

酶法制备直链麦芽寡糖

李晓磊^{1,2}, 李丹², 殷涌光¹

(1. 吉林大学生物与农业工程学院, 长春 130022; 2. 长春大学农产品加工吉林省普通高等学校重点实验室, 长春 130022)

摘要: 为了获得单一聚合度的麦芽寡糖, 以环糊精为原料, 利用环葡聚糖水解酶的单点水解开环反应活性, 在 95 °C、pH 5.5、30 min 的条件下, 生产出高纯度的直链麦芽寡糖; 并以此为基础, 提出了一种以环糊精葡萄糖基转移酶和环葡聚糖水解酶先后降解淀粉, 生产直链麦芽寡糖的新方法。

关键词: 食品加工技术; 淀粉; 麦芽寡糖; 环糊精; 环葡聚糖水解酶

中图分类号: TS23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-5497(2009)06-1559-04

Enzymatic preparation of linear malto oligosaccharides

LI Xiao-lei^{1,2}, LI Dan², YIN Yong-guang¹

(1. College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China; 2. Key Laboratory of Agricultural Products Processing in Jilin Province Universities, Changchun University, Changchun 130022, China)

Abstract: In order to obtain single malto oligosaccharide (maltohexaose, maltoheptaose, or maltooctaose), the ring-opening reactions of α -, β -, γ -cyclodextrin were performed at 95 °C and pH 5.5 for 30 min using cyclomaltodextrinase. And, a novel method for the production of linear malto oligosaccharides from starch, hydrolyzed by cyclodextrin glucanotransferase and cyclomaltodextrinase, was proposed.

Key words: food processing technology; starch; malto oligosaccharides; cyclodextrin; cyclomaltodextrinase

麦芽寡糖 (malto oligosaccharides) 具有很多优良的特性, 已广泛应用于食品业及发酵工业中。由于麦芽寡糖在人体小肠内被水解吸收, 食用麦芽寡糖还能够维持血糖水平, 缓解疲劳等。最近, 国内筛选到可以利用麦芽寡糖合成海藻糖的菌株 D 97^[1]。

目前, 已经在一些微生物中发现能将淀粉转化为麦芽寡糖的酶。但是这些酶的最适温度都很低, 反应速度慢, 而且水解的产物中含有多种不同聚合度的麦芽寡糖^[2-5]。最近, 对嗜热菌

Archaeoglobus fulgidus strain 7324 的淀粉代谢途径进行研究表明^[6]: 嗜热菌能分泌胞外环糊精葡聚糖转移酶 (cyclodextrin glucanotransferase, CGTase) 转化环境中的大分子淀粉为小分子环糊精, 后者经膜转运系统运至胞内后, 被环葡聚糖基水解酶 (cyclomaltodextrinase, CDase) 降解为直链麦芽寡糖后进一步代谢。嗜热菌对淀粉的这种利用方式明显不同于常温菌。后者主要产生 α -淀粉酶和普鲁兰酶, 而这些酶在上述嗜热菌中并没有被检测到。

收稿日期: 2008-09-10.

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金项目; 吉林省科技发展计划项目 (20080253).

作者简介: 李晓磊 (1978-), 女, 博士研究生. 研究方向: 食品生物工程. E-mail: xiaolei97@163.com

通信作者: 殷涌光 (1949-), 男, 教授, 博士生导师. 研究方向: 农产品加工. E-mail: biofood@jlu.edu.cn

本文以环糊精为原料,利用热稳定的来源于嗜热菌体的环葡聚糖水解酶的活性,在高温、短时的体外反应条件下,生产出单一聚合度的麦芽寡糖产品,有望作为一种新型糖源用于食品工业。

1 材料与方 法

1.1 试剂

α -、 β -和 γ -环糊精 (α -、 β -、 γ -CD) 购自美国 Sigma 公司。环葡聚糖水解酶 CDase 来源于 *Hyperthermophiles sp* 菌。

K5F 薄层色谱硅胶板(长 10 cm,厚 0.25 mm)购自英国 Whatman plc;自制二次蒸馏水;其他均为国产分析纯试剂。

1.2 酶活的测定

取浓度 1.0% 的底物 150 μ l 置于 1.5 ml 离心管内,分别加入 120 μ l、pH 5.5 的乙酸-乙酸钠(HAc-NaAc)缓冲溶液振荡混匀,在 95 $^{\circ}$ C 数显干浴器(AccublockTM, digital dry bath, 美国 Labnet International, Inc.)中预热 5 min 后,加入 30 μ l 环葡聚糖水解酶准确反应 10 min,加入 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂 900 μ l 终止反应,振荡混匀后于沸水中煮 5 min,立即于流水下冷却至室温后,在 575 nm 下比色,根据麦芽糖标准曲线计算出产生的还原糖量。单位酶活(1U)定义为 1 min 内产生 1 μ mol 还原糖所需要的酶量^[7]。

1.3 酶促反应条件

1.3.1 多产物形成

取 300 μ l 浓度为 1% 的 γ -环糊精放入 1.5 ml 离心管内,每支小管内加入 pH5.5 的乙酸-乙酸钠(50 mM, HAc-NaAc)缓冲溶液 280 μ l,旋涡振荡混匀,在 95 $^{\circ}$ C 数显干浴器中预热 5 min 后,立即加入 20 μ l(酶活为 4U)环葡聚糖水解酶于 95 $^{\circ}$ C 下反应,于 20 s 和 5、10、20、30、60、150 min 分别取样 20 μ l,立即加入已事先浸在冰水中的 1.5 ml 空离心管中,终止反应;待反应全部完成后于同一硅胶板上点样,进行 TLC 分析。

1.3.2 单产物形成

取 300 μ l 浓度为 1% 的 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精,分别放入 1.5 ml 离心管内,每支小管内加入 pH 5.5 的乙酸-乙酸钠(50 mM, HAc-NaAc)缓冲溶液 240 μ l,旋涡振荡混匀,在 95 $^{\circ}$ C 数显干浴器中预热 5 min 后,立即加入 60 μ l(酶活为 0.15 U)环葡聚糖水解酶于 95 $^{\circ}$ C 下反应,于 30 min 分别取样 50 μ l,立即加入已事先浸在冰水中

的 1.5 ml 空离心管中,终止反应;待反应全部完成后于同一硅胶板上点样,进行 TLC 分析。

1.4 产物检测方法

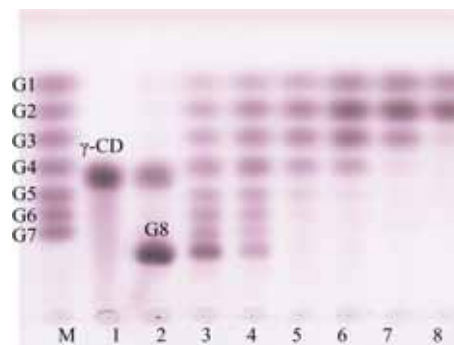
将长 10 cm 薄层色谱(TLC)硅胶板在 110 $^{\circ}$ C 活化 30 min,用移液枪各点样 1 μ l,电风吹干,放入展开剂为异丙醇:乙酸乙酯:水为 3:1:1 的展开缸中展开 2 次,每次均用电风吹干;然后浸于含有 0.3%(质量浓度) N-(1-萘基)乙二胺和 5%(体积分数)硫酸的甲醇溶液中衍生化,再置于 110 $^{\circ}$ C 下显色 10 min。

2 结果与讨论

2.1 环葡聚糖水解酶催化环糊精水解反应的动力学过程

图 1 的结果表明:环葡聚糖水解酶首先催化 γ -环糊精的单个葡萄糖苷键水解而生成麦芽八糖,这种转化过程是相当迅速的。在本研究中,仅 20 s 的时间,4U 的环葡聚糖水解酶就将大部分 γ -环糊精底物转化为单一产物麦芽八糖。而在随后的反应过程中,G8 被继续降解为 7 种更低分子量的麦芽寡糖 G7-G1;经过 2.5 h 反应,最终的产物是麦芽糖和葡萄糖。

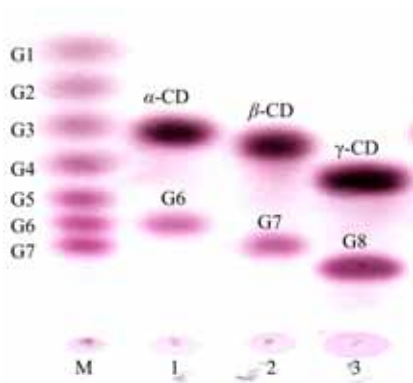
以上的反应结果说明:在底物 γ -环糊精未被完全降解的时候(图 1,带 2),所生成的 G8 也基本不会被水解;而当底物 γ -环糊精被完全降解时(图 1,带 3~8),所生成的 G8 才会被水解。这说明, γ -环糊精较麦芽八糖易被环葡聚糖水解酶所水解。利用环葡聚糖水解酶的这种性质,作者以 α -、 β -和 γ -环糊精为底物,减少了酶加入量,进行了制备高纯度麦芽六糖、麦芽七糖和麦芽八糖的试验。



(M:G1-G7 标准品;1: γ -CD 标准品;2:20s;3:5 min;4:10 min;5:20 min;6:30 min;7:60 min;8:150 min)

图 1 环葡聚糖水解酶在不同时间催化 γ -环糊精水解产物的 TLC 分析

Fig. 1 TLC analysis of γ -CD degrading products by CDase at different time



M: G1~G7 标准品; 1: α -CD 水解 30 min; 2: β -CD 水解 30 min;
3: γ -CD 水解 30 min

图 2 环葡聚糖水解酶催化 α -、 β -和 γ -环糊精水解制备 G6、G7 和 G8 的 TLC 分析

Fig. 2 TLC analysis of G6、G7 and G8 from α -、 β - and γ -CD degrading reactions by CDase

2.2 环葡聚糖水解酶能水解环糊精产生单一产物直链麦芽寡糖

图 2 的结果表明: α -、 β -和 γ -环糊精, 于 95°C 的高温下反应 30 min, 均能被热稳定的环葡聚糖水解酶催化部分水解, 而形成相应的单一产物——直链麦芽寡糖。由于环糊精和麦芽寡糖在理化性质上有很大的差别, 所以很容易采用色谱法将产物和未反应的底物相分离。分离出来的未反应底物可以继续加酶水解生成直链麦芽寡糖。

2.3 环葡聚糖水解酶优先催化环糊精的单点开环反应

对于图 1 和图 2 的结果, 图 3 给出了反应机理。环葡聚糖水解酶首先催化 α -、 β -和 γ -环糊精的开环反应; 而且, 由于这种环葡聚糖水解酶在环糊精底物未被完全降解的时候, 不会水解麦芽寡

图 3 环葡聚糖水解酶催化 α -、 β -和 γ -环糊精水解为麦芽寡糖的反应

Fig. 3 α -、 β - and γ -CD were degraded into malto oligosaccharides by CDase

糖, 所以最初的开环反应只会形成一种直链麦芽寡糖。这种结果表明: 环葡聚糖水解酶在与底物环糊精结合的过程中, 只能随机识别环糊精上的任意一个葡萄糖苷键, 而催化水解开环; 这种反

应, 从本质上来看是一种单点开环反应。

随着上述反应时间的延长, 底物 α -、 β -或 γ -环糊精就会全部发生这种单点开环反应而在反应体系中消失; 这时单点开环反应所形成的麦芽寡糖

G6、G7 或 G8 才会进一步被降解为更低分子量的麦芽寡糖;终产物为麦芽糖和葡萄糖也说明了这两种小分子不是环葡聚糖水解酶的底物。

2.4 以淀粉为原料,经二步酶促反应,生产直链麦芽寡糖的新方法

麦芽寡糖生产的传统工艺是:以淀粉为原料,经过多种酶先后水解,再经过分离、纯化等多步处理;最终得到含有不同聚合度麦芽寡糖的混合物。主要的问题是:工艺复杂、副产物多、产品纯度低。

环葡聚糖水解酶能催化环糊精单点开环反应的结果,为生产单一组分的高纯度麦芽寡糖提供了可能。因此可以采用环糊精葡萄糖基转移酶和环葡聚糖水解酶先后降解淀粉生产直链麦芽寡糖。

3 结 论

(1)热稳定的环葡聚糖水解酶 CDase 能在较高的温度和较短的时间内催化环糊精的单点开环反应,生产出单一聚合度的直链麦芽寡糖;明显区别于以淀粉作为底物、反应温度较低、时间较长、产物为混和物的普通麦芽寡糖形成酶。

(2)热稳定的环葡聚糖水解酶 CDase 在将底物环糊精全部转化为单一聚合度的直链麦芽寡糖后,会继续催化高直链的麦芽寡糖水解为各种低直链的麦芽寡糖,最终的水解产物为麦芽糖和葡萄糖;反应体系所加入环葡聚糖水解酶 CDase 的活力和反应时间决定环糊精水解为单一产物还是多产物。

(3)以淀粉为底物,经环糊精葡萄糖基转移酶 CGTase 催化形成环糊精,再利用环葡聚糖水解酶 CDase 的单点开环水解活性降解环糊精,从而可以生产出高纯度、单一聚合度的直链麦芽寡糖。

参考文献:

- [1] 荣绍丰,徐骥,张海平,等.一株转化淀粉或麦芽寡糖生成海藻糖的菌株 D-97 鉴定[J].微生物学通报,2003,30(2):57-61.
- Rong Shao-feng,Xu Ji,Zhang Hai-ping,et al. Identification of bacterium D-97 producing trehalose from starch or maltooligosacchrides[J]. Microbiology, 2003, 30(2): 57-61.
- [2] Champreda V,Kanokratana P,Sriprang R,et al. Purification,biochemical characterization,and gene cloning of a new extracellular thermotolerant and glucose tolerant maltooligosaccharide-forming alpha-amylase from an endophytic ascomycete *Fusicoccum* sp. BCC4124[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2007,71(8):2010-2020.
- [3] Dey G,Palit S,Banerjee R,et al. Purification and characterization of maltooligosaccharide-forming amylase from *Bacillus circulans* GRS 313[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2002, 28(4):193-200.
- [4] Doukyu N,Yamagishi W,Kuwahara H,et al. Purification and characterization of a maltooligosaccharide-forming amylase that improves product selectivity in water-miscible organic solvents, from dimethylsulfoxide-tolerant *Brachy bacterium* sp. strain LB25[J]. Extremophiles,2007,11(6):781-788.
- [5] Nagarajan D R,Rajagopalan G,Krishnan C. Purification and characterization of a maltooligosaccharide-forming alpha-amylase from a new *Bacillus subtilis* KCC103 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 73(3):591-597.
- [6] Labes A,Schönheit P. Unusual starch degradation pathway via cyclodextrins in the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* Strain 7324 [J]. J Bacteriol, 2007, 189(24): 8901-8913.
- [7] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination reducing sugar[J]. Anal Chem, 1959, 31:426-428.
- [1] 荣绍丰,徐骥,张海平,等.一株转化淀粉或麦芽寡糖