

双酶法制备小麦微孔淀粉的动力学

张国权, 张 艳, 张 洁, 梅仕峰, 罗勤贵

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 为明确 α -淀粉酶和糖化酶协同水解小麦淀粉制备微孔淀粉的动力学特征, 以小麦A淀粉为材料, 系统地分析pH值、反应温度、 α -淀粉酶及糖化酶用量对水解速率的影响, 并确定 α -淀粉酶、糖化酶单一酶的米氏常数以及双酶协同效应。结果表明: 在单一水解体系中, α -淀粉酶和糖化酶对小麦A淀粉的降解均遵循Michaelis-Menten方程, α -淀粉酶的米氏常数 K_m 为9.548mg/mL, 最大反应初速率(V_{max})为0.659mg/(mL·min), 糖化酶以淀粉为底物的米氏常数(K_m)为12.676mg/mL, 最大反应初速率(V_{max})为0.555mg/(mL·min)。水解产物葡萄糖对反应体系具有竞争性抑制剂的作用, 其抑制常数(K_i)为4.288mg/mL。在小麦A淀粉质量浓度为5mg/mL、 α -淀粉酶10U/mL、糖化酶20U/mL、反应温度55℃、pH4.5、水解时间为25min的条件下, 可达到淀粉的水解极限即还原糖生成质量浓度为2.54mg/mL。 α -淀粉酶和糖化酶可协同水解小麦A淀粉制备微孔淀粉, 双酶协同作用的水解效率明显高于单酶的水解效率。

关键词: 小麦A淀粉; 微孔淀粉; α -淀粉酶; 糖化酶; 动力学

Kinetics of Enzymatic Hydrolysis of Wheat Starch by α -Amylase and Glucoamylase for Preparation of Microporous Starch

ZHANG Guo-quan, ZHANG Yan, ZHANG Jie, MEI Shi-feng, LUO Qin-gui

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: In order to understand the kinetic characteristics of the synergistic hydrolysis of wheat starch by α -amylase and glucoamylase for preparing microporous starch, the effects of pH, reaction temperature and enzyme dosage on hydrolysis rate during the hydrolysis of wheat type A granular starch by both enzymes were investigated and the Michaelis constants (K_m) for the individual and combined enzymatic hydrolysis of wheat starch were determined. Both individual enzymatic hydrolysis processes obeyed the Michaelis-Menten equation, and the K_m and V_{max} (maximum reaction velocity) were 9.548 mg/mL and 0.659 mg/(mL·min) for α -amylase, and 12.676 mg/mL and 0.555 mg/(mL·min) for glucoamylase, respectively. The hydrolysis product glucose was a competitive inhibitor against the enzymes with an inhibitory constant (K_i) of 4.288 mg/mL. Maximum hydrolysis was reached when 5 mg/mL of wheat type A granular starch was hydrolyzed with 10 U/mL of α -amylase and 20 U/mL of glucoamylase under the conditions of 55 °C and pH 4.5 for 25 min. As a result, 2.54 mg/mL of reducing sugar was produced. In conclusion, α -amylase and glucoamylase can be used together to hydrolyze wheat starch for the preparation of microporous starch and their combination shows significantly higher hydrolysis efficiency than individual use.

Key words: wheat type A granular starch; microporous starch; α -amylase; glucoamylase; kinetics

中图分类号: TS231

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)23-0184-05

小麦淀粉颗粒按其粒径大小可分为A型(10~40 μ m)、B型(1~10 μ m)和C型(<1 μ m), 通常将C型归入B型^[1]。小麦A淀粉呈圆盘形, 约占淀粉颗粒总体积的70%~80%, B淀粉多以球形分布^[2-4]。与B淀粉相比, 工业化生产的小麦A淀粉中含有的非淀粉物质如蛋白质、纤维素等更少, 淀粉纯度更高^[5]。微孔淀粉是指生淀粉酶在低于淀粉糊化温度下水解各种淀粉形成的一种中空的变化性淀粉^[6-7], 与天然淀粉相比具有较大的比表面积、比孔容及良好的吸水、吸油性能, 并且成本低, 无毒害, 可自然降解, 用

途广泛, 目前制备微孔淀粉的原料多以玉米淀粉、大米淀粉、薯类淀粉等为主^[8-12], 以小麦淀粉为原料制备微孔淀粉的报道甚少。在以往酶水解淀粉的动力学研究中, 单酶或多酶作用的底物常为淀粉糊(熟淀粉), 如王华等^[13]利用双酶一步法协同水解马铃薯淀粉, 并建立了动力学速度方程, 而对于利用双酶法(α -淀粉酶和糖化酶协同水解)对小麦生淀粉进行部分水解制备微孔淀粉的动力学研究还未见报道。本实验通过对 α -淀粉酶和糖化酶协同水解小麦A淀粉制备微孔淀粉的动力学研究, 以期对双酶协

收稿日期: 2011-08-01

基金项目: 国家现代农业(小麦)产业技术体系建设专项(MATS)

作者简介: 张国权(1968—), 男, 教授, 博士, 主要从事谷物品质评价及淀粉工程技术研究。E-mail: zhangggq98@126.com

同水解小麦A淀粉的过程加以定量描述,实现对小麦微孔淀粉制备过程的有效控制,提高小麦淀粉深加工产品的品质。

1 材料与方法

1.1 材料

小麦A淀粉以西农979面粉为材料,采用马丁法^[14]制备; α -淀粉酶(酶比活力 $\geq 4000\text{U/g}$,实测酶比活力为 4400U/g)、糖化酶(酶比活力为 100000U/g ,实测酶比活力为 87000U/g) 北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.2 方法

准确称取 0.5g (干基)小麦A淀粉放入 250mL 的三角瓶中,加入 95mL 一定pH值的乙酸-乙酸钠缓冲溶液,用保鲜膜和橡皮筋封口,在一定温度的恒温摇床中水浴预热 20min 。将 5mL 含有一定酶活力的乙酸-乙酸钠缓冲溶液加入三角瓶中,经过一定的反应时间后,迅速放入沸水浴中灭酶 10min ^[15-16]。离心后取样用DNS法测定还原糖的含量^[17],并根据不同的实验要求改变pH值、反应温度、加酶量、淀粉质量浓度和反应时间。

1.2.1 pH值对反应速率的影响

在 50°C 、 α -淀粉酶加入量 10U/mL 、糖化酶加入量 20U/mL 条件下,分别测定乙酸-乙酸钠缓冲液pH值为 3.0 、 3.5 、 4.0 、 4.5 、 5.0 、 5.5 时反应 5min 的还原糖含量,并制作pH值与反应速率 r_p 的关系曲线。

1.2.2 反应温度对反应速率的影响

在pH4.5、 α -淀粉酶加入量 10U/mL 、糖化酶加入量 20U/mL 条件下,分别测定温度在 40 、 45 、 50 、 55 、 60 、 65 、 70°C 时反应 5min 的还原糖含量,并制作温度与反应速率 r_p 的关系曲线。

1.2.3 α -淀粉酶用量对反应速率的影响

在 55°C 、pH4.5、糖化酶加入量 10U/mL 条件下,分别测定 α -淀粉酶加入量为 0 、 5 、 10 、 15 、 20 、 25U/mL 时反应 5min 的还原糖含量,并制作 α -淀粉酶加入量与反应速率 r_p 的关系曲线。

1.2.4 糖化酶用量对反应速率的影响

在 55°C 、pH4.5、 α -淀粉酶用量为 5U/mL 条件下,分别测定糖化酶加入量为 0 、 5 、 10 、 15 、 20 、 25U/mL 时反应 5min 的还原糖含量,并制作糖化酶浓度与反应速率 r_p 的关系曲线。

1.3 动力学参数的确定

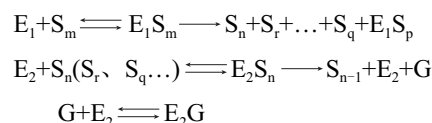
1.3.1 动力学方程构建

双酶协同水解的动力学方程的构建基于如下假定^[13,20-21]:

1)当底物分子(淀粉链长)足够大时, α -淀粉酶、糖化酶的反应活性不随底物大小变化而变化。

2)协同作用阶段, α -淀粉酶的水解作用增加糖化酶底

物的浓度,其协同水解模型如下:



式中: E_1 为 α -淀粉酶; E_2 为糖化酶; S_n 、 S_r ... S_q 、 S_p 为 α -淀粉水解过程中的不同产物; G 为葡萄糖。

3)葡萄糖的生成受到已生成的葡萄糖的抑制。

4)在协同作用结束前,当酶水解反应到一定程度,淀粉形成较大孔径且不坍塌时,终止反应^[22]。

5)上述水解反应遵循Michealis-Menten规律。

由假定2)和假定5), α -淀粉酶的水解作用增加糖化酶底物质量浓度的速率可表示为^[13]:

$$\frac{d\rho}{dt} = \frac{V_{m1}\rho_a}{\rho_a + K_{m1}} \quad (1)$$

式中: ρ 为 α -淀粉酶酶促反应的底物质量浓度/(mg/mL); ρ_a 为底物初始质量浓度/(mg/mL); V_{m1} 为最大反应速率/($\text{mg}/(\text{mL}\cdot\text{min})$); K_{m1} 为米氏常数/(mg/mL)。

葡萄糖的生成速率可表示为:

$$\frac{d\rho}{dt} = \frac{V_{m2}\rho_b}{\rho_b + K_{m2}(1 + \rho/K_i)} \quad (2)$$

式中: ρ 为糖化酶酶促反应中葡萄糖的生成质量浓度/(mg/mL); ρ_b 为底物初始质量浓度/(mg/mL); V_{m2} 为最大反应速率/($\text{mg}/(\text{mL}\cdot\text{min})$); K_{m2} 为米氏常数/(mg/mL); K_i 为抑制系数/(mg/mL)。

1.3.2 单一 α -淀粉酶的米氏常数的确定

根据公式(1),在 55°C 、pH4.5、 α -淀粉酶用量为 10U/mL 条件下分别测定淀粉质量浓度为 10.00 、 5.00 、 2.50 、 2.00 、 1.25 、 1.00mg/mL 时反应 5min 时的初速率,并以 $1/V$ 对 $1/[S]$ 作Lineweaver-Burk图。

1.3.3 单一糖化酶米氏常数的确定

糖化酶用量为 20U/mL 、取淀粉质量浓度为 10.00 、 5.00 、 2.50 、 2.00 、 1.25 、 1.00mg/mL ,并根据公式(1)分别测定其在 55°C 、pH4.5、反应 5min 时的初速率。以 $1/V$ 对 $1/[S]$ 作Lineweaver-Burk图。

1.3.4 抑制常数 K_i 的确定

取糖化酶用量为 20U/mL ,淀粉质量浓度为 7 、 4mg/mL ,分别加入无水葡萄糖质量浓度 0.00 、 0.02 、 0.04 、 0.06 、 0.08 、 0.10mg/mL 作为抑制剂,根据公式(2)测定在 55°C 、pH4.5、反应 5min 时的初速率。以 $1/V$ 对葡萄糖质量浓度做Dixon图^[13]。

1.3.5 双酶体系协同作用与单一酶体系的水解效率比较

根据需要配制质量浓度为 5mg/mL 的小麦A淀粉乳若干,在 55°C 、pH4.5的条件下,分别加入单一的 α -淀粉酶(10U/mL)、单一的糖化酶(20U/mL)和双酶(α -淀粉酶 10U/mL ,

糖化酶20U/mL), 然后分别反应10~60min, 测定其生成还原糖的质量浓度。以还原糖质量浓度对时间 t 作图。

2 结果与分析

2.1 pH值对反应速率的影响

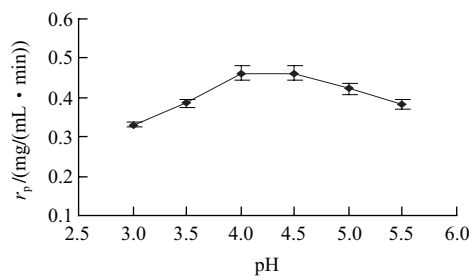


图1 pH值对反应速率的影响
Fig.1 Effect of pH on reaction rate

酶的活性部位存在可解离基团, 而一些基团的解离状态将受到pH值影响而变化, 从而直接影响到酶的活性及酶与底物的亲和力, 影响反应速率。由图1可知, 在较强的酸性条件下, 酶的活性受到抑制, pH值增加活性上升, pH值在4.5~5.5的范围内, 反应速率达到最高。pH值再上升, 酶与底物的亲和力下降, 反应速率降低。

2.2 反应温度对反应速率的影响

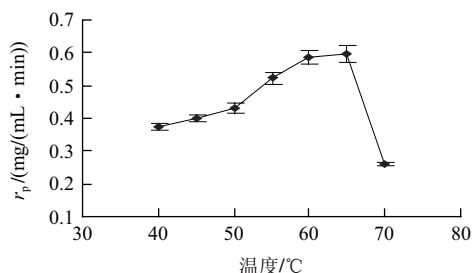


图2 反应温度对反应速率的影响
Fig.2 Effect of temperature on reaction rate

提高反应温度可以使反应速率加快, 但反应温度过高也可使酶失活。只有在酶的最适温度时酶促反应的速率才会最高。由图2可知, 在40~65°C范围内, 双酶协同体系的反应速率随反应温度的升高而增大, 在60~65°C时水解速率最大; 当反应温度超过65°C, 反应速率则随着反应温度的继续升高而迅速降低, 这说明酶作用的最适温度为60~65°C。实际操作中, 小麦A淀粉在pH4.0~4.5范围内, 水解温度为55°C时未糊化, 但当温度大于60°C时, 达到小麦A淀粉的糊化温度, 淀粉颗粒结构开始崩解, 不宜制备微孔淀粉, 因此本研究选择55°C作为反应温度。

2.3 酶用量对反应速率的影响

由图3可知, 固定糖化酶的用量, 逐渐增加 α -淀粉酶

用量, 酶解速率增加但并不显著, 反应速率 r_p 与 α -淀粉酶的用量不呈线性关系; 当固定 α -淀粉酶用量, 增加糖化酶用量时, 反应速率 r_p 对 α -淀粉酶用量的关系曲线近似一条直线。这是因为当固定 α -淀粉酶的用量时, 在一定时刻, 糖化酶的底物是一定的, 在糖化酶作用的底物未被饱和的情况下增加一定的糖化酶的用量就会增加相应还原糖的生成量, 使反应速率 r_p 对 α -淀粉酶用量呈一定的正相关关系。本实验结果与王华^[13]、郭桥^[19]等的相关结果一致。

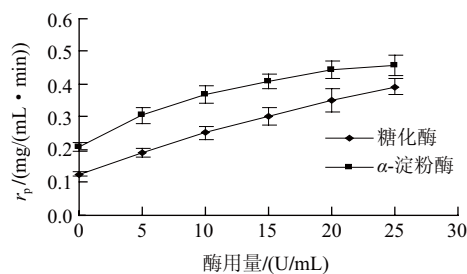


图3 酶用量对反应速率的影响
Fig.3 Effect of enzyme concentration on reaction rate

2.4 动力学参数的确定

米氏常数(K_m)和最大反应速率(V_m)是酶促反应的重要动力学参数。 K_m 相当于酶的活性部位一半被底物占据时所需的底物浓度。 V_m 表示在酶用量不变时, 酶被底物饱和, 反应速率达到最大。

2.4.1 单一 α -淀粉酶的米氏常数和最大反应速率

酶水解反应初期, α -淀粉酶对淀粉的降解遵循Michaelis-Menten规律。横轴截距的负倒数为 K_m , 纵轴截距的倒数为 V_{max} (图4)。对实验数据进行最小二乘法线性回归, 由直线的斜率及截距得出, 在反应温度为55°C、pH4.5时, α -淀粉酶的米氏常数(K_m)为9.548mg/mL, 最大反应速率(V_{max})为0.659mg/(mL·min)。

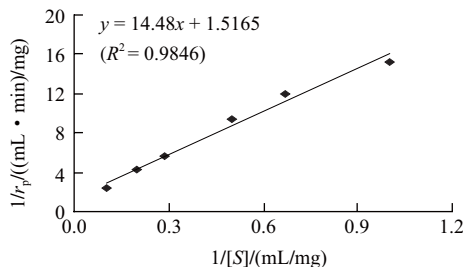


图4 α -淀粉酶的Lineweaver-Burk图
Fig.4 Lineweaver-Burk plot for α -amylase

2.4.2 单一糖化酶的米氏常数和最大反应速率

图5、6表明, 在酶水解反应初期, 糖化酶对小麦A淀粉的降解也遵循Michaelis-Menten规律。横轴截距的负倒数为 K_m , 纵轴截距的倒数为 V_{max} 。对试验数据进行最小

二乘法线性回归得出,在反应温度为55℃、pH4.5时,以小麦A淀粉为底物时糖化酶的米氏常数(K_m)为12.676mg/mL,最大反应速率(V_{max})为0.555mg/(mL·min);以麦芽糖为底物时糖化酶的米氏常数(K_m)为24.130mg/mL,最大反应初速率(V_{max})为4.462mg/(mL·min)。

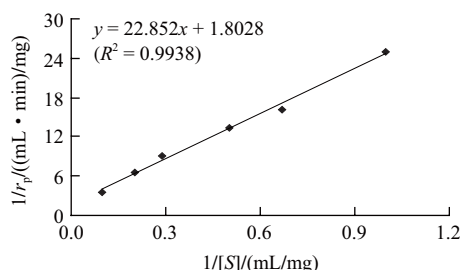


图5 以小麦淀粉为底物时糖化酶的Lineweaver-Burk图

Fig.5 Lineweaver-Burk plot for glucoamylase in the presence of wheat starch as substrate

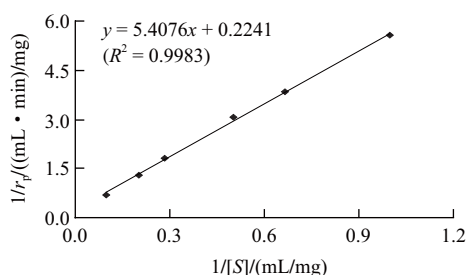


图6 以麦芽糖为底物时糖化酶的Lineweaver-Burk图

Fig.6 Lineweaver-Burk plots for glucoamylase in the presence of maltose as substrate

2.4.3 抑制常数 K_i 的确定

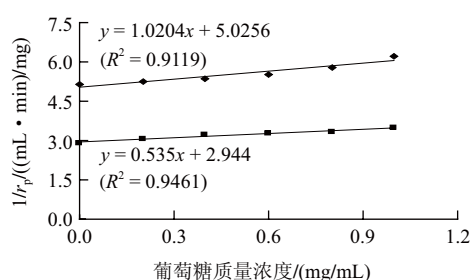


图7 葡萄糖为抑制物的糖化酶Dixon plot图

Fig.7 Dixon plot for glucoamylase in the presence of glucose as inhibitor

图7为两条底物质量浓度不同的速率直线,把这两条直线向左延长能交于一点。根据Dixon理论,说明葡萄糖对产物具有竞争性抑制剂的作用,两直线交点的横坐标的负值就是 K_i 。在反应温度为55℃、pH4.5时,抑制常数 K_i 为4.288mg/mL。

2.5 双酶协同作用体系与单酶作用体系水解能力的比较

图8结果表明,当水解时间相同时, α -淀粉酶与糖化酶共存反应体系中所生成的还原糖浓度比单一 α -淀粉酶

及单一糖化酶反应体系的总和还要大。这说明在酶水解小麦淀粉制备微孔淀粉的过程中,双酶协同作用的水解效率比单酶的水解效率都高。

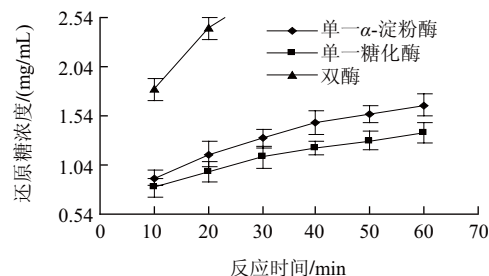


图8 还原糖质量浓度与反应时间的关系

Fig.8 Correlation between reducing sugar concentration and reaction time

双酶水解制备微孔淀粉与酶水解生产淀粉糖浆的原理相同,只是控制的过程及程度不同。酶水解制备淀粉糖浆往往要求温度适宜,尽可能使淀粉彻底水解;而酶法水解制备微孔淀粉则底物淀粉不能糊化且具有一定的水解极限,否则淀粉颗粒将会坍塌破损。根据已完成的小麦微孔淀粉的制备工艺研究结果,该小麦A淀粉制备微孔淀粉的水解极限为45.67%,由此推知还原糖的生成浓度应为2.54mg/mL。从图8可以看出,在小麦A淀粉质量浓度为5mg/mL、 α -淀粉酶10U/mL、糖化酶20U/mL、反应温度55℃、pH4.5的条件下,双酶体系经过25min左右能够达到水解极限,而单酶体系在60min后仍远离水解极限值。

3 结论

3.1 小麦A淀粉制备微孔淀粉的水解极限为体系的还原糖生成质量浓度为2.54mg/mL,在淀粉质量浓度为5mg/mL、 α -淀粉酶10U/mL、糖化酶20U/mL、反应温度55℃、pH4.5的条件下,双酶体系经25min水解反应能够达到淀粉的水解极限。

3.2 α -淀粉酶和糖化酶可协同水解小麦A淀粉制备微孔淀粉,在单一水解体系中, α -淀粉酶和糖化酶对小麦淀粉的降解均遵循Michaelis-Menten方程, α -淀粉酶的米氏常数(K_m)为9.548mg/mL,最大反应初速率(V_{max})为0.659mg/(mL·min),糖化酶以淀粉为底物的(K_m)为12.676mg/mL, V_{max} 为0.555mg/(mL·min)。

3.3 双酶协同水解产物葡萄糖对反应体系具有竞争性抑制剂的作用,其抑制常数 K_i 为4.288mg/mL,同时,双酶协同作用的水解效率明显高于单酶作用的水解效率。

参考文献:

- [1] STODDARD F L. Genetics of starch granule size distribution in tetraploid and hexaploid wheats[J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2004, 54(7): 637-648.

- [2] STODDARD F L. Survey of starch particle-size distribution in wheat and related species[J]. *Cereal Chemistry*, 1999, 76(1): 145-149.
- [3] KIM H S, HUBER K C. Channels within soft wheat starch A- and B-type granules[J]. *Journal of Cereal Science*, 2007, 9: 2-14.
- [4] PENG M, GAO M, ABDEL-AAL E S M, et al. Separation and characterization of A- and B-type starch granules in wheat endosperm[J]. *Cereal Chemistry*, 1999, 76: 375-379.
- [5] 顾正彪, 王良东. 小麦淀粉颗粒大小和糊化特性的相关性研究[J]. *中国粮油学报*, 2006, 21(4): 32-34.
- [6] 刘雄, 阚建全, 陈宗道, 等. 酸法制备微孔淀粉的技术研究[J]. *食品科学*, 2003, 24(10): 81-83.
- [7] 张燕萍. 变性淀粉制造与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 155-174.
- [8] 吴非, 李永平, 印方平. 玉米微孔淀粉酸法制备及其特性研究[J]. *中国粮油学报*, 2008, 23(6): 89-92.
- [9] 徐忠, 刘明丽. 玉米交联微孔淀粉制备工艺的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(2): 94-98.
- [10] 周琼, 张涛, 刘雄. 木薯微孔淀粉制备技术的研究[J]. *食品工业科技*, 2005, 26(10): 127-129.
- [11] 刘文宏, 袁怀波, 王宇. 木薯微孔淀粉的制备及性质研究[J]. *食品科学*, 2006, 27(10): 265-268.
- [12] 杜敏华, 刘福林. 大米微孔淀粉的酶法制备工艺优化研究[J]. *粮油加工*, 2007(5): 104-106.
- [13] 王华, 韩金玉, 钟穗生, 等. 双酶一步法水解马铃薯淀粉的动力学研究[J]. *高校化学工程学报*, 2001, 15(5): 446-451.
- [14] 周申, 李万平. 不同小麦谷朊粉加工工艺对小麦粉质量的要求[J]. *粮油加工*, 2008(8): 41-42.
- [15] 颜思旭, 蔡红玉. 酶催化动力学原理与方法[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1987.
- [16] KOMOLPRASERT V. Starch hydrolysis kinetics of *Bacillus licheniformis*[J]. *Chem Tech Biotechnol*, 1991, 51: 209-223.
- [17] 孙伟伟, 曹维强, 王静. DSN法测玉米秸秆中总糖[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(6): 120-122.
- [18] DIXON M. The determination of enzyme inhibitor constants[J]. *Biochemistry Journal*, 1953, 55: 107-171.
- [19] 郭桥. α -淀粉酶和糖化酶的共同固定化研究[J]. *生物化学杂志*, 1994, 10(3): 259-262.
- [20] FUJII M, HOMMA T, TANIGUCHI M. Synergism of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 32(7): 910-915.
- [21] KUSUNOKI K, KOEIKAWAKAMI K, SHIRAISHI F, et al. A kinetic expression for hydrolysis of soluble starch by glucoamylase[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1982, 24(2): 347-354.
- [22] ROY W L. Microporous granular starch matrix compositions: US, 4985082A[P]. 1988-11-17.