

# 麸曲糖化酶活力测定方法探讨

罗惠波<sup>1,2</sup>, 王毅<sup>1,2</sup>, 边名鸿<sup>1,2</sup>, 杨晓东<sup>3</sup>, 杨建勤<sup>4</sup>

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000; 2. 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000;  
3. 江安县工业园区管理委员会, 四川 江安 644200; 4. 成都新忆坊商贸有限公司, 成都 610036)

**摘要:**糖化酶活力是制曲过程中的一个重要指标。建立了 3,5-二硝基水杨酸(DNS)结合连续流动化学分析仪(API)检测麸曲糖化酶活力的方法。结果表明:通过 *t* 检验,次碘酸盐法、DNS 法和 DNS 优化法测定糖化酶活力均无显著性系统误差,DNS 优化法的误差值最低为 13.1 U/g,RSD 值为 1.97%。通过 *F*-检验双样本方差分析,DNS 优化法较快速滴定法、DNS 法测定麸曲糖化酶活力的精密度均有显著性提高,且具有简便、快捷的特点。

**关键词:**麸曲;连续流动化学分析仪(API);3,5-二硝基水杨酸(DNS);糖化酶

**中图分类号:**TQ925

**文献标志码:**A

糖化酶(Glucoamylase, EC 3.2.1.3.)是一种外切型糖苷酶,作为白酒微生物代谢过程主要代谢产物之一,其活力大小是衡量麸曲质量的重要指标<sup>[1-3]</sup>。糖化酶能按顺序水解淀粉或淀粉类似物非还原端的多种糖苷键而生成葡萄糖<sup>[4]</sup>,因此被广泛运用于食品工业中。常规测定糖化酶活力方法有次碘酸盐法、Schoorl 法(DU 法)、快速滴定法和 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法等,但各个测定方法均有一定的缺陷<sup>[5-8]</sup>。

本文采用微量连续流动分析仪对 DNS 法进行改进,利用导管取样,运用分光光度计的原理,通过电脑软件自动检测样品含量<sup>[9-10]</sup>,并与次碘酸盐法、快速滴定法进行比较,以期建立检测麸曲糖化酶活力准确、实用、快速、简便的新方法,并为麸曲生产的规范化提供数据与理论支持,更好的指导麸曲生产。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

材料:麸曲,由酿酒生物技术及应用四川省重点实验室提供;糖化酶(酶活力 100 000 U/g),上海蓝季科技发展有限公司。

试剂:MgSO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaNO<sub>3</sub>、醋酸、醋酸钠、葡萄糖、3,5-二硝基水杨酸(DNS)等均为分析纯,购于成都科龙化工试剂厂。

仪器与设备:UV-2000 紫外可见分光光度计(上海尤尼柯有限公司);连续流动化学分析仪(Micro-CFA)(美国 Astoria Pacific International);恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司);pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

### 1.2 固态发酵培养

称取 10 g 的麸皮,加水 8% (v/m),KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 g, MgSO<sub>4</sub> 0.02 g, NaNO<sub>3</sub> 0.3 g, 在 250 mL 三角瓶中润料 2 h 后,121 °C 灭菌 30 min,趁热摇散,冷却至 40 °C 左右,接入 0.3% (m/m) 麸曲,混合均匀,于温度 30 °C、湿度 95%,培养 48 h<sup>[11]</sup>(22 h 时进行扣瓶)。

### 1.3 粗酶液的制备

发酵结束后,加入 40 °C 水 170 mL。然后加入 20 mL pH4.6 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液,搅匀,40 °C 保温浸泡 1 h,保温时每隔 10 min 搅拌 1 次。用脱脂棉过滤,弃去初滤液,得澄清滤液待用<sup>[11]</sup>(滤液应尽快分析,若 30 min 内不能使用,应将滤液暂置冰箱中冷藏,分析时升温至

收稿日期:2014-01-03

基金项目:酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金项目(NJ2010-05;NJ2011-05;NJ2013-03)

作者简介:罗惠波(1969-),男,四川自贡人,教授,主要从事酒类发酵方面的研究,(E-mail)1036884458@qq.com

40 °C 后使用)。

### 1.4 检测方法

#### 1.4.1 酶活力测定方法

次碘酸盐测定糖化酶活力<sup>[5]</sup>。

快速滴定法测定糖化酶活力<sup>[7]</sup>。

3,5 - 二硝基水杨酸法测定糖化酶活力<sup>[8]</sup>。

#### 1.4.2 连续流动化学分析仪检测

在传统 3,5 - 二硝基水杨酸 (DNS) 法的基础上, 结合美国 (API) 连续流动化学分析仪, 对麸曲糖化酶和标准糖化酶活力进行测定 (图 1)。

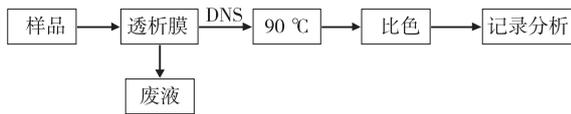


图 1 糖化酶活力测定连接示意图

#### 1.4.3 葡萄糖标准曲线测定

浓缩标准液 (10 g/L): 称取 1 g 葡萄糖溶于 100 mL 蒸馏水, 需存于棕色瓶内, 4 ~ 6 °C 保存, 备用。

葡萄糖标准液梯度稀释: 将浓缩标准液进行梯度稀释, 稀释浓度见表 1。

表 1 葡萄糖标准液

| 还原糖标准液 | 浓缩标准液 mL | 中性蒸馏水加至 mL | 标准液浓度 mg/L |
|--------|----------|------------|------------|
| 1      | 10.0     | 100        | 100        |
| 2      | 20.0     | 100        | 200        |
| 3      | 40.0     | 100        | 400        |
| 4      | 60.0     | 100        | 600        |
| 5      | 80.0     | 100        | 800        |
| 6      | 100.0    | 100        | 1000       |

#### 1.4.4 糖化酶酶液的制备

称取 1.1366 g 糖化酶, 溶于 200 mL 蒸馏水中, 配得的糖化酶活力为 568.3 U/mL, 4 ~ 6 °C 保存, 备用。

### 1.5 数据分析

应用 SPSS 17.0 统计软件对不同方法测定的糖化酶活力与准确度进行 *t* 检验分析。结合 *F* - 检验双样本方差分析, 分析测定麸曲糖化酶活力的最佳方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同方法测定糖化酶活力

采用不同方法对糖化酶的活力进行测定, 通过 *t* 检

验分析结果见表 2。

表 2 不同方法测定糖化酶活力分析

| 方法       | 次碘酸盐法  | 快速滴定法  | DNS 法  |
|----------|--------|--------|--------|
| n        | 5      | 5      | 5      |
| df       | 4      | 4      | 4      |
| 误差       | 20.2   | 23     | 23.8   |
| 均值 (U/g) | 560.84 | 551.18 | 558.54 |
| RSD (%)  | 3.6    | 4.2    | 4.3    |
| t        | 2.118  | 3.293  | 2.317  |
| 单尾概率     | 0.051  | 0.015  | 0.407  |
| 双尾概率     | 0.102  | 0.03   | 0.081  |

由表 2 可知, 采用不同方法测定糖化酶活力其准确度有较大的差异。通过误差和均值分析可知, 次碘酸盐的差值最小, 说明次碘酸盐有较高的准确度; 而 DNS 法的差值最大, 准确度最低。从 RSD 值也可以看出, 次碘酸盐法的 RSD 值为 3.6%, 较快速滴定法和 DNS 法准确度高。

通过 *t* 检验, 采用次碘酸盐法和 DNS 法测定糖化酶活力, *t* 值分别为 2.118 和 2.317, 均小于  $t(0.025, 4) = 2.776$ 。双尾概率分别为 0.102 和 0.081, 均大于 0.05。所以采用次碘酸盐法和 DNS 法测定糖化酶活力无显著性的系统误差。而采用快速滴定法测定糖化酶活力时,  $t = 3.293 > t(0.025, 4) = 2.776$ , 双尾概率  $0.03 < 0.05$ , 说明采用快速滴定法测定糖化酶活力的结果有显著性的系统误差。

### 2.2 不同方法测定麸曲糖化酶活力

采用不同方法对麸曲糖化酶的活力进行测定, 通过 *F* 检验分析结果见表 3。方差分析结果见表 4。

表 3 不同方法测定麸曲糖化酶活力分析

| 方法       | 次碘酸盐法   | 快速滴定法   | DNS 法   |
|----------|---------|---------|---------|
| n        | 5       | 5       | 5       |
| df       | 4       | 4       | 4       |
| 误差       | 39.6    | 59.6    | 55.6    |
| 均值 (U/g) | 1046.12 | 1036.94 | 1037.16 |
| RSD (%)  | 3.7     | 5.7     | 5.3     |

由表 3 可知, 通过误差分析, 不同方法测定麸曲糖化酶活力有相对误差, 且次碘酸盐法测定结果误差值最小, RSD 为 3.7%。快速滴定法和 DNS 法测定的结果都有较大的误差, 影响的因素可能是测定结果的判定和操作引起的。

表 4 不同方法测定糖化酶活力方差分析

| 方法       | 次碘酸盐法与快速滴定法 |         | 次碘酸盐法与 DNS 法 |         | 快速滴定法与 DNS 法 |         |
|----------|-------------|---------|--------------|---------|--------------|---------|
| 均值 (U/g) | 1044.12     | 1036.94 | 1044.12      | 1037.16 | 1036.94      | 1037.16 |
| 方差       | 399.697     | 520.753 | 399.697      | 474.523 | 520.753      | 474.523 |
| F        | 0.768       |         | 0.842        |         | 1.097        |         |
| P        | 0.402       |         | 0.436        |         | 0.465        |         |

由表4可知,通过F-检验双样本方差分析,三种测定方法相互比较,其结果是P值均大于0.05,即三种测定结果的精密度没有显著性。

### 2.3 DNS法优化探讨

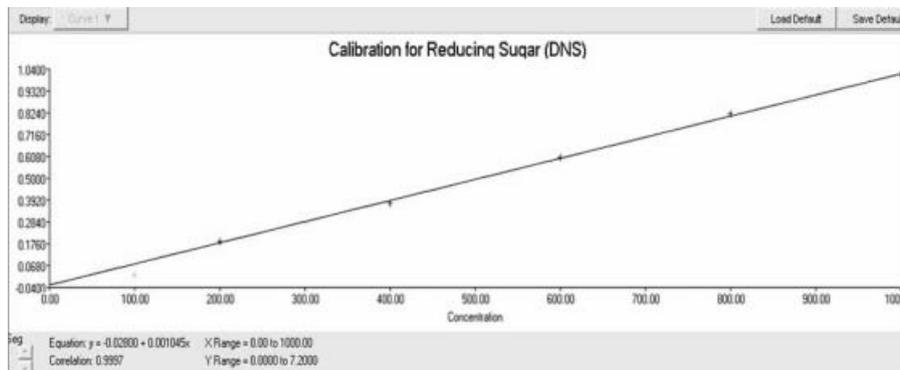


图2 还原糖含量测定标准曲线

将DNS法应用到连续流动化学分析仪中,进行还原糖的测定,由图2可知,采用DNS改进法测定还原糖的标准曲线回归方程为:  $y = 0.001045x - 0.028$ ,  $R^2 = 0.9997$ 。所以,在还原糖标准液浓度测定范围内,标准

#### 2.3.1 标准曲线的测定

将梯度葡萄糖溶液通过连续化学分析仪进行检测,并利用一次曲线对标准曲线进行拟合,结果图2所示。

曲线线性良好,符合检测要求。

#### 2.3.2 DNS优化法测定糖化酶活力

采用DNS优化法测定糖化酶活力,通过t检验分析结果见表5。

表5 DNS优化法测定糖化酶活力分析

| 方法     | n | df | 误差   | 均值(U/g) | RSD(%) | t     | 单尾概率  | 双尾概率  |
|--------|---|----|------|---------|--------|-------|-------|-------|
| DNS优化法 | 5 | 4  | 13.1 | 564.38  | 2.3    | 1.806 | 0.073 | 0.145 |

由表5可知,通过t检验,采用DNS优化法测定糖化酶活力  $t = 1.806 < t(0.025, 4) = 2.776$ ,双尾概率为  $0.145 > 0.05$ ,所以采用DNS优化法测定无显著性的系统误差。

### 2.4 对比试验

对比次碘酸盐法、快速滴定法和DNS改进法测定麸曲糖化酶活力的结果见表6。DNS优化法方差分析结果

见表7。

表6 对比试验结果

| 方法      | 次碘酸盐法   | 快速滴定法   | DNS法    | DNS优化法  |
|---------|---------|---------|---------|---------|
| n       | 5       | 5       | 5       | 5       |
| df      | 4       | 4       | 4       | 4       |
| 误差      | 39.6    | 59.6    | 55.6    | 20.8    |
| 均值(U/g) | 1046.12 | 1036.94 | 1037.16 | 1050.84 |
| RSD(%)  | 3.7     | 5.7     | 5.3     | 1.97    |

表7 DNS优化法方差分析结果

| 方法      | DNS优化法与次碘酸盐法 |         | DNS优化法与快速滴定法 |         | DNS优化法与DNS法 |         |
|---------|--------------|---------|--------------|---------|-------------|---------|
| 均值(U/g) | 1050.84      | 1046.12 | 1050.84      | 1036.94 | 1050.84     | 1037.16 |
| 方差      | 61.148       | 278.097 | 61.148       | 520.753 | 61.148      | 474.523 |
| F       |              | 0.220   |              | 0.117   |             | 0.129   |
| P       |              | 0.086   |              | 0.031   |             | 0.036   |

由表6可知,经F-检验双样本分析,采用DNS优化法测定麸曲糖化酶活力,与快速滴定法和DNS法方差比较,P值分别为0.031和0.036,均小于0.05;同时F值均小于1,即DNS优化法较快速滴定法和DNS法精密度有显著提高。DNS优化法较次碘酸盐法精密度没有显著性差异,但误差减小。

### 3 结束语

通过t-检验,采用次碘酸盐法和DNS法测定糖化

酶活力,t值分别为2.118和2.317,均小于  $t(0.025, 4) = 2.776$ ,双尾概率分别为0.102和0.081,均大于0.05,所以采用次碘酸盐法和DNS法测定糖化酶活力无显著性的系统误差。而采用快速滴定法测定糖化酶活力时,  $t = 3.293 > t(0.025, 4) = 2.776$ ,双尾概率  $0.03 < 0.05$ ,说明采用快速滴定法测定糖化酶活力的结果有显著性的系统误差。通过t-检验可知,采用DNS优化法测定无显著性系统误差。

通过F-检验双样本方差分析,采用次碘酸盐法、

快速滴定法和 DNS 法三者比较,其  $F$  - 检验的  $P$  值均大于 0.05,即三种测定结果的精密度没有显著性。DNS 优化法与次碘酸盐法、快速滴定法、DNS 法进行双样本方差分析,DNS 优化法与快速滴定法、DNS 法比较,其精密度有显著提高,而与次碘酸盐法没有显著性差异。

改进后的 DNS 法在操作上更加简便、人为因素影响小,在处理样品较多的时候优势明显。同时,DNS 改进法为后续麸曲及麸曲酿造过程中糖化酶活力的分析检测奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 黄群,肖文军,孙术国,等. $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶协同酶解葛根淀粉动力学研究[J].食品科学,2012,33(21):187-191.
- [2] 罗惠波,苟云凌,饶家权,等.酶制剂对浓香型白酒发酵过程中高级醇生成的影响[J].四川理工学院学报:自然科学版,2011,24(2):186-189.
- [3] 白利涛,张丽萍.糖化酶活力测定方法研究[J].酿酒科技,2012(2):100-102.
- [4] 钟浩,谭兴和,熊兴耀,等.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(3):1-4.
- [5] GB 8267-2006,食品添加剂 糖化酶制剂[S].
- [6] 马歌丽,魏泉增,张志刚.分光光度法测定大曲糖化酶活力探讨[J].中国酿造,2008(17):69-71.
- [7] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,2009.
- [8] 黄丹,尚志超,袁先玲,等.泸型大曲中根霉固态发酵产糖化酶条件研究[J].四川理工学院学报:自然科学版,2012,25(3):9-13.
- [9] 罗宏德,王沙毅.连续流动化学技术的发展与应用[J].现代科学仪器,2010(5):131-132.
- [10] 李丹宇.浓香型大曲制备过程中理化指标及微生物群落演替规律的研究[D].自贡:四川理工学院,2013.
- [11] 李锐利,方尚玲,陈茂彬,等.绿观音土曲中霉菌糖化酶活力的研究[J].酿酒,2010(1):50-52.

## Study on the Determination of Glucoamylase Activity of Koji

LUO Huibo<sup>1,2</sup>, WANG Yi<sup>1,2</sup>, BIAN Minghong<sup>1,2</sup>, YANG Xiaodong<sup>3</sup>, YANG Jianqin<sup>4</sup>

(1. School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China;

2. Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China;

3. Industrial Park Management Committee of Jiangan County, Jiangan 644200, China;

4. New Recalling Square-commerce Co. Ltd of Chengdu 610036, China)

**Abstract:** One of the important indexes of Koji preparation is glucoamylase activity. A method that combined 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) with American Continuous-Flow Analysis-CFA (API) is established to detect the glucoamylase activity. The results indicate that, the  $t$  tests of glucoamylase activity by hypiodite, DNS and improved DNS all have no significance systematic errors. The lowest error value of improved DNS is 13.1U/g, RSD is 1.97%. Through  $F$  test double sample variance analysis, glucoamylase activity determination by improved DNS has higher precision than that by rapid titration and DNS, and the improved DNS has the traits of simple and rapid operation.

**Key words:** Koji; Continuous-Flow Analysis-CFA (API); 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS); glucoamylase