

高效液相色谱法在双酶协同作用酶解淀粉制取 麦芽低聚糖工艺研究中的应用*

吴红京 唐根源 李 昊 李志达

(中国科学院福建物质结构研究所 福州 350002) (福州大学生物与食品科学工程系 福州 350002)

提 要 介绍了高效液相色谱在双酶协同作用酶解制取麦芽低聚糖工艺研究中的应用。以 C_{18} 柱为分离柱, 水作流动相, 利用折光检测器来检测麦芽低聚糖产品中的 7 种糖, 同时评估了补加酶量与麦芽低聚糖中麦芽三糖至六糖含量的关系, 并测定了二次确认实验中麦芽低聚糖产品中各糖的含量。

关键词 高效液相色谱法, 木薯淀粉, α -淀粉酶, 异淀粉酶, 麦芽低聚糖, 协同作用

分类号 O658

1 前言

麦芽低聚糖是以淀粉为原料, 经过酶水解获得主要含麦芽三糖至麦芽六糖($M_3 \sim M_6$)组成的直链低聚糖。它是一种新型的低热值淀粉糖, 人体长期食用低聚糖, 对肠道中产气腐败菌和胡萝卜软腐欧文氏病原菌的增殖有特别的抑制作用, 能净化肠道, 增进健康, 延年益寿。在双酶协同作用酶解制取麦芽低聚糖工艺研究中, 随时了解产品中麦芽三糖至麦芽六糖的含量是关键环节。我们将文献[1]中所介绍的分离测定麦芽低聚糖的方法用于该工艺研究中, 并且根据产品中麦芽三糖至六糖的含量, 调整工艺中 α -淀粉酶和异淀粉酶的补加量范围, 并由此设计最佳双酶协同作用的工艺途径。

2 实验部分

2.1 仪器

LC-4A 高效液相色谱仪, RID-2AS 示差折光检测器, C-R2AX 数据处理机(以上均为日本岛津产品)。

2.2 试剂

见文献[1]。

2.3 色谱条件

示差折光检测器灵敏度: $\times 0.5$; 分离柱: Nucleosi C_{18} (4.6 mm i. d. \times 250 mm, $7 \mu\text{m}$); 流动相: 蒸馏水; 流速: 0.8 mL/min; 实验在室温下进行。

2.4 标准曲线及标准谱图

见文献[1]。

2.5 样品处理

称取淀粉糖化液约 1.5 g, 置于 10 mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 取部分溶液经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 取 $20 \mu\text{L}$ 进样作色谱分析(图 1)。

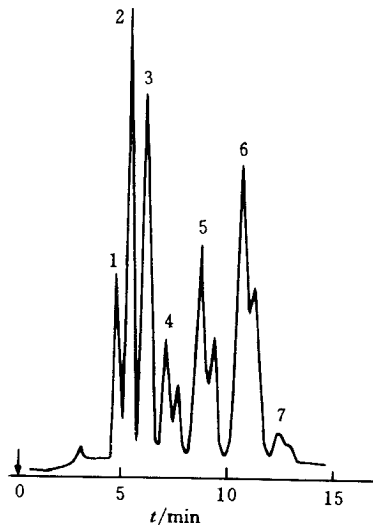


图 1 麦芽低聚糖样品的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the maltooligosaccharides

1. 葡萄糖, 2. 麦芽糖, 3~7. 麦芽三糖至麦芽七糖。

1. glucose, 2. maltose,

3-7. M_3 - M_7 maltooligosaccharides.

3 结果与讨论

本工艺是采用聚砜中空纤维酶膜反应器, 运用 α -淀粉酶和异淀粉酶的协同作用来制取麦芽低聚糖^[2], 因此, 淀粉在糖化过程中, 除了要控制糖化液中的 pH 值以及糖化的时间、温度以外, 酶的催化反

* 本课题获福建省科委重点科研项目基金资助
本文收稿日期: 1997-10-15, 修回日期: 1998-01-05

应还决定了产物的质量。所以,在淀粉进行糖化过程中,如果酶用量不足,直接会影响产品质量,使产品中 $M_3 \sim M_6$ 的质量分数小于 60%,同时 M_7 以上较多,而葡萄糖含量极少。这样,在淀粉糖化过程中及时补加 α -淀粉酶和异淀粉酶是关键的一环。在本文中,我们用 HPLC 分析产品中 $M_3 \sim M_6$ 的质量来确定补加两种酶的量,并进行了一系列的讨论。

3.1 确定 α -淀粉酶补加量范围

取 3 份在 45℃ 经过 1.5 h 糖化后的木薯淀粉糖化液,补加不同比例的 α -淀粉酶,再对继续糖化反应 4 h 后的样品作 HPLC 分析。随后,我们根据测定数据绘制确定补加 α -淀粉酶比例的范围图(图 2)。由图 2 中可见,补加 α -淀粉酶的质量分数分别为 15% 和 20% 效果较好,产品中 $M_3 \sim M_6$ 的质量分数超过 60% 的质量指标要求。

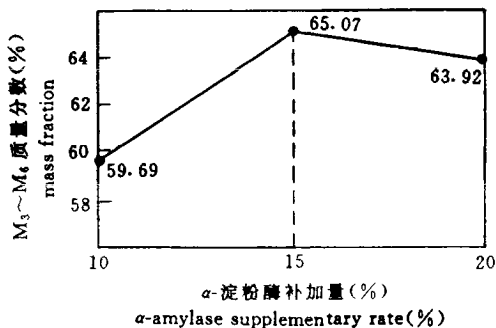


图 2 补加 α -淀粉酶的质量分数范围

Fig. 2 Determination of α -amylase supplementary rate

3.2 确定异淀粉酶补加量范围

分别测定 5 份在 45℃ 经过 1.5 h 糖化、补加不同异淀粉酶后继续糖化 4 h 的木薯淀粉糖化液样品,

并根据测定数据同样绘制确定异淀粉酶补加量范围图(图 3)。从图 3 中可见,补加异淀粉酶质量分数为 15% 时效果最佳, $M_3 \sim M_6$ 的质量分数可达 65%, 但当异淀粉酶质量分数增加到 20% 和 25% 时, $M_3 \sim M_6$ 的质量分数反而呈下降趋势。可见在淀粉糖化工艺中补加过多的异淀粉酶反而使 $M_3 \sim M_6$ 的质量分数降低。

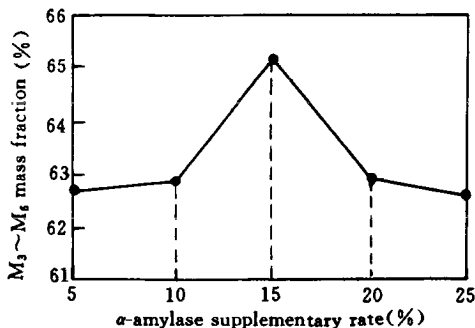


图 3 补加异淀粉酶的质量分数范围

Fig. 3 Determination of isoamylase supplementary rate

在分别测定了补加两种酶与糖化液产品中 $M_3 \sim M_6$ 质量关系以后,我们采用正交实验设计模式,在计算机上进行最佳工艺模拟计算,通过方差分析,来评价各参数指标,并通过酶稳定性动力学研究得出最佳工艺条件为: α -淀粉酶补加 20%, 异淀粉酶补加 5%, 糖化温度为 45℃, 糖化补酶时间为 1.5 h。

3.3 二次确认实验

根据最佳工艺条件,我们又在该工艺条件下进行了二次确认实验,并对所得淀粉糖化液产品进行分析,结果见表 1。表 1 中数据说明所选择的最佳工艺条件是可行的。因本课题产品质量要求 $M_3 \sim M_6$

表 1 二次确认实验分析结果(%)

Table 1 Analytical results of the two confirmation experiments

No.	产物 DE 值* Product DE value	G	M	M_3	M_4	M_5	M_6	M_7	M_{3-6}	G- M_7
1	31.24	3.79	12.85	17.46	9.39	19.53	30.27	3.68	76.65	96.96
2	30.26	3.36	12.60	16.59	8.37	18.74	33.29	3.01	76.99	95.96
平均值 Average	30.75	3.58	12.73	17.03	8.88	19.14	31.77	3.35	76.81	96.45

* DE 值为还原糖含量(DE value stands for the content of reduced sugar)。

的质量分数达到 60% 以上即可,而实际实验结果达到 77% 以上,已远远超过指标。本着经济、高效的原则,改变补加 α -淀粉酶质量分数 20% 为 15% 进行实验,即:补加 α -淀粉酶为 15% (37.5 mg), 异淀粉酶 5% (50.0 mg), 其它条件不变,产品经 HPLC 分析结果见表 2。

表 2 HPLC 分析结果

Table 2 Analytical results from HPLC

补料用量(g) Supplementary weight (g)	反应后补酶时间(h) Amylase supplementary reaction (h)	$M_3 \sim M_6$ (%)	G- M_7 (%)
250	1.5	73.21	93.83
250	1.5	73.42	92.60
250	1.5	73.43	91.69

结论:在较优化工艺条件反应的结果前提下,进行了此经济工艺条件下的实验,1.5 h 补一次双酶(α -淀粉酶 37.5 mg,异淀粉酶 50 mg,连续补料 250 g 淀粉,糖化液 600 mL),得 $M_3 \sim M_6$ 质量分数为 73.21%;第二个 1.5 h 补同样量的双酶, $M_3 \sim M_6$ 质量分数为 73.42%;又 1.5 h 补同样量的双酶, $M_3 \sim M_6$ 质量分数为 73.43%。由此可见, $M_3 \sim M_6$ 的收率比较稳定,并且都达到 70% 以上,超过日本 1983 年报道^[3] $M_3 \sim M_6$ 达 68.8% 的水平,也远远超过本课题

质量指标 10 个百分点以上,实验结果令人满意。

参 考 文 献

- 1 吴红京,唐根源,李志达等. 色谱,1994,12(4):289~290
- 2 李 昊,李志达,郭养浩等. 浙江农业大学学报,1997,23(S):69~73
- 3 李志达,陈剑锋,张蓉真等. 中国粮油学报,1994,9(4):48~54

Application of High Performance Liquid Chromatography to the Study on the Production of Maltooligosaccharide by Synergistic Action of Two-Enzymes

Wu Hongjing and Tang Genyuan

(Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, the Chinese Academy of Sciences, Fuzhou, 350002)

Li Hao and Li Zhida

(Department of Biotechnology and Food Science, Fuzhou University, Fuzhou, 350002)

Abstract This paper describes the application of high performance liquid chromatography to the study on the production of maltooligosaccharide by synergistic action of two-enzymes. Seven sugars in products were separated on a column of Nucleosil C_{18} with water as the mobile phase and determined refractometrically. Meanwhile, for the preparation of maltooligosaccharide, the effect of supplementing rate of the two enzymes on the content of maltooligosaccharide in products is examined in this paper. The optimum technological conditions were obtained by using the orthogonal design and the amount of the two enzymes added was determined. Thus more than 70% of $M_3 \sim M_6$ maltooligosaccharide in product was obtained.

Key words HPLC, cassava starch, α -amylase, isoamylase, maltooligosaccharide, synchronous hydrolysis

《离子对高效液相色谱法》征购

中科院大连化学物理研究所-国家色谱研究分析中心邹汉法教授、张玉奎教授和卢佩章院士合著的《离子对高效液相色谱法》已于 1994 年 10 月由河南科学技术出版社出版发行。

本书共分十二章。第一章介绍了液相色谱法的发展史。第二、三章介绍了液相色谱中的基本参数及选择各种液相色谱分离模式的方法原理。第四~六章介绍了离子对色谱法的保留机理和离子对色谱法分离条件最优化的方法。第七章是常用的离子对色谱检测器检测原理的介绍。第八~十二章是近来离子对色谱法在无机离子的分离分析、离子性手性对映体的分离、生物化学、临床医学和药品以及其它方面的应用举例和综述。

该书定价 15 元,邮费、包装费 5 元,合计 20 元。

欲购者请将款汇至:大连市中山路 161 号 国家色谱研究分析中心 于宋顺收,联系电话:3693411。