

用麦芽四糖淀粉酶生产麦芽四糖

朱 明

(无锡轻工大学中央研究所,无锡 214036)

摘要 采用麦芽四糖淀粉酶,以可溶性淀粉为底物进行了包括温度、pH值、反应时间、加酶量等多种产糖条件的试验,得到了较理想的反应参数。所得产品麦芽四糖占总糖的比例达 80% 以上,转化率为 55% 左右。

关键词 麦芽四糖;麦芽四糖淀粉酶;可溶性淀粉

中图分类号 TS245.5

0 前 言

国内对葡萄糖和麦芽糖生产已作了许多研究,进展也较快,然而对麦芽糖以上的寡糖的研究还较少。随着科技不断发展,寡糖的性质和用处日益引起人们的兴趣,寡糖除了可用作淀粉酶测定底物外,还广泛用于医疗、保健等领域^[1,2],日本等国家已率先对麦芽四糖等寡糖进行研究^[3~8],并得了一些成果,少数产品已开始批量生产。针对上述情况,作者和中国科学院微生物研究所合作,由微生物所负责筛选麦芽四糖产酶菌株和对产酶条件的研究,作者所在课题组负责研究用麦芽四糖淀粉酶生产麦芽四糖的工艺条件和优化工艺参数。

麦芽四糖淀粉酶(1,4 α -D-Glucan Maltotetraohydrolase EC. 3.2.1.60)为顺序切割糖链非还原性末端的第 4 个 α -1,4 葡萄糖苷键,产物为麦芽四糖,是淀粉酶中第 3 个外切型酶。

采用微生物研究所提供的产碱菌麦芽四糖淀粉酶,以可溶性淀粉为底物,进行了包括温度、pH值、反应时间、加酶量等多种产糖条件的试验,得到了较理想的反应参数。所得产品麦芽四糖占总糖的比例达 80% 以上,转化率为 55% 左右。

研究中还在 1 吨反应锅中进行了小规模中试,中试产品各项指标同样达到了上述要求。此外,还研究了中试产品液体的精制和固体的喷雾干燥等工艺路线,分别得到了麦芽四糖的液体和固体产品。对中试产品进行了卫生指标检测和急性毒理试验,结果均符合食品卫生要求。

1 器材和方法

1.1 器材

1.1.1 材料 麦芽四糖酶液 中科院微生物所提供;标准麦芽四糖 Sigma 公司产品;可溶性淀粉 浙江湖州食品化工集团生产,AR 级

收稿日期:1996-10-29

第一作者:朱 明,男,1962 年 10 月出生,理学学士,助理研究员。

1.1.2 仪器 72分光光度计 上海第三分析仪器厂制; 80-2离心沉淀器 上海手术机械厂制; 离子色谱仪 美国 Dionex -2010i 型

1.1.3 设备 反应锅、过滤器 无锡金成食品有限公司; 高速离心喷雾干燥机等 无锡县喷雾干燥设备厂制。

1.2 方法

1.2.1 酶活力测定及定义 反应液总体积为 5 ml, 2. 5% 可溶性淀粉溶液 2 ml, 0. 1 mol /L pH 6. 0磷酸缓冲液 2. 4 ml, 于 50℃保温 10 min, 加入酶液 0. 1 ml (已预先稀释 10倍), 50℃反应 10 min, 然后在 100℃沸水浴中加热 10 min, 停止反应, 用 DNS法测定反应液中的还原糖, 对照用失活的酶。在上述反应条件下, 每小时释放 1 mg 还原糖 (以葡萄糖作标准曲线) 所需酶量定义为一个酶活力单位 (u)。

1.2.2 酶解产物中的糖组分测定 酶解反应液用酒精沉淀糊精后, 取滤清液稀释一定倍数, 用离子色谱仪测定糖液组成, 并以 Sigma 公司生产的葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖等作为标样。

1.2.3 酶解产物转化率的测定 取 1单位体积反应液加 2单位体积无水乙醇混合均匀后, 离心沉淀约 10 min。将沉淀物完全取出, 烘干称重, 可计算得到酶解产物的转化率。

1.2.4 DE值的测定 采用菲林试剂滴定法, 以亚甲基蓝作为指示剂。

1.2.5 卫生指标测定 委托江苏省卫生防疫站测定。

1.2.6 急性毒理试验 根据卫生部 85第 78号《食品安全性毒理评价程序 (试行) 》, 委托江苏省卫生防疫站进行检测。

2 结果和讨论

2.1 pH值与 DE值和转化率之间的关系

配制 15% 的可溶性淀粉溶液, 用磷酸缓冲液调节 pH值分别为 6. 2, 6. 5, 6. 8, 7. 1, 7. 4。以 300 u/g 加酶量加入麦芽四糖酶液, 在 52℃条件下保温 8 h, 分别测定其 DE值和转化率。

表 1 pH 值与 DE值和转化率之间的关系

pH	DE(%)	转化率 (%)
6. 2	25. 3	48. 7
6. 5	27. 8	53. 9
6. 8	29. 2	55. 7
7. 1	28. 5	54. 4
7. 4	26. 1	51. 2

由表 1可见, 麦芽四糖酶水解可溶性淀粉溶液的最佳 pH在 6. 8左右。试验中还发现, 随着反应时间的增加, 反应体系的 pH值略有下降。

2.2 温度与 DE值和转化率之间的关系

将可溶性淀粉配成 15% 的溶液, 调节 pH为 6. 8, 以 300 u /g 加入麦芽四糖酶, 分别在 50, 52, 54, 56, 58, 60℃条件下保温 8 h, 分别测定其 DE值和转化率。结果见表 2。

表 2 温度与 DE值和转化率之间的关系

温度 /℃	DE(%)	转化率 (%)	温度 /℃	DE(%)	转化率 (%)
50	27. 5	53. 3	56	27. 9	53. 2
52	29. 3	55. 8	58	26. 3	51. 7
54	28. 7	55. 1	60	24. 2	47. 0

根据以上试验, 在酶解过程中, 一般将温度控制在 52~ 54⁰ C, 也可采用前 4 h 温度控制在 52⁰ C, 后 4 h 温度保持在 54⁰ C。

2.3 反应时间和 DE 值的关系

配制 15% 可溶性淀粉溶液,调节 pH 至 6.8,温度 52℃,加酶量为 300 u/g,分别在 2,4,6,8,10,12 h 取样,测定其 DE 值,结果见表 3.可知,随着反应时间增加,一开始 DE 值增加很快,但反应时间到 8 h 后,DE 值增加几乎停止.所以,反应时间一般为 8~10 h.

2.4 加酶与反应状况及麦芽四糖组成的关系

在 pH 值 6.8,质量分数 15% 的可溶性淀粉溶液中分别加酶 100,200,300,400,500 u/g,于 52℃ 水浴中反应 8 h,观察其反应结束时液体中絮凝状况和透明程度.

由表 4 可见,水解反应程度随加酶量增加而增加,当加酶量达到一定浓度时,反应体系产生絮凝现象,透明度也随之增加.取 300 u/g 和 500 u/g 两个样品,进一步用离子色谱仪测定其糖液组成.结果见表 5.

		加酶量 / u g ⁻¹				
		100	200	300	400	500
絮凝性	-	-	-	+	+	++
透明性	--	-	-	+	+	+

表 3 反应时间与 DE 值的关系						
时间 / h	2	4	6	8	10	12
DE(%)	17.3	20.5	24.7	29.1	29.3	28.9

加酶量 u g ⁻¹		糖液组成 (%)				
		G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅
300	1.45	4.80	7.70	83.10	2.95	
500	1.41	5.30	7.92	82.50	2.78	

可见,增加酶用量一方面能使水解较完全,产生较明显的絮凝现象,分离方便;但另一方面,也使四糖含量有所下降,而且用酶量增加还带来精制困难、成本增加等缺点.所以,试验中加酶量采用 300 u/g.

2.5 麦芽四糖和 α 酶及普鲁蓝酶协同水解试验

试验中采用组合对比,即:① 仅用麦芽四糖酶水解;② 先加普鲁蓝酶水解 2 h,再加入麦芽四糖酶协同反应;③ 先用 α 酶水解 0.5 h,再加入麦芽四糖酶协同水解.结果表明:① 能保证麦芽四糖占总糖比例 80% 以上;② 转化率略有上升;③ 生成了大量的一糖、二糖和三糖,而四糖比例仅占 20% 左右.该法虽能提高转化率,但因四糖比例太低而不宜采用.

2.6 麦芽四糖酶水解可溶性淀粉中试

经实验室多次小试后,最终确定中试条件为:可溶性淀粉浓度 15%,麦芽四糖酶用量 300 u/g,pH 为 6.8~7.0,温度为 52~54℃,时间为 8~10 h.

中试采用吨反应锅,连续生产 5 批,其转化率和糖分组成见表 6.

表 6 麦芽四糖中试产品的糖分组成和转化率			
中试	麦芽四糖占 总糖比例 (%)	麦芽四糖 转化率 (%)	麦芽四糖 总收率 (%)
1	85.1	55.7	47.4
2	85.4	56.3	48.1
3	83.9	54.7	45.9
4	84.2	55.1	46.4
5	85.2	54.8	46.1
平均	84.8	55.3	46.8

2.7 液体麦芽四糖精制工艺的确定

粗水解液→灭酶→冷却澄清→清液过滤→一次脱色→离子交换→初浓缩→二次脱色→真空浓缩→液体成品

2.8 固体麦芽四糖生产工艺的确定

粗水解液→灭酶→冷却澄清→过滤→真空浓缩→喷雾干燥→固体成品

2.9 卫生指标测定结果^[9]

经江苏省卫生防疫站测定:铅、砷均低于 0.5 mg/kg,灰分为 0.024%,细菌总数 < 1 个/ml,大肠菌群 < 3 个/100 ml,致病菌未检出.

2. 10 急性毒理试验结论^[10]

经过江苏省卫生防疫站作急性毒理试验, 结论为“小鼠急性经口毒性试验, LD₅₀值大于 21. 5g /kg 体重, 属无毒级”。

3 结 语

麦芽四糖属新型淀粉糖, 由麦芽四糖酶水解淀粉所得, 目前在国际上仅有少数国家开始生产, 在国内尚属空白。由于麦芽四糖在保健和医疗上有特殊用途, 作为新的功能食品原料, 麦芽四糖有着广阔的发展前景。

试验中主要研究了用麦芽四糖淀粉酶水解可溶性淀粉以制备麦芽四糖的小试最佳条件和中试工艺参数。在小试成功的基础上进行了小规模中试生产。中试所得产品各项指标已达到规定的要求, 即 $G \geq 80\%$, 转化率 $\geq 55\%$, 并且通过了江苏省卫生防疫站卫生检测和毒理检测。为今后进一步扩大中试和转化为生产应用作了一定的基础研究。

参 考 文 献

1 Woo-G.J, McCord-JD. Applied-Microbiology-and-Biotechnology. 1992, 38(5): 586.
2 Kimura-T, Nakakuki-T. Starch /staerke-. 1990, 42(4): 151.
3 Roby t, J. F, R. J. Ackerman. Arch. Biochem. Biophy. 1971, 145: 105.
4 Takashi kimura, Masafumi Ogata. Biotechnology and Bioengineering, 1988, 32: 669.
5 Keiji kainuma et al. Biochimica et Biophysica Acta. 1975, 410(333).
6 Shigeaki Maruo et al. Biosci. Bio tech. Biochem. 1993, 57(3): 499.
7 Shu ji Aoachi et al. Biosci. Bio tech. Biochem. 1996, 60(2): 338.
8 Fogarty-WM et al. Biotechnology-Letter. 1994, 16(5): 473.
9 江苏省卫生防疫站. 质量检测报告书. (食)检字第 95712号.
10 江苏省卫生防疫站. 质量检测报告书. (毒)检字第 95036号.

Study of Maltotetraose Production Technique by
Using Maltotetraose-Forming Amylase

Zhu Ming

(Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract A lot of tests of producing sugar conditions which included temperture, pH, reaction time, enzyme-containing content and so on were carried out while soluble starch as reactant. Relatively ideal reference data of the small-scale test were obtained. The content of maltotetraose production is over 80% , the conversion percentage is about 55% .

Key-words maltotetraose; maltotetraose-forming amylase; soluble starch

(责任编辑: 秦和平)