

文章编号: 1001-7453(1999)02-0007-06

麦芽四糖生产工艺试验

朱 明

(无锡轻工大学中央研究所, 江苏无锡 214036)

摘要: 麦芽四糖是一种新型麦芽低聚糖. 试验中采用麦芽四糖淀粉酶和普鲁兰酶协同水解预处理过的淀粉, 通过单因素试验和响应面曲线 (RSA) 法确定了较好的酶解工艺条件. 所得产品中麦芽四糖占总糖比例达 84% 以上, 转化率为 77% 左右.

关键词: 麦芽四糖; 麦芽低聚糖; 麦芽四糖淀粉酶; 普鲁兰酶; 淀粉

中图分类号: TS245.5 文献标识码: A

麦芽四糖是一种特定聚合度的直链麦芽低聚糖, 一般不能用简单的酸法或酶法水解得到, 而必须采用专一的麦芽四糖淀粉酶水解淀粉来制备^[1~3]. 该淀粉已经过适当的预处理, 以适合麦芽四糖淀粉酶糖化所需. 麦芽四糖淀粉酶是一种类似于 β -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶的外切型淀粉酶, 所不同的是, 该酶作用于直链淀粉分子时, 从淀粉分子的非还原性末端开始, 依次间隔 4 个葡萄糖分子切开 α -1, 4 糖苷键, 生成麦芽四糖. 如果底物是由奇数个葡萄糖单位所构成, 则还可生成麦芽三糖或葡萄糖分子; 如果底物是由偶数个葡萄糖单位所构成, 且非 4 的整数倍, 则还可生成麦芽糖分子^[4]. 试验中使用中科院微生物所专门提供的产碱菌麦芽四糖淀粉酶 (*Alcaligenes* sp.)^[5]. 麦芽四糖淀粉酶水解支链淀粉的作用是不完全的, 在遇到分枝点 α -1, 6 糖苷键时作用受阻, 不能进一步水解, 残留下一定量的极限糊精. 由于绝大多数淀粉中均含有 75% ~ 85% 的支链淀粉, 因此要提高麦芽四糖的得率, 必须同时使用能切开支链淀粉中 α -1, 6 糖苷键的切枝酶. 切枝酶作用于支链淀粉时, 能使整个支链切下, 成为相对分子量较小的直链糊精, 以利于麦芽四糖淀粉酶顺利水解. 本试验采用丹麦 Novo 公司提供的普鲁兰酶新品种 promozyme.

在麦芽四糖生产用酶制剂确定之后, 麦芽四糖的含量就主要取决于反应温度, pH 值及反应时间等因素. 试验中采用响应面分析 (RSA) 法对这些工艺参数进行分析和优化. 此外, 麦芽四糖的含量还受到预处理淀粉 DE 值以及底物浓度的影响. 预处理淀粉 DE 值较低, 则生成聚合度是奇数的寡糖机会较少, 有利于提高终产物中麦芽四糖的含量; 采用较低的底物浓度也有利于麦芽四糖的生成, 且对操作有利. 当然, 浓度太低会加重浓缩负荷, 使成本增

收稿日期: 1998-06-28; 修订日期: 1999-03-01

基金项目: 国家“八五”重点科技攻关项目 (85-722-12-05)

作者简介: 朱 明 (1962 年 10 月生), 男, 江苏无锡人, 工学硕士, 助理研究员.

加.课题研究中对这些因素也进行了系统地考虑,制订了切实可行的生产工艺路线.

1 材料与方法

1.1 原料 试剂 仪器、设备

1.1.1 主要原料与试剂 麦芽四糖淀粉酶 中科院微生物研究所提供;普鲁兰酶 丹麦 NoVo 公司提供;预处理淀粉 自制;麦芽四糖标样 Sigma 公司提供

1.1.2 主要仪器与设备 淀粉糖中试成套设备 无锡金成食品有限公司提供;高效液相色谱仪 490型 美国 Waters 公司制;电导率仪 DDS-11C 上海雷磁仪器厂制;糖量计 泉州光学仪器厂制;酸度计 上海第二分析仪器厂制.

1.2 主要测定方法

1.2.1 麦芽四糖淀粉酶活力的测定 反应总体积 5 ml, 1% 可溶性淀粉, pH6.6, 0.05 mol/L 磷酸缓冲液, 适量酶液, 50℃ 保温 10 min, 然后在 100℃ 水浴中加热 10 min 停止反应, 用 DNS 法测定反应液中还原糖, 对照用失活的酶. 在上述反应条件下, 1 h 释放 1 mg 的还原糖 (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 普鲁兰酶活力的测定 酶作用底物为 0.2% 普鲁兰, 温度 40℃, pH5.0, 0.05 mol/L 柠檬酸盐缓冲液. 反应时间 30 min. 在上述标准条件下, 每分钟水解普鲁兰释放出相当于 1 μmol 葡萄糖的还原糖所需酶量, 定义为一个普鲁兰酶活力单位 μmol/min.

1.2.3 还原糖测定 菲林试剂热滴定法.

1.2.4 糖液组成测定 HPLC 法. 氨基柱 25cm×4.9cm, 流动相 CH₃CN/H₂O=70/30, 示差折光检测器衰减 8x. 根据峰面积采用一元线性回归方程计算样品各组分浓度.

1.3 主要试验方法

响应面分析方法 (RSA). 采用三因素三水平响应面分析实验, 用计算机软件作响应面分析曲线图及回归模型数学分析和回归方程的方差分析.

2 结果与讨论

2.1 温度、pH 值对麦芽四糖淀粉酶活力和稳定性的影响.

按常规方法, 在不同温度下分别测定酶活力, 另将酶液分别在 30~70℃ 不同温度下, 保温相同时间, 测定酶的残余活力. 图 1 显示了以预处理淀粉为底物时温度对麦芽四糖酶活力及稳定性的影响. 其最适温度为 55~60℃. 在 30℃~60℃ 时, 酶较稳定.

采用不同 pH 值的缓冲溶液, 分别测定酶活力, 另在不同的 pH 值缓冲溶液中, 将酶液保温 30 min, 按常规方法测定酶的残余活力. 图 2 显示了 pH 值对麦芽四糖酶活力的影响. 结果表明: 以预处理淀粉为底物时, 最适 pH 值为 6.5~7.0. 在 pH 值为 5.5~8.5 时, 酶仍保持稳定.

底物质量分数: 预处理淀粉 1%; Ca²⁺ 质量分数: ≥ 30×10⁻⁶

图 1 温度对麦芽四糖淀粉酶活力和稳定性的影响

2.2 温度 pH值对普鲁兰酶活力的影响

试验表明,普鲁兰酶的最适温度为60℃左右,最适 pH值为 4.5~5.5.比较麦芽四糖酶和普鲁兰酶的最适温度和最适 pH值可以发现,上述两种酶的最适温度非常接近,而最适 pH值有一定差异.因此,如果使用普鲁兰酶协同糖化时,可使反应体系最初两小时控制在 pH值为 5.5左右,使普鲁兰酶在最适条件下充分发挥切枝作用,然后调 pH值到 6.5~7.0,加入麦芽四糖淀粉酶,协同进行糖化.

2.3 麦芽四糖淀粉酶水解不同 DE值底物的试验

采用不同 DE值的预处理淀粉作为麦芽四糖淀粉酶水解底物.反应结束后,用 HPLC法测定糖分组成,结果见表 1.

表 1 麦芽四糖淀粉酶水解不同 DE值底物的结果

底物	DE/%	液化方式	糖分组成/%				
			G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅
3		酸水解	1.8	4.9	7.6	81.2	4.5
5		酸水解	2.0	5.4	8.2	80.3	4.1
8		酶液化	2.2	8.5	12.0	72.5	4.8
12		酶液化	2.8	10.6	14.7	67.1	4.2
20		常规酶液化	6.2	18.7	27.1	36.6	11.4

注: G₁葡萄糖, G₂麦芽糖, G₃麦芽三糖, G₄麦芽四糖, G₅ 麦芽五糖及以上部分

由表 1可见,随着底物 DE值增加,最终产品中麦芽四糖含量逐渐下降,采用酸法预处理,一般 DE值在 3%~5%左右,最终麦芽四糖质量分数可达到 80%以上.采用酶法预处理,当 DE值控制在 8%~12%时,麦芽四糖质量分数也能达到 63%以上.而一般淀粉糖生产中,液化 DE值

经常控制在 20%左右,此时麦芽四糖质量分数仅能达 36%左右.当然 DE值越低,相应操作越困难.因此必须根据产品的要求,选择合适的液化方式和相当的 DE值.

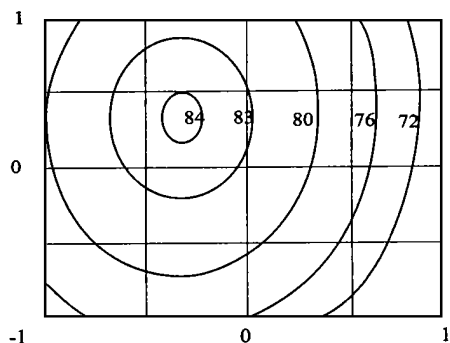
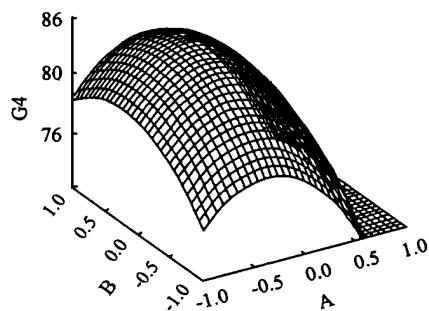
2.4 单酶水解和双酶协同水解对麦芽四糖产品组成和得率的影响

将酸水解淀粉,酶液化淀粉溶液分别进行单酶水解试验和双酶协同水解试验.单酶试验时直接调整反应液 pH值为 6.8左右,反应温度 55℃,反应时间 6 h.双酶协同水解试验时,首先调整反应液 pH值为 5.5左右,反应温度 55℃,先加入普鲁兰酶,反应 2 h后,调整 pH值为 6.8左右,分别采用 HPLC法测定终产物中麦芽四糖含量,酒精沉淀法测定转化率,结果见表 2

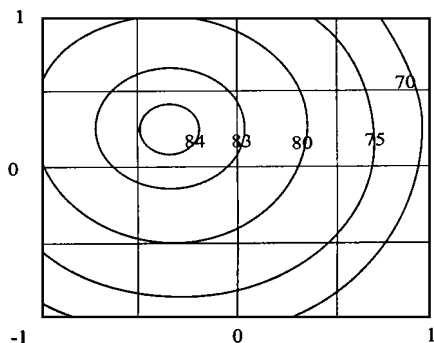
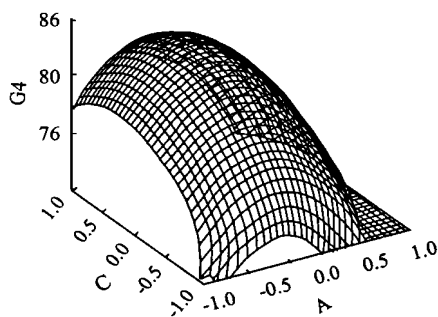
表 2 单酶水解和双酶协同水解对麦芽四糖产品组成和得率的影响

方法	加酶量			糖液组成/%					转化率/%
	麦芽四糖淀粉酶 (U/g)	普鲁兰酶 (t mol/(min·g))		G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	
酸法 预处理	单酶 200	/		1.8	4.9	7.6	81.2	4.5	53.1
	双酶 200	2		2.0	5.1	8.0	84.6	0.3	77.6
酶法 预处理	单酶 200	/		2.2	8.5	12.0	72.5	4.8	57.1
	双酶 200	2		2.6	9.3	13.4	74.7	0.0	85.4

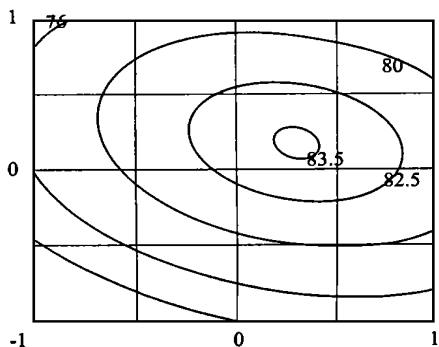
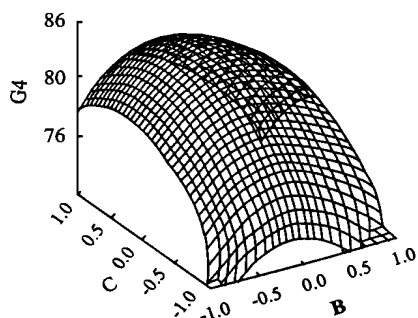
由表 2可见,单酶水解时,麦芽四糖产品中除 G₁~G₄外,还有一定的 G₅及聚合度更高的低聚糖,且转化率较低,糖液中残留极限糊精量较多.当双酶协同作用时,首先让普鲁兰酶在最适条件下水解预处理淀粉中的支链淀粉,切开 α-1,6键,使大部分支链淀粉转变为直链



$Y = f(x_1, x_2)$ 麦芽四糖含量的响应面立体图和响应面平面图



$Y = f(x_1, x_3)$ 麦芽四糖含量的响应面立体图和响应面平面图



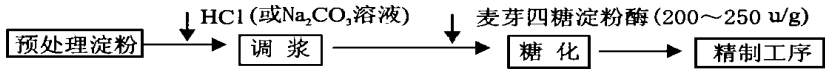
$Y = f(x_2, x_3)$ 麦芽四糖含量的响应面立体图和响应面平面图

图 3 麦芽四糖含量的响应面分析图

2.6 麦芽四糖酶水解工艺的确定

根据试验结果,可初步确定麦芽四糖酶水解工艺条件,即预处理淀粉 DE 值分别控制在 3~5(酸法)和 8~12(酶法),麦芽四糖加酶量为 200 U/g,反应温度为 58℃,反应 pH 值为 6.8~7.0,反应时间 6~7 h。如需提高转化率,可加入普鲁兰酶协同作用,开始时调整 pH 为 5.5 左右,先加入普鲁兰酶反应 2 h,然后调整 pH 为 6.8,再加入麦芽四糖酶协同反应 6 h。水解工艺流程见图 4。

单酶水解：酸水解淀粉，底物质量分数20%；酶液化淀粉，底物质量分数30%



双酶水解：酸水解淀粉，底物质量分数20%；酶液化淀粉，底物质量分数30%

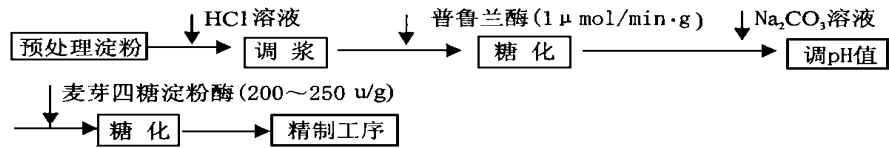


图 4 水解工艺流程图

3 结 语

本文主要讨论了有关麦芽四糖糖化的各种工艺条件,采用响应面分析法 (RSA)重点研究了温度、pH和反应时间等重要因素对麦芽四糖淀粉酶水解预处理淀粉的影响,并得到了最佳工艺参数。

致谢 在本文的写作过程中,曾得到中科院微生物所严自正研究员的指导,特此致谢!

参考文献:

[1] FOGARTY W M, BOURDE A C, KELLY C T. A constitutive maltotetraose-producing amylase from *Pseudomonas SP* IMD 353 [J]. **Appli Micro Biotechnol**, 1994, 42(2/3): 198

[2] GUN JO WOO, MCCORD J D. Bioconversion of starches into maltotetraose using *Pseudomonas stutz eri* maltotetraohydrolase in a membrane recycle bioreactor [J]. **Enzyme Micro Technolo**, 1994, 16(12): 1016

[3] 朱明.用麦芽四糖淀粉酶生产麦芽四糖 [J].无锡轻工大学学报,1997, 17(4): 34~ 37

[4] SAKANO Y, TAKASAKI Y. Method of using G-4 amylase to produce high maltotetraose and high maltose, United States Patent [P].美国专利: 4925995, **Agric Biol Chem**, 1990.

[5] 余晓红,严自正,李梅.产碱菌麦芽四糖淀粉酶的纯化及性质 [J].微生物学报,1993, 33(5): 339

Research on the Production Technology of Maltotetraose

ZHU Ming

(Center Research Institute, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract Maltotetraose is a kind of new maltooligosaccharide. The method of hydrolyzing pretreated starch with Maltotetralhydrolase and pullulanse was optimized by RSA. The maltotetraose is over 84% of total saccharides in the products.

Key words maltoretraose; maltooligosaccharide; maltotetraohydrolase; pullulanse; starch