开，通过把钙盐和/或钠盐加入到最好有一些 α -淀粉酶的淀粉水浆中，淀粉就能很容易被完全液化。

美国专利3912590 已公开一种淀粉液化和稀化的联合过程，这个过程包括用一种来自地衣形芽孢杆菌的 α -淀粉酶在高温下处理淀粉的水悬浮液。

美国专利4,284,722 对一种来自嗜热脂肪芽孢杆菌的对热和酸稳定的 α -淀粉酶提出权利要求。

Pace等在J.Biol.Chem.中报道溶菌酶在各种不同浓度的三-N-乙酰基葡萄糖胺时的热变性及盐酸胍变性。三-N-乙酰基葡萄糖胺专一地结合在自然状态溶菌酶的活性部位，并且它的存在会导致蛋白质发生很容易观察到的对热和盐酸胍变性的稳定作用。

把氯离子加到 α -淀粉酶的水溶液中，尽管加氯离子的最初目的是调节pH值，已发现它会提供某些热稳定作用。

在美国专利4,497,867 中，公开了将得自卡氏(Carlsberg)从枯草杆菌中分离的蛋白酶延长贮存期限的方法，该法包括在酶溶液里加入钙离子和选自甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐及其混合物的一种水溶性羧酸盐。

美国专利4,318,818 公开了一种稳定化的酶水溶液的组合物，它包括：

a) 0-75% 左右的一种洗涤剂用表面活性剂：

- b) 0.025% - 10%左右的纯酶,最好是一种蛋白水解酶;
- c) 0 - 80%的低分子量的伯醇或仲醇;
- d) 0.1 - 10%左右的短链羧酸盐,最好是甲酸盐;
- e) 足够量的可溶性钙盐,每升提供0.1到10毫摩尔的钙离子,和
- f) 其余为水补足。

在典型的工业操作中,淀粉是用热稳定的 α -淀粉酶在80° - 110℃左右的温度范围内, pH 6.0以上被液化。为了在高温使酶进一步稳定化,一般加入钙盐(50 - 150 ppm Ca^{++})。这些条件下进行淀粉的酶促液化有三个缺点。首先,淀粉在pH 6.0以上, 80℃或更高温度进行水解,会促使淀粉的还原基团异构化,结果在以后的转化过程中形成maltulose,造成最后葡萄糖收率的下降。第二,液化了的淀粉进一步糖化产生葡萄糖,再转化成果糖,其中所使用的葡萄糖淀粉酶的最佳pH,对于麹霉菌型的葡萄糖淀粉酶来说,一般在4.5左右,而对于根霉菌型的酶来说是5.0左右。这样,当淀粉在pH 6.0或6.0以上液化时,必须在用葡萄糖淀粉酶进行糖化之前就降低pH,这样调整pH,因加了酸而增加了葡萄糖浆中的盐含量,进而提高了为除去过多的盐所需要的离子交换树脂的费用。因为液化作用在pH 6.0或6.0以下进行,必须补加钙离子(达到约500 ppm)。这样,就在当此葡萄糖浆是用于由葡萄糖异构酶法生产高果糖玉米浆时,使得从淀粉糖化制备的葡萄糖浆中完全除去钙离子一事变复杂了。

为增强 α -淀粉酶在水溶液中的热稳定性,找到一种新的方法是十分需要的,这就是本发明的目的。进一步的目的是要用这种方法提供

一种稳定化的 α -淀粉酶的组合物。

附带的目的是要提供这样一种组合物,它不需要加入钙离子,而能在钙含量很低(25-50ppm)的情况下液化淀粉。

另一目的是要提供pH低到5.0时能用于高温液化淀粉的一种组合物。

本发明是一种增强细菌 α -淀粉酶对热稳定性的方法。这方法包括在 α -淀粉酶水溶液中加入致稳量的一种亲水脂两性物(amphiphile)。用这一方法稳定化的 α -淀粉酶溶液及其在淀粉液化中的应用也是本发明的范围。

本发明使用的 α -淀粉酶是通过在营养生长培养基上培养适当的微生物所形成的胞外酶来生产的。亲水脂两性物稳定剂可以在除去微生物或酶溶液浓缩之前或之后加入。然而,在典型的操作中,微生物细胞用常规方法(如带有透析装置的离心和/或过滤)从含有 α -淀粉酶的培养液中除去。再用超过滤和真空蒸发技术浓缩过滤液,以提供具有所需活性水平的酶溶液。这种酶溶液最好还应用本发明的方法使之稳定化。

提高 α -淀粉酶溶液的热稳定性还通过加入致稳定量的亲水脂两性物来实现。至于亲水脂两性物(amphiphile)这一术语,我们的意思是一种分子或离子,具有极性的(水溶的)头部和非极性的(水不溶的)尾端。此外,亲水脂两性物必须够大,足以使每端表现出它自己的溶解性能。亲水脂两性物的一般结构式是

X

®

其中X表示一个极性的或离子基团，如 COO^- ， NH_4^+ ， OH ， SO_3^- ， $\text{SO}_3^=$ 或 CONH_2 ，而R是非极性部分。这样，不同种类的亲水脂两性物被考虑到有助于 α -淀粉酶的热稳定性作用。有用的亲水脂两性物的例子有醇类（如乙醇、丙醇、丁醇、苯甲醇等），胺（如苯胺、丁胺、乙胺、己胺等），酰胺（如丁酰胺、乙酰胺、苯乙酰胺、苯甲酰胺等）。我们不打算在解释该发明如何起作用时拘泥于任何专门理论，而是相信亲水脂两性物由于彼此间静电的和疏水性的相互作用有助于 α -淀粉酶的热稳定性。在优选的实例中，亲水脂两性物的离子基团是具有化学式



表示离子部分的羧酸盐，其中R是H，或者含有2到14个碳原子的脂肪族或芳香族基团。更具体讲，R能够是甲基、乙基、正丙基或异丙基、正丁基或异丁基、苯基或者被取代的苯基等。含有羧酸盐的亲水脂两性物能够以相应的羧酸形式加入到 α -淀粉酶水溶液里，由于酸的盐有较高的溶解性，因此更好是使用相应的羧酸的钠盐或钙盐。

羧酸盐的离子，典型的代表是它们的钠盐形式，以达到致稳量加入到 α -淀粉酶水溶液里（致稳量就是能在很大程度上提高酶对热失活的抗性所需要的量）。商业上得到的 α -淀粉酶制备物经分析已显示出，它们在以实例I所述测定MWU表示的每百万单位酶活力中，含有0.02克乙酸盐离子。存在乙酸盐离子可能是加乙酸调pH的结果。这样低的浓度并不足以给 α -淀粉酶提供有意义的热稳定性。通常乙酸盐的浓度应该至少每摩尔 α -淀粉酶大约是 2.89×10^3 摩尔，这里为计算起见， α -淀粉酶的分子量采用58,000道尔顿。这相当于每百万单位酶活力有0.24克乙酸盐。其它亲水脂两性物使

酶能有效地稳定所需的最低含量，随所用各种物质而有改变，但这种含量不需很多的实验工作就很容易测定。

乙酸盐作稳定剂时，稳定化的 α -淀粉酶配方体系的配制通常将乙酸离子钠盐加到 α -淀粉酶水溶液的浓缩物中，使其最终浓度是170,000—180,000 MWU/ $m l$ 活性的酶浓缩物每100 $m l$ 中加入10克乙酸钠。在另一个实例中，加入 α -淀粉酶之前或之后，把亲水脂两性物加到淀粉中，其加入量应足以使亲水脂两性物对 α -淀粉酶提供当量比例。

实施本发明的方法在下列实例中作进一步的阐述。

实 例 I

α -淀粉酶样品是用地衣形芽孢杆菌的一突变株培养在适当的营养生长培养液中产生的。发酵后，微生物细胞用常规方法除去，在溶液里剩下胞外酶。含酶的溶液再用超滤方法和真空蒸发浓缩到所要的活性水平340,000—360,000 MWU/克(每克中含修正的Wohlgemuth单位数目)。

α -淀粉酶的活性是用淀粉-碘复合物的蓝值下降测定可溶性淀粉的水解来量度的。在一个典型操作中，5 $m l$ 缓冲在pH 5.4的2%可溶性淀粉和4 $m l$ 水，同1 $m l$ 适当稀释的酶在40℃水浴里一起保温。在每一定时间间隔(从加酶开始5—30分钟)取出1 $m l$ ，注入到有5 $m l$ 稀碘液的试管内，摇匀，显示的颜色再在Hellige公司600DA型日光亮度比较计(daylight comparator illuminator)来监测达到反应终点，以修正的Wohlgemuth单位表示酶的活力。一个修正的Wohlgemuth单位(MWU)是使1 $m l$ 可溶性淀粉在测定的条件下，30分钟内糊精化为规定的蓝值的

酶活力。用公式计算如下。

$$MWU/g = \frac{100 \times 30}{TW}$$

这里，100 = 每个保温混合物中淀粉的毫克数，

30 = 以分钟表示的规定的糊精化时间，

T = 以分钟表示达到反应终点所需时间，

W = 加到保温混合物中的酶重量，以酶稀释液 1 ml 样品里酶量的克数表示。

乙酸钠以各种不同的量加入到适当稀释过的 (340,000 MWU/ml - 1700 MWU/ml 或 0.2mg/ml 蛋白质) 酶溶液里，而保持溶液 pH 为 5.8。每个溶液的酶活力以上述方法测定。然后酶溶液加热到 90°C、10 分钟。加热后再测酶活力。以确定加入乙酸钠对酶稳定性有什么影响 (如果有影响的话)。乙酸钠不同含量的实验结果示于表 1

表 1. 乙酸盐浓度对 α-淀粉酶热稳定性的影响

每百万单位酶活力		酶活力 (MWU/ml)		
加乙酸钠的克数		室温下	加热后	残余活力百分数
对照	0	1714	0	0
	0.235	1578	231	12.7
	0.47	1714	286	15.7
	2.35	1714	837	46.0
	4.70	1818	735	40.4
	11.75	1818	522	28.7

从表 1 可以确定, 以乙酸钠的形式加入乙酸盐离子会增强 α -淀粉酶的热稳定性。并且, 所观察到的稳定作用随着乙酸盐浓度的增加而增加, 在每百万单位酶活力有 2.35 克乙酸钠时达到最大活性, 超过这个浓度含量时, 热稳定性开始下降。

实 例 II

单羧酸的钠盐, 如甲酸钠, 乙酸钠, 丙酸钠和丁酸钠加入到含有 40 mg/ml 蛋白质的酶溶液 (α -淀粉酶活力为 34000 MWU/ml) 中, 最终浓度为 1.22 M 。

适当稀释后 (1×100), 酶溶液在 $\text{pH } 5.8$ 加热到 95°C , 通过稀释的酶液在加热不同时间间隔后测定残留的活性, 来计算酶的热稳定性。50% 失活所需时间 (即半衰期, $t_{1/2}$) 是从残余活性百分数的对数, 对保温时间作图而求得。这些计算结果示于图 1。从图 1 可以看到增加脂肪族链的长度对 α -淀粉酶热稳定性的影响。增加脂肪族链的长度引起在 95°C , $\text{pH } 5.8$ 时水溶液中酶的热稳定性成比例地增强。酶的热稳定性遵照这样的顺序,

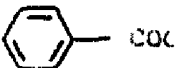
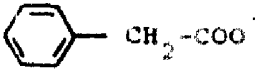
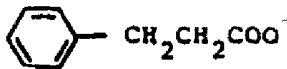
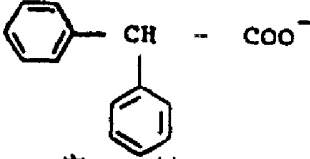
甲酸盐 < 乙酸盐 < 丙酸盐 < 丁酸盐。

甲酸处理过的酶在 95°C , $\text{pH } 5.8$ 时的半衰期是 6.3 分钟, 而同样条件下的对照酶是 1.8 分钟。然而引入一非极性的甲基基团取代甲酸盐中的氢, 引起酶热稳定性的明显提高 (半衰期 = 10.5 分钟)。烷链进一步增长, 在该试验条件下酶的半衰期只有微小的增加 (每个 CH_2 基增加 1.4 分钟)。这样可以看到, 含有非极性脂肪族链 (尾端) 和极性的羧基 (头部) 的化合物会防止酶在高温下的变性。

实 例 III

在这实验中试了含有非极性芳香族基团的有机酸。酶溶液(40mg/ml 蛋白质, α -淀粉酶的活力 340,000 MWU/ml) 中加入苯甲酸钠、苯乙酸钠、苯丙酸钠、二苯乙酸钠, 最终浓度 1.22 M。这些芳香族酸也会引起在 95°C、pH 5.8 时 α -淀粉酶的热稳定性明显提高。这些实验结果总结于表 2。从表 2 能够确定, 在试验过的芳香族羧酸中, 用苯甲酸达到的稳定性最小, 而用二苯乙酸阴离子达到的热稳定性最大。

表 2、含非极性芳香族基团的羧酸盐对 α -淀粉酶热稳定性的影响 (在 95°C, pH 5.8)

钠 盐	结 构 式	在 95°C, pH 5.8 时的半衰期
对 照	-	1.8 分钟
苯甲酸		6 分钟
苯乙酸		7 分钟
苯丙酸		12 分钟
二苯乙酸		15 分钟

实 例 IV

乙酸钠加到含有 40 mg/ml 蛋白质的 α -淀粉酶浓缩物(α -

淀粉酶活性为340,000 MWU/—l)中,最终浓度1.22 M(10% W/V),然后酶的水溶液用氢氧化钠调pH到5.0, 5.6, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0。在30分钟后,酶被稀释(1×100倍),并在不同时间间隔里加热到95℃,然后测定余下的酶活力。pH 5.0和5.5时,测定在85℃的稳定性。为作比较,也测定了没有乙酸钠时pH对酶热稳定性的影响。其实验结果列于表3。

表3. pH对 α -淀粉酶热稳定性的影响

温 度	处理的 pH	半衰期, t _{1/2}	
		对 照	加 0.0122M 乙酸钠
85℃	pH 5.0	1-1.5 分钟	3 分钟
	pH 5.5	6 分钟	25 分钟
95℃	pH 6	3 分钟	12 分钟
	pH 7	6 分钟	19 分钟
	pH 8	11 分钟	30 分钟
	pH 9	15 分钟	23 分钟

从上述结果得到下列明显的特点,

- 1). α -淀粉酶用含有一个羧基基团和脂肪族或芳香族的非极性残基的亲水脂两性物处理,使酶的热稳定性明显提高,
- 2). 增加非极性基团的链长度,会提高热稳定性,
- 3). 芳香族残基比脂肪族残基有更大的效果。

本发明的专利性不是依据任何独特的机制,而是从实验证据证实,对于观察到的稳定作用所要求的必要结构是由与酶的极性官能团相互作用的极性头部,和与酶分子邻近疏水残基相互作用的非极性烃脂

肪族和芳香族)的尾端所组成。也可能是烃尾端把酶分子的某些部位与周围的水分子档隔开了,这就提供酶分子在结构上抗热变性所必需的刚性。已观察到甲酸离子(HCOO^-)远不如乙酸、丙酸或丁酸提供的阴离子有效。甲酸阴离子中的氢同大量的水相互作用,趋向于减弱酶和阴离子的相互作用,而乙酸盐中的甲基能同蛋白质的邻近疏水侧链相互作用,让热稳定自由能明显增高。在试过的芳香族酸的阴离子中,苯甲酸的效能最小。可能是在羧基和苯环之间化学键的双键特性限制了羧基离子同酶分子极性残基相互作用的灵活性。由于加入羧酸盐提高 α -淀粉酶热稳定性并相应增加稳定自由能已计算出,并示于表4。

表4. 含有非极性脂肪族和芳香族残基的羧酸
在95℃, pH 5.8时对 α -淀粉酶热稳定性的影响

化合物	$t_{1/2}$ (分钟)	$t_{1/2}/t_{1/2}^0$ (F) ^a	$(-\Delta G^\circ)^b$ 千卡/摩尔
—	1.8	1	0
甲酸钠	6.3	3.5	0.9
乙酸钠	10.5	5.8	1.3
丙酸钠	11.9	6.6	1.4
丁酸钠	13.3	7.4	1.5
苯甲酸钠	6.0	3.3	0.9
苯乙酸钠	7.0	3.9	1.0
苯丙酸钠	12.0	6.7	1.4
二苯乙酸钠	15.0	8.3	1.5

a-加入的配位体产生的相对稳定性

b-按公式 $-RT\ln F$ 得出的稳定自由能,

在这里, $T=368^\circ\text{K}$

F - 相对稳定因数

R - 气体常数, 1.987卡/摩尔/度

$t_{1/2}$ - 不存在配位体时的半衰期

从表4 可以确定, 羧酸盐加到 α - 淀粉酶中会延长这种酶的半衰期。相对稳定因数, 即存在加入的化合物时的 $t_{1/2}$ 与它不存在时的 $t_{1/2}$ 之比值, 能随着羧酸链长的增加而增加。这种相对稳定因数用 $\Delta G = -RT\ln F$ 的关系, 能换算成附加的稳定自由能, 在这里 T 是酶加热达到的温度 ($^\circ\text{K}$), R 是气体常数, F 是相对稳定因数。甲酸盐赋予的稳定自由能为 0.9千卡/摩尔 。相信这主要是通过同酶的正电荷基团的相互静电作用产生的。影响主要是熵的变化, 是由于释放水分子与带电基团相互作用的结果。丁酸盐中 CH_3 基给出的另外大约 0.6千卡/摩尔 的稳定作用可能来自一种强化的疏水性相互作用, 这种作用对自由能也主要是熵的作用。链长效应也有所增加。并且芳香环并不是不起作用的, 它驱使相互作用着的分子朝向最佳相互作用位置。无论何种情况, 这种相互作用 (尽管很弱) 的特点是具有静电成分和疏水成分。协同的相互作用可能比个别的相互作用给出更大的稳定化效果。这表现在产生效能的分子在间隔的区域与酶相互作用, 并不一定在活性部位, 但一样地有助于迫使酶的构型在同样温度下保持更长时间的完整, 或者能承受住暴露在更高的温度中。尽管并不排除在表面上的相互作用, 但侧边的非极性基团的增强效应表示了这种相互作用的内在性。

实 例 V

用本发明的方法稳定化的 α -淀粉酶特别适合于麦芽糊精生产中淀粉的液化和转化,以及用葡萄糖淀粉酶进一步产生葡萄糖。美国专利 3,654,081 所述用热稳定 α -淀粉酶在高温下喷煮液化淀粉的过程在本例中得到了采用。一次典型的操作中,60磅玉米淀粉悬浮在33升水中,提供淀粉的浓度35—37%DSB,用乙酸调到pH 5.0。用10%乙酸钠配制的Taka-Therm[®]热稳定的 α -淀粉酶,具有170,000 MWU/ml (Taka-Therm L-170)的活力,以0.05%干基固体(DSB)加入。淀粉浆然后在试验厂的蒸汽喷煮器(*steam jet cooker*)中在140℃糊化15秒钟。糊化的淀粉直接闪蒸到保持在95℃的控温容器内。加入0.10%DSB的Taka-Therm L-170,000(配制有10%乙酸钠),以提供总浓度为每100克淀粉有20,400 MWU的酶,液化作用继续进行20分钟,然后冷却到85℃,淀粉保持在85℃约120分钟。在液化过程中用标准滴定方法跟踪右旋葡萄糖的当量(DE)。

用Taka-Therm L-170在存在有150 PPM加入的钙、pH 6.5(用NaOH调pH),以及存在有500 PPM钙、pH 5.0时重复上述实验。每种情况里都未见到淀粉的老化(*retrogradation*)。结果汇总于表5。表中所谓“离心残留物”指离心后回收的未水解的淀粉。

表5的结果指出,与不加乙酸盐的 α -淀粉酶相比较,乙酸盐稳定化的 α -淀粉酶在液化的淀粉中达到更大的DE值。加入乙酸盐不仅在淀粉酶促液化中代替了钙,而且能在较低pH的情况下用酶使淀粉液化。

表5 液化淀粉的葡萄糖当量DE

取样 时间	液化作用的pH							
	pH6.3-6.5				pH5.0			
	标准过程		乙酸盐稳定		标准过程		乙酸盐稳定	
	150ppmCa ⁺⁺		的酶,无Ca ⁺⁺		500ppmCa ⁺⁺		的酶,无Ca ⁺⁺	
	DE	离心残余物%	DE	离心残余物%	DE	离心残余物%	DE	离心残余物%
20分 钟后, 95℃	5.47	2.5	4.59	1.6	4.5	3.0	8	2.5
60分 钟后, 85℃	11.77	0.2	11.8	0.2	6.32	2.5	11	0.02
120分 钟后, 85℃	20.17	0.02	21.8	0.02	8.30	0.08	15	0.02

实 验 VI

除了高温喷煮过程(120—140℃, 15秒钟)液化淀粉之外, 也按美国专利3, 912, 590号Soet等叙述的低温喷煮(105-107℃, 3—5分钟)过程来液化淀粉。在一次典型操作中, 70磅玉米淀粉悬浮在59升水中, 用乙酸盐调pH到5.0。加入用10%乙酸钠配制的Taka-Term L-170, 000 MWU/毫升升到最终浓度0.15%DSB(20, 400 MWU/100克淀粉), 含有酶的淀粉浆通过一个保持在105—107℃的蒸汽喷煮器, 并保持这温度3—5分钟。糊化后, 将淀粉闪蒸到一个保持在95℃的温度控制的容器内, 继续液化2小时。在另一实验中, 淀粉的液化在存在有50ppm钙、

pH 6.3-6.5(用NaOH调pH)的条件下进行。然后比较DE的进展情况,结果列于表6。

表6 低温喷煮过程中淀粉液化时的DE变化

液化时间 在95℃	标准过程		改进的过程	
	pH6.3-6.5 D.E.	并加50ppmCa ⁺⁺ 残留物(%)	pH5.0 D.E.	不加Ca ⁺⁺ 残留物(%)
30分钟	13.01	0.4	15.6	0.1
60分钟	15.52	0.4	17.70	0.1
90分钟	16.02	0.4	20.65	0.04
120分钟	18.59	0.4	23.50	0.04

从表5、表6给出的数据能够证明,乙酸盐稳定的 α -淀粉酶是热稳定的,足以在pH5.0并且没有加入钙的条件下而使淀粉液化。

实 例 Ⅲ

用乙酸盐稳定的 α -淀粉酶的稳定性与含有已知阴离子的酶的稳定性作比较研究,这些阴离子的 α -淀粉酶溶液里是加进商售的已知阴离子。含有各种阴离子的酶溶液的粘性用前述方法进行测定。按残留活性百分数对90℃时的时间函数作图。研究结果示于图2。各种阴离子对酶的受热失活的稳定效果按如下顺序,柠檬酸盐<硫酸盐<氯化物<乙酸盐。

实 例 Ⅳ

商业上液化的淀粉具有10左右的DE值,所以进行了一系列液化实验来确定液化的淀粉中得到最终DE=10的最佳酶浓度。使用这种酶浓度进行几种液化研究,评价经乙酸盐稳定的Taka-Therm酶在低pH和前面所述的低温喷煮条件下,液化淀粉的商业适用性。

结果总结于表 7、8 和 9。

表 7

pH6.3-6.5, Taka-Therm L-170 为 0.08% DSB
(13,600 MWU/100克淀粉) 淀粉浓度 32-33% DSB

研究号	液化条件	DE 进程和离心残余物 (%)					
		时 间 (小时)	0	0.5	1.0	1.5	2.0
1	50ppmCa ⁺⁺ 正常的 Taka- Therm L-170	DE	8.32	7.91	9.37	10.97	11.59
		离心残 余 物	6.0	0.8	0.2	0.1	0.1
2	50ppmCa ⁺⁺ 10%乙酸盐 稳定的 Taka- Therm L-170	DE	8.91	10.51	11.64	12.76	13.91
		离心残 余 物	6.0	0.15	0.15	0.15	0.15
3	无Ca ⁺⁺ 10%乙酸盐 稳定的 Taka- Therm L-170	DE	6.71	8.53	10.05	11.51	12.89
		离心残 余 物	4.0	0.40	0.1	0.1	0.1
4	50ppmCa ⁺⁺ 5%乙酸盐 稳定的 Taka- Therm L-170	DE	2.16	5.0	7.23	9.4	11.84
		离心残 余 物	4.0	0.4	0.4	0.4	0.4
5	无Ca ⁺⁺ 5%乙酸盐 稳定的 Taka- Therm L-170	DE	2.53	5.11	7.58	9.59	11.71
		离心残 余 物	8.0	0.08	0.04	0.02	0.02

表 8

液化 $pH = 5.5$

Taka-Therm L-170 为 0.08%DSB

(13,600 MWU/100克淀粉)

淀粉浓度 32-33% DSB

		DE 进程和离心残余物 (%)					
研究号	液化条件	时间(小时)	0	0.5	1.0	1.5	2.0
6	50ppm Ca^{++} 正常的 Taka-Therm L-170	DE	ND	2.72	3.96	4.57	5.5
	离心残余物		ND	0.3	0.4	0.4	0.4
7	无 Ca^{++} 10%乙酸盐 稳定的 Taka-Therm L-170	DE	2.39	5.77	6.47	9.89	11.58
	离心残余物		2.0	0.10	0.1	0.1	0.1
8	50ppm Ca^{++} 10%乙酸盐 稳定的 Taka-Therm L-170	DE	2.32	4.70	7.9	9.12	12.24
	离心残余物		2.0	0.10	0.1	0.1	0.1
9	50ppm Ca^{++} 5%乙酸盐 稳定的 Taka-Therm L-170	DE	1.53	4.58	7.37	9.37	10.74
	离心残余物		1.0	0.08	0.06	0.04	0.04

表 9
 液化 pH = 5.0
 Taka-Therm L-170 为 0.08% DSB
 (13,600 MWU/100 克淀粉)
 淀粉浓度 32-33% DSB

		DE 进程和离心残余物 (%)					
研究号	液化条件	小时	0	0.5	1.0	1.5	2.0
	50ppmCa ⁺⁺	DE	1.61	2.97	4.12	5.40	5.98
	正常						
10	Taka-Therm L-170	离心残余物	8.0	0.2	0.2	0.1	0.1
	无Ca ⁺⁺	DE	1.29	3.06	4.57	5.5	6.51
	10%乙酸盐稳定的						
11	Taka-Therm L-170	离心残余物	4.0	0.2	0.1	0.1	0.1
	50ppmCa ⁺⁺	DE	2.29	4.06	5.52	6.96	8.55
	10%乙酸盐稳定的						
12	Taka-Therm L-170	离心残余物	1.0	0.04	0.04	0.04	0.04

表 5、7、8 和 9 中的“无Ca⁺⁺”是指不补加钙离子,因为淀粉浆和所加的水已提供了大约 25—50ppm 的钙离子。

实 例 K

淀粉液化时 pH 对 *maltulose* 形成的影响

表 7、8 和 9 的研究号 1、7 和 11 中, 淀粉液化进行更长的时间, 以测定 pH 和高温对还原基团化学异构作用的影响。然后, 液化的淀粉再用葡萄糖淀粉酶 (100 DU/lb 淀粉) 在 pH 4.2 和 60°C 糖化 48 小时。最后葡萄糖浆的碳水化合物分布情况用气液色谱和高压液相色谱法分析样品来测定。*maltulose* 用 HPX-87 离子交换柱在 HPLC 中与其它二糖 (麦芽糖和异构麦芽糖) 分离开。如此得到的数据汇总在下面的表 10 中。

表 10 液化 pH 对 *maltulose* 形成的影响

液化条件			葡萄糖浆中的碳水化合物分布情况					
液化 pH	时间	温度	葡萄糖	麦芽糖	<i>Malt- ulose</i>	异麦 芽糖	三糖	> 三糖
pH	2 小时	95°C	94.44	2.11	痕量	1.49	0.64	1.32
6.3-	4 小时	95°C	93.62	2.08	0.81	1.07	0.81	3.60
6.5	2 小时	95°C	94.32	1.9	0	1.39	0.87	1.52
5.5	4 小时	95°C	94.01	2.02	0	1.05	0.78	2.14
pH	2 小时	95°C	95.18	1.69	0	1.36	0.45	1.33
5.0	4 小时	95°C	95.04	1.74	0	1.37	0.55	1.31

从上表可以确定, 多糖还原性基团的异构作用发生在 pH 6.0 以上。这样, 在淀粉液化过程中, 通过控制液化时的 pH (pH 低于 6.0) 来消除 *maltulose* 的形成, 结果使葡萄糖最终总收率的增加多于 1%。

实 例 X

进行如下实验来确定淀粉在高温和低 pH 条件下液化时, 直接加入到淀粉浆里的亲水脂两性物对 α -淀粉酶活力热稳定性的影响。无水乙

酸鈣加入到含水淀粉漿(31%DSB)中,最終酸度為0.01M
(65克/含70磅淀粉的21加侖),加氯化鈣至25ppm(以 Ca^{++}
計算)的含量,用10%NaOH調pH到5.5。加入 α -淀粉酶(Taka-
Therm L-170, 20,400 MWU/100克淀粉)。按例Ⅱ所述
的低溫噴煮過程將淀粉液化。用含有乙酸鈉的淀粉漿重複此實驗,
其中所含乙酸鈉相當於用10%乙酸鈉配制的Taka-Therm L-170
所得淀粉漿中的量,即0.7mM(4.6克/含70磅淀粉的21
加侖)。為了作比較,也在有25ppm Ca^{++} 存在 pH5.5條件下
用通常的Taka-Therm L-170和用10%乙酸鈉配制的Taka-
Therm L-170將淀粉液化。這些實驗結果總結於表11。

表 11
液化作用的 pH = 5.5
酶的濃度 = 20,400 MWU/100克淀粉
鈣的濃度 = 25ppm (Ca^{++})
淀粉 = 31% DSB

液化條件	DE的進展 時間(小時)			
	1	1	1½	2
對照 不加乙酸鈉 但有 25ppm Ca^{++}	3.12	5.42	7.72	8.75
淀粉漿含有: 0.01M 乙酸鈉 25ppm Ca^{++}	5.53	8.64	10.82	13.01
淀粉漿含有: 0.7mM 乙酸鈉 (4.6克/21加侖淀粉漿) 25ppm Ca^{++}	4.15	6.11	8.87	10.25
Taka-Therm 酶用 10%乙酸鈉和 18%氯化鈉 穩定化 在液化過程中鈣加到 25ppm	4.86	7.25	9.64	12.35

在上面表中的数据清楚地表明，将亲水脂两性物加到淀粉浆里或酶液里，在淀粉液化时对 α -淀粉酶活力的稳定性有相同的作用。

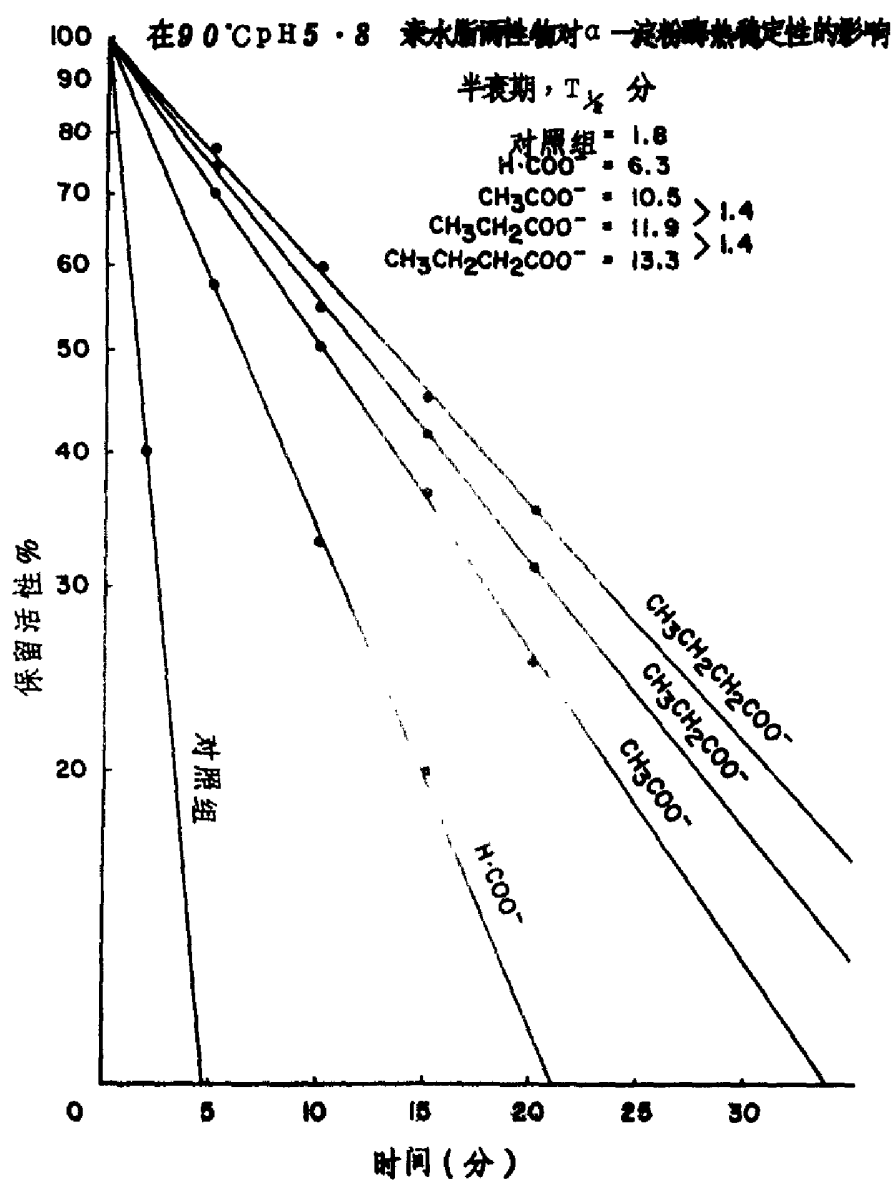


图 1

PH 6.2 时阴离子对 α -淀粉酶热稳定性的影响

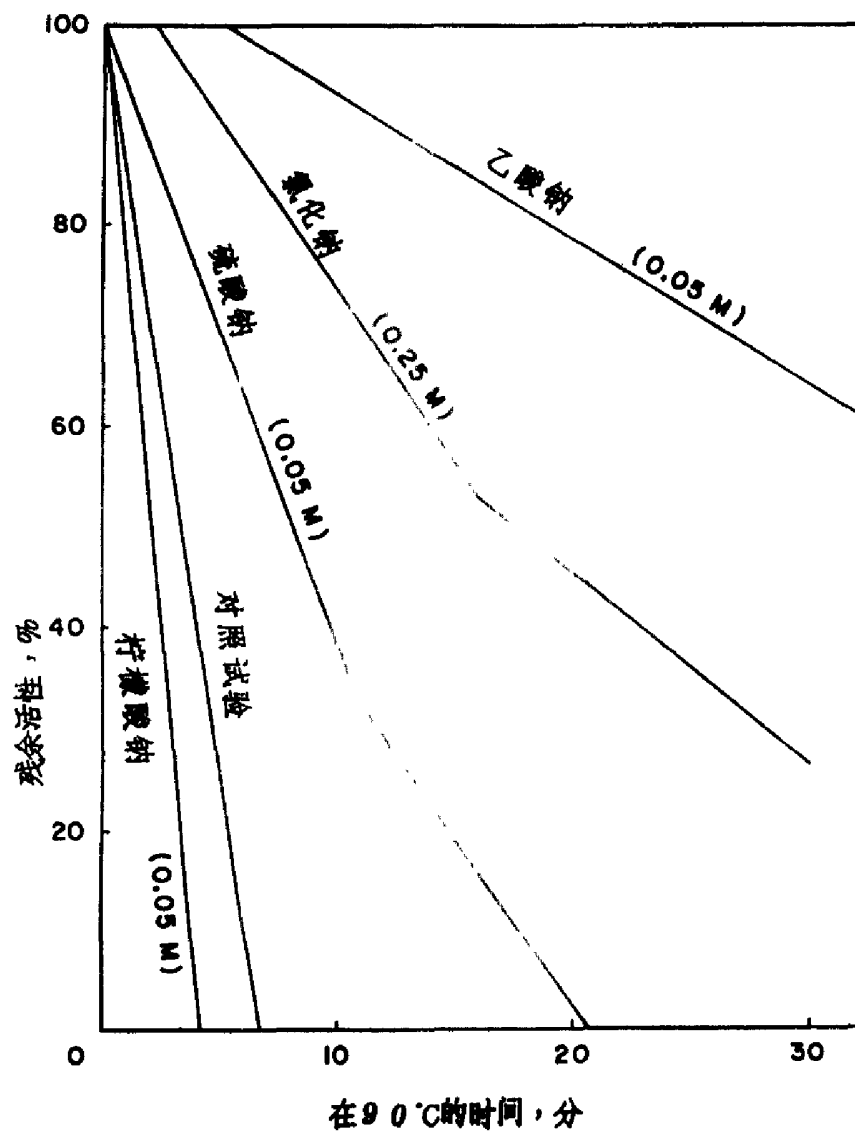


图 2