

# 双酶法水解玉米淀粉的工艺研究

张 剑<sup>1</sup>, 易华锋<sup>2</sup>, 张开诚<sup>1</sup>, 林庭龙<sup>1</sup>

(1. 武汉工业学院化学与环境工程系, 湖北 武汉 430023; 2. 英博金龙泉(孝感)啤酒有限责任公司, 湖北 孝感 432100)

**摘要:** 模拟水解玉米淀粉的生产工艺, 初步探讨液化时间、液化过程引入  $\text{Ca}^{2+}$  对糖化质量的影响。研究表明,  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶的最适 pH 分别为 5.0 和 4.2; 在淀粉水解过程中, 一定量的  $\text{Ca}^{2+}$  能促进  $\alpha$ -淀粉酶的活性并能增强其热稳定性, 但对糖化酶的活性却表现为抑制作用。在保证正常液化的前提下, 应尽可能减少  $\text{Ca}^{2+}$  用量。液化时间选定 90~130 min 为宜。糖化时间并不是愈长愈好, 只有定期对产品实施监控, 才能获得高 DE 值的葡萄糖浆。

**关键词:**  $\alpha$ -淀粉酶; 糖化酶;  $\text{Ca}^{2+}$ ; 玉米淀粉; 淀粉降解

中图分类号: Q814, Q55, TS261.4

文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2009)03-0095-03

## Research on the Degradation of Maize Starch by Double-enzyme Method

ZHANG Jian<sup>1</sup>, YI Hua-feng<sup>2</sup>, ZHANG Kai-cheng<sup>1</sup> and LIN Ting-long<sup>1</sup>

(1. Department of Chemistry and Environmental Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023;

2. Inbev JLQ (Xiaogan) Brewery Co.Ltd., Xiaogan, Hubei 432100, China)

**Abstract:** The hydrolysis of maize starch was simulated. The effects of liquefaction time and the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  in liquefaction process on the saccharification quality were investigated. The results indicated that the optimum pH values of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase were 5.0 and 4.2 respectively, the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  during starch hydrolysis could improve the activity and the thermal stability of  $\alpha$ -amylase, however, it behaved as an inhibitor to glucoamylase activity. Therefore, the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  should be reduced as possible to ensure normal liquefaction. The proper liquefaction time should be between 90 and 130 min. Longer saccharification process did not stand for better production quality, only the monitoring of the products periodically could ensure glucose syrup with a higher dextrose equivalence (DE).

**Key words:**  $\alpha$ -amylase; glucoamylase; calcium ion; maize starch; starch degradation

现在, 酶法水解淀粉的工艺由淀粉凝胶化(糊化)、液化和糖化 3 步完成<sup>[1-2]</sup>。用高压高温(100~175 °C)蒸汽对淀粉浆处理数秒钟, 即完成凝胶化操作; 随后, 浆液通过挤压机被打入反应器作一段时间的液化处理; 待料液降到 55~65 °C 时, 调 pH 4.5~5.0, 再添加糖化酶处理 48~92 h, 生成 DE 值为 97%~98% 的葡萄糖<sup>[3-5]</sup>, 表明酶法水解淀粉的工艺完成。为了提高液化质量, 许多厂家往往要添加一定剂量的  $\text{Ca}^{2+}$ , 以维持  $\alpha$ -淀粉酶(EC 3.2.1.1)的高活性与热稳定性。而  $\text{Ca}^{2+}$  的引入必然对后续工序提出更高的要求(如: 采用离子交换树脂除  $\text{Ca}^{2+}$  等), 此外,  $\text{Ca}^{2+}$  的引入对糖化工艺是否会产生影响? 液化时间的选定等问题都值得深入探讨。

带着这一系列问题, 本课题组考察了  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶(EC 3.2.1.3)的部分性质, 并设计了“调浆-液化-凝胶化-糖化”的生产工序, 进而省去了高温、高压对淀粉凝胶化处理的操作。此外, 还对液化时间以及液化工序是否添

加  $\text{Ca}^{2+}$  等问题进行了探讨。旨在为双酶法水解淀粉的工艺提供重要参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

$\alpha$ -淀粉酶(武汉华润啤酒股份有限公司提供), 按文献[6]的方法测定其酶蛋白浓度为 1.94 mg/mL; 糖化酶(湖南鸿鹰祥生物工程股份有限公司提供), 固体酶稀释 500 倍后的酶蛋白浓度为 43.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 用 SDS-PAGE 法测得其分子量约为 95 kDa; 可溶性淀粉(洛阳市化学试剂厂), AR; 玉米淀粉(武汉太阳行食品有限责任公司), 一级淀粉; 3,5-二硝基水杨酸(浙江湖州食品化工联合公司菱湖望菱试剂厂), CP; 其他试剂均为市售分析纯。

DNS 试剂的配制: 称取 3,5-二硝基水杨酸 6.3 g, 苯酚 5 g, 无水亚硫酸钠 5 g, 固体氢氧化钠 10.48 g, 酒石酸钾钠 71.62 g, 用蒸馏水溶解后, 定容至 1000 mL, 于棕色瓶保存, 2 周后使用。

基金项目 湖北省教育厅项目(2008B027, D2005118004)资助。

收稿日期: 2008-11-18

作者简介 张剑(1970-), 男, 湖北汉川人, 讲师, 主要从事工业酶制剂的研究与开发。

## 1.2 仪器与设备

pHS-3C 数字酸度计, 杭州东星仪器设备厂; 7200 分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; HH-2 数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; DHG-9060A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精密实验设备有限公司; 全自动电光天平, 直流稳压电源, 真空干燥器, 秒表等。

## 1.3 方法

### 1.3.1 两种酶活力测定方法

按照 DNS 法, 将酶液与可溶性淀粉溶液 (pH 5.0, 0.02 M 柠檬酸溶于 0.04 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液中, 用 HCl 和 NaOH 调 pH 5.0, buffer 1) 于 60 °C ( $\alpha$ -淀粉酶)/ 50 °C (糖化酶) 水浴中预热 3~5 min 后, 取 0.2 mL 酶液 (空白为 0.2 mL buffer 1) 加到 9.8 mL 2 % (w/w) 的可溶性淀粉溶液中反应 15 min。取上述反应液 0.5 mL 到 1.5 mL DNS 试剂中, 摇匀。沸水浴 15 min 后, 取出, 迅速冷至室温。加入 10.5 mL 蒸馏水稀释, 摇匀, 于 550 nm 处测 OD 值。麦芽糖和葡萄糖的标准曲线分别为:  $y = 0.7175x - 0.0889$  和  $y = 0.897x - 0.1074$ , 这两条曲线分别用于计算  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶实验过程中还原糖的生成量。

$\alpha$ -淀粉酶活力的定义: 在 60 °C、pH 5.0 条件下, 1 min 水解可溶性淀粉产生 1 mg 麦芽糖所需酶量为一个酶活力单位。

糖化酶活力的定义为: 在 50 °C、pH 4.2 的条件下, 每 15 min 水解可溶性淀粉产生 1 mg 葡萄糖所需酶量为一个酶活力单位。

### 1.3.2 各时段的糖产量计算

间歇性的从淀粉水解液中取样 0.2 mL, 作适当稀释后, 再取稀释液 0.5 mL 到 1.5 mL DNS 试剂中, 摇匀。然后按还原糖的测定方法操作, 根据稀释倍数计算出淀粉水解液中的糖产量。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶的性质

#### 2.1.1 酸度对酶活性的影响

pH 值是影响酶活的主要因素之一, 其决定着酶分子极性基团的解离状态, 并影响着酶分子构象的稳定性, 同时对底物的解离也起到关键性作用。因此, pH 值关系到酶的活性及酶与底物亲和力的大小<sup>[7]</sup>。

酸度对酶活力影响的操作方法基本与酶活力测定法相同, 只是移取 0.2 mL 酶液到用不同酸度 (3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0) 溶解的 2 % (w/w) 可溶性淀粉溶液中, 然后根据麦芽糖和葡萄糖标准曲线将 OD 值换算成还原糖量, 进而求出各酸度下的酶活力, 结果见图 1。

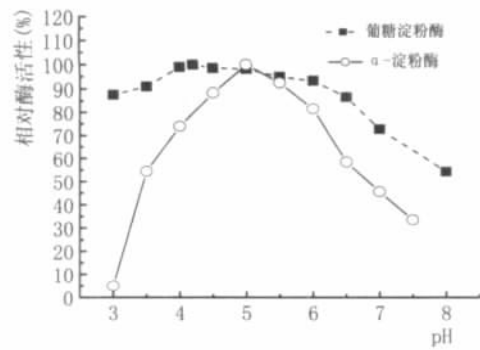


图1 酸度对两种淀粉酶活性的影响

由图 1 可知,  $\alpha$ -淀粉酶活性受酸度的影响较大。pH 5.0 时,  $\alpha$ -淀粉酶能发挥最大活性, 酶活力达到 33.08 u/ $\mu$ g 蛋白。在 pH 3.5~6.5 之间, 可保留半数以上的酶活力, 当 pH > 7.5 或者 < 3.0 时, 该酶的活性低。糖化酶的活性受酸度的影响相对要小一些。pH 4.2 时, 糖化酶的活性最高, 为 1.416 u/ $\mu$ g 蛋白。在 pH 3.0~6.0 之间, 可保留 85 % 以上的酶活力, 当 pH > 8.0 时, 该酶的活性低。

#### 2.1.2 $\text{Ca}^{2+}$ 对两种酶催化效率的影响

##### 2.1.2.1 对 $\alpha$ -淀粉酶催化效率 (图 2)

催化时间与  $\alpha$ -淀粉酶作用对糖产量关系的影响结果见图 2。

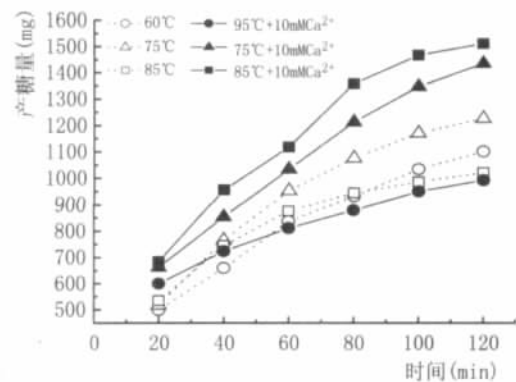


图2 催化时间与  $\alpha$ -淀粉酶作用产糖的关系

由图 2 可知, 未加  $\text{Ca}^{2+}$  时,  $\alpha$ -淀粉酶 (0.01164  $\mu$ g/mL) 催化 50 mL 5 % (w/w) 的可溶性淀粉 (pH 5.0) 的最适温度为 75 °C (注: 70 °C 和 80 °C 时的糖产量稍低于 75 °C, 图 2 中未画出); 60 °C 的温度相对较低,  $\alpha$ -淀粉酶的催化效能未得到充分发挥; 85 °C 时的糖产量低于 75 °C, 表明有部分  $\alpha$ -淀粉酶发生了热变性。

添加 10 mmol / L  $\text{Ca}^{2+}$  (400  $\times 10^{-6}$  g / g 浆料) 后,  $\alpha$ -淀粉酶的最适反应温度为 85 °C, 与对照酶相比, 该温度提高了 10 °C。就  $\alpha$ -淀粉酶在 75 °C 和 85 °C 催化效率而言, 加  $\text{Ca}^{2+}$  后的糖产量也有较大的提高。这说明  $\text{Ca}^{2+}$  的引入提高了  $\alpha$ -淀粉酶的活性和热稳定性。该结论与许多文献 [8] 报道一致。

##### 2.1.2.2 $\text{Ca}^{2+}$ 对糖化酶催化效率的影响

糖化酶作用底物的最适温度为 58~65 °C 已多有文献[3]报道。本文以 50 mL 5 % (w/w) 的可溶性淀粉 (pH 4.2, 65 °C) 为底物, 间歇性地考察了  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对糖化酶 (1.089  $\mu\text{g}$  蛋白 / mL) 催化性能的影响, 结果见图 3。

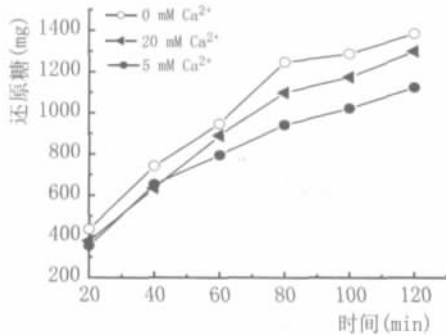


图 3 催化时间与糖化酶作用产糖的关系

由图 3 可知, 随着  $\text{Ca}^{2+}$  用量的加大, 糖化酶催化可溶性淀粉释放的还原糖量呈下降的趋势, 这表明  $\text{Ca}^{2+}$  对糖化酶的催化效能有抑制作用。

## 2.2 液化时间的影响

将 90 g 玉米粉配成 30 % (w/w) pH 5.0 的玉米浆后, 加入 1.32 mL  $\alpha$ -淀粉酶 (2873 u), 混匀后, 于 75 °C 反应不同时间, 考察液化时间对后续糖化工艺的影响。具体操作如下:

当液化进行到 90 min 时, 从混合液中取 50 mL 样品 2 份。将其中一份的品温迅速降至 65 °C, 再加入 5 mL 糖化酶 (498 u) 进行糖化 (样品 1)。另一份样品则置于电炉上加热, 煮沸后保持 10 min, 以实现灭酶和淀粉凝胶化的目的。随后, 将样品品温降至 65 °C, 再加入与第一份样品等量的糖化酶继续糖化 (样品 2)。两种样品液化与糖化共历时 340 min 后, 发现样品 2 的溶液均匀, 而样品 1 中仍存在大量不溶性淀粉, 且糖产量明显低于样品 2。可见, 淀粉凝胶化的操作在酶法水解淀粉的工序中必不可少。

当液化进行到 130 min、160 min 和 325 min 时, 从反应混合液中分别取 50 mL 样品各 1 份, 其后续操作与样品 2 相同, 然后分时段 (从  $\alpha$ -淀粉酶加入后计时) 考察各样品的糖产量 (见表 1)。

表 1 液化时间对糖化产糖的影响 (g)

| 催化总时间 (h) | 液化时间 (min) |       |       |       |
|-----------|------------|-------|-------|-------|
|           | 90         | 130   | 160   | 325   |
| 9         | 15.52      | 15.86 | 16.58 | 14.52 |
| 13        | 17.19      | 17.64 | 17.31 | 17.58 |
| 25        | 18.53      | 19.03 | 18.59 | 18.03 |
| 30        | 19.48      | 19.70 | 18.92 | 18.75 |

由表 1 可知, 双酶催化玉米淀粉的糖产量随反应时间的延长而增大。在 30 h 的考察时间内, 各样品的糖产量接近。由于液化的品温较糖化要高, 故液化时间愈

长, 能耗愈大, 生产成本越高。所以液化时间选定 90~130 min 为宜。

## 2.3 液化过程中引入 $\text{Ca}^{2+}$ 对糖化质量的影响

将 75 g 玉米淀粉配成 30 % (w/w) pH 5.0 的玉米浆后, 将其平均分为 2 份, 1 份加入  $\text{CaCl}_2$ , 使其浓度为 10 mmol/L。随后, 将 2 份样品置于 75 °C 水浴预热 5 min, 再分别加入 0.55 mL  $\alpha$ -淀粉酶 (1197 u), 混匀。液化 90 min 后, 再将样品置于电炉上加热, 煮沸后保温 10 min, 再使 2 份样品的品温迅速降至 65 °C。从 1 份样品中移取 50 mL 混合物 2 份, 分别加入 5 mL (498 u)、10 mL (996 u) 糖化酶。另一份样品的处理方法与前一样品同。

完成上述操作后, 将 4 份样品同时放入 65 °C 水浴中, 间歇性取样, 分析各时段的糖产量, 以考察糖化酶的用量和液化过程中  $\text{Ca}^{2+}$  的使用对糖化效果的影响 (见表 2)。

表 2 糖化酶和  $\text{Ca}^{2+}$  添加量对糖产量的影响 (g)

| 糖化酶加入量                       | 糖化时间 (h) |       |       |       |
|------------------------------|----------|-------|-------|-------|
|                              | 2        | 4     | 18    | 19    |
| 498 u (添加 $\text{Ca}^{2+}$ ) | 11.00    | 13.03 | 16.15 | 16.35 |
| 996 u (添加 $\text{Ca}^{2+}$ ) | 11.56    | 14.06 | 16.24 | 16.86 |
| 498 u (不加 $\text{Ca}^{2+}$ ) | 11.04    | 14.10 | 16.71 | 17.33 |
| 996 u (不加 $\text{Ca}^{2+}$ ) | 12.47    | 15.22 | 17.87 | 17.32 |

由表 2 可知, ① 操作条件相同, 糖化酶使用剂量愈大, 相同时段的糖产量愈高。② 采用相同剂量的糖化酶糖化, 若液化过程中引入  $\text{Ca}^{2+}$ , 则该方案的糖化效果要比对照的差。说明液化过程中应尽可能少地引入  $\text{Ca}^{2+}$ , 否则, 不仅影响糖化效果, 还会增添后续工序, 增加除  $\text{Ca}^{2+}$  的费用。③ 液化过程中不加  $\text{Ca}^{2+}$ , 采用 996 u 糖化酶的糖化方案, 19 h 时的糖产量反而不及 18 h 时的高。这说明糖化酶中含有一定数量的转苷酶, 因为这种酶能将葡萄糖转化为异麦芽糖、曲二糖等产品, 使葡萄糖的产率大大降低<sup>[5,9]</sup>。该方案也进一步说明, 糖化时间并不是愈长愈好。只有定期地对产品实施监控, 才能保证产品的高 DE 值。

## 3 结论

3.1  $\text{Ca}^{2+}$  能提高  $\alpha$ -淀粉酶的活性和热稳定性, 但对糖化酶的活性具有抑制作用。因此, 为保证糖化效果, 液化过程中应尽量少地引入  $\text{Ca}^{2+}$ 。

3.2 在葡萄糖浆的生产工艺中,  $\alpha$ -淀粉酶的液化时间选定在 90~130 min 为宜。液化后对淀粉凝胶化的操作必不可少。

3.3 糖化时间并不是愈长愈好。只有定期地对产品实施监控, 才能保证产品的质量。

## 参考文献:

- [1] Baks T, Kappen FHJ, Janssen AEM, Boom RM. Towards an  
(下转第 102 页)

- 可再生能源,2007,25(1):51-55.
- [6] 夏爽.聚焦国际追捧的中国甜高粱[N].科学时报,2008-09-08(B02).
- [7] 汪元欣(责编).以色列高效利用海藻[J].农村实用技术,2008,(01):28.
- [8] 丰洋.美国国际能源公司启动“海藻变油”研发计划[J].石油炼制与化工,2008,(03):57.
- [9] 楚德强,马晓建,陈俊英.盾叶薯蓣发酵生产酒精的研究[J].酿酒科技,2007,(2):25-28.
- [10] 谢光辉,郭兴强,王鑫,等.能源作物资源现状与发展前景[J].资源科学,2007,29(5):74-80.
- [11] Deepak .R. Keshwani,Jay J.Cheng Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review[J]. Bioresource Technology 2009,100 ,1515-1523.
- [12] 曲音波.纤维素乙醇产业化[J].化学进展,2007,19(7/8):1098-1108.
- [13] 王凡强,许平.产乙醇工程菌研究进展[J].微生物学报,2006,46(4):673-675.
- [14] 马晓建,赵银峰,祝春进.纤维素类物质为原料发酵生产燃料乙醇的研究进展[J].食品与发酵工业,2004,30(11):77-81.
- [15] 冯玉杰,李冬梅.纤维素分解菌的筛选及用于秸秆燃料酒精发酵的试验研究[A].中国生物质能技术与可持续发展研讨会论文集[C].2004.
- [16] 赵小蓉,林启美,孙焱鑫.纤维素分解菌对不同纤维素类物质的分解作用[J].微生物学杂志 2000,20(3):12-14.
- [17] 高建民,翁海波,席宇.一株嗜热嗜酸纤维素酶高产霉菌分离鉴定及其酶学性质研究[J].微生物学通报,2007,34,(4):715-718.
- [18] 刘长莉,王小芬,牛俊玲.一组多功能细菌复合系 NSC-7 的培养特性及稳定性[J].微生物学通报,2008,35(5):725-730.
- [19] 杨声莲,李登煜,郑林用,等.混合菌在纤维素降解中的作用研究[A].第九届中国青年土壤科学工作者学术讨论会暨第四届中国青年植物营养与肥料科学工作者学术讨论会论文集[C].2004.
- [20] 夏子芳,王正祥.成乙醇重组乳杆菌的研究[J].微生物学通报,2007,34(5):934-938.
- [21] 段黎萍.纤维素乙醇的专利综述与分析[J].现代化工,2008,(5):11-15.
- [22] 柴梅,袁振宏,颜涌捷.肠溶衣聚合物固定化纤维素酶性质的研究[J].微生物学通报 2007,34(3).
- [23] M.Linde, M.Galbe, G.Zacchi .Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40,100-1107.
- [24] E.Tomás-Pejó et al, Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes[J]. Bioresource Technology , 2008,100 , 90-895.
- [25] Guido Zacchi et al, A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover[J]. Process Biochemistry , 2007,42 ,834 -839.
- [26] S.Marques et al,Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*[J].Biomass and Bioenergy,2008,32,400-406.
- [27] Isabella D B,Daniela C,Francesco N,et al. Ethanol production in immobilized-cell bioreactors from mixed sugar syrups and enzymatic hydrolysates of steam-exploded biomass[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2004,113-116,539-557.
- [28] Mahesh S K,Maria B,Christopher K S,et al. Ethanol production from glucose and xylose by immobilized *Zymomonas mobilis* CP4(pzb5) [J].Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000,84-86,525-541.
- [29] 宋向阳,徐勇,杨富国,等.海藻酸锰固定化细胞的乙醇发酵[J].南京林业大学学报(自然科学版),2003,27(4):1-4.
- [30] 季更生,勇强,余世袁.固定化酵母戊糖己糖混合连续发酵制取酒精[J].林产化学与工业,2007,27(4):71-74.
- [31] Yuya Yamashita, Akihiro Kurosumi,Chizuru Sasaki,Yoshitoshi Nakamura.Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis*[J].Biochemical Engineering Journal, 2008,42 ,314-319.

(上接第97页)

- optimal process for gelatinisation and hydrolysis of highly concentrated starch- water mixtures with alpha- amylase from *B. licheniformis*[J]. Journal of Cereal Science, 2008, 47 :214-225.
- [2] Wong DWS, Robertson GH, Lee CC, Wagschal K. Synergistic action of recombinant  $\alpha$ -amylase and glucoamylase on the hydrolysis of starch granules[J]. The Protein Journal, 2007, 26(2):159-164.
- [3] Pronpong S, Saovane D, Sittiwat L. Effect of glycation on stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from *aspergillus niger*[J]. Process Biochemistry, 2005, 40 : 2821-2826.
- [4] Crabb WD, Mitchinson C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars[J]. Trends Biotechnol, 1997, 15:349-352.
- [5] 郭勇,郑穗平.酶在食品工业中的应用[M].北京:中国轻工业出版社,1996.53-54.
- [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72 :248-254.
- [7] 张剑,张开诚,田辉,等.混合酶水解水溶性淀粉的研究[J].中国酿造,2007,167(2):23-26.
- [8] Feller G, Payan F, Theys F, et al. Stability and structural analysis of  $\alpha$ -amylase from the Antarctic psychrophile *alteromonas haloplanctis* A23[J]. Eur. J. Biochem. 1994, 222 :441-447.
- [9] 姜锡瑞,段刚.新编酶制剂实用技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,2002.109-113.