

# 产糖化酶 K-1 根霉菌在不同酿酒原料上的应用

尹城明<sup>1</sup>, 贺胜英<sup>3</sup>, 周 胜<sup>1</sup>, 寸跃芳<sup>1</sup>, 孔维锐<sup>1</sup>, 郭福宗<sup>1</sup>, 蒲壮萍<sup>1</sup>, 黄遵锡<sup>1,2</sup>, 唐湘华<sup>1,2</sup>

(1. 云南师范大学生命科学学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 云南 昆明 650500; 3. 宜宾学院, 四川 宜宾 644000)

**摘要:** 研究了 K-1 根霉菌对不同酿酒原料的水解糖化能力。结果表明, 根霉糖化酶对玉米粉、高粱粉、小麦粉、小米粉和苦荞粉的分解率在 60 min 时都达到了 50% 左右, 均显著高于其他对照酶样品, 特别是对小麦粉和苦荞粉的分解能力更是极显著高于其他酶样品; 此外根霉糖化酶对黄豆粉也有一定的分解能力。经薄层分析发现, 根霉糖化酶将酿酒原料中的淀粉分解为葡萄糖和麦芽糖两大产物。

**关键词:** 糖化酶; 转化率; 酿酒原料; 薄层分析

中图分类号: TS261.1; TS262.3; TS261.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2012)12-0065-04

## Applicating of Glucoamylase-producing K-1 *Rhizopus* in the Hydrolysis of Different Liquor-making Raw Materials

YIN Chengming<sup>1</sup>, HE Shenying<sup>3</sup>, ZHOU Sheng<sup>1</sup>, CUN Yuefang<sup>1</sup>, KONG Weirui<sup>1</sup>, GUO Fuzong<sup>1</sup>, PU Zhuangping<sup>1</sup>, HUANG Zunxi<sup>1,2</sup> and TANG Xianghua<sup>1,2</sup>

(1. School of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500; 2. Key Lab of Yunnan Province for Biomass Energy & Environmental Biotechnology, Kunming, Yunnan 650500; 3. Yibin College, Yibin, Sichuan 644007, China)

**Abstract:** The hydrolyzing capacity and saccharifying capacity of K-1 *Rhizopus* to different liquor-making raw materials were studied. The results showed that the decomposition rate of glucoamylase from K-1 *Rhizopus* to corn starch, sorghum powder, wheat flour, millet flour and buckwheat powder reached about 50% in 60 minutes, better than other enzyme samples, especially the decomposition rate of wheat flour and buckwheat powder was evidently higher. Moreover, glucoamylase from K-1 *Rhizopus* could decompose soybean meal. Thin layer analysis indicated that starch in liquor-making raw materials would be finally decomposed into glucose and maltose by glucoamylase from K-1 *Rhizopus*.

**Key words:** glucoamylase; decomposition rate; liquor-making raw materials; thin layer analysis (TLA)

糖化酶, 全名葡萄糖淀粉酶 (Glucoamylase EC. 3.2.1.3), 又称为淀粉  $\alpha$ -1,4 葡萄糖苷酶、 $\gamma$ -淀粉酶, 是由一系列微生物分泌的, 具有外切酶活性的胞外酶。其主要作用是从淀粉、糊精、糖原等碳链上的非还原性末端依次水解  $\alpha$ -1,4 糖苷键, 切下一个葡萄糖单元, 并像  $\beta$ -淀粉酶一样, 使水解下来的葡萄糖发生构型变化, 形成  $\beta$ -D-葡萄糖<sup>[1]</sup>。它一般都能将淀粉百分之百地水解成葡萄糖, 因此被广泛应用于酒精、白酒、抗生素、氨基酸、有机酸、甘油、淀粉糖等工业中, 是我国产量最大的酶制剂产品<sup>[2]</sup>。特别是在利用酿酒酵母进行淀粉原料发酵时, 淀粉液化后的糖化作用是必不可少的工序, 因为大多数酿酒酵母只能利用可发酵的糖<sup>[3]</sup>。在酿酒时一般采用双酶法

对原料中的淀粉进行分解, 即 75 °C 左右时加  $\alpha$ -淀粉酶进行液化, 55 °C 左右时加糖化酶进行糖化, 使淀粉分解更彻底<sup>[4]</sup>。但在实际生产中, 产物中往往还存在大量寡糖没有被分解成为葡萄糖, 许多可发酵性糖不能被利用。因此, 许多科研工作者采用多种分离方法对糖水解产物进行了大量研究工作, 其中以薄层色谱法最受青睐<sup>[5-11]</sup>, 如: Saelim<sup>[12]</sup> 等人通过薄层色谱得知 YCY1 酵母将木薯淀粉分解成葡萄糖和麦芽糖; Tresnawati Purwadaria<sup>[13]</sup> 等人通过薄层分析得出尼日尔 NRRL-337 糖苷酶在糖化活动扮演着重要的角色; Moumita Karmakar 和 Rina Rani Ray 通过薄层色谱验证了 KR-11 产生的淀粉酶能将淀粉分解成麦芽三糖<sup>[14]</sup>。通过对淀粉糖产物的分析, 为微生

基金项目 2011 年云南师范大学大学生科研训练基金项目-宜宾五粮液酒厂周边根霉产糖化酶能力筛选及其固体发酵条件优化(ky-2011-119)。

收稿日期: 2012-09-27

作者简介: 尹城明(1987-), 男, 云南大理人, 在读本科, 生物技术专业。

通讯作者: 唐湘华, E-mail: txhact@gmail.com。

优先数字出版时间 2012-11-22; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20121122.0903.002.html>。

物彻底发酵糖产物,提高转化率奠定基础。本实验选取了玉米粉、高粱粉、小麦粉、黄豆粉、小米粉、苦荞粉和菊芋粉等在酿酒中经常用到的酿酒原料为实验材料,分别用自己筛选产糖化酶根霉菌、市售糖化酶、异淀粉酶和市售 $\alpha$ -淀粉酶进行降解对比试验,并应用薄层分析法对酿酒原料的分解产物进行分析比较,了解水解产物组成,旨在如何对不同的酶进行组合,加强应用价值理论基础。

本试验根据不同的微生物产生的液化性淀粉酶和糖化性淀粉酶的特点,考虑在相同pH值、相同添加酶活单位、相同反应温度条件下进行对比试验,了解水解产物的特点。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料、试剂及仪器

#### 1.1.1 材料

酿酒原料:经0.125 mm筛子过筛的玉米粉、高粱粉、小麦粉、黄豆粉、小米粉、苦荞粉和菊芋粉。

酶液的制备:产糖化酶根霉菌K-1(糖化酶I)(1000 IU/g)、糖化酶II(市售)(10000 IU/g)、异淀粉酶III(1600 IU/g)、 $\alpha$ -淀粉酶IV(市售)(3000 IU/g)。分别将糖化酶I、糖化酶II、异淀粉酶III和 $\alpha$ -淀粉酶IV用pH7.0缓冲液稀释为100 IU/mL酶液,振荡混匀后转入离心管中,以5000 r/min离心5 min,取上清液备用。

薄层层析展开液的配制:取35 mL正丁醇,50 mL乙酸和15 mL水,混合均匀后再加总体积10%的甲醇,待用。

薄层层析显色剂的配制:取1 mL苯胺,并称取1 g二苯胺,然后加5 mL 85%的磷酸,再加50 mL丙酮充分溶解,待用。

薄层层析标准液的配制:配制1%浓度的葡萄糖、果糖、木糖、麦芽糖和糊精溶液。

#### 1.1.2 试剂及药品

正丁醇、乙酸、甲醇、苯胺、二苯胺、85%磷酸、丙酮、蒸馏水。

#### 1.1.3 设备及仪器

硅胶板,电炉,UV-2000紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司),恒温水浴箱。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 还原糖含量的测定

依照参考文献进行<sup>[15]</sup>。

### 1.2.2 各种酶对同一酿酒原料的分解能力

分别配制2%的玉米粉、高粱粉、小麦粉、黄豆粉、小米粉、苦荞粉、菊芋粉浆液50 mL各4份(pH值自然),倒入已编号的小三角瓶中,于50℃恒温振荡水浴锅中保

温5 min,分别加入1 mL的糖化酶I、糖化酶II、异淀粉酶和 $\alpha$ -淀粉酶IV,每隔10 min分别从各体系中取样1次,取至60 min,共取7次。每次取0.1 mL上清液,加1.9 mL蒸馏水和3 mL DNS,沸水浴5 min,流水冷却加蒸馏水10 mL后,以0 min时为空白对照,测其还原糖含量,计算分解率。

### 1.2.3 各种酶对不同酿酒原料的分解能力

分别配制2%的玉米粉、高粱粉、小麦粉、黄豆粉、小米粉、苦荞粉、菊芋粉浆液50 mL各4份(pH值自然),倒入已编号的小三角瓶中,于50℃恒温振荡水浴锅中保温5 min,分别加入制备好的1 mL糖化酶II、异淀粉酶、 $\alpha$ -淀粉酶IV,每隔10 min分别从各体系中取样1次,取至60 min,共取7次。每次取0.1 mL上清液,加1.9 mL蒸馏水和3 mL DNS,沸水浴5 min,流水冷却加蒸馏水10 mL后,以0 min时为空白对照,测其还原糖含量。

### 1.2.4 薄层样品制备

从上述各反应体系中取出5 mL反应液于10 mL离心管中,在5000 r/min下离心5 min。从中取上清液0.5 mL于1.5 mL离心管中,再加入0.5 mL纯乙醇,振荡后于15000 r/min下离心5 min,取上清液于1.5 mL离心管中编号待用。

### 1.2.5 各酶分解不同酿酒原料产物的薄层分析

取出硅胶板,用铅笔在离硅胶板底部1 cm处画1条线,并在线上每隔1 cm处画1个点,后在硅胶板上方做标记。分别取出上述实验中经处理过的备用反应液和对照液1  $\mu$ L分别点样,使用葡萄糖、果糖、木糖、麦芽糖、糊精为标准样品。样品为玉米粉、小麦粉、高粱粉、小米粉、苦荞粉、黄豆粉和菊芋粉。样品烘干后,将硅胶板底部置于展开液中,展开液不能掩过铅笔所画的线,待展开液至离硅胶板顶端1 cm左右时,即可取出烘干,再将硅胶板置于显色剂中浸泡20 s左右,取出后置于电炉上方烘干至有明显条带出现,照相记录。每块硅胶板可反映出1种酶分解不同酿酒原料后的产物。

### 1.2.6 双酶法对玉米粉分解能力及其产物薄层的比较

配制2%的玉米粉浆液150 mL,加入3 mL的 $\alpha$ -淀粉酶IV,于70℃恒温振荡水浴锅中反应,直到用碘液检测反应液不变蓝时,取出0.1 mL上清液,测其还原糖含量。另外从体系中取出0.5 mL于1.5 mL离心管中,加入0.5 mL纯乙醇,以15000 r/min离心5 min,取上清液做薄层分析。完成后将反应体系分成每份50 mL共3份,分别加入1 mL的糖化酶I、糖化酶II和异淀粉酶III,计时,50℃反应30 min后,取上清液0.1 mL,以0 min时为对照组测其还原糖含量,并取出0.5 mL上清液处理后进

行薄层分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 各酶对同一酿酒原料分解能力的比较

糖化酶 I 和糖化酶 II 属于糖化型淀粉酶,而异淀粉酶 III、 $\alpha$ -淀粉酶 IV 属于液化型淀粉酶。对不同酶对同一酿酒原料的分解能力进行比较,结果见图 1。

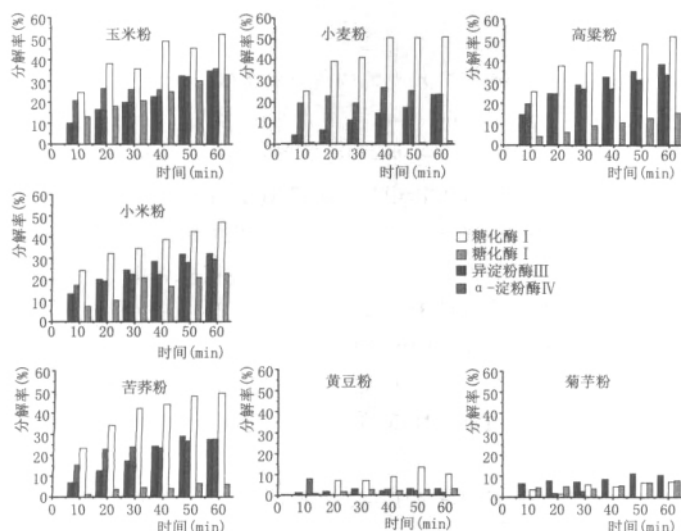


图 1 不同酶对同一酿酒原料的分解能力比较

由图 1 可知,除黄豆粉和菊芋粉外,糖化酶 I 对其他 5 种酿酒原料的分解率在 60 min 时都达到了 50% 左右,均明显高于糖化酶 II;糖化酶 I 对小麦粉和苦荞粉的分解作用较其他酶高出的最多,异淀粉酶 III、 $\alpha$ -淀粉酶 IV 对酿酒原料的分解率相差不多,形成的还原糖产物较少。4 种没形成的还原糖含量虽不同,但都相对较高,整体都有糖化效果。

### 2.2 4 种酶对不同酿酒原料的分解能力

对 4 种酶对不同酿酒原料的分解能力进行比较分析,其结果见图 2。由图 2 可看出,糖化酶 I 对酿酒原料的分解能力都较强,以玉米、高粱、小麦、小米、苦荞最为明显,分解率都达 50% 左右。糖化酶 II 对玉米和小米的分解能力较强,以玉米粉最为显著,分解率为 33.2%。异淀粉酶 III 对玉米和高粱的分解能力较强,以高粱最为明显,达到 38.3%,此外,异淀粉酶对菊芋粉也有较强的分解能力。 $\alpha$ -淀粉酶 IV 对玉米和高粱的分解能力较强,以玉米最高,为 35.98%。

从试验可知,不同来源的酶对不同的原料降解能力不同,选择使用酶制剂必须根据其对原料的专一性进行选择。根据降解能力的强弱可知,糖化酶 I 适合于降解玉米、高粱、小麦、苦荞和小米等酿酒原料;糖化酶 II 适合于降解玉米和小米原料;异淀粉酶 III 适合于降解高粱、玉米、小米和菊芋粉; $\alpha$ -淀粉酶 IV 适合于降解玉米和高

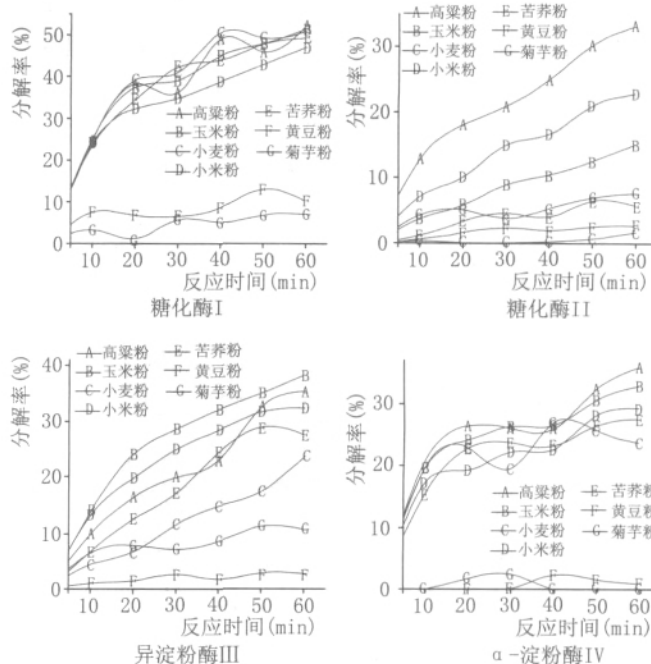
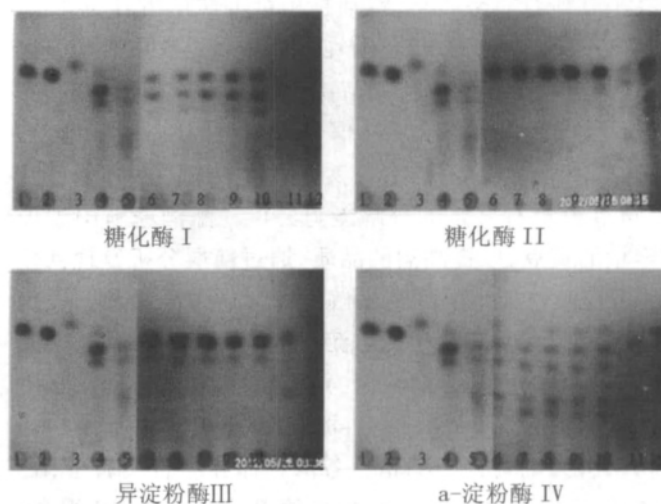


图 2 4 种酶对不同酿酒原料的分解能力

粱。各种酶对不同原料都有一定的专一性,其催化的产物成分肯定会有所不同。

### 2.3 4 种酶分解不同酿酒原料产物的薄层分析

图 3 为 4 种酶分解不同酿酒原料产物的薄层分析结果。由图 3 可看出,糖化酶 I 将酿酒原料中的淀粉分解成为葡萄糖和麦芽糖;糖化酶 II 将酿酒原料中的淀粉分解为葡萄糖;异淀粉酶 III 将酿酒原料中的淀粉分解为麦芽糖;而  $\alpha$ -淀粉酶 IV 将酿酒原料中的淀粉分解为葡萄糖和糊精。

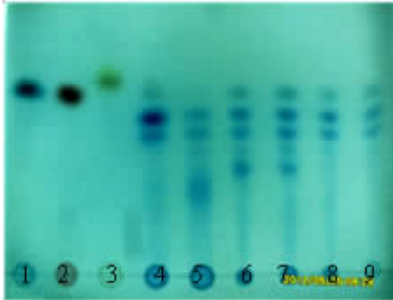


(注:1:葡萄糖;2:果糖;3:木糖;4:麦芽糖;5:糊精;6:玉米粉水解产物;7:小麦粉水解产物;8:高粱粉水解产物;9:小米粉水解产物;10:苦荞粉水解产物;11:黄豆粉水解产物;12:菊芋粉水解产物)

图 3 4 种酶分解不同酿酒原料产物的薄层分析

### 2.4 双酶法对玉米粉分解能力及其产物薄层的比较

双酶法对酿酒原料分解能力,以总分解率(%)表示,为:加 $\alpha$ -淀粉酶 IV 为 42.717%; $\alpha$ -淀粉酶 IV+糖化酶 I 为 52.568%; $\alpha$ -淀粉酶 IV+糖化酶 II 为 56.233%; $\alpha$ -淀粉酶 IV+异淀粉酶 III 为 52.450%。由此结果看出, $\alpha$ -淀粉酶 IV 和糖化酶 I、糖化酶 II、异淀粉酶 III 的 3 种组合在玉米粉的分解率上都有所上升,其中以糖化酶 II 上升较多。图 4 为双酶法分解玉米粉的产物薄层分析结果。



(注:1:葡萄糖;2:果糖;3:木糖;4:麦芽糖;5:糊精;6:只加 $\alpha$ -淀粉酶 IV;7: $\alpha$ -淀粉酶 IV 和糖化酶 I 组合;8: $\alpha$ -淀粉酶 IV 和糖化酶 II 组合;9: $\alpha$ -淀粉酶 IV 和异淀粉酶 III 组合)

图 4 双酶法分解玉米粉的产物薄层分析

由图 4 可看出,只加 $\alpha$ -淀粉酶后玉米粉中的淀粉被分解为葡萄糖和糊精; $\alpha$ -淀粉酶 IV 和糖化酶 I 组合,葡萄糖的含量有所增加; $\alpha$ -淀粉酶 IV 和糖化酶 II 或异淀粉酶 III 组合,糊精被分解为以麦芽糖和葡萄糖为主。

### 3 结论

在实验中,除黄豆粉和菊芋粉外,糖化酶 I 对其他酿酒原料的分解率在 60 min 时都能达到 50%左右,都明显高于其他对照酶产品,特别是相对于糖化酶 II,更是高出许多。K-1 根霉菌糖化酶在 pH 值中性条件下具有相当高的分解率,该酶的使用解决了酿酒生产中用 $\alpha$ -淀粉酶液化后需要加酸降低 pH 值进行糖化的一直难以解决的问题,简化生产工艺,节约大量生产成本。此外糖化酶 I 对黄豆粉也有一定的分解能力,可在酿酒原料中添加一定量的黄豆,以提高酒的品质。通过薄层分析发现糖化酶 I 将酿酒原料中的淀粉水解为葡萄糖和麦芽糖,表明根霉菌中还存在其他种类的淀粉酶。而糖化酶 II 将酿酒原料中的淀粉水解为葡萄糖,异淀粉酶 III 将酿酒原料中的淀粉水解为麦芽糖,而 $\alpha$ -淀粉酶 IV 将酿酒原料中的淀粉水解为葡萄糖和糊精,各酶样品在组合实验中, $\alpha$ -淀粉酶 IV 分别和糖化酶 I、糖化酶 II、异淀粉酶 III 组合,其玉米粉的分解率都有所上升,以 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶 II

的组合上升较多。

在后期的工作中将对根霉菌中的糖化酶进行分离提纯,研究其酶学性质,并进行酿酒实验,针对不同的原料进行组合配比,为该酶曲用于酿酒和制糖工业提供理论基础。同时需要强调的是不同来源的酶其对原料降解能力是不同的,选择高效的酶制剂必须根据其原料的专一性进行选择。

### 参考文献:

- [1] 张秀媛,袁永俊,何扩.糖化酶的研究概况[J].食品研究与开发,2006,27(9):163-166.
- [2] 吴荣荣,张志民,张煜行,佟兰欣,等.黑曲霉固态发酵产液化酶和糖化酶的研究[J].中国酿造,2012,31(1):107-111.
- [3] 钟浩,谭兴和,熊兴耀,苏小军,胡亚平.糖化酶研究进展及其在食品工业中的应用[J].保鲜与加工,2008,46(3):1-4.
- [4] 张剑,易华锋,张开诚,林庭龙.双酶法水解玉米淀粉的工艺研究[J].酿酒科技,2009(3):95-102.
- [5] 孙子羽,迟乃玉,王宇,李兵,张庆芳.低温生淀粉糖化酶菌株 RS01 分离及其酶学性质[J].微生物学通报,2010,37(6):798-802.
- [6] 陈波,李大力,杨树林.酸性-淀粉酶生产菌株的筛选和酶的性质研究[J].食品科学,2005,26(5):119-122.
- [7] 刘艳,赵海,戚天胜,唐秋琳,黄宇峰.一株运动发酵单胞菌 Zy21 快速生产乙醇[J].应用与环境生物学报,2007,13(1):69-72.
- [8] 许少春,李艳丽,柳永,许尧兴.饲用葡甘露低聚糖的酶法提取[J].饲料工业,2011,32(2):47-50.
- [9] 陈冠军,罗贵氏,程玉华.黑曲霉糖酶的分离纯化及其性质[J].微生物学报,1991,31(3):215-220.
- [10] 莫德姣,刘君梁,洗亮,段承杰,冯家勋.一株曲霉的一种中温糖化酶的纯化及其部分酶学特性[J].基因组学与应用生物学,2010,29(3):434-440.
- [11] 彭惠,雷寅,刘源涛,汪颖.海洋环境来源的淀粉酶 AmyP 对生玉米淀粉的降解特性[J].中国生物工程杂志,2010,32(7):79-83.
- [12] Kraiyot Saelim, Y aowaluk Dissara, Aran H-Kittikun. Saccharification of cassava starch by *Saccharomycopsis fibuligera* YCY1 isolated from Loog-Pang (rice cake starter)[J]. Songklanakarin J. Sci. Technol, 2008,30 (Suppl.1):65-71.
- [13] Tresnawati Purwadaria et al. Synergistic activity of enzymes on oil palm factory wastes[J]. Biotropia, 2003,20:1-10.
- [14] Moumita Karmakar, Rina Rani Ray. A Maltotriose producing thermostable amylase from *Bacillus* sp. KR11[J]. Microbiol. Biotech. Res., 2011, 1 (3):91-99.
- [15] 白利涛,张丽萍.糖化酶活力测定方法研究[J].酿酒科技,2012(2):1-4.

欢 迎 订 阅 《 酿 酒 科 技 》