

HPLC 分析大曲中酶组分的研究

张强¹,左勇¹,鲍楠²

(1.四川理工学院生物工程学院,四川 自贡 643000;2.大连职业技术学院,辽宁 大连 116037)

摘要: 在提取条件为料液比 1:2、pH 值 6.0、温度 30 ℃、提取时间 2 h 下,用水相制取不同大曲的酶组分溶液,并按常规方法测定其液化力、糖化力。以 α -淀粉酶、糖化酶水溶液作为标样,对提取液中酶组分进行高效液相色谱(HPLC)分析,分别计算标样和提取液对应峰的峰面积,进行峰面积比较并换算为酶活。与常规方法测试结果进行比较,HPLC 分析结果与常规分析结果一致。

关键词: 高效液相色谱; 大曲; 质量; α -淀粉酶; 糖化酶

中图分类号:TS262.3;O657.72;TS261.1;Q55 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2013)06-0107-03

Study on Enzyme Components of Daqu by HPLC Analysis

ZHANG Qiang¹, ZUO Yong¹ and BAO Nan²

(1.Bioengineering Dept, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000;

2.Dalian Vocational & Technology College, Dalian, Liaoning 116037, China)

Abstract: In the extracting conditions of 1:2 ratio of raw materials and liquid, pH 6.0, temperature at 30 ℃, and 2 h extracting time, enzyme components solution of different Daqu were prepared by aqueous phase, and its liquefying power and saccharifying power were measured by conventional methods. α -amylase solution and saccharifying enzyme solution were used as the standard samples, and HPLC analysis of enzyme components of the extracting solution was carried out, the peak areas of the standard samples and the extracting solution were calculated respectively and then converted into enzyme activity, and their peak areas were compared. HPLC analytical results were in accord with conventional analytical results in the experiments.

Key words: HPLC; Daqu; quality; α -amylase; saccharifying enzyme

大曲在白酒的酿造过程中是作为糖化剂、增香剂使用,有着举足轻重的作用。大曲一般采用小麦、大麦和豌豆等为原料,经粉碎拌水后压制成砖块状的曲坯,自然网罗制曲环境中的微生物接种发酵,微生物在曲坯中彼此消长,自然积温转化并风干而成的一种多酶、多菌的微生物生态制品^[1]。大曲中的酶根据各自不同的催化功能大致可分为糖化酶、液化酶、酯化酶、酸性蛋白酶、脂肪酶、半纤维素酶、纤维素酶、单宁酶、果胶酶等酶类^[2]。

大曲生产发酵积累的酶对随后的窖池发酵起着重要作用,如液化、糖化、酯化等。部分酶也因此成为大曲的常规质量指标体系的重要组成。大曲质量好坏直接关系到后续的白酒生产过程,判别大曲质量对白酒生产有着重要的意义。但由于大曲是酶、微生物的混合制剂,还无法对其质量进行精准的判断,目前常采用感官识别结合化学方法分析其糖化、液化、酯化以及发酵力等参数^[3]。

本研究将大曲中的蛋白以水相提取,以 α -淀粉酶、糖化酶水溶液为标样采用高效液相色谱(HPLC)进行分

析,并与常规化学法测定的糖化力、液化力进行比对,以此探索大曲质量指标(酶组分)的快速测试方法。

1 材料与方法

1.1 材料

大曲:泸州老窖、水井坊、郎酒、丰谷成品曲药,酿酒重点实验室提供。

酶: α -淀粉酶,生化试剂 BR,北京奥博星生物技术有限责任公司;糖化酶,生化试剂 BR,北京奥博星生物技术有限责任公司。

仪器:高效液相色谱,Agilent 1100 系列,美国安捷伦公司。其余试剂和设备均为实验室常规配备。

1.2 实验方法

大曲酶蛋白液制取:大曲粉碎,与蒸馏水混合,料液比 1:2、pH6、温度 30 ℃、提取时间 2 h,提取时 60 r/min 匀速搅拌,提取完后用真空泵抽滤,滤液 4000 r/min 离心 15 min,上清液即为大曲酶蛋白液。

基金项目:酿酒与生物技术四川省重点实验室开放基金(NJ2009-12)。

收稿日期:2012-11-16

作者简介:张强(1975-),男,四川沐川人,副教授,硕士研究生,主要从事发酵工程方面的研究。

优先数字出版时间:2012-12-26;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20121226.1102.001.html>。

大曲液化力测定:根据 QB/T 1803—1993^[4]测定。

大曲糖化力测定:根据 QB/T 1803—1993^[4]和 GB/T 5009.7—2008^[5]进行测定。

高效液相色谱分析方法^[6-7]:色谱柱:C₁₈柱(4×150 mm);柱温:30℃;检测波长λ:280 nm;进样量:10 μL;流动相A:异丙醇、B:0.1 mol/L NaH₂PO₄;流速:0.6 mL/min;洗脱方式:梯度洗脱,使A相在30 min从20%升至60%、B相在30 min从80%降到40%。

2 结果与分析

2.1 大曲液化力测定

对丰谷大曲、泸州老窖大曲、水井坊大曲、郎酒大曲曲药蛋白(酶)提取液和α-淀粉酶标样进行淀粉酶酶活的吸光值测定,分别测定3个平行样,求算术平均,结果见表1。

表1 各试样大曲吸光值测定结果

项目	丰谷大曲	泸州老窖大曲	水井坊大曲	郎酒大曲	α-淀粉酶标样
吸光值1	0.342	0.231	0.401	0.425	0.112
吸光值2	0.351	0.22	0.393	0.422	0.117
吸光值3	0.348	0.227	0.398	0.418	0.116
平均值(A)	0.347	0.226	0.397	0.422	0.115
α-淀粉酶活力(U/mL)	3.73	4.108	3.591	3.522	4.619
液化力换算	0.808	0.889	0.777	0.763	1

根据吸光值对查附表得到各样液中α-淀粉酶活力。α-淀粉酶的酶活力为4.619 U/mL,此为稀释50倍的酶活力,原酶活力为230.950 U/mL,测得α-淀粉酶酶活力小于标称的酶活力,可能是由于α-淀粉酶在贮藏过程中有部分酶变性失活造成的。以α-淀粉酶酶活力为1,则定其液化力比值为“丰谷大曲:泸州老窖大曲:水井坊大曲:郎酒大曲:α-淀粉酶=0.808:0.889:0.777:0.763:1.000”。泸州老窖大曲的液化力最高。

2.2 大曲糖化力测定

用葡萄糖标液滴定每10 mL碱性酒石酸铜溶液(甲、乙液各半)的相当量,3个平行样算术平均值为10.49 mL,即10 mL碱性酒石酸铜溶液相当于10.49 mg葡萄糖。

分别用丰谷大曲、泸州老窖大曲、水井坊大曲、郎酒大曲曲药和糖化酶标样糖化(20 g/L)淀粉溶液1 h的糖化液经处理后滴定10 mL酒石酸铜溶液(甲、乙液各半),以计算糖化液中含还原糖的含量,分别测定3个平行样,求算术平均,结果见表2。

由表2可知,4个大曲糖化(20 g/L)淀粉溶液1 h后,糖化液中还原糖含量为丰谷大曲0.725 mg/mL,泸州老窖大曲0.568 mg/mL,水井坊大曲0.538 mg/mL,郎酒大曲0.588 mg/mL·h,糖化酶标样的糖化力为1.262 mg/mL·h。以糖化酶的糖化力为1,则它们的糖化力比值为“丰谷大曲:泸州老窖大曲:水井坊大曲:郎酒大曲:糖化酶=0.575:

表2 各试样大曲滴定酒石酸铜溶液结果

项目	丰谷大曲	泸州老窖大曲	水井坊大曲	郎酒大曲	糖化酶
消耗体积1(mL)	14.41	18.5	19.42	17.79	8.3
消耗体积2(mL)	14.53	18.46	19.51	17.84	8.24
消耗体积3(mL)	14.44	18.48	19.58	17.89	8.19
平均消耗体积(mL)	14.46	18.48	19.5	17.84	8.31
糖化力(mg/mL·h)	0.725	0.568	0.538	0.588	1.262
糖化力换算	0.575	0.45	0.426	0.466	1

0.450:0.426:0.466:1.000”。其中,丰谷大曲(20 g/L)淀粉溶液1 h后每毫升含还原糖量最高,说明丰谷大曲的糖化力最强,郎酒大曲、泸州老窖大曲次之,水井坊大曲的糖化力最弱。

2.3 HPLC 分析

对α-淀粉酶、糖化酶以及4个大曲提取液在相同的条件下进行HPLC过柱分析,结果见图1、图2。

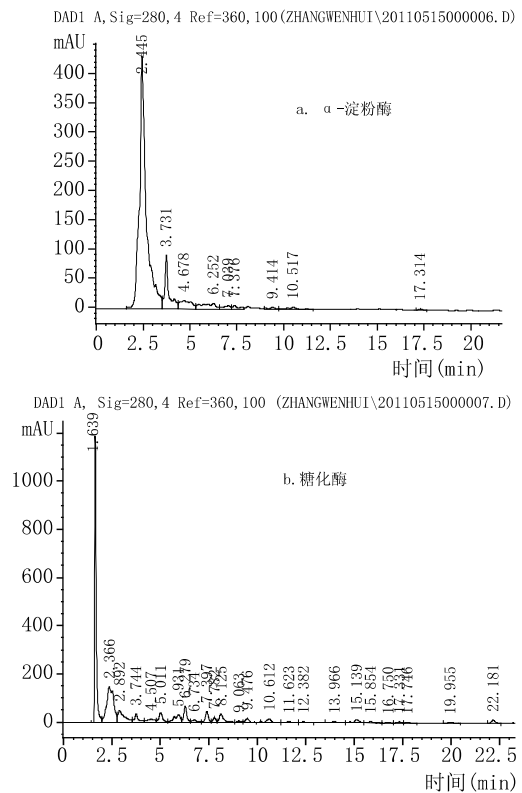


图1 酶样液相色谱分析峰图

从图1可知,α-淀粉酶的最大吸收峰在2.44 min附近,糖化酶的最大吸收峰在1.64 min附近,酶液吸收峰较多的原因应是纯度不高、贮存时间长所导致,但其最大吸收峰仍然是代表糖化酶、α-淀粉酶。对应与4种大曲吸收峰图(图2),在1.64 min、2.44 min附近都有相应的吸收峰,表明大曲样中都含有糖化酶、α-淀粉酶成分。

将图中吸收峰面积依据α-淀粉酶、糖化酶特征峰进行换算,其结果见表3。

由表3的换算数据与表1、表2进行比较可知,液化

表3 HPLC峰面积换算结果

项目	丰谷大曲	泸州老窖大曲	水井坊大曲	郎酒大曲	α -淀粉酶标样	糖化酶
吸收峰面积1.64 min	1075.7	828.4	792.8	863.2	—	1862.3
糖化力换算	0.578	0.445	0.425	0.464	—	1
吸收峰面积2.44 min	39270.5	45242.8	38149.4	37498.7	49108.3	—
液化力换算	0.8	0.921	0.777	0.764	1	—

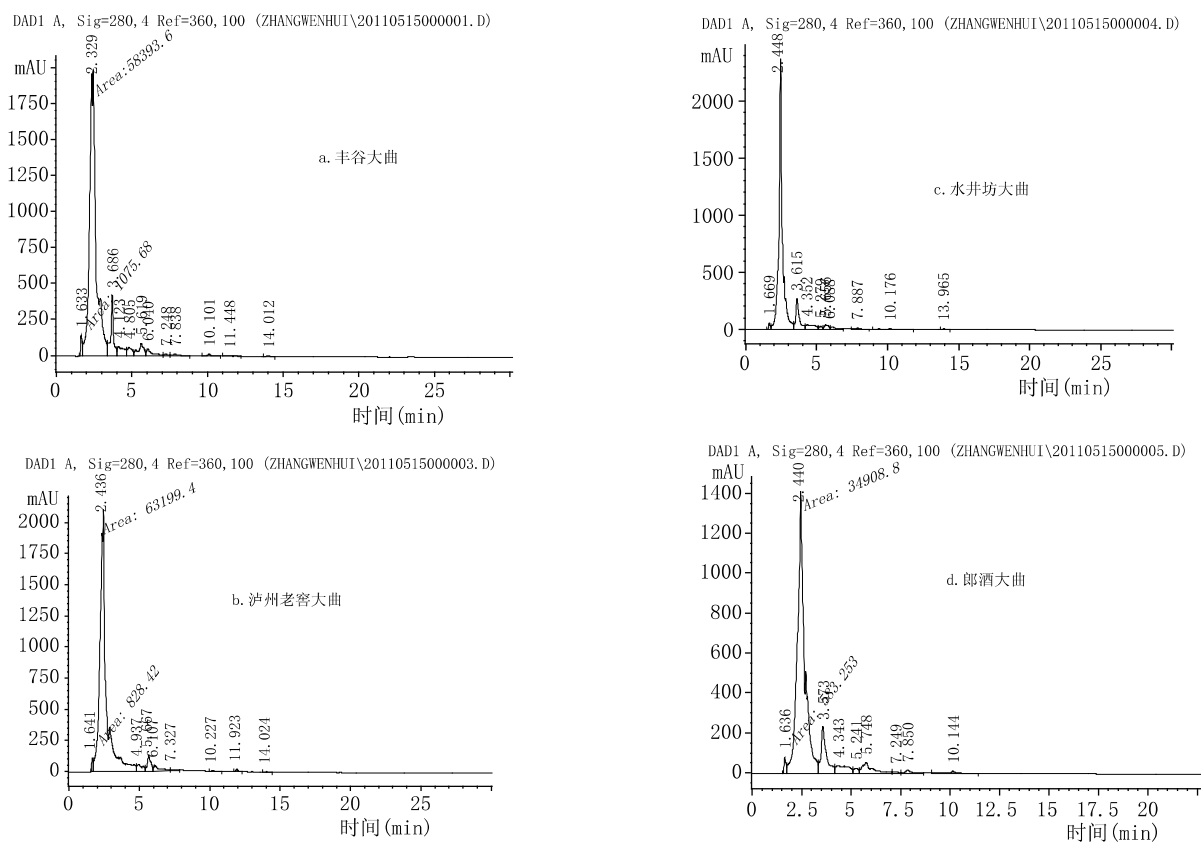


图2 大曲高效液相色谱分析峰图

力换算比值除泸州大曲药有7.6%的偏差外,化学法测定的液化酶活力与采用HPLC分析结果一致。糖化酶活力的化学法测定结果与HPLC分析结果高度一致。表明HPLC分析大曲中活性蛋白成分的方法可行。

从4个大曲的吸收峰图可以看出,在提取液中还有多种蛋白(酶)组分,如酯化酶、蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶等,但由于本研究使用的液相色谱仪为半制备型,不能收集分离组分,故而不能确定此次所测定的大曲中还含有的蛋白(酶)种类和含量,若有标酶样品,通过吸收峰对比也可进行HPLC定性定量分析。

3 结论

以提取条件为料液比1:2、pH值6.0、温度30℃、提取时间2h,用水相制取不同的酒曲的酶组分溶液,并按常规测定其液化力、糖化力。以 α -淀粉酶、糖化酶水溶液作为标样,对提取液中酶组分进行高效液相色谱(HPLC)分析,分别计算标样和提取液对应峰的峰面积,进行峰面积比较并换算为酶活。与常规方法测试结果进行比较,

HPLC分析结果与常规分析结果一致。这一结果表明HPLC适用于大曲的质量评价,HPLC的精确性和可同时分析多组分特性表明,该法在曲药质量测定中有较好的应用前景。

由于实验条件的限制,未能对更多的酶组分进行分析,且方法是否适用于所有的酶组分还有待进一步的研究。在后续的研究工作中结合目前蛋白质组学研究中运用的新方法应能对大曲的酶组分进行快速的分析。

参考文献:

- [1] 谢小林,龙立丽.大曲生产中新技术的应用[J].农村新技术,2009(20):25.
- [2] 周恒刚.大曲的特征[J].酿酒科技,1993(2):85.
- [3] 沈才洪,张良,应鸿,等.大曲质量标准体系设置的探讨[J].酿酒科技,2005(11):19.
- [4] QB/T 1803—1993,工业酶制剂通用试验方法[S].
- [5] GB/T 5009.7—2008,食品中还原糖的测定[S].
- [6] 唐玲玲,夏明.高效液相色谱法在蛋白质分离检测中的应用[J].农产品加工·学刊,2009(1):89-92.