

DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2012.10.025

# 超声波对糖化酶酶解作用的影响\*

高振鹏 岳田利 袁亚宏 宁龙 周郑坤 李昭

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

**【摘要】** 以液化后的红薯汁为原料,通过单因素及正交试验探讨了超声波功率、频率、酶解温度及加酶量4个因素对糖化酶酶解作用,优化出最佳超声波促进糖化酶酶解作用参数为:超声波功率420 W、频率45 kHz、酶解温度65℃和加酶量150 U/g,在此条件下还原糖含量达到1.541 mg/mL,比无超声波促进作用下的还原糖含量增加了24.78%。

**关键词:** 超声波 糖化酶 酶解作用

**中图分类号:** TS231; Q681 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2012)10-0138-05

## Effect of Ultrasonic on Enzymolysis for Glucoamylase

Gao Zhenpeng Yue Tianli Yuan Yahong Ning Long Zhou Zhengkun Li Zhao

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&amp;F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

### Abstract

The sweet potato liquefaction juice was used as raw material. Ultrasound was employed in the processing of glucoamylase enzymatic digestion. The influence of ultrasonic power, frequency, enzymolysis temperature and enzyme dosage on glucoamylase enzymolysis reaction were studied by using single factor experiment and orthogonal test. The optimum condition of glucoamylase enzymolysis reaction was obtained. Research results indicated that, under the optimal conditions of ultrasonic power of 420 W, frequency of 45 kHz, enzymolysis temperature of 65℃ and enzyme dosage of 150 U/g, the reducing sugar content arrived to 1.541 mg/mL, which increased by 24.78% compared with control.

**Key words** Ultrasound, Glucoamylase, Enzymolysis

### 引言

糖化酶又称葡萄糖淀粉酶,它以淀粉为底物,在一定条件下能将淀粉转化为葡萄糖<sup>[1]</sup>。糖化酶是世界上产量最大的酶制剂产品之一,被广泛应用于酒精、有机酸、氨基酸、味精、浓缩汁及酿酒工业<sup>[1-2]</sup>。为了提高糖化酶的活力,科研工作者进行了大量的研究,尤其在生产高活力糖化酶的菌种选育及固定化糖化酶方面做了大量工作<sup>[2-3]</sup>。然而,通过一些辅助手段如超声波处理提高糖化酶活性对糖化酶的应用也是一个低成本、高效率的方法。

超声波技术利用其空化作用、自由基作用和机械作用,已经被广泛地应用于各种食品加工及危害物处理等领域<sup>[4-5]</sup>。同时,超声波处理提高酶活性的研究也取得了一些成绩<sup>[6]</sup>。超声波释放的能量促使酶分子构象发生改变,导致酶分子的生物学功能发生变化<sup>[7]</sup>,主要体现在超声波对酶活力的促进作用和钝化作用<sup>[7-13]</sup>。超声波对酶的作用由于超声波处理的条件和强度的不同对酶的作用也不同<sup>[9]</sup>。

目前,国内外关于超声波促进糖化酶酶解作用参数优化方面的研究未见报道。本文以液化后的红

收稿日期:2011-12-01 修回日期:2012-01-04

\*农业部“948”项目(2011G83)、陕西省科技攻关资助项目(2011K17-05-01)和西北农林科技大学基本科研业务费科技创新专项(QN2011136)

作者简介:高振鹏,副教授,主要从事食品加工及安全控制研究,E-mail:gzp1988@yahoo.com.cn

通讯作者:岳田利,教授,博士生导师,主要从事食品生物技术及食品安全控制研究,E-mail:yuetl@nwsuaf.edu.cn

薯汁为底物,采用超声波辅助促进作用,分别研究超声波功率、超声波频率、温度及加酶量对糖化酶酶解作用的影响,探索超声波对糖化酶的促进作用,并对糖化酶酶解条件进行优化,旨在为超声波促进糖化酶活性工业化应用及降低生产成本方面提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

#### 1.1.1 材料

红薯(徐薯 22,采购自陕西杨凌农贸市场),糖化酶(活力单位 100 000 U/g,北京双旋生物有限公司生产)。

#### 1.1.2 试剂

$\alpha$ -淀粉酶(活力单位 3 700 U/g),北京双旋生物有限公司生产;硫酸铜、次甲基蓝、酒石酸钾钠、氢氧化钠、亚铁氰化钾、乙酸锌、冰乙酸、葡萄糖和盐酸等均为国产分析纯。

#### 1.1.3 仪器

KQ-700GVDV 型超声波处理器,昆山市超声波仪器有限公司;SC-3610 型离心机,安徽中佳科学仪器有限公司;JYL2350 型打浆机,山东九阳股份有限公司;SHB-3 型水环式真空泵,郑州长城科工贸有限公司;HH2S 型数显恒温水浴锅,江苏金坛市医疗仪器;JM2L50 型胶体磨,温州市金松轻工机械有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 原料处理

原料处理工艺为:红薯→清洗、去皮→切片、热烫→打浆、胶磨→蒸煮、软化→液化→糖化(在超声波处理下)→灭酶→离心→红薯汁。

将红薯切成 2 mm 厚的片,在 95℃ 的热水中热烫 5 min。在红薯浆中加入 14 U/g 的  $\alpha$ -淀粉酶,于 40℃ 的水浴锅中处理 120 min。控制超声波处理过程的温度、超声波功率、超声波频率及加酶量 4 个因素,对红薯汁进行酶解处理,糖化酶作用时间 30 min,以确定最佳条件。将酶解后的红薯汁置于 95℃ 的水浴锅中处理 20 min,以钝化  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶。将灭酶后的红薯汁在 3 500 r/min 的离心机中离心 10 min。

### 1.2.2 还原糖测定方法

还原糖测定方法参照 GB/T 5009.7—2003<sup>[14]</sup>。

### 1.2.3 超声波酶解单因素试验条件

单因素试验基本条件为糖化酶添加量 100 U/g、超声波功率 420 W、酶解温度 45℃、超声波频率 45 kHz 条件下,超声波处理 180 mL 红薯汁 30 min,

每隔 5 min 测定一次还原糖含量,重复 3 次。

#### (1) 超声波功率

其他条件不变情况下,超声波功率分别为 0(对照)、280、350、420 和 490 W 下进行试验。

#### (2) 超声波频率

其他条件不变情况下,超声波频率分别为 0(对照)、28、45 和 100 kHz 下进行试验。

#### (3) 酶解温度

其他条件不变情况下,酶解温度分别在室温、35、45、55、65 和 75℃ 下进行试验。

#### (4) 加酶量

其他条件不变情况下,分别向红薯汁中加酶 50、100、150、200 U/g 及 150 U/g(无超声波作用)进行试验。

### 1.2.4 超声波酶解正交试验条件

在单因素试验基础上,选取酶解温度、超声波功率、超声波频率和加酶量 4 个因素,每个因素 3 个水平,设计四因素三水平试验,每个测定结果重复 3 次,确定超声波对糖化酶活性的最佳促进条件,正交试验因素和水平如表 1 所示。

表 1 试验因素和水平  
Tab. 1 Factors and levels

水平	因素			
	酶解温度 $a/^\circ\text{C}$	超声波功率 $b/\text{W}$	超声波频率 $c/\text{kHz}$	加酶量 $d/\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$
1	55	350	28	100
2	65	420	45	150
3	75	490	100	200

### 1.2.5 统计方法

用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 超声波功率

超声波功率对糖化酶酶解作用的影响如图 1 所示。

由图 1 可知,不同功率超声波对糖化酶酶解曲

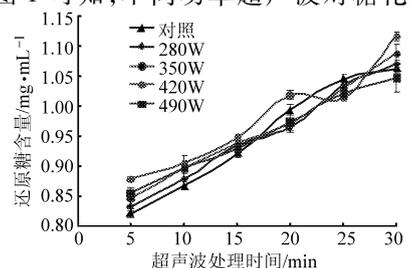


图 1 超声波功率对糖化酶酶解作用的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic power on activity of glucoamylase

线与不经超声波处理的对照曲线相比,超声波功率对糖化酶的酶解作用均有影响。当超声波处理 5 ~ 15 min 时,超声波功率均能促进糖化酶的酶解作用;超声波处理 20 min 时,只有功率为 420 W 的超声波对酶解有促进作用,其他功率则对糖化酶有钝化作用;在 25 min 时,所有功率的超声波均对酶解作用有钝化作用;在 30 min 时,功率为 280、350、420 W 的超声波能够促进酶解作用,而功率为 490 W 的超声波则对酶解作用钝化。综合几条曲线发现,超声波功率为 420 W 时对糖化酶酶解促进作用最好。由超声波功率为 420 W 的曲线可知,在处理时间为 5 ~ 20 min 时,还原糖的含量高于未经超声波处理的对照组;在 20 ~ 25 min 时,还原糖含量呈下降趋势,可能这段时间超声波处理对酶解作用有钝化;在 25 ~ 30 min 时,还原糖含量呈上升趋势,最终还原糖含量达到最大。综上所述,功率为 420 W 的超声波处理条件下,作用时间 30 min 时对酶解作用影响最大,效果最明显。

## 2.2 超声波频率

超声波频率对糖化酶酶解作用的影响如图 2 所示。

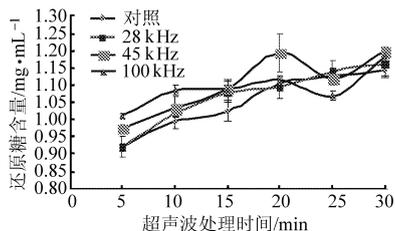


图 2 超声波频率对糖化酶酶解作用的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic frequency on activity of glucoamylase

由图 2 可知,3 种超声波频率对糖化酶酶解曲线与不经过超声波处理的对照曲线相比,超声波频率对糖化酶的酶解作用均有影响。当超声波处理 5 ~ 20 min 时,超声波频率均能促进糖化酶的酶解作用;超声波处理 20 ~ 25 min 时,45 和 100 kHz 2 种频率对酶解作用有钝化作用;超声波处理 25 ~ 30 min 时,所有的超声波频率均对酶解作用有促进作用。综合曲线发现,超声波频率为 45 kHz 时对糖化酶酶解促进作用最好。由超声波频率为 45 kHz 的曲线可知,在处理时间为 5 ~ 20 min 时,还原糖的含量上升,频率对酶解促进作用明显;在 20 ~ 25 min 时,还原糖含量呈下降趋势,酶促作用放缓;在 25 ~ 30 min 时,还原糖含量呈上升趋势,最终还原糖含量达到最大。综上所述,超声波频率为 45 kHz 的处理条件下,处理时间为 30 min 时对酶解作用影响最大,效果最明显。

## 2.3 酶解温度

酶解温度对糖化酶酶解作用的影响如图 3 所示。

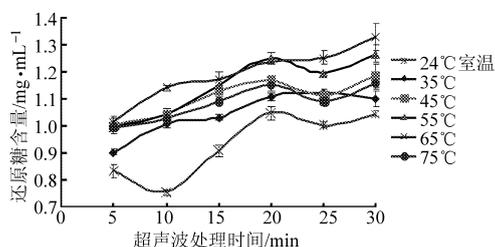


图 3 酶解温度对糖化酶酶解作用的影响

Fig. 3 Effect of temperature on activity of glucoamylase

对比不同酶解温度下糖化酶酶解曲线发现,在一定的超声波功率、频率作用下,合适的酶解温度有利于糖化酶酶解作用,酶解温度过高或过低则对酶解有抑制作用。由图 3 可知,当酶解温度为 65°C 时酶解作用最好,随着处理时间的延长,酶解作用上升;当酶解温度超过 65°C 时,酶解作用则下降。由 65°C 的酶解曲线可知,在处理时间为 5 ~ 30 min 时,还原糖的含量一直呈上升趋势,酶解促进作用明显。综上所述,酶解温度 65°C 时对酶解作用影响最大,效果最明显。

## 2.4 加酶量

加酶量对糖化酶酶解作用的影响如图 4 所示。

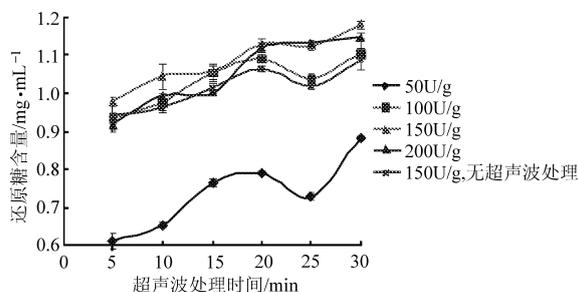


图 4 加酶量对糖化酶酶解作用的影响

Fig. 4 Effect of amount of enzyme on activity of glucoamylase

由图 4 可知,加酶量对酶解作用影响显著,总体来看加酶量越多,酶解作用越强,其还原糖含量也越大。对比施加超声波促进作用,不同加酶量的糖化酶酶解曲线与未施加超声波作用的曲线发现,加酶量为 150 U/g 时的超声波促进作用效果最好。由该曲线可知,在处理时间为 5 ~ 30 min 时,还原糖的含量呈上升趋势。在超声波作用 30 min 时,还原糖含量达到最大。对照相同加酶量下,超声波处理与未经过超声波处理的酶解效果,发现施加超声波处理的糖化酶酶解率比未施加超声波的糖化酶提高了 8.31%,主要是因为超声波处理催化了酶活性。综上所述,加酶量为 150 U/g 的条件下,超声波作用时

间为 30 min 时对酶解作用影响最大,效果最明显。

## 2.5 超声波促进糖化酶酶解作用最佳工艺条件

为了优化超声波对糖化酶酶解条件,以优选出的最佳单因素为基础,采用  $L_9(3^4)$  正交试验,综合考察 4 个因素对糖化酶酶解作用的影响,试验结果如表 2 所示。

表 2 正交试验结果分析

Tab. 2 Results of orthogonal experiment

试验 序号	因素				还原糖含量 /mg·mL <sup>-1</sup>
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.187 ± 0.017
2	1	2	2	2	1.453 ± 0.080
3	1	3	3	3	1.350 ± 0.016
4	2	1	2	3	1.491 ± 0.017
5	2	2	3	1	1.383 ± 0.018
6	2	3	1	2	1.334 ± 0.010
7	3	1	3	2	1.137 ± 0.018
8	3	2	1	3	1.058 ± 0.070
9	3	3	2	1	1.162 ± 0.017
$K_1$	3.990	3.816	3.579	3.732	
$K_2$	4.208	3.894	4.106	3.924	
$K_3$	3.357	3.846	3.870	3.899	
$k_1$	1.330	1.272	1.193	1.244	
$k_2$	1.403	1.298	1.369	1.308	
$k_3$	1.119	1.282	1.290	1.300	
R	0.284	0.026	0.176	0.064	
主次顺序	A、C、D、B				
最优水平	$A_2B_2C_2D_2$				

由表 2 可知,影响糖化酶酶解作用的主次因素顺序依次为:酶解温度、超声波频率、加酶量、超声波功率。超声波促进糖化酶酶解最佳条件组合为: $A_2B_2C_2D_2$ ,即酶解温度 65℃、超声波功率 420 W、超声波频率 45 kHz 和加酶量 150 U/g。利用 SPSS 17.0 软件对数据进行处理,如表 3 所示。由表 3 可知,正交模型与预测值有很好的相关性( $R^2 = 0.991$ ),酶解温度、超声波频率和加酶量对糖化酶酶解促进作用均有极显著影响( $P < 0.01$ )。为了验证试验所得结论的正确性,在最佳条件下进行了

3 次重复试验,试验得到的还原糖平均含量为 1.541 mg/mL。从重复结果可看出,验证试验还原糖含量比正交试验中最佳的 4 号试验还原糖含量高,说明正交试验优选的超声波促进糖化酶酶解条件是正确的。

表 3 试验方差分析

Tab. 3 Variance analysis of experiment

变异来源	三类平方和	自由度	均方	F	P
校正模型	0.555	8	0.069	251.596	0
截距	44.523	1	44.523	161478.104	0
A	0.391	2	0.196	709.367	0
B	0.003	2	0.002	5.610	0.013
C	0.139	2	0.070	252.204	0
D	0.022	2	0.011	39.205	0
误差	0.005	18	0		
总变异	45.083	27			
校正总变异	0.56	26			

## 2.6 无超声波促进作用与超声波促进糖化酶作用的比较

为了比较超声波促进糖化酶酶解作用与无超声波促进作用的效果,在酶解温度为 65℃、糖化酶用量为 150 U/g 的酶解条件与优化出的最佳超声波促进糖化酶酶解条件下进行对比试验。其结果显示,超声波促进酶解作用的还原糖含量为 1.541 mg/mL 比无超声波促进的还原糖含量 1.235 mg/mL 增加了 24.78%,说明超声波促进了糖化酶的酶解作用。

## 3 结论

(1) 通过单因素试验得出当超声波功率 420 W、超声波频率 45 kHz、酶解温度 65℃、加酶量 150 U/g 时,糖化酶促进作用明显。

(2) 在单因素基础上,通过正交试验对超声波促进糖化酶酶解条件进行优化,得出最佳的超声波促进糖化酶酶解参数为:酶解温度 65℃、超声波功率 420 W、超声波频率 45 kHz 和加酶量 150 U/g。

(3) 在优化条件下,超声波促进酶解作用比未施加超声波作用的酶解率提高了 24.78%,说明超声波对糖化酶的酶解促进作用效果明显。

## 参 考 文 献

- 李彧娜,石贵阳,王武,等. *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* 生淀粉糖化酶的分离纯化及酶学性质[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(5): 714 ~ 718.  
Li Yuna, Shi Guiyang, Wang Wu, et al. Purification and properties of a novel raw starch digesting glucoamylase from *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* [J]. Chinese Journal Applied & Environmental Biology, 2010, 16(5): 714 ~ 718. (in Chinese)

- 2 朱俊晨,叶心华. 多孔聚酯材料固定化黑曲霉产糖化酶条件的研究[J]. 江苏食品与发酵,2001(2):1~5.  
Zhu Junchen, Ye Xinhua. Studies on immobilization of aspergillus niger for repeated batch production of glucoamylase[J]. Jiangsu Food & Fermentation, 2001(2):1~5. (in Chinese)
- 3 黎卫强. 糖化酶在食品工业中的应用研究进展[J]. 沿海企业与科技,2010(4):65~67.
- 4 高振鹏,岳田利,袁亚宏,等. 超声波强化有机溶剂提取石榴籽油的工艺优化[J]. 农业机械学报,2008,39(5):77~80.  
Gao Zhenpeng, Yue Tianli, Yuan Yahong, et al. Technology optimization on extracting pomegranate seed oil using organic solvent assisted by ultrasound[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2008, 39(5):77~80. (in Chinese)
- 5 高振鹏,岳田利,袁亚宏,等. 苹果汁中展青霉素的超声波降解[J]. 农业机械学报,2009,40(9):139~143.  
Gao Zhenpeng, Yue Tianli, Yuan Yahong, et al. Ultrasonic degradation of patulin in apple juice[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009,40(9):139~143. (in Chinese)
- 6 肖琼,姚春才,勇强,等. 玉米秸秆超声辅助酶水解[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2007,31(4):85~88.  
Xiao Qiong, Yao Chuncai, Yong Qiang, et al. Study on ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of corn stover[J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition, 2007,31(4):85~88. (in Chinese)
- 7 覃益民,唐江涛,魏远安,等. 超声波对 $\beta$ -果糖基转移酶催化活性的影响[J]. 食品与机械,2007,23(5):23~25.  
Qin Yimin, Tang Jiangtao, Wei Yuanan, et al. Effect of ultrasound on catalytic activity of  $\beta$ -fructosyl transferase[J]. Food and Machinery, 2007, 23(5):23~25. (in Chinese)
- 8 陈小丽,黄卓烈,巫光宏,等. 超声波对淀粉酶催化活性的影响[J]. 华南农业大学学报,2005,26(1):76~79.  
Chen Xiaoli, Huang Zhuolie, Wu Guanghong, et al. Effect of ultrasound on catalytic activity of amylase[J]. Journal of South China Agricultural University, 2005,26(1):76~79. (in Chinese)
- 9 梁春虹,黄惠华. 超声波场致效应对酶的影响[J]. 食品与机械,2007,23(2):133~136.  
Liang Chunhong, Huang Huihua. A review on effects of ultrasound treatment on enzymes[J]. Food and Machinery, 2007, 23(2):133~136. (in Chinese)
- 10 高大维,陈满香,梁竑,等. 超声波催化糖化酶水解淀粉的初步研究[J]. 华南理工大学学报:自然科学版,1994,22(1):70~74.  
Gao Dawei, Chen Manxiang, Liang Hong, et al. Study on the acceleration effect of ultrasound on the hydrolyzation of starch with glucoamylase[J]. Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition, 1994, 22(1):70~74. (in Chinese)
- 11 Ertugay M F, Yuksel Y, Sengul M. The effect of ultrasound on lactoperoxidase and alkaline phosphatase enzymes from milk[J]. Milchwissenschaft-milk Science International, 2003, 58(11~12):593~595.
- 12 Raviyan P, Zhang Z, Feng H. Ultrasonication for tomato pectinmethylesterase inactivation: effect of cavitation intensity and temperature on inactivation[J]. Journal of Food Engineering, 2005, 70(2):189~196.
- 13 Zhong M T, Ming X W, Su P W, et al. Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin[J]. Ultrasonic Sonochemistry, 2004, 11(6):399~404.
- 14 GB/T 5009.7—2003 食品中还原糖的测定[S]. 2003.

~~~~~

(上接第 113 页)

- 10 张庆椿,徐玉玲. 鸡粪厌氧消化接种物对沼气产气率的影响[J]. 环境导报,1998(2):17~19.  
Zhang Qingchun, Xu Yuling. The effect of inocula on the gas production rate in the progress of anaerobic fermentation through chicken dung[J]. Environment Herald, 1998(2):17~19. (in Chinese)
- 11 Walter J W. Anaerobic dry fermentation [J]. Biotechnology & Bioengineering Symp, 1980(10):43~65.
- 12 李想. 农业废弃物干法厌氧发酵关键参数优化研究[D]. 北京:中国农业科学院,2007.  
Li Xiang. The optimized study on the pivotal parameters of agriculture residues dry anaerobic fermentation[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007. (in Chinese)
- 13 蒋建国,姜志颖,赵振振,等. 添加污泥饼补充氮源的农作物秸秆高固体厌氧消化启动研究[J]. 环境科学,2009,30(1):297~301.  
Jiang Jianguo, Lou Zhiying, Zhao Zhenzhen, et al. Start-up of high solid anaerobic digestion process for treating straw with sludge cake as nitrogen additive[J]. Environmental Science, 2009, 30(1):297~301. (in Chinese)
- 14 王金丽,焦静,张劲,等. 甘蔗叶干法厌氧发酵工艺研究[J]. 农业机械学报,2011,42(3):109~114.  
Wang Jinli, Jiao Jing, Zhang Jin, et al. Research on sugarcane leaves dry anaerobic fermentation[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2011, 42(3):109~114. (in Chinese)