

β -淀粉酶酶解甘薯淀粉条件分析

梁新红¹,李 英²,孙俊良^{1,*},马汉军¹

(1.河南科技学院食品学院,河南新乡 453003;

2.河南科技学院化学化工学院,河南新乡 453003)

摘要:麦芽糖可以诱导枯草芽孢杆菌产生中温 α -淀粉酶,甘薯淀粉的 β -淀粉酶酶解产物主要为麦芽糖。应用高效液相色谱示差折光检测法对不同酶解条件下甘薯淀粉 β -淀粉酶酶解产物进行分析。结果表明,液化酶加入量为5~10U/g干淀粉时,酶解产物中葡萄糖的含量最高可达0.94%±0.048%,其含量较低,不会对枯草芽孢杆菌产 α -淀粉酶具有阻遏作用。酶解最佳条件为液化酶加入量5U/g干淀粉, β -淀粉酶最佳加入量为200U/g干淀粉,酶解最佳温度为60℃,最佳酶解时间为28h时,此条件下甘薯淀粉酶解产物中麦芽糖含量达75.8%±1.7%。甘薯淀粉 β -淀粉酶酶解产物可以诱导 β -淀粉酶酶解产物枯草芽孢杆菌发酵生产中温 α -淀粉酶。研究对枯草芽孢杆菌发酵生产中温 α -淀粉酶碳源优化具有重要意义。

关键词:甘薯淀粉, β -淀粉酶,麦芽糖

Analysis of hydrolysates from sweet potato starch by β -Amylase

LIANG Xin-hong¹, LI Ying², SUN Jun-liang^{1,*}, MA Han-jun¹

(1.School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China;

2.Chemistry and Chemical Engineering, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: It is critical for hydrolysates from starch by β -amylase to induce mesophilic (α -amylase fermented by *Bacillus subtilis*). Their hydrolysates were determined by HPLC with differential refractometer detector. The results showed that the addition of heat resistant α -amylase was 5~10U/g, the level of glucose was in trace amount, 0.94%±0.048%, and it could not produce catabolic repression to *B. subtilis*. The optimal parameters of enzyme hydrolysating was β -amylase 200U/g, temperature 60℃, time 28h, and the level of maltose was 75.8%±1.7%. The hydrolysates from sweet potato starch by β -amylase could induce mesophilic (α -amylase fermented by *Bacillus subtilis*). The research has important significance in theory and practice on fermentation mesophilic (α -amylase by *Bacillus subtilis*).

Key words: sweet potato starch; β -Amylase; maltose

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)07-0178-04

甘薯淀粉是枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)生长和代谢重要的碳源,*B.subtilis* ZJF-1A5 是生产中温 α -淀粉酶的重要菌株之一^[1-2]。研究表明 *B.subtilis* 在发酵过程中存在葡萄糖代谢阻遏效应,发酵液中葡萄糖含量的增多会抑制 α -淀粉酶的产生^[3-4]。同时 α -淀粉酶是诱导酶,孙俊良等^[5]提出麦芽糖和麦芽三糖能够诱导 *B.subtilis* ZJF-1A5 产生 α -淀粉酶。其他研究也证实麦芽低聚糖在诱导 *B.subtilis* ZJF-1A5 产 α -淀粉酶量升高过程中起到重要作用^[6-7]。自然界中并不存在游离的麦芽糖,一般是以淀粉或淀粉质为原料,经过酶的降解而得^[8-10],主要作用酶为 β -淀粉酶^[11-12]。 β -淀粉酶是一种外切酶,

从淀粉侧链的非还原端开始水解相隔的 α -1,4糖苷键,依次切下一个麦芽糖单位,并在切断麦芽糖的同时发生瓦尔登转化,使产物由 α 型变为 β 型麦芽糖^[13-15]。 β -淀粉酶酶解产物的成分及其含量对 *B.subtilis* ZJF-1A5 发酵产生 α -淀粉酶非常关键。

目前,葡萄糖、麦芽糖等寡糖的检测方法主要有化学分析法^[16]和高效液相色谱法^[17]等。化学分析法操作过程繁琐,选择性较差,采用高效液相示差折光检测法糖分容易分离,简便快捷。

β -淀粉酶酶解受温度、加酶量及酶解时间等因素影响。本研究主要对不同酶解工艺条件下甘薯淀粉酶解产物进行分析,优选出最佳的 *B.subtilis* ZJF-1A5 是生产中温 α -淀粉酶的碳源。为了准确的测定出淀粉酶解产物的成分及含量,用高效液相色谱法进行定性定量分析。研究将对 *B.subtilis* 发酵生产中温 α -淀粉酶碳源优化具有重要的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

收稿日期:2013-09-05 * 通讯联系人

作者简介:梁新红(1971-),女,博士,副教授,研究方向:食品生物技术。

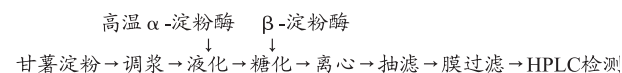
基金项目:河南省科技攻关计划项目(122102110037);国家自然科学基金项目(31171641/C200101);河南省高校科技创新团队支持计划资助(13IRTSTHN006)。

甘薯淀粉 郑州市福源生物科技有限公司; 耐高温 α -淀粉酶、 β -淀粉酶 郑州市福源生物科技有限公司; 麦芽糖、麦芽三糖 sigma 公司, 纯度 $\geq 98\%$; 葡萄糖、蔗糖 分析纯; 实验用水 超纯水; 乙腈 色谱纯。

Waters Breeze 高效液相色谱系统由 Waters 1525 Binary HPLC Pump, Waters 2707 自动进样器, DC-230 柱温箱, Waters 2414 示差检测器及 Bus SAT/N 模块及 Waters Empower 色谱软件组成。

1.2 实验方法

1.2.1 甘薯淀粉酶解工艺流程 以甘薯淀粉为原料, 甘薯 β -淀粉酶水解产物的工艺流程如下:



1.2.2 样品制备

1.2.2.1 甘薯淀粉的酶解处理 将甘薯淀粉加水调成一定浓度的淀粉浆, 按照甘薯淀粉:水为 1:3.5 的比例调节淀粉浆, 加入一定量的耐高温 α -淀粉酶, 90℃ 保温 10min。液化后于 121℃ 高压灭酶 15min, 使耐高温 α -淀粉酶失活。灭酶后的液化液中加入一定量的 β -淀粉酶, 于自动糖化仪中进行 β -淀粉酶解, 酶解条件进行参数优化, 实验设计见表 1。酶解结束, 煮沸 10min, 使 β -淀粉酶完全灭活后, 用蒸馏水定容至原体积。

表 1 β -淀粉酶解条件因素水平表 $L_9(3^4)$

Table 1 The level of factor table for β -amylase $L_9(3^4)$

实验号	因素			
	A β -淀粉酶 (U/g 干淀粉)	B 酶解温度 ($^{\circ}\text{C}$)	C 空列	D 空列
1	100	55		
2	150	60		
3	200	65		

1.2.2.2 样品预处理 酶解液定容后, 在离心机中进行离心。离心条件为: 转速 6000r/min, 温度为 4℃, 时间为 20min。离心后取其上清液进行抽滤, 然后 0.45 μm 膜过滤。滤液按照色谱分析条件进行 HPLC 检测。以峰面积外标法进行定量。

1.2.3 标准溶液配制 分别精确称取 0.2000g 葡萄糖, 蔗糖, 麦芽糖, 麦芽三糖, 用超纯水溶解于 10mL 容量瓶中, 定容后得 4 种糖浓度均为 0.02g/mL 的混合糖标准溶液, 使用时根据需要移取不同的体积进行测定。

1.3 实验方案设计

1.3.1 β -淀粉酶酶解温度对甘薯淀粉水解的影响 依据方法 1.2.2, 高温 α -淀粉酶加入量 5U/g, β -淀粉酶加入量 200U/g 干淀粉, 酶解 30h, 考察酶解温度为 35、40、45、50、55、60、65、70 和 75℃ 时对甘薯淀粉水解的影响。

1.3.2 β -淀粉酶加酶量对甘薯淀粉酶解产物中麦芽糖含量的影响 依据方法 1.2.2, 高温 α -淀粉酶加入量 5U/g, 酶解温度 60℃, 酶解 30h, 考察 β -淀粉酶加入量为 0、50、100、150、200、250、300 和 350U/g 干淀

粉时对甘薯淀粉水解的影响。

1.3.3 β -淀粉酶酶解温度及加酶量对甘薯淀粉水解影响的正交实验 依据方法 1.2.2, 高温 α -淀粉酶加入量 5U/g, 根据表 1 的正交实验设置酶解温度及加酶量的水平, 酶解时间 30min, 以麦芽糖含量为指标, 进行酶解温度和加酶量的正交实验。

1.3.4 β -淀粉酶酶解时间对酶解产物中麦芽糖含量的影响 依据方法 1.2.2 制备甘薯淀粉水解样品, 高温 α -淀粉酶加入量 5U/g, β -淀粉酶加入量 200U/g 干淀粉, 酶解温度 60℃, 考察酶解时间为 0、4、8、12、16、20、24、28 和 32h 时对甘薯淀粉水解产物中麦芽糖含量的影响。

1.4 分析方法

酶解产物测定 (HPLC 方法)

色谱分析条件: 色谱柱为 ZORBAX 碳水化合物分析柱 (4 μm , 4.6mm \times 250mm); 流动相: 乙腈:水 (75:25, V/V); 流速 1.0mL/min; 柱温: 30℃, 示差折光检测器温度: 30℃; 进样量为 10 μL 。

2 结果与分析

2.1 高温 α -淀粉酶加入量对甘薯淀粉水解产物组成的影响

葡萄糖对 *B.subtilis* 产 α -淀粉酶具有阻遏作用, 即使培养基中有诱导底物存在, 葡萄糖含量也会影响 α -淀粉酶的产生。因此培养基中葡萄糖含量过高, 会阻遏 *B.subtilis* 产 α -淀粉酶。高温 α -淀粉酶作用淀粉的产物主要为各种聚合度的糊精及少量的糖, 包括葡萄糖。研究高温 α -淀粉酶加入量对甘薯淀粉降解产物的影响, 选择酶解产物中葡萄糖含量低的作用条件, 意义重大。依据方法 1.2.1 及 1.2.2 制备甘薯淀粉水解样品, 考察高温 α -淀粉酶加入量对甘薯淀粉水解产物组成的影响。结果如表 2。

表 2 高温 α -淀粉酶加入量

对甘薯淀粉水解产物组成的影响 ($n=3$)

Table 2 The effect of the addition of heat resistant α -amylase on hydrolysates from sweet potato starch ($n=3$)

α -淀粉酶 (U/g 干淀粉)	葡萄糖 (%)	麦芽糖 (%)	麦芽三糖 (%)
5	0.55 \pm 0.028	1.72 \pm 0.085	2.53 \pm 0.13
10	0.94 \pm 0.048	2.61 \pm 0.14	7.46 \pm 0.39
15	1.87 \pm 0.11	8.44 \pm 0.43	12.63 \pm 0.56
20	2.65 \pm 0.14	11.18 \pm 0.52	15.45 \pm 0.71

由表 2 可知, 高温 α -淀粉酶加入量对甘薯淀粉水解产物组成有一定的影响。随着 α -淀粉酶加入量的增加, 葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖的含量均有增加。 α -淀粉酶加入量从 5U/g 增加至 20U/g 时, 酶解产物中葡萄糖的含量从 0.55% \pm 0.028% 增加至 2.65% \pm 0.14%, 麦芽糖的含量从 1.72% \pm 0.085% 增加至 11.18% \pm 0.52%, 麦芽三糖的含量从 2.53% \pm 0.13% 增加至 15.45% \pm 0.71%, 表明随着 α -淀粉酶加入量的增加, 甘薯淀粉的酶解程度增加。从分析结果上看, 葡萄糖含量较低, 麦芽糖和麦芽三糖占干基比例较高, 因此, 采用高温 α -淀粉酶甘薯进行液

表4 正交实验结果方差分析

Table 4 Analysis of variance of orthogonal experimental results

变异来源	SS	df	MS	F	F_{α}
A	1316.0052	2	658.0026	175.1387 **	$F_{0.05}(2,18) = 3.55$
B	2555.5919	2	1277.7959	340.1074 **	
C	215.1385	2	107.5693	28.6314 **	$F_{0.01}(2,18) = 6.01$
D	24.9163	2	12.4581	3.3160	
实验误差(e)	67.6267	18	3.7570		

化, α -淀粉酶诱导产物含量较高, 阻遏物产量较低。为尽量减少葡萄糖的阻遏作用, 高温 α -淀粉酶加入量确定为 5U/g。

2.2 β -淀粉酶酶解温度对甘薯淀粉水解的影响

β -淀粉酶酶解产物主要为麦芽糖, 其次是麦芽糊精, 因此, 研究 β -淀粉酶酶解温度对甘薯淀粉水解的影响, 以酶解产物中麦芽糖含量为指标, 考察酶解温度, 对甘薯淀粉水解的影响, 结果如图 1。

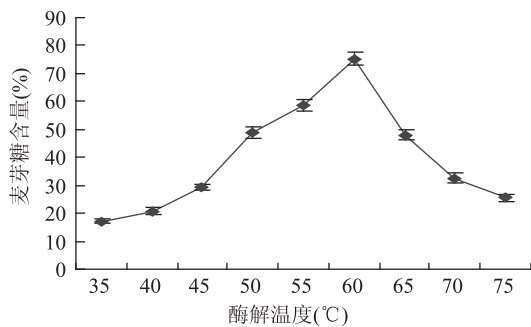
图1 β -淀粉酶酶解温度对甘薯淀粉水解的影响

Fig.1 The effect of the temperature on the level of maltose from sweet potato starch

由图 1 可知, 酶解温度对酶解产物中麦芽糖含量影响较大。随着酶解温度的升高, 麦芽糖含量逐渐增加, 酶解温度达 60℃ 时, 麦芽糖含量达到最大值 75.3% \pm 2.3%; 随着酶解温度的继续升高, 麦芽糖含量迅速下降, 酶解温度升至 75℃ 时, 麦芽糖含量为 25.5% \pm 1.1%。因此 β -淀粉酶最佳酶解温度为 60℃。

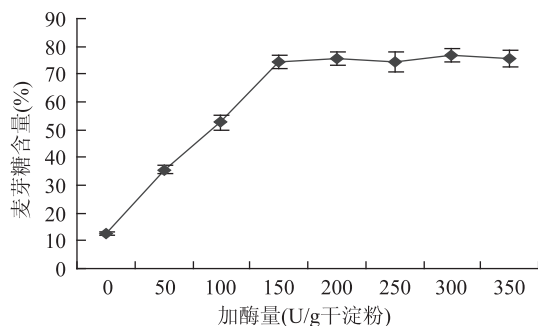
2.3 β -淀粉酶加酶量对甘薯淀粉酶解产物中麦芽糖含量的影响

加酶量对酶解作用影响较大, 考察 β -淀粉酶加入量对甘薯淀粉水解的影响, 结果如图 2。

由图 2 可知, β -淀粉酶加酶量对酶解产物中麦芽糖含量有较大影响。 β -淀粉酶加酶量在 0~150U/g 时, 随着加酶量的增加, 麦芽糖含量从 12.5% \pm 0.6% 迅速增加至 74.4% \pm 2.3%; 随着 β -淀粉酶加酶量的继续增加, 麦芽糖含量增加不明显, 经方差显著性分析, 在 $p < 0.05$ 水平时, 加酶量在 150U/g 至 350U/g 时酶解产物麦芽糖含量没有显著性差异, 因此, 在酶解淀粉时 β -淀粉酶加酶量应不低于 150U/g。

2.4 β -淀粉酶酶解温度及加酶量对甘薯淀粉水解影响的正交实验

β -淀粉酶作用于淀粉及糊精的产物主要为麦芽糖。一般情况下, β -淀粉酶作用的底物为经 α -淀粉

图2 β -淀粉酶加酶量对甘薯淀粉酶解产物中麦芽糖含量的影响Fig.2 The effect of the amounts of β -amylase on the level of maltose from sweet potato starch

酶液化的糊精。以经高温 α -淀粉酶液化的淀粉为底物, 对 β -淀粉酶作用的温度及加酶量进行正交实验, 实验设计见表 1。正交实验结果以酶解产物中麦芽糖含量为指标, 实验结果及极差分析见表 3。

表3 正交实验结果分析

Table 3 Analysis of orthogonal experimental results

实验号	A	B	C	D	麦芽糖含量(%) (n=3)
1	1	1	1	1	43.0 \pm 1.4
2	1	2	2	2	52.6 \pm 1.7
3	1	3	3	3	38.2 \pm 1.3
4	2	1	2	3	50.6 \pm 1.4
5	2	2	3	1	74.0 \pm 1.0
6	2	3	1	2	47.5 \pm 1.4
7	3	1	3	2	58.7 \pm 1.7
8	3	2	1	3	75.8 \pm 1.7
9	3	3	2	1	48.0 \pm 2.0
k_1	44.6	50.8	55.5	54.8	
k_2	57.2	67.3	50.4	52.9	
k_3	60.8	44.6	56.7	54.9	
R	16.2	22.7	6.3	1.9	

由表 3 直观分析可知, β -淀粉酶酶解温度对水解产物影响最大, 其次是 β -淀粉酶加入量, 即影响酶解程度的主要因素为酶解温度, 次要因素为酶加入量。因素最佳组合为 A_3B_2 , 即 β -淀粉酶加入量为 200 U/g 干淀粉, 酶解温度为 60℃, 对正交实验结果进行方差分析, 结果如表 4。

由正交实验结果的方差分析可知, C 列为极显著, 表明 β -淀粉酶加入量和温度有交互作用, 并且交互作用极显著。对麦芽糖含量的影响因素中,

β -淀粉酶加入量和温度为均极显著因素,表明此二因素对酶解产物均有较大影响。

综合单因素及正交分析结果,甘薯淀粉 β -淀粉酶酶解最佳条件为酶加入量为 200U/g 干淀粉,酶解温度为 60℃,此条件下麦芽糖含量为 75.8% ± 1.7%。

2.5 β -淀粉酶酶解时间对酶解产物中麦芽糖含量的影响

β -淀粉酶酶解时间对 β -淀粉酶酶解程度有影响,适时结束酶解过程对节省能源、提高设备利用率等均有重要意义。考察酶解时间对甘薯淀粉水解产物中麦芽糖含量的影响,结果如图 3。

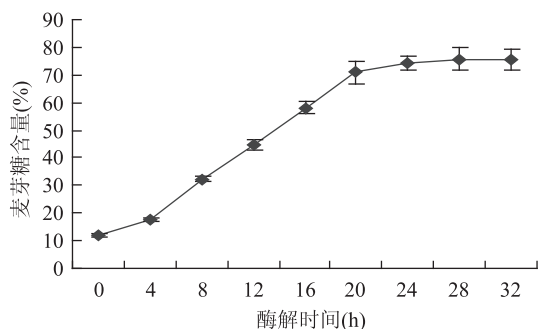


图3 β -淀粉酶酶解时间对酶解产物中麦芽糖含量的影响

Fig.3 The effect of the time on the level of maltose from sweet potato starch

从图 3 可以看出, β -淀粉酶在水解甘薯淀粉时,随着酶解时间的延长,酶解产物中麦芽糖含量逐渐增加。酶解时间从 0 增加至 20h 时,麦芽糖含量迅速增加,麦芽糖含量从 11.9% ± 0.5% 增加至 70.9% ± 4.3%。随着酶解时间的继续增加,至 28h 和 32h 时,麦芽糖含量分别为 75.8% ± 4.3% 和 75.7% ± 3.8%。根据方差显著性分析,酶解时间在 28~32h 时麦芽糖含量没有显著性差异 ($p < 0.05$)。因此,酶解时间在 28h 为佳。

依据方法 1.2.1 和 1.2.2,在最佳酶解条件下,即高温 α -淀粉酶加入量 5U/g,酶解温度 60℃,酶解 28h,对酶解产物进行分析,酶解产物葡萄糖为 0.5%,麦芽糖 75.8%,麦芽三糖 7.5%。甘薯淀粉 β -淀粉酶酶解产物中麦芽糖和麦芽三糖等麦芽糊精含量较高,是最佳的 *B.subtilis* ZJF-1A5 是生产中温 α -淀粉酶的碳源。

3 结论

随着高温 α -淀粉酶加入量的增加,甘薯淀粉的酶解程度增加。酶解产物中葡萄糖的含量较低。麦芽糖和麦芽三糖占干基比例较高。采用高温 α -淀粉酶对甘薯淀粉进行液化,*B.subtilis* 发酵时诱导产物含量较高,阻遏物产量较低。为尽量减少葡萄糖的阻遏作用,高温 α -淀粉酶加入量确定为 5U/g。

通过正交实验可得, β -淀粉酶酶解温度对水解产物影响最大,其次是 β -淀粉酶加入量, β -淀粉酶加入量为 200U/g 干淀粉,酶解温度为 60℃,此条件下麦芽糖含量为 75.8% ± 1.7%。正交实验方差分析表明, β -淀粉酶加入量和温度有交互作用。对麦芽

糖含量的影响因素中, β -淀粉酶加入量和温度均为极显著因素。 β -淀粉酶在水解甘薯淀粉时,随着酶解时间的延长,酶解产物中麦芽糖含量逐渐增加。酶解时间在 28h 最佳。

参考文献

[1] Henkin T M, Grundy F J, Nicholson W L, et al. Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* lacI and galR repressors [J]. *Molecular Microbiology*, 1991, 5(3): 575-584.

[2] Fujita Y. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis* [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2009, 73(2): 245-259.

[3] Liu X, Taber H W. Catabolite regulation of the *Bacillus subtilis* ctaBCDEF gene cluster [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(23): 6154-6163.

[4] Gupta R, Gigras P, Mohapatra H. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective [J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38(11): 1599-1616.

[5] 孙俊良. 淀粉糊精的制备工艺调控及诱导产 α -淀粉酶的研究[D]. 沈阳, 沈阳农业大学, 2009.

[6] Fujita Y. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis* [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2009, 73(2): 245-259.

[7] 李刚, 孙俊良, 葛晓虹, 等. 碳源对枯草芽孢杆菌产 α -淀粉酶的影响[J]. *食品与机械*, 2010, 26(5): 13-15.

[8] 林松毅, 邵淑娟, 赵宇星, 等. 响应面法优化玉米淀粉液化工艺的研究[J]. *食品与机械*, 2009, 25(4): 14-19.

[9] 吕晓燕, 董英. 紫甘薯淀粉酶解工艺条件优化及其喷干粉的制备[J]. *食品与机械*, 2010, 26(3): 124-128.

[10] 叶红玲, 杜先锋. 全酶法制备超高麦芽糖浆工艺[J]. *食品科学*, 2010, 31(20): 15-19.

[11] Fatma K, Dong Y S, Chariles L G. Roles of β -amylase and starch breakdown during temperatures stress [J]. *Physiol plantarum*, 2006, 126: 120-128.

[12] Ristina E G, Elisangela P, Barbosa, et al. Production of yrase by *A sperillus fumigatus* utilizing-glycoside, as ynthetic analogue of maltose assubstrate [J]. *FEMS Microbioloy Letters*, 1998, 167: 139-143.

[13] 贾彦杰, 梁新红, 朱文学. 不同沉淀方法分离甘薯 β -淀粉酶的研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(18): 22-25.

[14] Diaz A, Sieiro C, Villa T G. Production and partial characterization of a β -amylase by *Xan thophyllomyces dendrorhous* [J]. *Lett in Appl Micro*, 2003(36): 203-207.

[15] Kang Y N, Adachi M, Utsumi S. The roles of Glu186 and Glu380 in the catalytic reaction of soybean β -amylase [J]. *Mol Biol*, 2004, 339(5): 1129-1140.

[16] 中华人民共和国国家出入境检验检疫局. GB/T 18932.22-2003 中国标准书号[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.

[17] 郑名敏, 李静威, 荣廷昭等. HPLC 法测定雪莲果在不同储藏条件下糖分组成的变化[J]. *食品科学*, 2009, 30(8): 190-193.