第13卷 无锡轻工业学院学报 Vol.13
第4期 JOURNAL OF THE WUXI INSTITUTE OF LIGHT INDUSTRY 1994 No.4

啤酒酿造用复合酶的研制

尹象胜 李永仙 顾国贤 廖永红 樊 游

(生物工程系)

摘要 从一系列枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)和淀粉液化芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)出发,经筛选和诱变选育,得到一株淀粉液化芽孢杆菌突变株(WL-BA-1),该菌株经三角瓶摇瓶和20L发酵后,在3000L标准通风罐上进行试验,菌株发酵周期短,发酵液中β-葡聚糖酶约为120u/ml,α-淀粉酶约150u/ml,蛋白酶约1800u/ml. 发酵液经压滤浓缩后制得液体酶制剂。

关键词 淀粉液化芽孢杆菌;复合酶;糖化

0 前 言

啤酒以大麦为原料。大麦中β-葡聚糖一般占干物质的5%～8%[3],它是由β-1,3和β-1,4葡萄糖苷直链随机排列构成,其中β-1,3键相连约30%,β-1,4键约占70%. β-葡聚糖在大麦中分成水不溶性的,其平均分子量为10^7道尔顿,热水可溶性的为10^3～10^4道尔顿[1~2]。大麦中不存在β-葡聚糖酶(β-glucanase),大麦发芽时,胚乳糊粉层细胞受到赤霉酸GA_3刺激,分泌一系列的β-葡聚糖酶,水解大麦胚乳细胞壁的β-葡聚糖,分子量为10^7道尔顿→10^3～10^4道尔顿→小于10^2道尔顿→β-葡聚糖残片→纤维二糖和昆布二糖→葡萄糖。大麦在发芽过程中产生的β-葡聚糖酶活性高低的差别直接影响到大麦中β-葡聚糖的分解程度[3]。如果大麦中β-葡聚糖含量过高,分解不完全,反映在成品麦芽质量上的缺点是:协定糖化麦汁滤速太慢(>1h),麦汁粘度过大(8.6°P麦汁粘度大于1.65×10^{-3}Pa·s,粗细粉浸出率差大于2.5%,协定麦汁中的β-葡聚糖大于120mg/L. 反映在啤酒酿造上,糖化醪过滤困难(总过滤洗糟时间大于3h),麦汁混浊,原料浸出收率偏低,成品啤酒保质期短,形成雾浊或早期凝胶沉淀。

自60年代以来,啤酒界广泛采用外加α-淀粉酶、β-淀粉酶、蛋白酶、糖化酶的办法协助麦芽中的水解酶协同糖化,取得显著的效果,但这些酶制剂的使用还不能解决糖化醪中因原料麦芽中β-葡聚糖降解不足而引起的一系列问题,因此在70年代中期,啤酒工业发达的国

收稿日期:1994-06-28
本课题为国家教委霍英东青年教师基金项目。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

家的酶制剂公司相继推出了含 β- 葡聚糖酶的酶制剂,如丹麦 NOVO 公司的 Cereflo(β- 葡聚糖酶和 α- 淀粉酶复合酶)。作者通过三年多时间的研究,最后成功地利用一株淀粉液化芽孢杆菌突变株一次发酵,一次提取制备具有啤酒糖化三种关键酶(β- 葡聚糖酶、蛋白酶、α- 淀粉酶)的啤酒复合酶,利用该复合酶在武汉中德啤酒厂,江苏江都啤酒厂,安徽蚌埠啤酒厂进行糖化应用试验,取得良好的应用效果。已于 1992 年 12 月通过江苏省教委的鉴定。

1 结果与讨论

1.1 复合酶生产菌株的选育及复合酶制剂的制备[8~9]

1.1.1 突变株 WL-BA-1 的获得 对从国内外收集到的 42 株枯草芽孢杆菌及 6 株淀粉液化芽孢杆菌进行摇瓶筛选,最后确定一株淀粉液化芽孢杆菌及一株枯草芽杆菌作为出发株进行诱变处理,诱变系谱如图 1.

β-葡聚糖酶 (u/ml)	α-淀粉酶 (u/ml)	蛋白酶 (u/ml)	β-葡聚糖酶 (u/ml)	α-淀粉酶 (u/ml)	蛋白酶 (u/ml)
B·S(L-1) 9.41	0.5	584.4			
NTG↓37℃,30 min					
L-N-01 24.6	1.752	1323.6			
↓单菌落分离					
S-B 28.9	1.85	1363.6	B·am(L-2) 26.1	102.86	504.48
			DES↓37℃,37min		
DES↓37℃,30min			D-043 53.41	126.36	1122.05
			↓单菌落分离		
D-076 37.36	1.773	1168	S-A 58.84	135.85	1168
			NTG↓37℃,25min		
↓单菌落分离			N-078 81.08	205.71	818.16
D-076-08 41.04	1.96	1172	↓单菌落分离及条件改进		
			N-078-12		
			(WL-BA-1) 88.95	209	1182.5

图 1 菌株的诱变系谱

由图 1 可以看出,淀粉液化芽孢杆菌经两次诱变后,得到一株突变株 WL-BA-1,三种酶活均较高,因此确定该菌为试验菌。

1.1.2 菌株 WL-BA-1 的部分特征或特性

1) 细胞形态如图 2.

2) 菌株 WL-BA-1 的安全性 该菌株和枯草芽孢杆菌一样,是经 WHO 和 FAD 确定的产孢外酶的安全微生物源[5]。

3) 菌株的稳定性 WL-BA-1 经传代后,三角瓶摇瓶时,产酶性能稳定,结果如表 1.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

瓶产酶曲线及pH和糖化酶活

酶·液态发酵酶浆菌种一·X一 蛋白质

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.1.4 菌株的扩大发酵实验

1) 菌株的20L扩大发酵试验 接种量8%～10%,培养温度37℃±1℃,起始pH7.0,风量1∶0.3～0.8. 发酵曲线如图4.

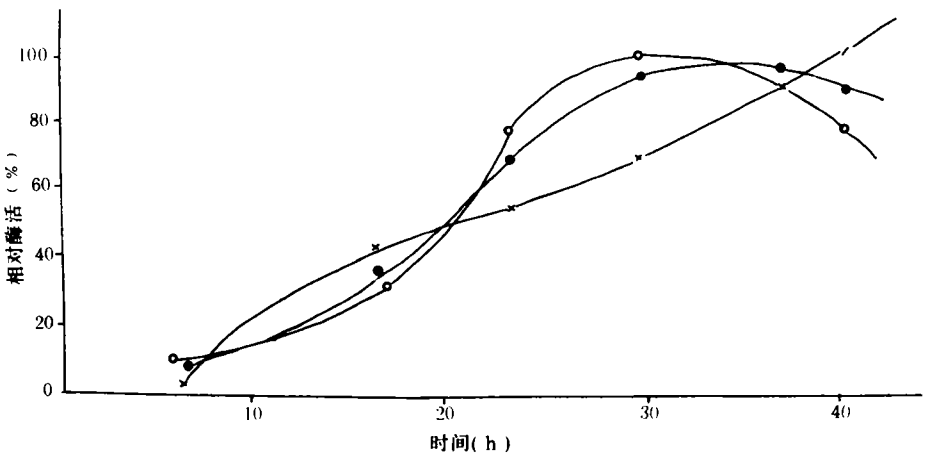


图4 菌株的20L发酵曲线

—●— β-葡聚糖酶 — × — α-淀粉酶 —○— 蛋白酶

2) 菌株的3000L扩大发酵试验

斜面菌样⟶茄子瓶⟶种子罐⟶3000L发酵罐。

利用该菌株在本院发酵厂进行30余批发酵试验,菌株的发酵周期短,在28～37h之间,发酵液中三种酶的平均活性为β-葡聚糖酶110u/ml,蛋白酶1800u/ml,α-淀粉酶150u/ml. 其中较连续的10批次发酵结果如表2.

表2 菌株3000L 10批次发酵结果

批号		1	2	7	9	10	11	12	14	15	16
发酵时间(h)		29	33	31	32	36	37	37	30	28	28
发酵结束时	β-葡聚糖酶(u/ml)	121	128	107	128	119	115	105	126	102	126
	α-淀粉酶(u/ml)	205	197	191	192	165	185	136	169	183	196
	蛋白酶(u/ml)	1484	1813	1478	1891	2415	1847	1697	1480	2025	1898

1.1.5 发酵液的提取及复合酶的保藏稳定性 发酵液经压滤,低温真空浓缩得到液体酶制剂:β-葡聚糖酶≥300u/ml,α-淀粉酶≥500u/ml,蛋白酶≥3000u/ml. 三种酶的提取得率均在75%以上。制得的液体酶制剂加入一定防腐剂装桶,室温下贮存的稳定性如图5.

综合以上结果,采用WL-BA-1菌株,在一般的通风条件及较低的固形物浓度下,一次发酵,一次提取即可制得含啤酒糖化所需的三种关键酶的复合酶。菌株的发酵周期短,可大大提高生产效率和经济效益。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

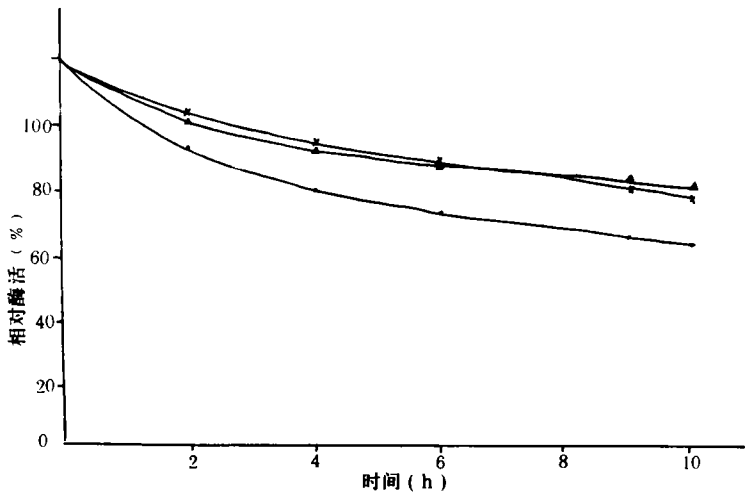


图5 复合酶室温下贮存的稳定性

—×— β-葡聚糖酶 —▲— α-淀粉酶 —●— 蛋白酶

1.2 酶的特性

1.2.1 *最适反应pH* 用不同pH值的缓冲液，将复合酶稀释至所需浓度，在各相应的pH条件下反应，测定酶活力，结果如图6.

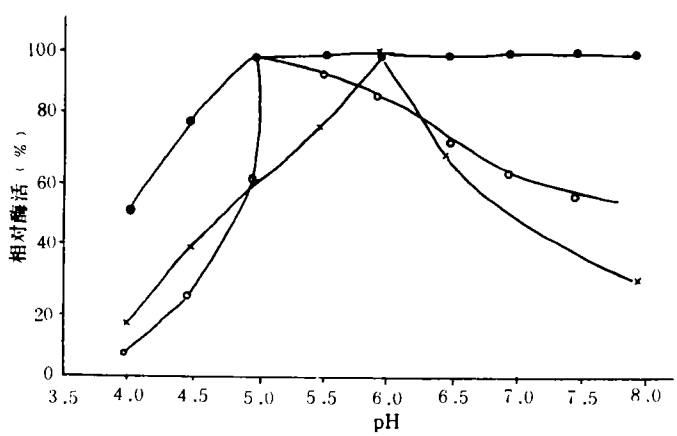


图6 复合酶的最适反应pH

—●— 蛋白酶 —○— α-淀粉酶 —×— β-葡聚糖酶

由图可知，最适pH分别为：β-葡聚糖酶为6.0，α-淀粉酶为5.0，蛋白酶为5.0～8.0.

1.2.2 *最适反应温度* 稀释至一定浓度的酶液，加入反应体系，分别在20℃，40℃，50℃，60℃，70℃测定，结果如图7.

由图7可知，最适反应温度为：β-葡聚糖酶为55℃，α-淀粉酶为60℃，蛋白酶为55℃.

1.2.3 *pH值对复合酶中各酶稳定性的影响* 将酶液加入不同pH值的缓冲液中放置一定

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

时间后,取样在 pH6.0 测酶活,结果如图 8.

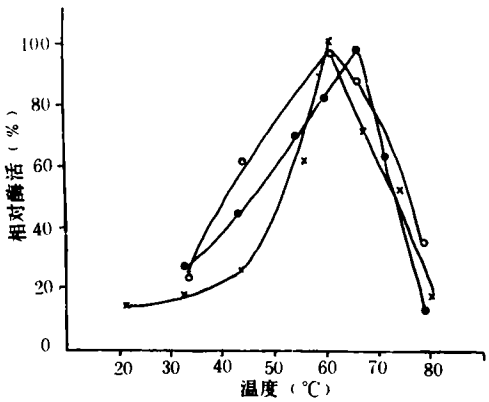


图 7 酶的最适反应温度

—●—蛋白酶 —○— α-淀粉酶 — × — β-葡聚糖酶

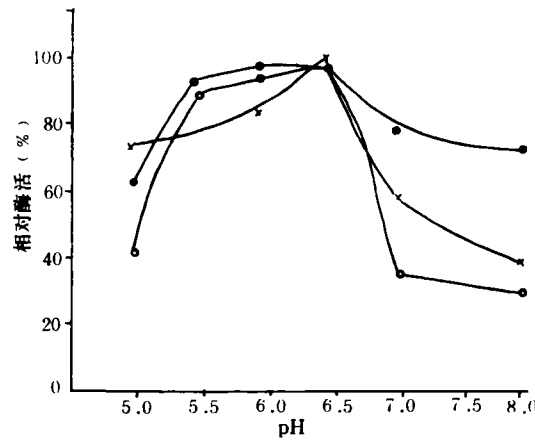


图 8 pH 值对酶活稳定性的影响

—●— β-葡聚糖酶 —○— 蛋白酶 — × —α-淀粉酶

在 50℃下,pH 为 6.0 左右,保温 30min 后,复合酶中各酶都具有很好的稳定性。

1.2.4 *温度对复合酶中各酶稳定性的影响* 复合酶在 pH 5.6 下分别在 40℃,50℃,55℃,60℃,70℃保温一定时间后,立即冷却至室温,取样在各酶相应条件下测酶活,结果如图 9.

pH 为 5.6,温度在 40～50℃之间,α-淀粉酶和蛋白酶有较高的活性,而 β-葡聚糖酶则在 60℃时活性最高。

1.2.5 *离子浓度对酶活性的影响* 稀释至适当浓度的酶液,添加 10mmol 的离子,室温下作用 20min,在 pH6.0,温度为 40℃条件下测定 β-葡聚糖酶活性,以蒸馏水代替离子溶液作对照,结果如表 3.

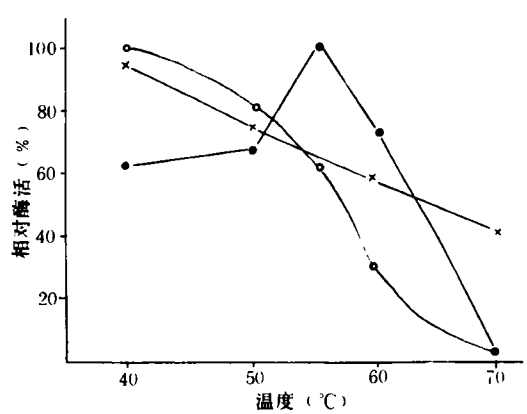


图 9 温度对酶活稳定性的影响

—●— β-葡聚糖酶 —○— 蛋白酶 — × —α-淀粉酶

表 3 离子对酶活性的影响

名称	最终浓度 (mol/L)	β-葡聚糖酶复合酶活性(%)
对照	—	100
$CaCl_2$	1×10^{-2}	104
NaCl	1×10^{-2}	154
NH_4Cl	1×10^{-2}	167
KCl	1×10^{-2}	148
EDTA	1×10^{-2}	83
$(NH_4)_2SO_4$	1×10^{-2}	151
$MgSO_4$	1×10^{-2}	170
$FeSO_4$	1×10^{-2}	40
$ZnSO_4$	1×10^{-2}	124
$CuCl_2$	1×10^{-2}	63

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表3表明，Ca^{2+}，Na^{+}，NH_4^{+}，K^{+}，Mg^{2+}对酶具有明显的激活效应，而且这些离子是啤酒酿造中常见的离子。

1.2.6 *经分离提纯的β-葡聚糖酶的酶促反应*[6],[10] 应用DEAE——纤维素离子交换层析柱分离复合酶，得到电泳纯β-葡聚糖酶，该酶作用大麦β-葡聚糖，得到数据如表4. 用Lineweaver和Burk的作图法，$1/V$对$1/S$作图得到图10.

表4 底物β-葡聚糖的浓度对酶反应速度的影响

β-葡聚糖酶 (mg/ml)	葡萄糖量 (mg/min)	$1/S$	$1/V$
10	0.0445	0.1	22.47
8	0.0436	0.125	22.93
7	0.0424	0.143	23.58
6	0.0416	0.167	24.04
5	0.0401	0.2	24.93

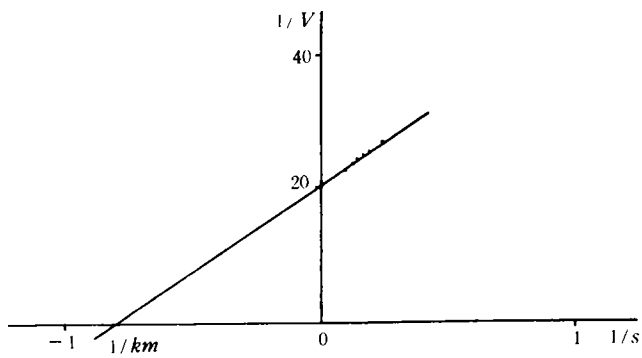


图10 $1/V$对$1/S$作图求Km

由图10可得$-1/Km = 1/S = 0.802$，米氏常数$Km = 1/0.802 = 1.247$mg/ml，最大反应速度$V_{max} = 0.0500$mg/min.

底物浓度对酶反应速度的影响如图11.

图11表明，β-葡聚糖酶催化反应的曲线为双曲线，符合一级反应曲线。

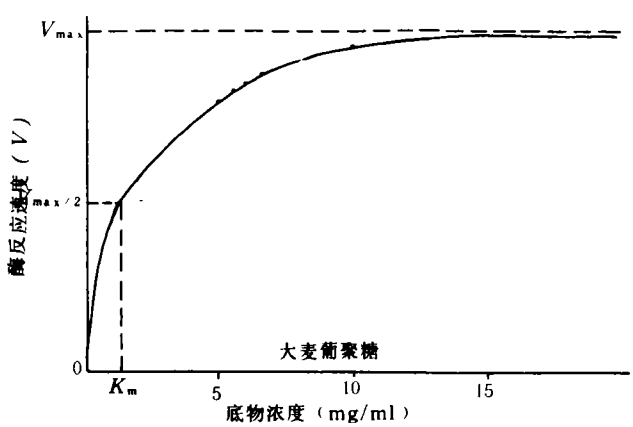


图11 底物浓度对酶反应速度的影响

从以上对复合酶特性的研究结果可知，啤酒酿造中糖化时醪液的pH值、糖化温度及糖化醪中存在的离子等均有利于复合酶中各酶对相应的大分子的降解作用。

1.3 复合酶制剂在啤酒酿造中的应用

国产大麦的二级麦芽，发芽率低(75%～85%)，叶芽伸长度不均匀(平均伸长度<75%)，造成麦芽中的蛋白酶及β-葡聚糖酶等的分泌不足，由此影响到麦芽中蛋白质的溶解度(库值34%～38%)，麦芽α-氨基氮偏低(140～150mg/100g绝干麦芽)；β-葡聚糖的降解不足，影响到麦芽的浸出率(粗细粉差>3.5%，麦汁粘度大，过滤时间长，麦汁混浊)。针对上述缺点，根据复合酶的酶学特性及作用性质，经过多次实验比较，确定了复合酶的添加工艺。

1.3.1 *麦芽中的三种酶活分析* 结果见表5.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 5 麦芽中的部分酶活分析

测定项目	加拿大大麦的麦芽		澳大利亚大麦的麦芽		国产大麦二级麦芽	
		加 0.1%复合酶		加 0.1%复合酶		加 0.1%复合酶
β-葡聚糖酶 (u/kg 绝干麦芽)	205	505	197	497	241	541
蛋白酶 (u/kg 绝干麦芽)	8.2×10^3	1.12×10^4	9.2×10^3	1.22×10^4	7.9×10^3	1.09×10^4
α-淀粉酶 (u/kg 绝干麦芽)	2.2×10^4	$2.2\times10^4+500$	1.89×10^4	$1.89\times10^4+500$	1.90×10^4	$1.90\times10^4+500$

1.3.2 *标准协定法糖化时的加酶*[3] 选用进口大麦麦芽,国产大麦麦芽进行标准协定法糖化,调节糖化醪 pH 为 5.4,当温度为 45℃时加入 0.1%的复合酶(以风干麦芽重量计)。结果如表 6 和 7.

表 6 标准协定法糖化时的加酶结果

测定项目	加拿大大麦的麦芽		国产大麦二级麦芽		国产大麦三级麦芽	
	不加酶	加 酶	不加酶	加 酶	不加酶	加 酶
70℃糖化时间(min)	<10	<10	10~15	10~15	10~15	10~15
浊 度(EBC)	6.95	3.45	13.15	3.68	7.90	4.16
色 度(EBC)	2.8	2.7	5.3	4.3	4.3	6.2
粘 度($\times10^{-3}$Pa·s)	1.329	1.315	1.453	1.412	1.431	1.407
α-氨基氮(mg/L 麦汁)	168	200	127	137	135	156
风干麦芽浸出率(E,%)	73.15	73.42	72.02	73.43	72.14	73.43

表 7 加复合酶后三项指标的变化

麦芽品种	粘度下降 (%)	α-氨基氮提高 (%)	E 提高 (%)
加 麦	1.0	21	0.4
二 级	2.8	7.8	2.0
三 级	1.7	15	1.8

1.3.3 *复合酶在啤酒生产中的应用*[3,7] 利用中试自制的复合酶制剂,先后在江都啤酒厂、溧阳啤酒厂、中德长江啤酒厂、蚌埠啤酒厂进行应用试验,效果明显。在蚌埠啤酒厂生产 1000t 啤酒中的应用结果如下:国产二级麦芽,按麦芽量的 0.1%添加复合酶,pH5.5,50℃加入作用 60min,麦汁分析结果见表 8. 生产中选用大米作辅料。

表 8 复合酶在生产中的应用结果

项 目	加 0.1% 复合酶					对 照				
	289	290	292	293	平均值	298	299	302	305	平均值
投料量 (kg)	5324	5337	5463	5449	5393	5474	5431	5482	5479	5467
麦芽的比例 (%)	64.7	64.4	65.3	65.6	65	65.5	65.2	65.4	65.4	65.4
过滤时间 (min)	130	115	150	130	131	135	139	165	160	149
糖化醪粘度 ($\times10^{-3}$Pa·S)	1.745	1.878	未测	1.769	1.797	1.922	1.925	未测	1.925	1.924
麦汁浓度 (°P)	11.821	11.959	11.816	11.888		11.912	11.864	12.007	12.150	

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

续表 8

项目	加 0.1% 复合酶					对照				
	289	290	292	293	平均值	298	299	302	305	平均值
α-氨基氮 (mg/L 麦汁)	163	175	178	185	175.3	171	168	160	139	164.5
还原糖麦芽糖 (g/100ml 麦汁)	8.89	8.91	8.86	8.80		8.83	8.78	9.27	8.83	
糖：非糖	1：0.32	1：0.34	1：0.33	1：0.35		1：0.35	1：0.35	1：0.30	1：0.37	
色 度(EBC)	7.1	7.3	7.5	7.6		7.5	7.0	7.1	6.9	
总酸 1mol/L 的 NaOH ml/100ml 麦汁	1.27	1.43	1.38	1.33		1.48	1.38	1.31	1.28	
苦味值 (BU)	28	30	34	35		32	33	31	36	
原料浸出物收得率 E(%)	71.6	75.2	73.6	70.1	72.6	71.1	72.7	70.2	71.6	71.4

糖化中添加复合酶后麦汁过滤时间平均缩短 18min，麦汁 α-氨基氮提高 6.6%，糖化醪粘度下降 8.0%，原料浸出物得率提高 1.2%.

国产三级麦芽添加复合酶后效果更为显著。加复合酶后啤酒各项理化指标和感观指标优于不加酶的，啤酒保质期预测可延长二个月。

2 结 论

对复合酶中各酶的酶学特性及酶作用性质的研究，为复合酶在啤酒酿造中的应用提供了依据。通过实验室的小型应用和啤酒厂大生产糖化应用研究，结果表明，对于国产二级、三级麦芽，添加适量该复合酶，可以提高麦芽浸出物收率，改善麦汁性能，延长啤酒 的保质期。

参 考 文 献

1 Bamforth C W Q, Martin H L. Journal of the Institute of Brewing, 1983,89:303

2 Forrest I S Q, Wainwright T. European Brewery Convention. Proceedings of the 10th Congress. Amsterdam, 197, 401

3 管敦仪. 啤酒工业手册(上、中). 轻工业出版社,1982

4 上海师范大学数学系. 回归分析及其试验设计. 上海教育出版社,1987

5 Knud Aunstrup, Extracellular Enzymes

6 沈同等. 生物化学(上、下). 人民教育出版社

7 周贵鑫. 纯 β-葡聚糖酶大生产应用试验. 中国啤酒通讯, 1991,(3)

8 张树政. 酶制剂工业(上、下). 科学出版社,1984

9 邬显章. 酶的工业生产技术. 吉林科学技术出版社,1988

10 南京大学生物系,生物化学实验. 高等教育出版社

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

The Study and Production on A Compound Enzyme of β- glucanase, α- amylase and Proteinase for Brewing

Yin Xiangsheng Li Yongxian Gu Goxian Liao Yonghong Fan You
(Dept. of Bioengineering)

Abstract A mutant (WL-BA-1) of Bacillus amyloliquefaciens was obtained by mutation and screening from a series of stratins of Bacillus subtilis and Bacillus amyloliquefaciens. After being scaled up from 250ml conical flask to 20L container, production trials of the compound enzyme have been done in 3000L aerated fermentor with the result of β-glucanase 120u/ml, α-amylase 150u/ml, and proteinase 1800u/ml respectively. The fermentation period was short, the broth was filtered and the filtrate was concentrated into liquid enzyme product.

Key-words Bacillus amyloliquefaciens; Compound enzyme; Mashing

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net