

新型麦芽四糖酶及其应用

钱莹, 段钢*

(杰能科(中国)生物工程有限公司, 江苏 无锡 214028)

摘要: 麦芽四糖属麦芽低聚糖,与蔗糖相比,它具有低甜度,高粘度,低渗透压,耐强酸等特性,因此在食品行业有特别的应用。目前虽然能够产生麦芽四糖的酶不少,但真正工业化生产的却很少,且被报道的大部分麦芽四糖酶须在中性或偏碱性条件下进行反应,这对实际生产操作带来很多不便,影响产品质量并导致生产成本较高。作者采用一种新型的由嗜糖假单胞菌改造得到的耐热耐酸的麦芽四糖酶,对其生产麦芽四糖的工艺条件进行了研究及优化。实验表明,该酶可以在pH4.0~8.0,温度55~70℃,与普鲁兰酶协同作用生产质量分数在50%以上的麦芽四糖糖浆。

关键词: 麦芽四糖;麦芽低聚糖;麦芽四糖酶;嗜糖假单胞菌;普鲁兰酶

中图分类号: TS 245.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)01—0100—05

Maltotetraose Syrup Production and Process Optimization

QIAN Ying, DUAN Gang*

(Genencor (China) Bio-products Co., Ltd, Wuxi 214028, China)

Abstract: Maltotetraose is a key sugar in maltooligosaccharide family. It has quite some unique physical and chemical properties, such as low sweetness, low osmotic pressure, high viscosity, acid resistant and so on, which results in its wide application in food industry. Maltotetraose-forming amylases have been reported before, but few of them could be industrialized. The less thermostability and acid stability of the enzyme properties, and the cost of the enzyme make commercial production of the sugar less viable. A new acid stable and thermostable maltotetraose-forming amylase is introduced in this paper, and its operational process is optimized. The results showed that this new amylase could be operated at pH4.0~8.0, temperature from 55~70℃. At the same time, more than 50% maltotetraose syrup could be obtained with the presence of pullulanase. The new enzyme makes the production of maltotetraose more competitive.

Keywords: maltotetraose, maltooligosaccharide, maltotetraohydrolase, *Pseudomonas saccharophilia*, pullulanase

随着人们对健康意识的逐步提高,含有大量高甜度,高热量糖浆的食品正被越来越多的消费者所

抛弃,进而转向具有温和的甜度,较低的热量以及较高营养功效的食物。近年来发达国家对麦芽低聚

收稿日期: 2012-07-27

作者简介: 钱莹(1977—),女,吉林吉林人,工程师,主要从事酶制剂及应用研究。Email: Kathy.qian@danisco.com

*通信作者: 段钢(1966—),男,辽宁沈阳人,工学博士,亚太地区技术总监,主要从事工业酶及应用研究。Email: Gang.duan@danisco.com

糖的研究,因其显著的保健功能,麦芽低聚糖已被做为一种“功能性食品”被人们所接受^[1]。

麦芽四糖是麦芽低聚糖家族中的一员,由4个葡萄糖通过 α -1,4糖苷键连接而成。麦芽四糖的甜度只有蔗糖甜度的20%,但其粘度却为蔗糖的2~5倍。麦芽四糖具有很好的保湿性,而且其低含量的葡萄糖与麦芽糖使得美拉德反应不容易发生。麦芽四糖具有低渗透压及耐酸、耐热等特性,因此其在食品行业中的应用颇广^[2]。麦芽四糖还由于其良好的成膜性而做为施胶剂用于造纸行业以及其与可溶淀粉相似性用于生化试剂分析行业^[3]。麦芽四糖有诸多保健功能,如可抑制肠内腐败菌的增殖,改善肠内环境;促进人体对钙的吸收等^[3]。鉴于麦芽四糖的众多特性,日本学者 Nakakuki 称其为最有希望的麦芽低聚糖^[4]。

麦芽四糖糖浆一般是由淀粉经过酶解而制得。淀粉先在液化酶的作用下转化成可溶性糊精,再由麦芽四糖酶水解,将长链的糊精降解为以麦芽四糖为主的小分子糖,最后经过分离纯化制成麦芽四糖糖浆。目前研究报道的麦芽四糖淀粉酶主要来源于 *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis* 和 *Pseudomonas saccharophilia*, 其中大部分酶的 pH 使用范围集中在中性及偏碱性,体系的反应温度也不能高于 60 °C,但是在相对较低的温度及高 pH 值的操作条件下,很容易造成系统染菌及糖液颜色变深,这对实际生产操作会造成很大的难度^[6-12]。另外麦芽四糖酶的生产成本是另一个限制其商业化大规模使用的原因。

作者使用了一种新型的从 *Pseudomonas saccharophilia* 基因修饰而得到的麦芽四糖酶,该酶不仅具有一般淀粉酶的内切性质,能够快速降低糊精的粘度,同时还具有外切酶的性质,产生大量的麦芽四糖。通过对其生产麦芽四糖糖浆工艺的研究以及优化,使其可以更加高效率更加方便的用于实际生产中。

1 材料与方法

1.1 实验材料

玉米商品淀粉:山东诸城兴茂公司产品;液化酶 Spezyme Fred, 麦芽四糖酶 Optimal 4G, 普鲁兰酶 Optimax L-1000:杰能科公司产品,单糖,双糖,三糖及四糖标准品:色谱级。

1.2 实验仪器

快速水分测定仪:MA 30,德国 Sartorius 公司产品;电子恒温水浴锅:美国 Fisher 公司产品;电子天平:PL4002, 瑞士 Mettler 公司产品;阿贝折光仪:RE40D, 瑞士 Mettler 公司产品;高效液相色谱:HPLC,美国 Agilent 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 工艺流程 配料→调 pH, 加酶→喷射液化→维持→冷却,调 pH→糖化

1.3.2 高效液相色谱分析 示差折光检测器,分离柱:Phenomenex Rezex ROA–Organic Acid column;柱温:60 °C;流动相:0.005 mol/L 硫酸;流量:0.6 mL/min,分析在常温下进行 15 min。

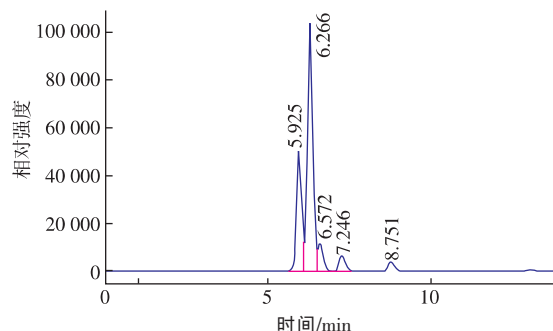


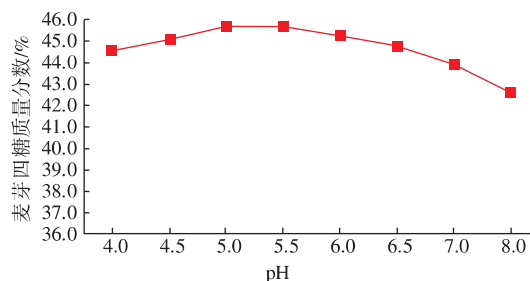
图1 麦芽四糖的色谱分离图谱

Fig. 1 HPLC of maltotetraose

2 结果与讨论

2.1 pH 对麦芽四糖酶的影响

以淀粉液化液做为底物, 麦芽四糖酶在不同 pH 的反应体系中产生的麦芽四糖质量分数如图 2 所示。



反应条件:底物质量分数32%, 温度60°C,
麦芽四糖酶添加量为25 g/L, 反应24 h

图2 麦芽四糖酶在不同 pH 值条件下对麦芽四糖质量分数的影响

Fig. 2 Effect of system pH on maltotetraose-forming amylose performance

从图2中可以发现,当糖液起始 pH 为 4.0 时, 24 h 的麦芽四糖质量分数就能够达到 44.5% 以上。随着 pH 的上升, 麦芽四糖质量分数不断升高, 当 pH 达到 5.0~5.5 时, 麦芽四糖质量分数达到最高点, 而后麦芽四糖的质量分数随着 pH 的升高后回落, 但总的来讲, 麦芽四糖质量分数变化不是特别大。这说明该麦芽四糖酶的使用 pH 范围很广, 这与以前报道过的麦芽四糖酶需在中性及偏碱性条件下才能发挥作用有很大不同。该酶能在偏酸的条件发挥最佳作用对实际生产非常有利的, 因为淀粉乳液化的 pH 值通常控制在 pH 5.2~5.8, 如果糖化单元也可以在此 pH 范围内操作, 则可省去调节 pH 的步骤, 非常方便。

2.2 温度对麦芽四糖酶的影响

以淀粉液化液做为底物, 麦芽四糖酶在不同温度的反应体系中产生的麦芽四糖质量分数如图 3 所示。

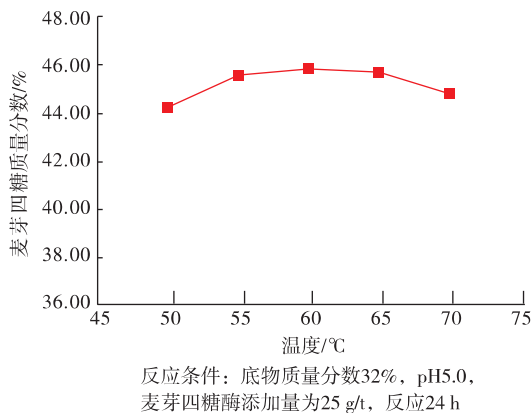


图3 麦芽四糖酶在不同温度下对麦芽四糖质量分数的影响
Fig. 3 Effect of reaction temperature on maltotetraose-forming amylase performance

从图3中可以发现,当反应温度为 50 °C 时, 24 h 的麦芽四糖质量分数就能够达到 44% 以上。随着温度的上升, 反应速度加快, 麦芽四糖质量分数不断升高, 当温度达到 60 °C 时, 麦芽四糖质量分数达到最高点, 而后麦芽四糖的质量分数随着温度的升高而回落。当反应温度在 70 °C 时麦芽四糖质量分数仍然有 44%。这说明此麦芽四糖酶的使用温度范围很广, 这与以前报道过的麦芽四糖酶在 60 °C 已失活过半相比有很大不同^[12]。反应体系的温度升高, 可以加快酶促反应的速度, 同时反应在较高温度下

操作, 还可以降低微生物染菌的可能, 从而避免了目标产物的损失。

2.3 底物液化 DE 值对麦芽四糖酶的影响

在麦芽糖的生产过程中, 底物液化液的水解程度对最终产物麦芽糖的质量分数影响较大。底物液化液的水解程度过高, 即液化液的 DE 值过高, 麦芽糖的最终产率将越低。那么在麦芽四糖的生产过程中, 是否液化液的水解程度对其最终浓度也有影响。将不同 DE 值的麦芽糊精做为底物, 对最终的麦芽四糖质量分数做了比较(图4)。通过对比发现, 液化液 DE 值的高低对麦芽四糖的最终产率也有着与麦芽糖生产相似的趋势, 随着液化液的 DE 值的升高, 麦芽四糖的质量分数逐渐降低。当底物液化液 DE 分析其原因可能是因为液化液的 DE 值越高, 表明液化液体系内的糊精的分子链越短, 特别是葡萄糖, 麦芽糖等小分子的含量越高, 造成麦芽四糖酶与目标底物的结合就越困难, 因此对底物的水解越不利, 从而造成麦芽四糖的最终质量分数不高。

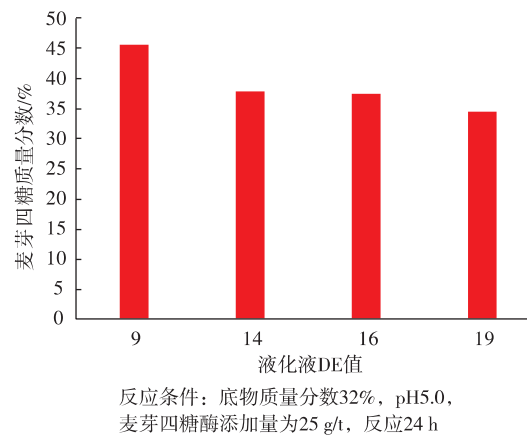
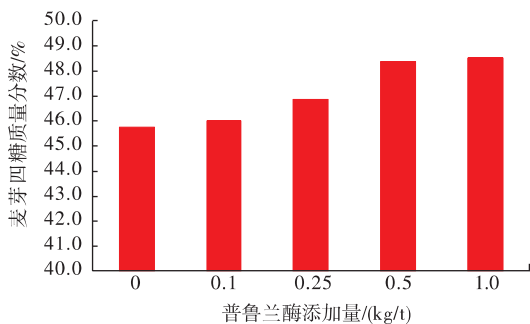


图4. 不同底物的水解程度对麦芽四糖质量分数的影响
Fig. 4 Effect of different liquefact DE on maltotetraose yield

2.4 普鲁兰酶与麦芽四糖酶的协同作用

普鲁兰酶是一种能够水解淀粉中的 α -1,6 糖苷键产生直链糊精的脱枝酶。在淀粉糖生产中, 由于液化酶与糖化酶水解支链淀粉的速度非常的缓慢, 因此在糖化过程中, 添加普鲁兰酶与糖化酶共同使用提高淀粉糖的产率。图5显示了不同计量的普鲁兰酶对麦芽四糖质量分数的影响。普鲁兰酶与麦芽四糖酶的协同作用效果明显。当普鲁兰酶的添加量为 100 g/t 时, 麦芽四糖的质量分数提高了不到 1%, 但是普鲁兰酶的添加量升高至 500 g/t, 麦芽四

糖的质量分数已经由原来的 45.7% 升到 48.3%。普鲁兰酶的计量继续调高到 1 000 g/t, 麦芽四糖质量分数的升高并不明显, 这说明普鲁兰酶的添加量 500 g/t 以足够。



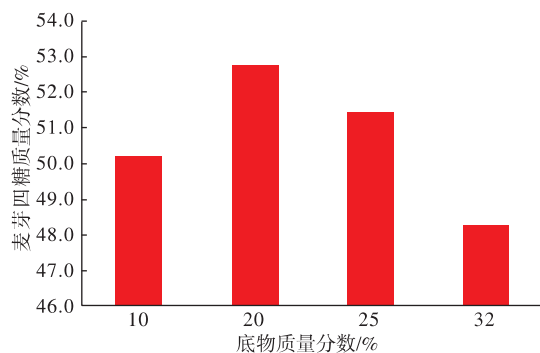
反应条件: 底物质量分数32%, pH5.0, 温度60℃, 麦芽四糖酶添加量为25 g/t, 反应24 h

图 5 麦芽四糖酶与不同普鲁兰酶协同作用对麦芽四糖质量分数的影响

Fig. 5 Effect of additional pululanase working with maltotetraose-forming amylase on maltotetraose yield

2.5 底物质量分数对麦芽四糖酶的影响

底物质量分数对酶促反应有着较大的影响, 当底物质量分数较低时, 反应速度会随着质量分数的增加而增加。但是当质量分数达到一定程度, 酶促反应速度的增加会放缓。但是从节能及设备利用率的角度, 底物质量分数高是有利的。因此如何控制底物质量分数在最佳范围对目标产物的产率有着实际的意义。从图 6 可知, 底物质量分数在 20% 时, 麦芽四糖质量分数可以在 50% 以上, 而当底物质量分数升高到 32% 时, 麦芽四糖质量分数已经降至到 48% 左右。



反应条件: 温度60℃, pH5.0, 麦芽四糖酶与普鲁兰酶添加量分别为25 g/t和500 g/t, 反应24 h

图 6 不同底物质量分数对麦芽四糖质量分数的影响

Fig. 6 Effect of different substance concentration on maltotetraose yield

3 结语

通过对麦芽四糖酶的反应 pH、温度、底物质量分数以及与普鲁兰酶的协同作用的研究发现, 新型的麦芽四糖酶可以在 pH 4.0~7.0 比较宽泛的条件下发生作用, 麦芽四糖质量分数均可达 42% 以上, 其最佳 pH 范围在 5.0~5.5 之间, 这与之前报道的大部分麦芽四糖酶需在偏中性或碱性条件下反应有很大的不同。由于淀粉的液化单元 pH 多控制在 5.2~5.8, 如果麦芽四糖酶反应过程也可以控制在此范围内, 则对生产操作非常有利, 因为无需调节 pH, 这不仅节约了碱的用量, 降低生产成本, 同时也避免了大量离子的存在, 减轻了后序的糖液离子交换环节的压力。对于反应温度, 新型的麦芽四糖酶可以在 60~65℃ 下进行反应, 在此温度下操作, 可以降低微生物染菌的可能, 从而避免目标产物的损失。研究还表明普鲁兰酶与麦芽四糖酶的协同作用效果明显, 底物质量分数不易过高, 20%~30% 即可。

参考文献:

[1] 姜锡瑞, 段钢. 新编酶制剂实用技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.

[2] DUAN GANG, QIAN Ying, et al. Improved production of maltotetraose syrup using a *Pseudomonas Saccharophila* maltotetraose hydrolase variant and a debranching enzyme[P]. WO:132157 A2, 2010.

[3] 朱明, 吴嘉根. 麦芽四糖的性质及在食品中的应用[J]. 冷饮与速冻食品工业, 1999(4): 23-24.

[4] Kimura. Maltotetraose, a new saccharide of tertiary property[J]. *Starch*, 1990(42): 151-157.

[5] Yoshiyuki Takasaki. Method of using G-4 amylase to produce high maltotetraose and high maltose content starch hydrolyastes[P]. 美国专利: US, 4925795.

[6] Tae Un Kim. Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* Strain, GM8901[J]. *Applied and environmental microbiology*, 1995, 61(8): 3105-3112.

- [7] Yoshihiro Mezaki. Crystallization and structural analysis of intact maltotetraose-forming α -amylase from *Pseudomonas stutzeri*[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2001, 65(1):222-225.
- [8] Shuichiro Murakami, Kenji Nagasaki, et al. Purification and characterization of five alkaline, thermotolerant, and maltotetraose-producing α -amylases from *Bacillus halodurans* MS-2-5, and production of recombinant enzymes in *Escherichia coli*[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2008(43):321-328.
- [9] Hayashi T, Akiba T. Properties of new alkaline maltohexose-forming amylases [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1998 (28):281-285.
- [10] Momma M. Cloning and sequencing of the maltohexose-producing amylase gene of *Klebsiella pneumonia* [J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2000(64):428-431.
- [11] Hashim So. Alkaline active maltohexose-forming α -amylase from *Bacillus halodurans* LBK 34[J]. **Enzyme Microb Technol**, 2005(36):139-146.
- [12] Yoshiyuki Takasaki. Maltotetraose-producing amylase from *Bacillus sp.* MG-4+[J]. **Agric Biol Chem**, 1991, 55(7):1715-1720.

会 议 信 息

会议名称(中文): 2013年糖生物学戈登研究研讨会

会议名称(英文): **The Glycobiology Gordon Research Seminar**

所属学科: 生物物理学、生物化学及分子生物学, 生物技术与生物工程

开始日期: 2013-03-02 结束日期: 2013-03-03

所在国家: 美国

具体地点: Ventura, CA

主办单位: Gordon Research Conference

联系电话: 401-783-7644 传真: 401-783-7644

通讯地址: Gordon Research Conferences 512 Liberty Lane West Kingston, RI 02892 USA

会议网站: http://www.grc.org/programs.aspx?year=2013&program=grs_glyco

会议名称(中文): 第8届生物标志物大会

会议名称(英文): **8th Annual Biomarkers Congress**

所属学科: 生物物理学、生物化学及分子生物学, 细胞生物学, 生物技术与生物工程

开始日期: 2013-02-19 结束日期: 2013-02-20

所在国家: 英国

具体地点: Manchester, UK

主办单位: Oxford Global Conferences

联系电话: +44 (0)1865 304925

传真: +44 (0)1865 304935

E-MAIL: info@oxfordglobal.co.uk

会议网站: <http://www.biomarkers-congress.com/>