

# 两种淀粉酶的酶学性质及应用研究

毕金峰

(中国农业科学院农产品加工研究所, 农业部农业核技术与农产品加工重点实验室, 北京 100094)

**摘要:** 研究了两种耐高温 $\alpha$ -淀粉酶和两种真菌 $\alpha$ -淀粉酶的酶学性质, 确定了最佳酶反应条件。将其应用于淀粉糖生产中, 以30%的玉米淀粉为原料, 用进口耐高温 $\alpha$ -淀粉酶水解至还原糖含量为16.5%, 再用日本真菌 $\alpha$ -淀粉酶在最佳条件下反应21 h, 可得到含纯麦芽糖31.1%、葡萄糖1.7%、糊精2.7%的高麦芽糖浆。

**关键词:** 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶; 真菌 $\alpha$ -淀粉酶; 生产; 高麦芽糖浆

中图分类号: TS201.2<sup>+</sup>5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2005)ZK-0238-04

## 0 引言

淀粉酶主要用于淀粉制糖工业中。耐高温 $\alpha$ -淀粉酶和真菌 $\alpha$ -淀粉酶(或 $\beta$ -淀粉酶)是玉米淀粉生产高麦芽糖浆的关键酶。高麦芽糖浆是一种麦芽糖含量较高(50%)而葡萄糖含量较低(10%)的淀粉糖浆。因其具有无色透明、甜度低、熬糖温度高、吸湿性低、抗结晶性好等特点而成为糖果工业更新换代的产品, 被广泛应用于糖果、蜜饯、果蔬汁饮料中<sup>[1-3]</sup>。耐高温 $\alpha$ -淀粉酶和真菌 $\alpha$ -淀粉酶的合理选择和有效使用, 不仅可以提高淀粉生产高麦芽糖浆的质量, 也可以降低生产成本。选用耐高温 $\alpha$ -淀粉酶一般要求作用温度高, 作用力强, 能耐110左右的高温; 选用真菌 $\alpha$ -淀粉酶要求产生界限糊精少。对市场上销售的多种耐高温 $\alpha$ -淀粉酶和真菌 $\alpha$ -淀粉酶, 国内进行比对研究的较少<sup>[4-6]</sup>。本文首先进行了两种耐高温 $\alpha$ -淀粉酶和两种真菌 $\alpha$ -淀粉酶的酶学性质研究, 优选最佳生产酶制剂, 并探讨了两种酶在淀粉生产高麦芽糖浆中的应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

酶制剂: 国产耐高温 $\alpha$ -淀粉酶(酶活力120000 U·mL<sup>-1</sup>, 以下简称“G酶”)、进口耐高温 $\alpha$ -淀粉酶(酶活力430000 U·mL<sup>-1</sup>, 以下简称“N酶”); 丹麦真菌 $\alpha$ -淀粉酶(酶活力为520000 U·mL<sup>-1</sup>, 以下简称“F酶”); 日本真菌 $\alpha$ -淀粉酶(酶活力为450000 U·mL<sup>-1</sup>, 以下简称“B酶”)。

玉米淀粉(洁鹅牌, 中国人民解放军辽宁省军区宁官农场淀粉厂, GB 8885, 1988)。

缓冲液: 磷酸氢二钠-柠檬酸。

麦芽糖: 上海生工生物工程有限公司, AM RESCO分装。

异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖标准样品: 均为美国Sigma公司产品。

### 1.2 主要仪器

高效液相色谱仪(Waters, 美国), 具体配置如下: 600型四元梯度高压泵; 全32位色谱管理系统; 2410示差折光检测器; 真空脱气机; 柱温箱; 碳水化合物分析柱等。

CR21G型紫外-可见分光光度计, 日本。

### 1.3 试验方法

每次试验设3个重复, 取平均值, 并对结果进行统计分析。

酶活测定方法: 吸光光度法<sup>[7]</sup>。

还原糖含量(以下简称DE值)测定方法: 采用直接滴定法测定还原糖和总糖的含量<sup>[8]</sup>, 计算公式为:

$$DE(\text{以葡萄糖计}) = \frac{\text{还原糖含量}}{\text{总干物质含量}} \times 100\%$$

糊精的测定: 国家标准(QB/T 2491-2000)<sup>[9]</sup>。

麦芽糖的定性测定: 纸层析法<sup>[9]</sup>。

麦芽糖、葡萄糖的定量测定: 高效液相色谱法<sup>[9]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶酶学性质研究

#### 2.1.1 稀释倍数对G酶、N酶酶活的影响

将G酶和N酶用蒸馏水(pH值6.0)稀释不同倍数, 测定不同稀释倍数下的酶活, 结果如表1。可知稀释倍数增加, 酶活迅速降低。N酶稀释300倍时酶活还高于G酶稀释200倍的酶活, 可见N酶的酶活高于G酶。为研究方便, 选用N酶稀释300倍(以下简称“N-300”)、G酶稀释200倍(以下简称“G-200”)作为反应酶液, 进行其它酶学性质研究。

表1 稀释倍数对酶活的影响

Table 1 Effect of dilution multiple on enzyme activity

稀释倍数	G酶酶活/U·mL <sup>-1</sup>	N酶酶活/U·mL <sup>-1</sup>
100	—	—
200	616.8	—
300	—	1304.1
400	—	—

注: “—”表示超出测定酶活力范围, 无法计算酶活力。

#### 2.1.2 N-300、G-200酶的最适温度

分别吸取2%的可溶性淀粉20 mL于若干试管中,

收稿日期: 2004-10-27 修订日期: 2005-02-10

作者简介: 毕金峰(1970-), 男, 副教授, 博士后, 主要从事食品化学与生物技术研究。北京市5109信箱 中国农业科学院农产品加工研究所, 100094。Email: bijinfeng@126.com

各加入缓冲液 5 mL 摇匀, 在不同温度的恒温水浴锅中预热 5 min, 再加入稀释好的酶液各 1 mL, 测试酶液的酶活, 结果见图1。可知N-300 酶在40~ 100 范围内, 随温度升高, 酶活增加; 而G-200 在80 时酶活最高。可确定在此研究范围内, N-300、G-200 的最适温度分别为 100 、80 。

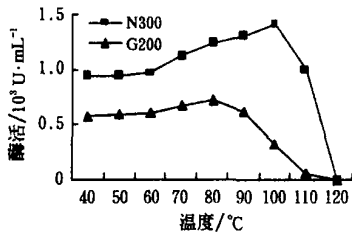


图1 两酶的最适温度

Fig 1 Optimum temperature for two kinds of enzymes

2.1.3 N-300、G-200 酶的热稳定性

取适量N-300、G-200 酶液, 分别在不同温度下保温 1 h, 然后冷却至室温, 按常规方法测定酶活(N-300 酶为100 、G-200 酶为80 ), 结果见表2。说明N-300 酶的热稳定性较好, 在不同温度下保温 1 h, 残余酶活力较高。G-200 酶热稳定性较差, 95 、100 保温 1 h 后, 丧失酶活。

表2 两酶的热稳定性

Table 2 Thermostability of two kinds of enzymes

温度/	N-300 酶活/10 <sup>3</sup> U · mL <sup>-1</sup>	G-200 酶活/10 <sup>3</sup> U · mL <sup>-1</sup>
75	1.21	0.68
80	1.22	0.72
85	1.12	0.61
90	1.21	0.41
95	1.39	—
100	1.38	—

注: “—”表示酶活较低, 超出测定范围。

2.1.4 N-300、G-200 酶的最适pH 值

配制不同pH 值的缓冲液, 用不同pH 值缓冲液配制2%的可溶性淀粉, 在最适温度(N-300 酶为100 、G-200 酶为80 )进行酶反应, 测定反应液酶活, 结果见图2。可知N-300 和G-200 酶的最适pH 值均为7.0, 当pH 值低于5.2 时, 酶活降低。说明耐高温α-淀粉酶对酸敏感, 可用加酸的方法来灭酶。

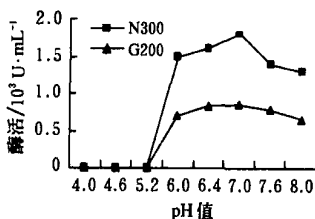


图2 两酶的最适pH 值

Fig 2 Optimum pH value for two kinds of enzymes

2.1.5 N-300、G-200 酶pH 值稳定性

配制不同pH 值的缓冲液, 用不同pH 值的缓冲液

将N 酶和G 酶分别稀释300 倍和200 倍。在常温下保温 1 h 后, 调pH 值为7.0, 在最适pH 值条件下测定酶活, 结果见图3。可知两种酶在pH 值4.0~ 7.0 的范围内较稳定, 当pH 值8.0 时, 残余酶活明显降低。当pH 值 3.0 时, 酶变性失活。同时, 也进一步证明了在相同条件下, N-300 的酶活要高于G-200。

2.1.6 Ca<sup>2+</sup> 对耐高温α-淀粉酶活力的影响

有些学者认为<sup>[1]</sup>, 耐高温α-淀粉酶作用时要求Ca<sup>2+</sup> 浓度越低, 酶稳定性越好, Ca<sup>2+</sup> 浓度对酶活影响不大, 本文对此做了研究。精确称取不同量的CaCl<sub>2</sub>(精确到0.0001 g) 放于小试管中, 加入定量的N-300、G-200 酶液, 配制不同Ca<sup>2+</sup> 浓度的酶液, 充分混匀后, 室温静置 30 min, 取 1 mL 酶液, 按标准方法测定酶活, 结果见图4。可见Ca<sup>2+</sup> 对耐高温α-淀粉酶有一定影响, 加入Ca<sup>2+</sup> 的处理稍好于对照, 尤其当Ca<sup>2+</sup> 浓度在7~ 9 mmol · L<sup>-1</sup> 时, 酶活有增加的趋势, 而后下降。

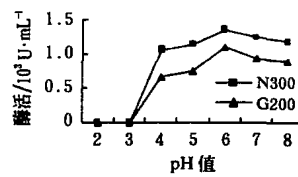


图3 两酶的pH 值稳定性

Fig 3 Stability of two kinds of enzymes in different pH value solution

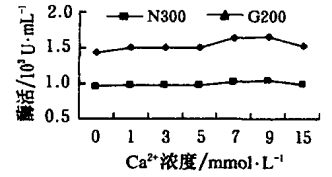


图4 Ca<sup>2+</sup> 对两酶酶活的影响

Fig 4 Effect of Ca<sup>2+</sup> on the activity of two kinds of enzymes

2.2 真菌α-淀粉酶酶学性质研究

2.2.1 稀释倍数对B 酶、F 酶酶活的影响

将B 酶和F 酶用蒸馏水(pH 值6.0) 分别稀释成不同倍数, 测定不同稀释倍数下的酶活, 结果见表3。可知稀释倍数增加, 酶活降低。相同稀释倍数下, F 酶的酶活高于B 酶。为研究方便, B 酶、F 酶均选用稀释1000 倍(以下分别简称B-1000、F-1000) 的酶液作为酶反应液, 进行其它酶学性质研究。

表3 稀释倍数对酶活的影响

Table 3 Effect of dilution multiple on enzyme activity

稀释倍数	F 酶酶活/10 <sup>3</sup> U · mL <sup>-1</sup>	B 酶酶活/10 <sup>3</sup> U · mL <sup>-1</sup>
100	5.21	4.50
500	4.80	4.31
1000	4.43	4.20
1500	4.13	3.78
2000	3.02	2.10

2.2.2 B-1000、F-1000 酶的最适温度

试验方法同2.1.2, 测定反应液酶活, 结果见图5。可见B-1000、F-1000 酶的最适温度分别是60 和55 。两种酶在70 时酶活都明显下降。

2.2.3 B-1000、F-1000 酶的热稳定性

试验方法同2.1.3, 测定酶活(B-1000 酶反应温度为60 、F-1000 酶反应温度为55 ), 结果见表4。表明两种酶在50 以下的热稳定性都较好, 55 以上时保温

1 h, 残余酶活力较低; F-1000 酶的热稳定性更好些。75 时保温 1 h, 两种酶均已失活。

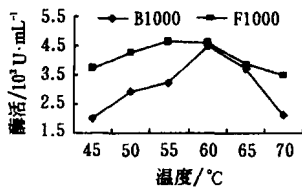


图5 两酶的最适温度

Fig 5 Optimum temperature for two kinds of enzymes

表4 两酶的热稳定性

Table 4 Heat-resistance of two kinds of enzymes

温度/°C	B-1000 酶活/10 <sup>3</sup> U · mL <sup>-1</sup>	F-1000 酶活/10 <sup>3</sup> U · mL <sup>-1</sup>
5	3.94	4.47
40	3.98	4.54
45	4.06	4.35
50	4.02	4.32
55	3.38	3.98
60	3.50	3.65
65	2.01	2.50
75	0.00	0.00

2.2.4 F-1000, B-1000 酶的最适 pH 值

操作同 2.1.4, 测定结果见图 6。可见两种酶在 pH 值 5.2~7.0 之间酶活较高, 最适 pH 值均为 5.5。

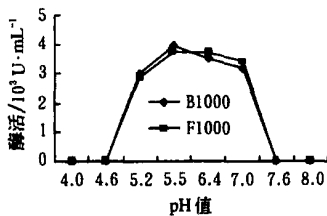


图6 两酶的最适 pH 值

Fig 6 Optimum pH value for two kinds of enzymes

2.2 B-1000, F-1000 酶 pH 值稳定性

操作方法同 2.1.5, 结果如图 7。可见 B-1000 酶在 pH 值 5~7 的范围内稳定, F-1000 酶在 pH 值 5~8 的范围内稳定。都在 pH 值 3 时失去酶活。

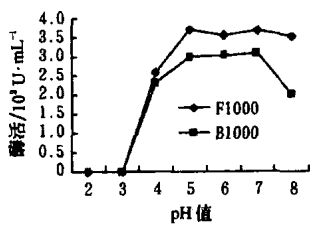


图7 两酶的 pH 值稳定性

Fig 7 Stability of two kinds of enzymes in different pH value solution

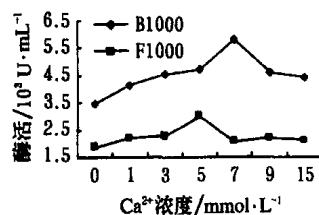


图8 Ca<sup>2+</sup> 对两酶酶活的影响

Fig 8 Effect of Ca<sup>2+</sup> on the activity of two kinds of enzymes

Ca<sup>2+</sup> 对真菌 α-淀粉酶有保护作用, 而且只可在适宜浓度范围内才表现出激活作用。操作方法同 2.1.6, 结果见图 8。可见 Ca<sup>2+</sup> 对真菌 α-淀粉酶酶活有一定影响, 加入 Ca<sup>2+</sup> 的处理好于对照, 尤其当 Ca<sup>2+</sup> 浓度在 7 mmol · L<sup>-1</sup> 时, 两种酶酶活增加都很明显。

2.3 淀粉酶在生产高麦芽糖浆中的应用

2.3.1 耐高温 α-淀粉酶反应时间与 DE 值关系

用 N-300 作为生产工艺试验用酶, 其最适 pH 值为 7.0, 最适温度为 100 。配制 30% 的玉米淀粉各 200 mL, 放于沸水浴中糊化, 当温度达到近 100 时, 加入 N-300 各 12 mL 进行液化, 分别在液化 6、8、10、12 min 时加入几滴 1 mol · L<sup>-1</sup> 的盐酸灭酶。测定还原糖和总糖含量, 计算 DE 值, 结果如表 5。可以看出, 随着液化时间延长, DE 值增加。根据文献 [2], 该 DE 值正好在生产所要求的范围内, 因此确定这 4 种液化液均为真菌 α-淀粉酶的反应底物。

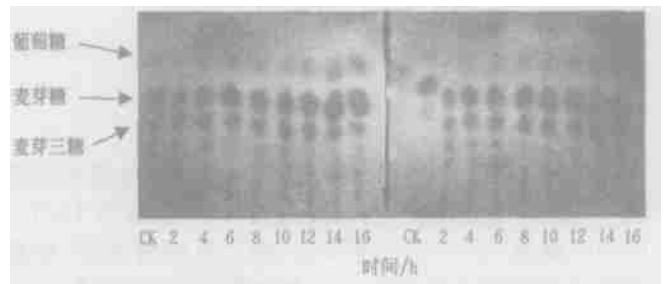
表5 酶反应时间和 DE 值的关系

Table 5 Effect of enzyme reaction time on DE value

液化时间/min	6	8	10	12
DE 值/%	14.3	16.5	18.5	20.3

2.3.2 真菌 α-淀粉酶生产高麦芽糖浆工艺

选用 B 酶作为试验用酶, 其最适 pH 值为 5.5, 最适温度为 60 。取耐高温 α-淀粉酶水解的产物作为底物, 调 pH 值为 5.5, 放于 60 水浴锅中保温 5 min, 加入稀释 1000 倍的 B 酶液, 按 1:50 比例加入淀粉液化液中, 分别在不同反应时间点样, 纸层析定性检测, 同时用高效液相色谱仪定量测定麦芽糖、葡萄糖含量。纸层析检测结果见图 9, 高效液相色谱定量测定麦芽糖结果见图 10。



注: 左右两张纸色谱图为重复处理, 每张图由左至右为麦芽糖原液 (CK)、酶解 2~16 h 反应液的结果

图9 不同反应时间的纸色谱

Fig 9 Paper chromatogram of different reaction time

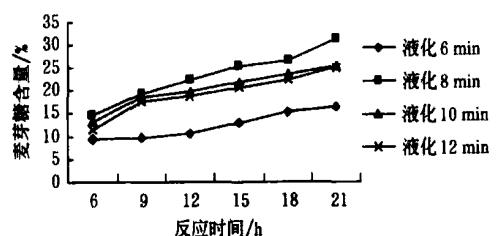


图10 不同反应时间麦芽糖含量

Fig 10 Change curve of maltose content with different reaction time

2.2.6 Ca<sup>2+</sup> 对真菌 α-淀粉酶的影响

从图 10 看出, 随着酶反应时间的延长, 麦芽糖含量逐渐升高。在试验所选的时间内, 以耐高温  $\alpha$ -淀粉酶作用玉米淀粉液化 8 min 的溶液为底物, 用真菌  $\alpha$ -淀粉酶糖化 21h 的麦芽糖含量最高, 达到 31.1%, 此时葡萄糖含量为 1.7%, 糊精含量为 2.7%。

### 3 讨论

#### 3.1 几种酶的价格比分析

G 酶和 N 酶的市场售价分别为 30 元/kg 和 47 元/kg。从酶学性质分析, N 酶的酶活高于 G 酶, N 酶耐高温能力强, 能满足蒸汽喷射液化工艺糊化、液化淀粉要求, 适合工业化生产。G 酶尽管价格较低, 但各方面性质不如 N 酶, 建议生产上使用 N 酶。B 酶和 F 酶的市场售价分别为 140 元/kg 和 167 元/kg。从酶学性质分析, F 酶的酶活略高, 但其价格亦较高; 从糖化结果和酶的最适温度、最适 pH 值分析, 二者差异不显著, 综合各种因素, 建议生产上选用 B 酶。市场上还有几家公司生产耐高温  $\alpha$ -淀粉酶、真菌  $\alpha$ -淀粉酶, 其酶学性质和催化特性有待于进一步研究。

#### 3.2 麦芽三糖对制品品质的影响

试验发现, 淀粉糖化产物中含有较高含量的麦芽三糖, 即在图 9 中由上向下数的第三个点, 在液相定量分析中也出现了明显的麦芽三糖峰。Jay K. Shetty 曾提出不同的麦芽糖糖浆类别, 其成分差别较大, 见表 6<sup>[10]</sup>。可见无论哪种麦芽糖糖浆, 均含有不同浓度的麦芽三糖, 若生产纯品麦芽糖, 则需加入脱支酶, 或进行麦芽三糖的分离提纯。

表 6 几种麦芽糖浆的成分

Table 6 Composition of several maltose syrups %				
糖浆	葡萄糖	麦芽糖	麦芽三糖	四糖及以上
麦芽糖浆	2~ 10	45~ 60	18~ 24	20~ 28
高麦芽糖浆	1~ 2	52~ 60	10~ 15	25~ 30
超高麦芽糖浆	< 1	80~ 82	9~ 11	8~ 10

### 4 结论

1) 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶 N 酶、G 酶的最佳试验稀释倍数分别为 300、200。N-300 酶的最适温度为 100, 最适 pH 值为 7.0。G-200 酶的最适温度为 80, 最适 pH 值为 7.0。Ca<sup>2+</sup> 浓度在 7~ 9 mmol·L<sup>-1</sup> 时对两种酶都有激活

作用。

2) 真菌  $\alpha$ -淀粉酶 B 酶、F 酶最佳试验稀释倍数均为 1000。B-1000 酶的最适温度为 60, 最适 pH 值为 5.5。F-1000 酶的最适温度为 55, 最适 pH 值为 5.5。Ca<sup>2+</sup> 浓度在 7 mmol·L<sup>-1</sup> 时对两种酶都有激活作用。

3) 选用耐高温  $\alpha$ -淀粉酶 (N 酶) 和真菌  $\alpha$ -淀粉酶 (B 酶) 进行玉米淀粉生产高麦芽糖浆工艺的研究。用稀释 300 倍的 N 酶作用于 30% 的淀粉, 在最佳条件下液化 8 min 后灭酶, 再加入稀释 100 倍的 B 酶, 在最佳条件下作用 21 h, 得到含纯麦芽糖 31.1% 的产品。该产品葡萄糖含量为 1.7%, 糊精含量为 2.7%, 生产出优质高麦芽糖浆。

#### [参 考 文 献]

- [1] 施金堂, 刘汉文. 利用真菌淀粉酶生产高麦芽糖浆工艺研究[J]. 食品科学, 1996, 17(6): 53- 54
- [2] 鲍元兴. 低聚异麦芽糖的质量与工艺设备[J]. 食品工业, 1999, 3: 8- 9
- [3] 刘汉文. 几种  $\alpha$ -淀粉酶生产麦芽低聚糖工艺研究[J]. 食品科技, 1999, 6: 31- 32
- [4] Ganghofner D., Kelleman J., Staudenbauer W L., et al. Purification and properties of an amylopullulanase, a glucoamylase, and an alpha-glucosidase in the amyolytic enzyme system of *Thermoanaerobacterium thomosaccharolyticum* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1998, 62(2): 302- 308
- [5] Krohn B M., Lindsay J A. Purification and characterization of a thermostable alpha-glucosidase from a *Bacillus subtilis* high-temperature growth transformant [J]. *Current Microbiology*, 1991, 22(4): 273- 278
- [6] Kow-Jen-Duan, Dey-Chyi-Sheu, Ming-Tse-Lin, et al. Reaction mechanism of isomaltoligosaccharides synthesis by alpha-glucosidase from *Aspergillus carbonarius* [J]. *Biotechnology Letters*, 1994, 16(11): 1151- 1156
- [7] 周晓云. 酶技术 (第 1 版) [M]. 北京: 石油工业出版社, 1995: 180- 297.
- [8] 大连轻工业学院等八所院校合编. 食品分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 152- 1.
- [9] 中华人民共和国轻工行业标准 [S]. 低聚异麦芽糖 QB/T 2491- 2000 2001- 04- 01 实施
- [10] Jay K. Shetty, 段 钢. 各类麦芽糖浆的生产工艺 [J]. 中国食品工业, 2001, 7: 24- 25

## Enzymatic properties of two kinds of amylases and their applications

Bi J infeng

(Institute of Agro-Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences,

Key Laboratory of Agricultural Nuclear Technology and Agro-Food Processing, Beijing 100094, China)

**Abstract** Optimum enzymes and their reaction conditions were determined after enzymatic properties of two kinds of thermostable  $\alpha$ -amylases and two kinds of fungal  $\alpha$ -amylases had been studied. 30% maize starch was hydrolyzed by imported thermostable  $\alpha$ -amylase and content of deoxidize sugar was 16.5% lastly, then 31.1% high purity maltose syrups which contained 1.7% glucose and 2.7% dextrin were obtained by Japanese fungal  $\alpha$ -amylase after reaction for 21 h under optimum conditions.

**Key words:** thermostable  $\alpha$ -amylases; fungal  $\alpha$ -amylases; manufacture; high maltose syrups