

清香型大曲淀粉水解酶系解析

张秀红^{1,2}, 马冰¹, 孔健³, 赵景龙¹

(1.山西杏花村汾酒厂股份有限公司, 山西 汾阳 032205; 2.山西师范大学生命科学学院, 山西 临汾 041000; 3.山东大学生命科学院, 山东 济南 250100)

摘要: 对清香型大曲中可能存在的淀粉代谢相关酶类及各自催化作用进行全面分析, 并从 Brenda 数据库中搜索酿酒相关的淀粉水解酶, 了解不同来源淀粉水解酶类的酶学特征, 并从基因组角度分析酿酒微生物合成的淀粉代谢酶类, 对酿酒微生物有更深入的认识, 为选育理想的酿酒微生物提供理论依据。

关键词: 淀粉水解酶类; 酿酒微生物; 基因组

中图分类号: TS261.1; TS262.3; Q93-3; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2012)11-0046-05

Analysis of Starch Hydrolytic Enzymes of Fen-flavor Daqu

ZHANG Xiuhong^{1,2}, MA Bing¹, KONG Jian³ and ZHAO Jinglong¹

(1. Shanxi Xinghuacun Fenjiu Distillery Co. Ltd, Fenyang, Shanxi 032205; 2. College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041000; 3. College of Life Science, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: The enzymes related to starch metabolism possibly-existed in Fen-flavor Daqu and their catalysis were analyzed comprehensively. Besides, starch hydrolytic enzymes related to liquor-making were searched from Brenda database to compare the enzymatic characteristics of enzymes from different sources. At the same time, starch metabolic enzymes from the synthesis of liquor-making microbes were analyzed in genomic levels in order to know more about liquor-making microbes.

Key words: starch hydrolytic enzymes; liquor-making microbes; genomes

酒曲是我国酿酒技术的重大发明, 是白酒生产的传统用曲, 是世界上最早的一种多种微生物的复合酶制剂, 也是迄今最为复杂的主要靠感官评价的生物制剂。清香型大曲用于酿造汾酒等著名的清香型白酒, 一般以大麦、豌豆和井水为原料踩制而成, 是我国古老的曲种之一。其中大麦营养丰富, 尤其淀粉含量高, 适合多种微生物生长, 但纤维素含量高, 曲坯质地过于疏松, 有上火快、退火快的缺点; 而豌豆含蛋白质高, 淀粉少, 粘性大, 与大麦配合使用, 可克服其上火快、退火快、成熟快的缺点^[1]。清香型大曲的一个特点是自然接种, 充分利用制曲原料及制曲环境中的微生物, 因而微生物种类较多。清香型大曲的制作工艺主要包括原料粉碎混合、拌和踩曲、入房排列、上霉、晾霉、潮火、大火、后火等过程, 众多的微生物在制曲过程中, 先后交替生长繁殖, 合成不同的代谢产物, 最后共同作用于酿酒过程。淀粉质原料酿酒的原理是在淀粉酶的作用下, 使淀粉降解转化为还原糖, 然后由酵母菌将还原糖转化为乙醇, 同时产生各种香气成分。因此, 淀

粉水解酶是酒曲中最为重要的水解酶类, 直接影响原料的转化率及出酒率^[2]。从大曲的制作过程看, 涉及到的淀粉水解酶种类较多, 微生物来源不同, 可以是分泌型的胞外酶, 也可能是菌体死亡释放的胞内酶, 是个相当复杂的酶制剂。本研究则是利用生物信息学的方法充分挖掘数据库, 从蛋白及基因组水平分析清香型大曲涉及的微生物及淀粉水解酶类, 以期深入了解影响酿酒大曲淀粉转化的因素, 为大曲的研究提供必要的科学信息, 加速大曲的专业化发展。

1 清香型白酒大曲涉及的微生物及淀粉水解酶

对于汾酒微生物的研究, 自 1965 年汾酒试点工作对清茬曲、红心曲和后火曲 3 种大曲中微生物种类、数量及消长规律做了大量分析, 及后续的研究发现, 汾酒大曲中的微生物主要有: 酵母属, 包括酿酒酵母、汉逊酵母、假丝酵母、拟内孢霉等; 霉菌属, 包括曲霉、根霉、梨头霉和毛霉等; 细菌类, 包括乳酸菌、醋酸菌、芽孢杆菌等。

基金项目: 山西省自然科学基金(2012011034-5)。

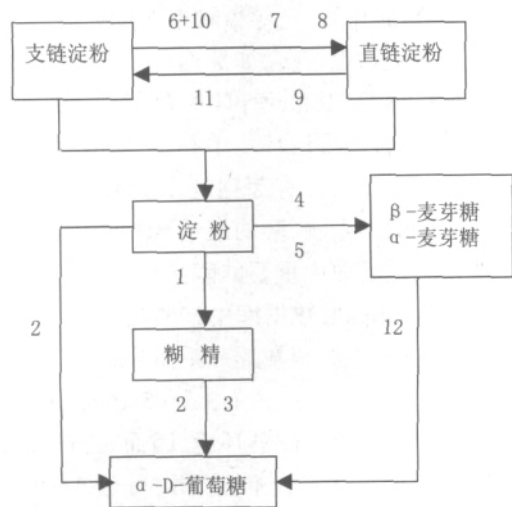
收稿日期: 2012-07-17

作者简介: 张秀红(1970-), 女, 山西襄汾人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事应用微生物研究。

通讯作者: 赵景龙(1963-), 男, 高级工程师, Email: zhaojinglong525@163.com。

优先数字出版时间: 2012-10-15; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20121015.1437.004.html>。

汾酒大曲中涉及的淀粉水解酶类较多(见图1),大致可以分为两类,一类是使淀粉大分子降解为小分子的,如 α -淀粉酶、糖化酶、 β -淀粉酶、脱支酶以及麦芽糖淀粉酶等;另一类是能水解淀粉类底物,同时还能使还原糖分子减少的,如 α -葡萄糖苷酶、葡聚糖分支酶和葡聚糖转移酶。各种酶的特点如下。



1. α -淀粉酶; 2. 糖化酶; 3. 寡-1, 76-葡萄糖苷酶; 4. β -淀粉酶;
5. 生麦芽糖 α -淀粉酶; 6. 磷酸化酶; 7. 普鲁兰酶; 8. 异淀粉酶;
9. 1, 4- α -葡聚糖分支酶; 10. 淀粉- α -1, 6-葡萄糖水解酶;
11. 4- α -葡聚糖转移酶; 12. α -葡萄糖苷酶

图1 淀粉代谢相关酶类

α -淀粉酶:系统名为4- α -D-葡聚糖水解酶,又称液化淀粉酶、内切淀粉酶和淀粉糊精酶,能从淀粉长链内部切成短链的糊精,使淀粉糊化物的粘度迅速降低。

糖化酶:系统名为淀粉-1,4- α -D-葡聚糖水解酶,或称作 α -1,4-葡萄糖苷酶,糖化型淀粉酶和葡萄糖淀粉酶。能把淀粉从非还原性末端水解 α -1,4-葡萄糖苷键产生葡萄糖,也能缓慢水解 α -1,6-葡萄糖苷键而转化为葡萄糖。

β -淀粉酶:系统名为 α -1,4-葡聚糖麦芽糖水解酶,又称外切型淀粉酶,它是从淀粉的非还原性末端以麦芽糖为单位顺次分解 α -1,4-糖苷键,同时使切下的麦芽糖还原性末端的葡萄糖残基构型转变成 β 型,故称为 β -淀粉酶。 β -淀粉酶不能水解 α -1,6-糖苷键,也不能跨越 α -1,6-糖苷键,水解作用在 α -1,6-键前2~3个葡萄糖残基处停止。

脱支酶:是专一性水解支链淀粉或糖原的 α -1,6-糖苷键,从而将侧支切下形成长短不一的直链糊精的一类酶。根据其作用方式可分为间接脱支酶和直接脱支酶。

间接脱支酶包括寡-1,6-葡糖苷酶和淀粉 α -1,6-葡萄糖水解酶。寡-1,6-葡糖苷酶,也称低聚葡萄糖苷酶,能内切水解 α -淀粉酶作用于淀粉和糖原形成的异麦芽糖

和糊精中的 α -1,6-糖苷键。淀粉 α -1,6-葡萄糖水解酶,系统名为糖原磷酸化酶糊精6- α -葡萄糖水解酶,糖原分解时先由糖原磷酸化酶催化,从直链或支链淀粉的非还原端开始逐个切割淀粉链上的 α -1,4-糖苷键,产生葡萄糖-1-磷酸,形成含有单个葡萄糖残基的极限糊精,极限糊精中单个葡萄糖残基的 α -1,6-糖苷键可由该酶水解。

直接脱支酶根据对底物的专一性分为异淀粉酶和支链淀粉酶(普鲁兰酶)两类。异淀粉酶,系统名为糖原-6-葡聚糖水解酶,能水解支链淀粉分支点的 α -1,6-糖苷键,但不能水解由2~3个葡萄糖残基构成的侧支。普鲁兰酶,系统名为普鲁兰-6-葡聚糖水解酶,亦称支链淀粉酶、淀粉-1,6-葡萄糖苷酶。能专一性地切开支链淀粉分支点中的 α -1,6-糖苷键,切下整个分支结构,形成直链淀粉。I型普鲁兰酶可特异性水解普鲁兰糖和具有分支结构 α -1,6-糖苷键;II型普鲁兰酶既能水解普鲁兰糖和其他具有分支的 α -1,6-糖苷键,又能水解线性和分支结构的 α -1,4-糖苷键。异普鲁兰酶,系统名为普鲁兰-4-葡聚糖水解酶,又称异支链淀粉酶,对淀粉作用较弱。新普鲁兰酶,系统名为普鲁兰-4-D-葡聚糖水解酶,能有效水解普鲁兰糖和少量淀粉,在一个活性中心能水解和转移 α -1,4-糖苷键和 α -1,6-糖苷键。

α -葡萄糖苷酶:可从低聚糖类的非还原端切开 α -1,4-糖苷键,释放葡萄糖,或将游离的葡萄糖基转移到另一类底物形成 α -1,6-糖苷键,从而得到非发酵性糖。

生麦芽糖 α -淀粉酶:俗称麦芽糖淀粉酶,全称1,4- α -D-葡聚糖- α -麦芽糖基水解酶,是一类水解 α -1,4-D-葡萄糖苷键的内切淀粉酶,作用于淀粉及相关多聚糖、寡糖,产物为 α -麦芽糖。麦芽糖单位从淀粉链的非还原末端按顺时针方向被水解下来。麦芽糖淀粉酶非常独特,不同于典型的淀粉酶,它不但可快速水解利用直链淀粉或环状糊精,也能少量利用支链淀粉,具有多底物特性;而且还具有转糖基作用^[3]。

磷酸化酶:系统名为磷酸 α -D-葡萄糖转移酶,淀粉的水解除了水解途径外,还有磷酸解途径。淀粉磷酸解作用使磷酸根和产物葡萄糖结合在一起产生磷酸葡萄糖,主要的酶为淀粉磷酸化酶。磷酸化酶依据底物不同,可分为淀粉磷酸化酶、麦芽糖磷酸化酶和糖原磷酸化酶等。

1,4- α -葡聚糖分支酶:能将直链淀粉转化为支链淀粉,根据其产物不同又分为糖原分支酶和支链淀粉分支酶。支链淀粉分支酶又叫Q酶,Q酶可以把直链淀粉改造成支链淀粉,即从直链的任意一个 α -1,4-糖苷键切断,并把这段转移到直链上的任意一个葡萄糖残基的6羟基处形成 α -1,6-糖苷键,即形成一个支链。

4- α -葡聚糖转移酶:将 1,4- α -葡聚糖转移到其他葡萄糖或葡聚糖受体上。

淀粉水解过程涉及的酶类较多,但目前酿酒行业主要考虑的只有液化酶(即 α -淀粉酶)和糖化酶,其他酶类则关注很少,随着酶学研究及应用的不断深入,发现酒曲微生物可能提供的淀粉酶远不止于此。如管斌在研究大麦制麦过程中淀粉酶变化动态时发现,不同品种大麦原料 α -淀粉酶、 β -淀粉酶和极限糊精酶差异较大,其中 β -淀粉酶酶活最大,其次是 α -淀粉酶,极限糊精酶最差。酿酒大曲中的淀粉酶也有制曲原料的贡献,即大麦和豌豆产生的淀粉酶^[4]。刘长虹等人在研究少根根霉对酵母馒头品质影响时发现,酵母的 β -淀粉酶酶活为 25.5, α -淀粉酶的酶活只有 8.7;通过优化条件得到少根根霉 M-2 的 β -淀粉酶和 α -淀粉酶分别达到 48 和 17.3,说明少根根霉产生的 β -淀粉酶要高于 α -淀粉酶^[5]。很多微生物通过发酵能产生 β -淀粉酶,如蜡状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、多粘芽孢杆菌、假单胞菌等^[6]。

麦芽糖淀粉酶是一种新型的酶制剂,主要用于淀粉及食品烘焙工业。国外关于微生物来源的麦芽糖淀粉酶的研究已经向分子生物学水平深入进行, Kim Do Yeon 等将 1 株 *Bacillus subtilis* SUH4-2 的麦芽糖淀粉酶基因在 *B. subtilis* 168 中表达并对其启动子功能进行研究^[7]; Park K H 等研究了来源于嗜热脂肪芽孢杆菌的麦芽糖淀粉酶的转糖基作用方式与机理^[8]。麦芽糖淀粉酶主要来源于芽孢杆菌和放线菌,如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、栖热菌属、嗜热放线菌等。1961 年,首次报道了普鲁兰酶的产生菌产气气杆菌(*Aerobacter aerogenes*),后在多种微生物中发现有普鲁兰酶产生,多为芽孢杆菌^[9-10]。

2 清香型大曲微生物源淀粉水解酶的酶学特征

Brenda 是德国科隆大学生物化学研究院维护的酶学数据库,包含酶的来源、酶分子特征及酶学性质等方面的综合酶学信息系统,是酶学研究的重要资源。本研究搜索了 Brenda 数据库中关于淀粉水解酶的信息,将酿酒大曲中涉及的微生物及其淀粉水解酶的酶学信息整理见表 1。

从表 1 可以看出,产 α -淀粉酶的微生物主要有芽孢杆菌、乳杆菌和曲霉属的微生物,其中芽孢杆菌最多,如淀粉液化芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和漠海威芽孢杆菌。芽孢杆菌产 α -淀粉酶的最适 pH 值范围在 2~8 之间,多数酶在 pH5 以下都能保持酶的稳定性,因此,芽孢杆菌可能是酿酒环境中 α -淀粉酶的重要来源之一。乳酸

菌中的解淀粉乳酸细菌可直接利用淀粉质原料发酵,不必进行糖化,如乳杆菌中食淀粉乳杆菌和食木薯乳杆菌均能产生 α -淀粉酶,一般乳酸菌的耐酸能力比较强,其 α -淀粉酶在 pH4 的环境下易保持稳定。曲霉属的某些菌株如黑曲霉和米曲霉菌株产生的 α -淀粉酶最适 pH 值略高一点,为 4~7。

对于 β -淀粉酶,高等植物来源的研究较多。产生 β -淀粉酶的微生物也较多,如芽孢杆菌中的蜡状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌等,其最适 pH 值范围为 4.2~7,最适温度较低,可以适合在酿酒环境中利用。生麦芽糖淀粉酶也叫 α -麦芽糖酶,其来源有芽孢杆菌和乳酸菌,是酿酒环境中数量较多的微生物,酶的最适 pH 值为 4~6.5。

糖化酶是酒曲中重要的酶系,一般主要是丝状微生物产生。从 Brenda 数据库中搜索也主要是丝状微生物,如黑曲霉属微生物、根霉属和毛霉属微生物。尤其黑曲霉菌株最适 pH 值较低,多在 3.5~5 之间, pH 值稳定范围在 3~7 之间,较符合酿酒环境,因而是重要酿酒微生物。根霉菌的菌株最适 pH 值也较低,可达 4~4.5,可提供有效的糖化酶。

作用于支链淀粉的脱支酶中,异淀粉酶产生菌不多,与酿酒相关的微生物中只发现多株淀粉假单胞菌能合成,其 pH 值稳定范围为 2.5~7.5;普鲁兰酶的产生菌较多,主要是芽孢杆菌,酶的 pH 值稳定性在 4~11,在酿酒环境中作用还需要进一步考察。寡-1,6-葡萄糖苷酶作用于异麦芽糖和糊精中的 α -1,6-糖苷键,其主要来源于芽孢杆菌,最适 pH 值范围在 5~7.2,在酿酒环境下的酶活可能要有所限制。产生淀粉- α -1,6-糖苷酶的微生物较少,在 Brenda 数据库中发现,与酿酒相关的微生物只有酿酒酵母。该酶作用于淀粉磷酸化酶得到的极限糊精,但由于酿酒微生物中通过磷酸化酶途径降解淀粉比较少,极限糊精少,故淀粉- α -1,6-糖苷酶不属酒曲中主要酶类。

α -葡萄糖苷酶可释放葡萄糖,也可将葡萄糖转移给其他受体降低葡萄糖浓度,其在酿酒中的作用还需进一步考察。能合成 α -葡萄糖苷酶的微生物较多,如黑曲霉、芽孢杆菌、根霉、乳酸菌和酿酒酵母。其中黑曲霉来源的 pH 值稳定范围较低,达到 4.3~6;酿酒酵母来源的最适 pH 值也较低,为 4.2。芽孢杆菌、乳酸菌和根霉菌产生的最适 pH 值略高一点。

能将直链淀粉转化为支链淀粉的分支酶则是酒曲中不希望出现的酶, Brenda 数据库搜索后发现,该酶主要由芽孢杆菌产生,最适 pH 值较高,但最适温度较低,在酿酒环境中是否起作用还需进一步考察。

表 1 酿酒大曲中涉及的微生物淀粉酶

酶类	名称	菌株	最适 pH 值	pH 稳定性	最适温度 (°C)	酶类	名称	菌株	最适 pH 值	pH 稳定性	最适温度 (°C)
EC 3.2.1.1	α -淀粉酶	黑曲霉	7	4.5	80	EC 3.2.1.10	寡-1,6-葡萄糖苷酶	鲁西阿努斯毛霉菌	4.6	4~7.5	55
			5.5	5	-			凝结芽孢杆菌	5	5~9.1	62
		米曲霉	4	-	50			芽孢杆菌	5.9	4.3~10.7	74
			5.5	-	37			芽孢杆菌 F5	6	6~9	45
		黄曲霉	5	-	50			蜡状芽孢杆菌	6.7	5.7~9	41
		食淀粉乳杆菌	5	3.5~6.5	62			酿酒酵母	6.8	-	30
		食木薯乳杆菌	6	4~8	55			蜡状芽孢杆菌	7	-	35
			5.5	4.5~8	45			芽孢杆菌	7.2	-	35
		解淀粉芽孢杆菌	6	5~8	55			酿酒酵母	4.2	-	37
			5	5~9.5	50			黑曲霉	4.3	3.5~8	-
		蜡状芽孢杆菌	6	-	50	EC 3.2.1.20	α -葡萄糖苷酶	烟曲霉菌	4.5	-	-
		环状芽孢杆菌	7	6~9	50			黑曲霉	4.5	-	-
			8	5~10	60			黑曲霉	4.5	-	37
		凝固芽孢杆菌	7.5	-	85			黑曲霉	4.5	-	37
			5	3~7	90			泡盛曲霉	5	4.5~6	-
		地衣芽孢杆菌	7	5~10	90			嗜酸乳杆菌	5	-	37
			8	5.5~10	-			解淀粉芽孢杆菌	5.3	6~9	30
		莫海威芽孢杆菌	6.5	2~12	80			地衣芽孢杆菌	6	-	-
			2	1~6	65			短乳杆菌	6	-	-
		芽孢杆菌属细菌	4.5	-	70			根霉	6	-	-
EC 3.2.1.2	β -淀粉酶		6	-	65			解淀粉芽孢杆菌	6.8	-	39
		枯草芽孢杆菌	4	4~10	60	EC 3.2.1.33	淀粉 α -1,6-葡萄糖水解酶	酿酒酵母	6	5~8	-
			6	4~9	65			嗜酸普鲁兰芽孢杆菌	5	4~8.5	65
		蜡状芽孢杆菌	4.2~6.7	-	37			环状芽孢杆菌	7	5~8	50
		蜡状芽孢杆菌	7	-	25			蜡状芽孢杆菌	6	5~9	50
		巨大芽孢杆菌	6.9	6.5~7.5	60			芽孢杆菌属	8.5	6.5~11	55
		黑曲霉	3.5	3~7	50			芽孢杆菌属	8.5	4~11	60
		泡盛曲霉	4	-	-	EC 3.2.1.68	异淀粉酶	多支淀粉假单胞菌	4	2.5~7.5	52
		黑曲霉	4	-	-			芽孢杆菌	4	-	60
		土曲霉	4	3~7	-			芽孢杆菌	6.5	-	40
		烟曲霉	4	3~7	65			α -淀粉酶	5	-	55
		米曲霉	4	3~7	65			蜡状芽孢杆菌	7.5	-	30
		泡盛曲霉	4.5	5~9	-			枯草芽孢杆菌	-	-	30
		黑曲霉	4.5	2~11	-			枯草芽孢杆菌	-	-	30
		海枣曲霉	4.5	2~8	-			枯草芽孢杆菌	-	-	30
		土曲霉	5	-	-			枯草亚种	-	-	30
		根霉属	4	-	-	EC 2.4.1.18	1,4- α -葡聚糖分支酶	芽孢杆菌属	5	3~8	-
EC 3.2.1.3	糖化酶	根霉属	4.5	-	-			黑曲霉	5.5	-	37
		根霉属	4.5	-	-						
		根霉属	4.5	4~8	-						
		根霉属	7	-	68						
		红曲霉属	4.5	3.5~6.5	55						

3 清香型大曲微生物基因组编码的淀粉水解酶分析

酒曲配制过程中环境条件不断发生变化,酒曲中的微生物的代谢调节也会发生相应的调整,合成不同产物。酿酒原料中淀粉降解涉及酶类较多,为了解酒曲微生物产生的淀粉降解酶。本研究从 NCBI 数据库中搜索了酒曲相关微生物的基因组序列,但 NCBI 数据库中并没有从

酒曲来源的微生物菌株,在其他来源的菌株中筛选应用环境接近的有 4 株菌,即 *Aspergillus niger* 513.88 是工业葡萄糖淀粉酶生产菌株, *Aspergillus niger* ATCC1015 是 1 株柠檬酸生产菌株, *Bacillus subtilis* subsp. *natto* BEST195 是纳豆发酵生产的商用菌株, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. SC-8 则是从传统的豆酱制品分离的。

表 2 酿酒微生物编码的淀粉降解酶

菌株	淀粉降解酶	其他酶类
<i>Aspergillus niger</i> ATCC1015	α -淀粉酶 (8)、淀粉- α -1,6-葡萄糖苷酶(1)、 α -葡萄糖苷酶(2)	糖原分支酶(1)、 α -1,3-葡聚糖合成酶(1)、海藻糖磷酸合成酶(1)
<i>Aspergillus niger</i> 513.88	α -淀粉酶(3)、 α -葡萄糖苷酶(1)、糖化酶(1)	海藻糖-6-磷酸合成酶亚基(1)、 α , α -海藻糖磷酸合成酶(1)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Subtilis</i> str. SC-8	α -淀粉酶(1)、普鲁兰酶(1)、麦芽糖磷酸化酶(1)、寡-1,6-葡糖苷酶(1)、生麦芽糖 α -淀粉酶(1)、6-磷酸- α -葡萄糖苷酶(1)	糖原分支酶(1)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Natto</i> BEST195	普鲁兰酶(1)、糖基转移酶(1)、6-磷酸- α -葡萄糖苷酶(1)、糖原磷酸化酶(1)	糖原分支酶(1)、糖原合成酶(1)

注: 括号中的数字为编码酶的个数。

这 4 株菌中淀粉降解酶类分析结果见表 2。

从表 2 可以看出, 不同来源的两株黑曲霉基因组编码的淀粉水解酶类相差较大, 如柠檬酸产生菌 *A. niger* ATCC 1015 居然编码了 8 个 α -淀粉酶, 另外还有 1 个淀粉- α -1,6-葡萄糖苷酶有利于极限糊精中降解, 2 个 α -葡萄糖苷酶可释放葡萄糖也可转移葡萄糖; 产酶菌株 *A. niger* 513.88 编码了 3 个分泌型的 α -淀粉酶和 1 个糖化酶, 都是淀粉降解主要酶类, 另外还有 1 个 α -葡萄糖苷酶。另外, 两株菌都编码了降低还原糖或单糖浓度的酶, 如 *A. niger* ATCC 1015 编码了糖元分支酶, 可把直链淀粉转化为支链淀粉, α -1,3-葡聚糖合成酶减少可利用的还原糖或单糖, 海藻糖磷酸合成酶则由葡萄糖通过合成海藻降低单糖浓度; *A. niger* 513.88 编码了海藻糖合成途径需要的海藻糖 6-磷酸合成酶和 α - α -海藻磷酸合成酶。

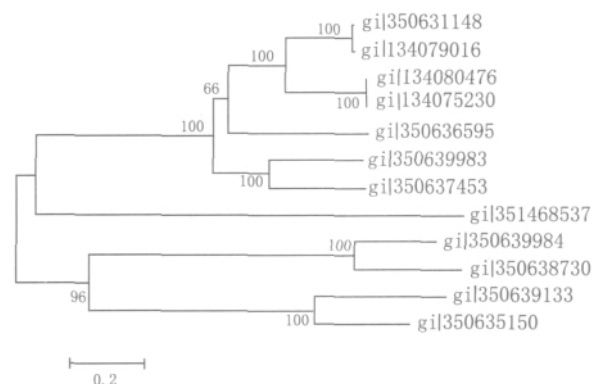
来自豆酱和纳豆的芽孢杆菌编码的淀粉水解酶类也不尽相同, 但两株菌均编码了普鲁兰酶、6-磷酸- α -葡萄糖苷酶, 前者编码了麦芽糖磷酸化酶水解麦芽糖得到葡萄糖, 后者则编码了糖原磷酸化酶; 另外, 来自豆酱的 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. SC-8 编码了 α -淀粉酶液化淀粉, 寡-1,4-1,6- α -葡萄糖苷酶继续降解 α -淀粉酶作用于淀粉后形成的糊精中的 α -1,6-糖苷键, 麦芽糖淀粉酶则可直接作用于淀粉生成 α -麦芽糖; 来自于纳豆的 *Bacillus subtilis* subsp. *natto* BEST195 还编码了糖苷转移酶; 两株芽孢杆菌编码的降低还原糖浓度的酶类比较相似, 均有糖元分支酶形成支链淀粉, 只是纳豆芽孢杆菌还编码了糖原合成酶。

鉴于很多菌株都编码了 α -淀粉酶, 甚至有的菌株还编码了多个 α -淀粉酶, 本研究对这些酶分子的分子量和等电点(表 3)及其进化关系(图 2)做了进一步分析。

从表 3 可看出, *Aspergillus niger* ATCC1015 合成的 8 个 α -淀粉酶等电点和分子量均不相同, 等电点分布在 4.08~6.36 之间; *Aspergillus niger* 513.88 合成的 3 个 α -淀粉酶中有 2 个, GI 号为 134080476 和 134075230 编码

表 3 酿酒微生物编码的 α -淀粉酶

菌株	大小 (氨基酸)	等电点/分子量	GI number
<i>Aspergillus niger</i> ATCC1015	511	5.56/57582.65	350639984
	552	4.79/60594.23	350639983
	562	5.42/65047.15	350639133
	524	6.36/59950.69	350638730
	550	4.75/61010.27	350637453
	567	4.53/61479.33	350636595
	587	5.29/68934.91	350635150
	593	4.08/64232.50	350631148
<i>Aspergillus niger</i> 513.88	498	4.48/54679.00	134080476
	505	4.23/55238.24	134079016
	498	4.48/54679.00	134075230
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. SC-8	659	5.80/72377.91	351468537

图 2 酿酒微生物编码的 α -淀粉酶的进化分析

的是完全一样的。从图 2 可以看出, 芽孢杆菌的 α -淀粉酶 pH 值较高, 单独成为一个分支, 其他黑曲霉的 α -淀粉酶位于两边, *Aspergillus niger* ATCC1015 的 8 个 *Aspergillus niger* ATCC1015 分为 3 组, 350631148 编码的与 *Aspergillus niger* 513.88 编码的 134079016 为一组, 350636595 编码的单独为一分支, *Aspergillus niger* 513.88 剩下的 2 个酶分子完全一样, 自然为一组。从进化图还可以看出, 各酶分子的进化距离与等电点距离很相近, 说明 α -淀粉酶进化或起作用与等电点关系密切。

(下转第 53 页)

表 2 各花色素苷相对含量

峰号	物质名称	工艺一		工艺二	
		峰面积	相对百分含量(%)	峰面积	相对百分含量(%)
1	花翠素 3-0-葡萄糖苷	436269	3. 5074	528161	3. 397
2	花青素 3-0-葡萄糖苷	49993	0. 4019	70248	0. 4518
3	3'-甲花翠素 3-0-葡萄糖苷	718460	5. 7761	799746	5. 1437
4	甲基花青素 3-0-葡萄糖苷	327670	2. 6343	353105	2. 2711
5	二甲花翠素 3-0-葡萄糖苷	7633525	61. 3701	9345682	60. 1084
6	甲基花青素 3-0-(6-0-乙酰)葡萄糖苷	151752	1. 22	200669	1. 2906
7	二甲花翠素 3-0-(6-0-乙酰)葡萄糖苷	2712770	21. 8094	3616507	23. 2602
8	甲基花青素 3-0-(6-0-对香豆酰)葡萄糖苷	34923	0. 2808	47938	0. 3083
9	二甲花翠素 3-0-(6-0-对香豆酰)葡萄糖苷	373152	3. 0	585988	3. 7689
	合计	12438514	100	15548044	100

3.3 两种工艺中各花色素苷组分的相对百分含量的大小趋势不尽相同，这可能与带皮渣酒精发酵的时间和程度有关,因为酒精对花色素的溶解有一定的影响。

参考文献:

[1] 李艳.干红葡萄酒色泽的形成[J].中外葡萄与葡萄酒,2003(3): 51-53.
[2] 王华,韩富亮.用 HPLC 分析赤霞珠干红葡萄酒中花色素苷成

分[J].酿酒科技,2005(4):81-84.
[3] 王贞强,韩富亮,王羽,等.HPLC 法测定葡萄与葡萄酒中的花色素苷[J].河北农业大学学报,2008(11): 59-61.
[4] 王华,菅蓁,郭耀东.葡萄果皮花色素苷提取工艺的研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2008(2): 129-133.
[5] 李华,王华,袁春龙,等.葡萄酒工艺学[M].北京:科学出版社,2007.

(上接第 50 页)

4 展望

大曲是中国的第五大发明，是中国白酒工艺独特的具体表现，其中微生物种类繁多，分泌的酶更是多种多样。仅淀粉代谢相关酶类就有很多种,这些酶类协同作用完成淀粉到乙醇的转变，但也有个别酶类使还原糖逆向合成二糖、非还原糖甚至支链淀粉,降低淀粉的转化率和利用率。大曲酶活的研究不必局限于液化酶和糖化酶,加入其他降解酶类如支链淀粉酶、普鲁兰酶等,尤其 α -葡萄糖苷酶、分支酶和其他二糖合成酶等,才能深入理解酿酒过程的代谢过程。

大曲是制酒的糖化发酵剂,不仅是复合酶制剂,还是发酵剂,含有重要的酿酒功能微生物。大曲中的酶组分不仅直接影响白酒的产量与品质，同时也是大曲微生物组成的间接表示。大曲研究可通过对大曲微生物的深入研究来优化酒曲酶活及酶组分。目前,各大数据库中大曲微生物及酶的信息非常少,迫切需要各界同仁共同关注,深入研究大曲中的功能微生物、特征微生物等,开展基因组测序,在基因组水平上优化基因资源及代谢过程,选育出理想的微生物菌种资源，为酒曲的专业化发展及质量控制奠定基础。

参考文献:

[1] 王元太.清香型白酒酿造技术[M].北京:中国轻工业出版社,

2009.
[2] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工出版社,2011.
[3] 訾楠,沈微,石贵阳,王正祥.地衣式抱杆菌生麦芽糖 α -淀粉酶的基因克隆与鉴定[J].应用与环境生物学报,2009,15(1): 130-133.
[4] 管斌,李珊,荀娟,等.啤酒大麦制麦过程中淀粉酶活性变化动态的研究[J].中国酿造,2009,206(5): 69-72.
[5] 刘长虹,韩旭.少根根霉对酵母馒头品质的影响[J].食品研究与开发,2009,30(9): 14-18.
[6] 孙俊良,梁新红,等.植物 β -淀粉酶研究进展[J].河南科技学院学报,2011,39(12): 1-4.
[7] Kim D.Y., Cha C. H., Oh W. S., Yoon Y. J., Kim J. W.. Expression of the promoter for the maltogenic amylase gene in *Bacillus subtilis* 168[J].J Microbiol, 2004, 42: 319-327.
[8] Park K. H., Kim M. J., Lee H. S., Han N. S., Kim D. M., Robyt J.F.Transglycosylation reactions of *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase with acarbose and various acceptors[J]. Carbohydr Res,1998,313: 235-246.
[9] Bender H., Wallenfels K.Untersuchungen an pullulan[J]. Biochem. Z.,1961,334: 79-95.
[10] Domań-Pytka M., Bardowski J. Pullulan degrading enzymes of bacterial origin[J].Crit Rev.Microbiol.,2004, 30(2): 107-121.