

文章编号: 1009-038X(2004)04-0090-04

复合酶中糖化酶活力的测定

郑曼新

(诺维信中国投资有限公司 研发中心, 北京 100085)

摘要: 复合糖化酶的酶活力检测是主要的质量控制指标, 只有选用合理的糖化酶活力检测方法, 才能真实反映出复合酶中糖化酶活力的高低. 为避免因协同作用而产生的复合酶中其他酶制剂对糖化酶活力检测的干扰, 作者总结了以往的研究成果, 结合4种不同酶制剂的作用机理, 最终否定了常用的淀粉底物法, 确定了麦芽糖底物法为首选方法.

关键词: 糖化酶; 复合酶; 酶活力; 淀粉

中图分类号: TQ 925

文献标识码: A

Determination of Glucoamylase Activity in Blending Enzyme

ZHENG Man-xin

(Novozymes China, R&D Center, Beijing 100085, China)

Abstract: As a food additive, blended glucoamylase activity is the major quality control criteria. With a suitable activity test method, the real glucoamylase activity in the blending product can be detected from synergistic effect be eliminated. In this article, the experimental results were summarized together with four kinds of enzyme acting mechanism. The results identified maltose as the enzyme analysis substrate instead of starch.

Key words: glucoamylase; blending enzyme; enzyme activity; starch

α -1, 4-葡萄糖淀粉酶又名糖化酶, 广泛应用于淀粉糖、食用酒精、味精、柠檬酸、啤酒、果汁等食品制造业中. 随着生物技术的不断发展, 除了单一糖化酶产品, 又出现很多将糖化酶与其他品种酶制剂混合的复合型酶制剂. 这种复合型酶制剂已经充分表现出其独到的优势. 例如糖化酶与普鲁兰酶混合, 可以最大限度地分解淀粉中的直链和支链淀粉, 获得最大的葡萄糖收率并缩短糖化时间, 减少葡萄糖复合反应的发生. 另外, 在某些糖化酶产品中还存在或多或少的副酶活性, 如芽孢杆菌中温淀粉酶、真菌麦芽糖淀粉酶等, 这些副酶的存在都会对糖化酶的应用效果产生影响.

糖化酶作为具有专一活性的酶, 其应用效果主要是通过酶活力的高低来评估, 糖化酶活力的检测, 就成为评估样品中糖化酶真实含量的主要方法, 而复合酶中普鲁兰酶或其他副酶的存在会对复合酶中真实糖化酶含量的检测产生一定的影响.

目前检测糖化酶活力最普遍的方法是用淀粉作底物, 通过测定被酶分解产生葡萄糖的含量来定量分析糖化酶的活力. 但作为底物的淀粉同样能被其他类型酶制剂所分解, 如复合糖化酶中的普鲁兰酶、芽孢杆菌中温淀粉酶、真菌麦芽糖淀粉酶等.

另外, 还有一种测定糖化酶活力的方法, 是用麦芽糖作底物, 通过测定被酶分解产生葡萄糖含量

收稿日期: 2003-12-24; 修回日期: 2004-01-13.

作者简介: 郑曼新(1974-), 女, 北京人, 助理研究员.

万方数据

来测定糖化酶活力的方法. 相比淀粉底物方法而言, 麦芽糖只能被糖化酶专一分解, 其他3种酶制剂不能对其产生影响.

针对复合酶中糖化酶活力检测方法, 作者对上述两种不同的方法进行了比较和研究, 并确定其中的麦芽糖底物法为推荐方法.

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

淀粉葡萄糖苷酶, 糖化酶, 真菌麦芽糖淀粉酶, 芽孢杆菌中温淀粉酶, 普鲁兰酶: 诺维信公司产品; 可溶性淀粉: 浙江湖州食品化工联合公司产品; 一水麦芽糖: Sigma 公司产品; 葡萄糖脱氢酶试剂 (GlucDH-R) 默克公司产品; 碘化钾, 碘, 乙酸钠等试剂均为分析纯.

1.2 主要仪器

自动分析仪、分光光度计、恒温水浴锅、秒表、比色管、移液管、滴定管、加样器、计时器.

1.3 试验方法

1.3.1 用淀粉底物法测定糖化酶活力

1) 方法原理: 糖化酶有催化淀粉水解的作用, 能从淀粉分子非还原性末端开始, 分解 α -1,4-葡萄

糖苷键生成葡萄糖. 葡萄糖分子中含有醛基, 能被次碘酸钠氧化, 过量的次碘酸钠酸化后析出碘, 再用硫代硫酸钠标准溶液滴定, 计算出酶活力.

2) 酶活力定义: 1 g 固体酶粉(或 1 mL 液体酶)于 40 °C、pH 4.6 的条件下, 1 h 分解可溶性淀粉, 产生 1 mg 葡萄糖, 即为一个酶活力单位, 以 u/g (u/mL) 表示.

3) 方法误差: 低于 2%.

1.3.2 用麦芽糖底物法测定糖化酶活力 采用诺维信公司糖化酶活力测定方法.

1) 方法原理: α -1,4-葡萄糖淀粉酶(即糖化酶)水解麦芽糖生成 D-葡萄糖. 生成的葡萄糖可通过与葡萄糖脱氢酶反应而测得, 结果见图 1.

葡萄糖脱氢酶 (GlucDH) 试剂中加入变构酶可将 α -D-葡萄糖转化成 β -D-葡萄糖. 在 GlucDH 的作用下 β -D-葡萄糖与 NAD(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 发生反应生成 NADH, 后者即等于葡萄糖初始浓度, 可用于分光光度法在 340 nm 测定其数值.

2) 酶活力定义: AMG 单位(1 AGU) 即标准条件下每分钟裂解 1 μ mol 麦芽糖所需酶量.

3) 标准条件: 底物: 麦芽糖 20 g/L, pH 4.30, 反应温度 37 °C, 反应时间 30 min.

4) 方法误差: 低于 2%.

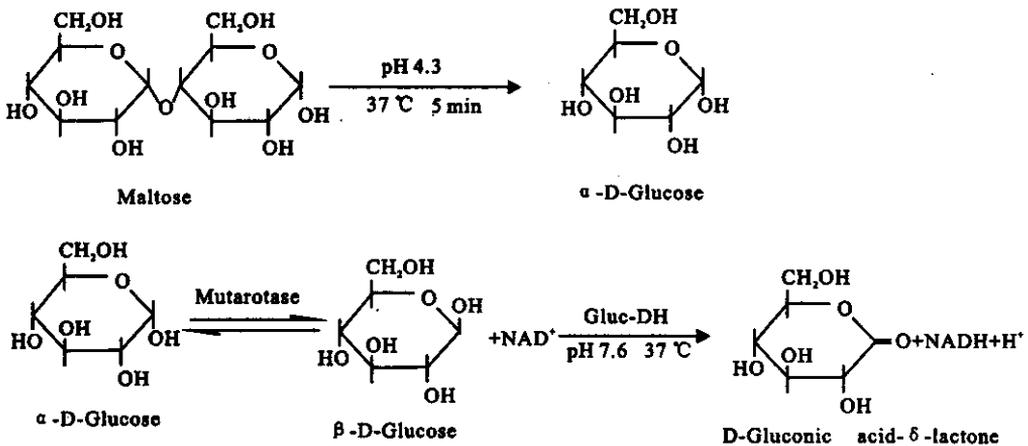


图 1 麦芽糖底物法的测定原理

Fig. 1 Test principle of maltose substrate method

2 结果与讨论

2.1 两种活力方法检测复合酶中糖化酶真实活力的实验结果

表 1 为糖化酶分别与 3 种不同的酶制剂复合时, 淀粉底物法与麦芽糖底物法测试糖化酶活力的实验结果. 表 1 数据: S2 为糖化酶与芽孢杆菌中温淀

粉酶复合酶; S3, S4 为糖化酶与真菌麦芽糖淀粉酶复合酶; S5, S6 为糖化酶与普鲁兰酶复合酶; Dextrozyme E 为诺维信公司复合酶.

2.2 对两种测定方法实验结果的评估

综合以上酶活力检测结果, 可以看出: 对以上 4 种复合酶, 麦芽糖底物法都能给出准确无误的真实的糖化酶活力结果, 而淀粉底物法测定的结果偏差很大, 最高达到 38%. 这说明副酶与糖化酶发生协

同作用,副酶的存在影响了葡萄糖的生成,从而得出错误的糖化酶活力.在淀粉底物法测定中,复合酶干扰严重程度的排序为:S3,S4>S1,S2>S5,S6.从淀粉底物法检测结果中还能看到,对于糖化酶与真菌麦芽糖淀粉酶或普鲁兰酶混合时,副酶含量过多会减少反应生成的葡萄糖;相反,副酶含量较少会增加反应生成的葡萄糖,从而产生糖化酶真实含量的结果偏差.淀粉底物法测定糖化酶活力的局限性由此而暴露出来.

表1 糖化酶活力检测结果

Tab.1 Glucoamylase activity result on starch substrate

测定方法	样品	复合酶中真实的糖化酶活力/(u/mL)	复合酶中检测出的糖化酶活力/(u/mL)	偏差/%
淀粉底物法	S1	22 400	24 764	11
	S2	44 799	50 450	13
	S3	22 400	13 970	-38
	S4	44 799	55 211	+23
	S5	22 400	21 052	-6
	S6	44 799	46 528	4
Dextrozyme E		46 276	50 607	9
麦芽糖底物法	S1	73	72	-1
	S2	145	150	3
	S3	73	73	0
	S4	145	146	0
	S5	73	72	-1
	S6	145	147	1
Dextrozyme E		185	182	2

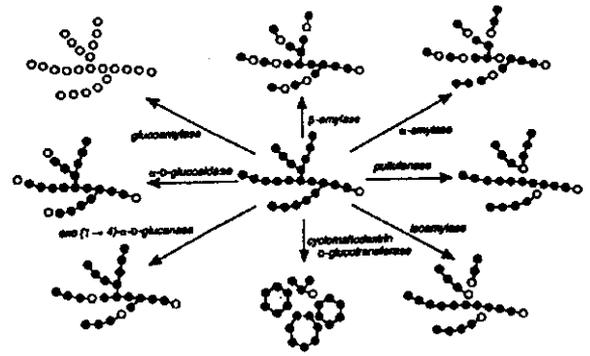
注:采用诺维信公司的Dextrozyme E复合糖化酶产品做为实例进行淀粉底物法与麦芽糖底物法比较时,前者的糖化酶活力检测偏差为9%,而后者只有2%.所以对于该产品的糖化酶活力检测应采用麦芽糖底物法,而不能用淀粉底物法.

2.3 各种酶制剂的水解方式

各种酶制剂对淀粉底物分解的机理与区别见图2.

2.3.1 α -1,4-葡萄糖淀粉酶(又名糖化酶)的水解方式 α -1,4-葡萄糖淀粉酶是一种 α -1,4-D-外切淀粉酶,学名为葡聚糖葡萄糖水解酶.它从非还原性糊精末端和低聚糖链末端分别将一个又一个的葡萄糖分子释放.它不仅能水解淀粉分子中的 α -1,4键,而且还能水解 α -1,6键和 α -1,3键,产生 α -葡萄糖,只是这3种键的水解速度不同,结果见表2.而糖化酶分解底物葡聚糖链的速度与其底物相对分子质量呈反比,即底物分子愈大而水解速度愈

慢,见表3.



α -amylase:芽孢杆菌中温淀粉酶;glucoamylase: α -1,4-葡萄糖淀粉酶;pullulanase:普鲁兰酶

图2 各种酶制剂对淀粉底物分解的机理与区别

Fig.2 Different enzymes function on starch substrate

表2 黑曲酶糖化酶水解双糖的速度^[1]

Tab.2 Aspergillus glucoamylase hydrolysis rate on carbohydrate

双糖	α -键	水解速度/(mg/u/h)
麦芽糖	1,4-	2.3×10^{-1}
黑曲酶糖	1,3-	2.3×10^{-2}
异麦芽糖	1,6-	0.83×10^{-2}

表3 黑曲酶糖化酶水解不同底物的反应初速度^[1]

Tab.3 Aspergillus glucoamylase hydrolysis initial rate on carbohydrate

底物	直链淀粉	支链淀粉	β -极限糊精	α -极限糊精	麦芽三糖	麦芽糖	葡聚糖	异麦芽三糖	异麦芽糖	潘糖
反应初速度	300	1260	800	690	142	100	0	极微	0.2	8.3

2.3.2 芽孢杆菌中温淀粉酶的水解方式 芽孢杆菌中温淀粉酶是一种内切淀粉酶,它以随机的方式切断淀粉分子内的 α -1,4葡萄糖苷键,但水解位于分子中间的 α -1,4键的概率比水解位于分子末端的概率大.它不能水解支链淀粉的 α -1,6键,也不能水解靠近1,6分支点的 α -1,4键,不能水解麦芽糖,但可以水解含有3个或3个以上 α -1,4糖苷键的低聚糖,其水解速度随底物聚合度减少而降低^[2].

2.3.3 普鲁兰酶(或脱支酶)的水解方式 普鲁兰酶是能够专一性切开支链淀粉和糖原等分支点的 α -1,6糖苷键,从而剪下整个侧支,形成长短不一的直链淀粉.因此,将该酶与糖化酶配合使用时,可使淀粉糖化完全.

2.3.4 真菌麦芽糖淀粉酶的水解方式 真菌麦芽糖淀粉酶可以用于对淀粉液化和糖化(葡萄糖和麦

芽糖释放)。此酶为内切淀粉酶,可以迅速水解糊化淀粉、直链淀粉和支链淀粉内部的 α -1,4糖苷键,从而生成具有两个葡萄糖单位的麦芽糖^[3]。

3 结 论

麦芽糖底物法应当是检测复合酶中糖化酶活力的首选方法。综合以上4种酶制剂的水解方式,并依据糖化酶产生葡萄糖的速度是基于作用底物葡聚糖链的长度,不难看出糖化酶分别与另处3种酶制剂复合时,由于它们都能降解淀粉底物,通过协同作用产生葡萄糖,这时候若使用淀粉底物法对复合糖化酶活力进行测定,就出现了结果偏差。当副酶含量过高时,由于淀粉底物葡聚糖链的长度被大大降解,从而降低了糖化酶的进一步酶解速度,产生的葡萄糖含量减少,检测出的糖化酶活力会偏

低,而当副酶含量较少时,产生较多的被部分降解的淀粉底物分子,葡聚糖链的长度适合糖化酶进一步水解底物,生成更多的葡萄糖。因此,检测出的糖化酶活力会偏高。在使用淀粉底物法测定糖化酶活力时,这种干扰是无法避免的。

当使用麦芽糖底物法对复合糖化酶活力测定时,由于麦芽糖底物只能被糖化酶专一分解,即使存在其它副酶,也不会产生葡萄糖,所以不会影响糖化酶活力的检测结果。

以上的实验结果以及原理分析证明了在对复合糖化酶活力的测定时,淀粉底物法存在结果偏差,不能准确反映出真实的糖化酶活力,而麦芽糖底物法由于不受复合糖化酶中副酶活力的影响而成为检测复合糖化酶中糖化酶活力的首选方法。

参考文献:

- [1] 张树政. 酶制剂工业(上、下册)[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [2] 郭显章. 酶的工业生产技术[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1988.
- [3] 魏述众. 生物化学[M]. 北京:轻工业出版社,1996.

(责任编辑 朱明)

(上接第85页)

参考文献:

- [1] Raymond R. Mahoney Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis[J]. **Food Chemistry**,1998,63:147-154.
- [2] Crittenden R G, Playne M J. Properties and applications of food-grade oligosaccharide[J]. **Trends in Food Science & Technology**,1996,7:353-361.
- [3] Hideo Tomomatsu. Health effects of oligosaccharides[J]. **Food Technology**,1994(10):61-65.
- [4] Teruo Nakakuki. Oligosaccharide,Production,Properties and Applications[M]. Japan:Gorden and Breach Science Publisher,1993.90-96.
- [5] Hyun-jac Shin. Continuous production of galacto-oligosaccharide from lactose by *Bullrea singularis* galactosidase immobilized in chitosan bead[J]. **Process Biochemistry**,1998,33(8):787-792.
- [6] Demon A L, Davies J E. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology[M]. Washington:ASM Press,1999.49-60.
- [7] Inge Petzellbauer, Berend Nidetzky. Development an ultra-high-temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,1999,64(3):322-332.
- [8] 陈石根,周润琦. 酶学[M]. 上海:复旦大学出版社,2001.

(责任编辑 李春丽)