

## 产碱菌麦芽四糖淀粉酶水解淀粉的特性\*

朱 静 严自正 周 健 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 产碱菌麦芽四糖淀粉酶水解不同来源淀粉的产物组成有差异:  $G_4$  占 81.5%~98.8%,  $G_3$  占 0%~9.6%,  $G_2$  占 0%~5.9%。不同淀粉的水解速度在  $4170\sim 9036\text{mgGlc}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  之间。对可溶性淀粉的水解产物为  $\alpha$ -型。麦芽四糖淀粉酶能被小麦、玉米及马铃薯的生淀粉吸附,其吸附率分别为 60.2%、50.0%及 52.2%,相对水解率分别为 4.5%、2.7%及 0%,水解生淀粉的主要产物为  $G_4$ 。

**关键词** 产碱菌, 麦芽四糖淀粉酶, 糖苷酶, 淀粉

1971 年 Robyt 和 Ackerman<sup>[1]</sup>首次报道了由斯氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 中得到麦芽四糖淀粉酶 (1,4- $\alpha$ -D-glucan maltotetraohydrolase EC 3.2.1.60), 该酶作用于淀粉, 其主要产物为麦芽四糖。此糖具有低甜度、低吸湿性及低渗透压等特点, 有广阔的应用前景。目前日本已有用斯氏假单胞菌麦芽四糖淀粉酶制造麦芽四糖的专利<sup>[2]</sup>, 日本市场上已有该糖产品。本实验室曾报道过由产碱菌 (*Alcaligenes sp.*) 培养液中得到该酶, 并进行了分离纯化<sup>[3,4]</sup>。本文从应用角度出发, 研究了该酶对各种淀粉的水解特性, 为其工业化提供了有用参数。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

凝胶电泳均一的麦芽四糖淀粉酶, 制备方法见文献[4]。支链淀粉、玉米淀粉及小麦淀粉 (Sigma), 直链淀粉 (Barber), 马铃薯淀粉 (E. Merck), 可溶性淀粉 (中国医药公司), 糊精 (中国医药工业公司), 糖原 (第二军医大学朝辉药厂), 麦芽寡糖 (无锡轻工业学院及宜兴米厂), 721 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂), 硅胶板 (中国军事医学科学院), 1000 型离子色谱仪 (Dinex), 241ME 旋光仪 (Perrin-Elmer)。

### 1.2 方法

**1.2.1 酶活力测定:** 以 1.0% 可溶性淀粉 (文中除指出为生淀粉外, 其余均为加热煮沸的糊化淀粉) 为底物, pH6.6 的 0.05mol/L 磷酸缓冲液、50℃ 反应 10min, 详细方法及活力定义见文献[4]

\* 中国科学院及“八五”攻关资助项目。

本文采用缩写附号:  $G_5$ , 麦芽五糖 (Maltopentaose);  $G_4$ , 麦芽四糖 (Maltotetraose);  $G_3$ , 麦芽三糖 (Maltotriose);  $G_2$ , 麦芽糖 (Maltose); Glc, 葡萄糖 (Glucose)。

本文于 1995 年 3 月 17 日收到。

1.2.2 糖的薄层层析<sup>[5]</sup>:展开剂:正丁醇:吡啶:水=6:4:3(体积比),显色剂:2%二苯胺丙酮溶液:2%苯胺丙酮溶液:85%磷酸=5:5:1,80℃显色10min。

1.2.3 产物组成测定:称取50mg淀粉,溶于10ml pH6.6的0.025mol/L磷酸缓冲液中,加入0.2ml酶液(120),50℃反应,分别于3.5h和24h取样1ml,100℃加热10min终止反应,用离子色谱仪测定产物的组成。

1.2.4 旋光度的测定:钠灯,波长589.3nm,1ml的管子。

1.2.5 生淀粉吸附率(AR)及相对水解率(RDA)<sup>[6]</sup>的测定:AR:称取1g生淀粉,加入2.5ml pH6.6,0.1mol/L的磷酸缓冲液,混匀后置于4℃下平衡10min,加入适当稀释的酶液2.5ml(100U),混匀后于4℃下静止吸附15min,立即离心后测定上清液中残留的淀粉酶活力,AR由下述公式算出:AR% =  $\{([A]-[R])/[A]\} \times 100$  此处[A]为原酶液活力,[B]为吸附后上清液酶活力。RDA:用pH6.6,0.05mol/L磷酸缓冲液配成1.0%的生淀粉10ml,加入适当稀释的酶液0.2ml(20U),50℃振荡反应30min,加碱1ml终止反应,离心取上清液,用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定还原糖<sup>[6]</sup>,与同样酶量水解同种糊化淀粉的活力相比,求得RDA。RDA% =  $A/B \times 100$  式中A为水解生淀粉的活力;B为水解糊化淀粉的活力。

## 2 结果和讨论

### 2.1 各种淀粉的水解速度

配制0.1%的各种淀粉,加酶后于50℃反应5min,用DNS法测定生成的还原糖量(用葡萄糖作标准曲线),根据加酶量计算出各种淀粉的水解速度,见表1。一般水解淀粉的速度在6935~9036mgGlc·h<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>之间,直链淀粉与糖原、糊精的速度则要低些,在4170~5035mgGlc·h<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>之间。与本实验室报道的已工业化生产的黑曲霉突变株糖化酶相比(该酶对各种淀粉的水解速度在942~1161.7mgGlc·h<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>之间)<sup>[7]</sup>,麦芽四糖淀粉酶水解淀粉的速度要快些,这对工业化生产是十分有用的。

### 2.2 不同淀粉的水解曲线

淀粉浓度为0.25%,加酶液后于50℃反应,不同时间取样,用DNS法测定G<sub>4</sub>含量;另以2mol/L盐酸水解淀粉,用DNS法测定Glc总量,换算成G<sub>4</sub>总量,以此为100%,求得不同时间淀粉的水解程度。酶对各种淀粉的水解曲线见图1。由于产碱菌麦芽四糖

表1 不同淀粉的水解速度(淀粉浓度0.1%)

Table 1 Hydrolysis of various starch

淀粉种类 Kinds of starch	水解速度 Hydrolysis velocity /mgGlc·h <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup>	淀粉种类 Kinds of starch	水解速度 Hydrolysis velocity /mgGlc·h <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup>
直链淀粉 Amylose	5035.3	糯米淀粉 Glutinous rice starch	8495.1
可溶性淀粉 Soluble starch	7722.8	支链淀粉 Amylopectin	6935.1
玉米淀粉 Corn starch	9035.7	糖原 Glycogen	4286.1
马铃薯淀粉 Potato starch	8881.2	糊精 Dextrin	4170.3

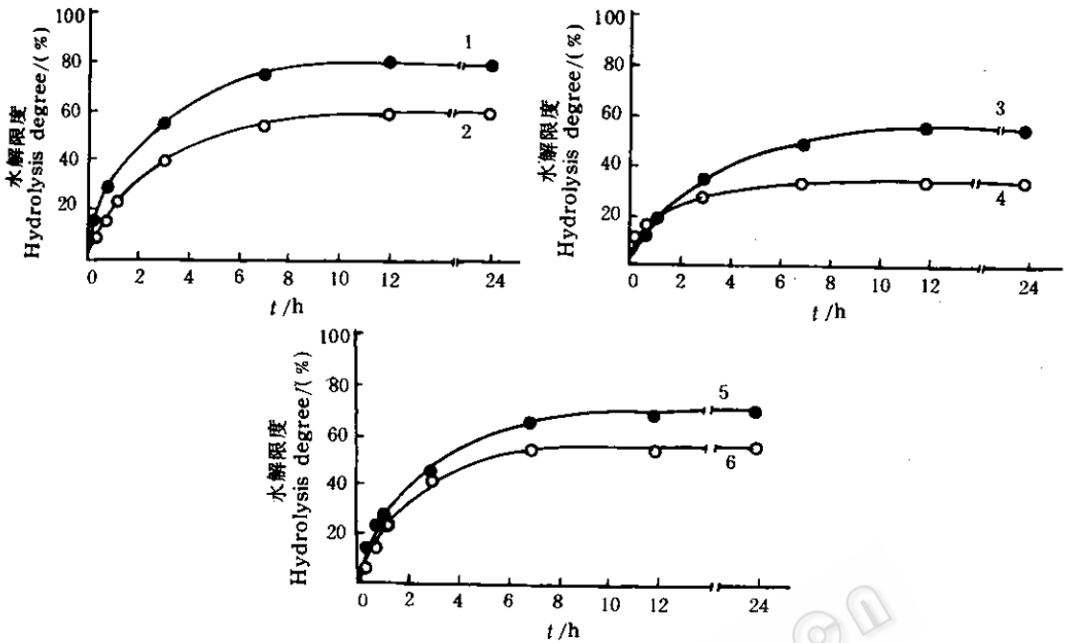


图1 麦芽四糖淀粉酶对各种淀粉的水解曲线

Fig.1 The hydrolysis curve of maltotetraose-forming amylase to different starch

- 1. 可溶性淀粉 Soluble starch; 2. 玉米淀粉 Corn starch; 3. 马铃薯淀粉 Potato starch; 4. 糖原 Glycogen; 5. 糯米淀粉 Glutinous rice starch; 6. 小麦淀粉 Wheat starch.

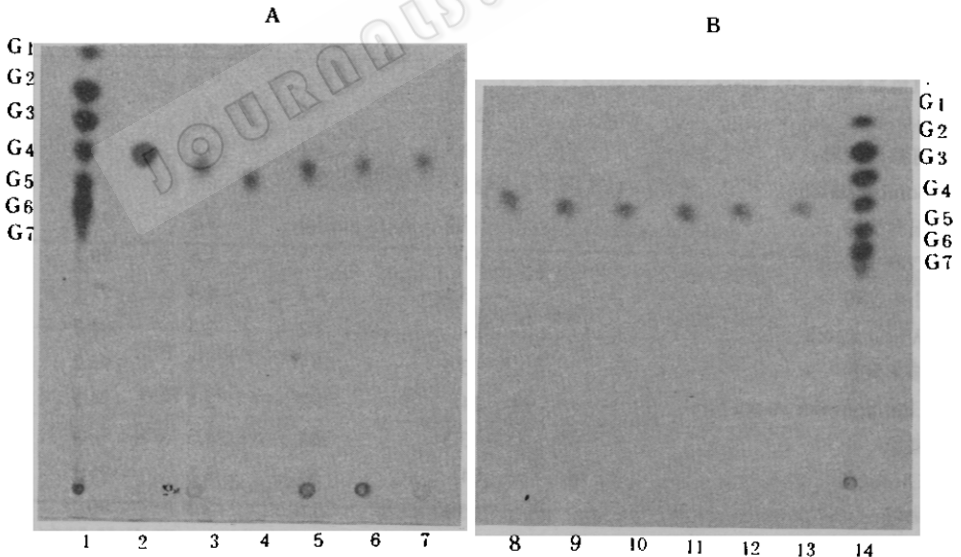


图2 麦芽四糖淀粉酶水解不同淀粉的薄层图

Fig.2 Thin-layer chromatogram of various starch after hydrolysis by maltotetraose-forming amylase

- 1. 14. 麦芽寡糖 Maltooligosaccharide; 2. 麦芽四糖 G4; 3. 可溶性淀粉 Soluble starch; 4. 直链淀粉 Amylose; 5. 支链淀粉 Amylopectin; 6. 糖原 Glycogen; 7. 糊精 Dextrin; 8. 小麦淀粉 Wheat starch; 9. 绿豆淀粉 Mung bean starch; 10. 马铃薯淀粉 Potato starch; 11. 玉米淀粉 Corn starch; 12. 芭蕉粉 Banana powder; 13. 树皮粉 Sogou starch.

淀粉酶只能水解  $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷键<sup>[8]</sup>,因此水解淀粉达到一定程度后便停止作用,剩下极限糊精;而糖化酶除能水解  $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷键外,还可微弱地水解  $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷键,因此延长水解时间,即能 100% 水解淀粉<sup>[7]</sup>。

### 2.3 各种淀粉的水解终产物

为了解麦芽四糖淀粉酶对各种淀粉水解后的产物情况,不仅采用了各种来源的淀粉,还用了野生植物粗粉,如芭蕉粉等。将各种淀粉配成 0.5% 的浓度,加酶后水解 3h, 100°C 终止反应,然后进行薄层层析以鉴定其产物,用麦芽寡糖和  $G_4$  作对照,结果表明,在层析板上水解产物主要为  $G_4$ ,还有  $G_3$  和  $G_2$  痕迹;在起点,除直链淀粉外,其它淀粉均有残余斑点(图 2),这与前面水解曲线结果是一致的。这说明产碱菌产生的麦芽四糖淀粉酶可以水解广泛的淀粉原料及植物粗粉,使得  $G_4$  将来工业化不受原料和地区的限制。

### 2.4 各种淀粉的水解产物组成

由层析结果可知,产物除  $G_4$  外,还有  $G_3$  及  $G_2$ ,进一步用离子色谱仪测定产物的组成比。采用了 7 种淀粉,2 种水解时间,结果表明,水解 3.5h 和 24h 的结果相近。 $G_4$  占产物的 80% 以上,最高可达 98%,此外还有少量的  $G_3$  和  $G_2$ ;在可溶性淀粉反应液中还有  $G_5$  出现(表 2)。

表 2 不同淀粉的水解产物组成

Table 2 Digested products from various starch

淀粉 Starch	作用时间 <i>t</i> / h	产物组成 Product composition / (%)			
		$G_2$	$G_3$	$G_4$	$G_5$
直链淀粉	3.5	0	0	98.8	
Amylose	24	0	9.6	89.5	
可溶性淀粉	3.5	4.4	6.8	81.5	6.3
Soluble starch	24	4.6	6.9	82.5	5.2
玉米淀粉	3.5	2.3	4.2	93.3	
Corn starch	24	1.3	1.8	96.3	
小麦淀粉	3.5	4.3	4.4	91.1	
Wheat starch	24	3.2	2.3	94.3	
糯米淀粉	3.5	3.1	1.5	95.2	
Glutinous rice starch	24	3.7	2.1	94.2	
糖原	3.5	2.1	1.3	96.4	
Glycogen	24	2.1	1.6	96.1	
糊精	3.5	5.6	3.3	90.7	
Dextrin	24	5.9	3.9	90.4	

### 2.5 水解产物的构型

用 pH6.6、0.1mol/L 的磷酸缓冲液配制可溶性淀粉,使其浓度为 2%。在 10ml 淀粉溶液中加入 2ml 酶液(约 30 U),于 16~18°C 反应,测其旋光度。等旋光度趋于稳定时,加入 0.1ml 0.5% 的  $HgCl_2$  终止反应,立即再测其旋光度,结果见图 3。反应终止后旋光度明显下降,表明产碱菌麦芽四糖淀粉酶对淀粉的水解产物为  $\alpha$ -型。这与文献[9]中报

道的假单胞菌麦芽四糖淀粉酶的产物构型是相同的,与 $\alpha$ -淀粉酶也相同,而与同属外切型酶的糖化酶、 $\beta$ -淀粉酶的产物构型不同<sup>[7]</sup>。

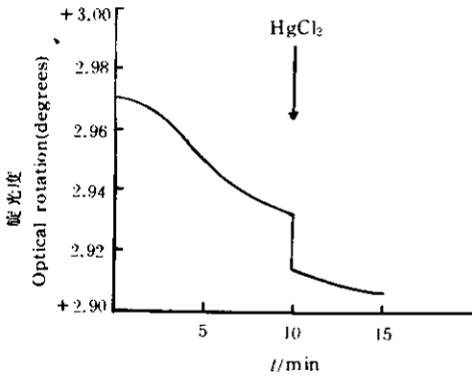


图3 麦芽四糖淀粉酶水解产物的旋光度变化

Fig.3 Mutarotation of product hydrolyzed by maltotetraose-forming amylase

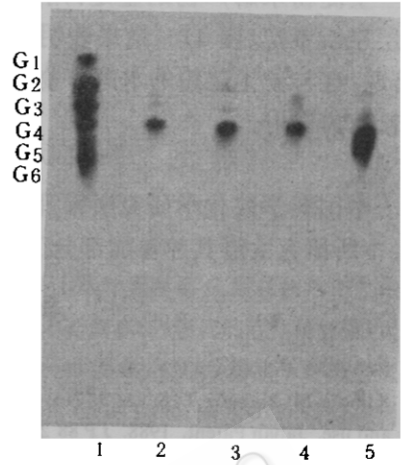


图4 麦芽四糖淀粉酶水解生淀粉的薄层层析图

Fig.4 Thin-layer chromatogram of hydrolysates from raw-starch with maltotetraose-forming amylase

1. 麦芽寡糖 Maltooligosaccharide; 2. 小麦淀粉(粗酶) Wheat starch (crude enzyme); 3. 小麦淀粉(纯酶) Wheat starch (pure enzyme); 4. 玉米淀粉(粗酶) Corn starch (crude enzyme); 5. 玉米淀粉(纯酶) Corn starch (pure enzyme).

表3 麦芽四糖淀粉酶的AR和RDA(%)

Table 3 AR and RDA of maltotetraose-forming amylase

		小麦淀粉 Wheat starch	玉米淀粉 Corn starch	马铃薯淀粉 Potato starch
AR	粗酶 Crude enzyme	63	54.3	52.6
	纯酶 Pure enzyme	60.2	50	52.2
RDA	粗酶 Crude enzyme	5.6	3.2	0
	纯酶 Pure enzyme	4.5	2.7	0

## 2.6 对生淀粉的作用

**2.6.1 生淀粉吸附及水解:**按方法所述,分别测定了粗酶(发酵液)和纯酶(凝胶电泳均一)的AR及RDA,结果(表3)表明,粗酶和纯酶能被生小麦淀粉和生玉米淀粉吸附并能将其水解;能被生马铃薯淀粉吸附但不能将其水解。粗酶的AR及RDA均略高于纯酶。关于麦芽四糖淀粉酶能水解生淀粉未见文献报道过,仅有一篇描述该酶具有两型的文章认为其中一型能被生淀粉吸附<sup>[10]</sup>。产碱菌麦芽四糖淀粉酶对生淀粉的吸附及水解结果与黑曲霉突变株糖化酶<sup>[7]</sup>十分相似,既能被生小麦淀粉和生玉米淀粉吸附,也能水解

生小麦淀粉和生玉米淀粉;对生淀粉的吸附率,麦芽四糖淀粉酶要比糖化酶高,对生淀粉的水解率则二者相近。

**2.6.2 生淀粉水解产物的鉴定:**用麦芽四糖淀粉酶水解生小麦淀粉与生玉米淀粉,产物用薄层层析鉴定(图4)。结果表明,其主要产物为 $G_4$ ,除此之外,还有少量的 $Glc$ 、 $G_2$ 和 $G_3$ 出现,这与糊化淀粉的水解产物(图2,表2)是一致的,说明水解生淀粉确实是麦芽四糖淀粉酶的作用。

**致谢** 中国科学院化学研究所常理文教授、腰锐锋先生协助用离子色谱测定酶水解产物组成,本所研究生潘其林参加部分工作,特此致谢。

### 参 考 文 献

- [1] Robyt J F, Ackerman R J. *Arch Biochem Biophys*, 1971, **145**: 105~141.
- [2] Kubota M, Nakada T, Sakai S. Novel maltotetraose-producing amylase and its fermentative manufacture and use. Japan Patent. 1988. J P 88 240 784.
- [3] 严自正,余晓红,李梅,等. 生物工程学报, 1992, **8**: 288~293.
- [4] 余晓红,严自正,李梅,等. 微生物学报, 1993, **33**(5): 339~346.
- [5] 戈苏国. 中性糖的测定. 见:张惟杰主编. 复合多糖生化研究技术. 上海:上海科学技术出版社, 1987. 1~2.
- [6] 管汉成,严自正,张树政. 生物化学与生物物理学报, 1993, **25**(5): 453~460.
- [7] 管汉成,严自正,张树政. 微生物学报, 1994, **34**(1): 20~28.
- [8] 朱静,周健,严自正,等. 生物化学与生物物理学报, 1995, **27**(3): 301~306.
- [9] Kobayashi S, Okemoto H, Hara K. *Denpun Kagaku*, 1991, **38**(1): 27~36.
- [10] Nakada T, Kubota M, Sakai S. *Agr Biol Chem*, 1990, **54**(3): 737~743.

## STARCH-DIGESTING PATTERNS OF MALTOTETRAOSE-FORMING AMYLASE FROM *ALCALIGENES* SP.

Zhu Jing Yan Zizheng Zhou Jian Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** When starch from different sources were treated with maltotetraose-forming amylase from *Alcaligenes* sp., their product compositions were different:  $G_4$  81.5%~98.8%,  $G_3$  0%~9.6% and  $G_2$  0%~5.9%. Their hydrolysis velocities were about 4170~9036 mgGlc · h<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup>. The product from soluble starch was  $\alpha$ -maltotetraose. The amylase can be adsorbed on raw-starch from wheat, corn, and potato with adsorption rates of 60.2%, 50% and 52.2% and digestion rates of 4.5%, 2.7% and 0%, respectively. The main product from raw-starch was  $G_4$ .

**Key words** *Alcaligenes* sp., Maltotetraose-forming amylase, Glycosidase, Starch