

Study on Degradation of *Canna Edulis* Starch by the Pullulanase-Assisted Double Enzyme Method

Changmei Wang¹, Wudi Zhang^{1*}, Wei Han^{1,2}, Wenrong Huang^{1,2*}, Yu Lei^{1,2}, Wanxian Li^{1,2}, Fang Yin¹, Xingling Zhao¹, Bin Yang¹, Kai Wu¹, Jing Liu¹, Hong Yang¹, Shiqing Liu¹

¹Solar Energy Research Institute, Yunnan Normal University, Kunming Yunnan

²Wanfang Biotechnology Co., Ltd. of Yunnan, Kunming Yunnan

Email: wangcmzf@163.com, *wootichang@163.com, *wonfine@126.com

Received: Oct. 29th, 2019; accepted: Nov. 12th, 2019; published: Nov. 19th, 2019

Abstract

Using *Canna edulis Ker* starch as raw material, the ratio of material to water was 1:3, and the degradation of *Canna edulis Ker* starch was studied by the pullulanase-assisted double enzyme method. It was determined by experiments that the optimum stage of the addition of pullulanase was added before liquefaction. Compared with the control group, the addition of pullulanase 30 μ /g before liquefaction can increase the content of reducing sugar by 1.29%, and the alcohol content after fermentation was increased by 1.3. The results indicated that the addition of pullulanase was helpful for the double enzymatic degradation of *Canna edulis Ker* starch.

Keywords

Pullulanase, Double Enzymatic Method, *Canna edulis Ker* Starch, Degradation

普鲁兰酶辅助双酶法降解芭蕉芋淀粉的研究

王昌梅¹, 张无敌^{1*}, 韩伟^{1,2}, 黄文荣^{1,2*}, 雷宇^{1,2}, 李万仙^{1,2}, 尹芳¹, 赵兴玲¹, 杨斌¹, 吴凯¹, 柳静¹, 杨红¹, 刘士清¹

¹云南师范大学太阳能研究所, 云南 昆明

²云南万芳生物技术有限公司, 云南 昆明

Email: wangcmzf@163.com, *wootichang@163.com, *wonfine@126.com

收稿日期: 2019年10月29日; 录用日期: 2019年11月12日; 发布日期: 2019年11月19日

*通讯作者。

文章引用: 王昌梅, 张无敌, 韩伟, 黄文荣, 雷宇, 李万仙, 尹芳, 赵兴玲, 杨斌, 吴凯, 柳静, 杨红, 刘士清. 普鲁兰酶辅助双酶法降解芭蕉芋淀粉的研究[J]. 食品与营养科学, 2019, 8(4): 285-290. DOI: 10.12677/hjfn.2019.84037

摘要

以芭蕉芋淀粉为原料,料水比为1:3进行发酵,确定了普鲁兰酶辅助双酶法对芭蕉芋淀粉的降解情况。通过实验确定普鲁兰酶添加的最适阶段是在液化前添加,与对照组相比,在液化前先添加普鲁兰酶30 μg ,可使还原糖的含量提高1.29%,发酵结束后的酒精质量分数提高1.3,结果表明添加普鲁兰酶有助于双酶法降解芭蕉芋淀粉。

关键词

普鲁兰酶, 双酶法, 芭蕉芋淀粉, 降解

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

芭蕉芋,学名蕉藕,是美人蕉科美人蕉属多年生单子叶草本植物,原产于南美等地,我国主要分布在贵州、云南、广西、广州等南部省区[1][2][3][4],具有适应性广、喜温光、抗逆性强、产量高、易栽培、用途广等特点。芭蕉芋块茎含有高达60%的淀粉,近年来已有将芭蕉芋淀粉简单物化改性制备改性淀粉[5]、生产粉丝、淀粉糖、代餐粉和甘油等产品[4][6][7][8],也有将芭蕉芋淀粉经生物转化而获得乙醇[9][10]。普鲁兰酶是淀粉酶的一种,属于脱支类淀粉酶,用普鲁兰酶对淀粉适度处理能改变淀粉的分子结构和理化特性[11][12]。普鲁兰酶与双酶法结合应用到原料水解工艺中,可提高淀粉转化还原糖的效率,增加发酵速度,提高原料利用率[13]。

来源于不同产地的同一品种,原料的成分也有所不同,成分不同会影响原料的出酒率,通过对其所含的水分、淀粉含量、蛋白质含量、脂肪、纤维素含量进行常规分析后,有针对性添加酶制剂,可有效促进原料的充分降解及利用。根据芭蕉芋淀粉的特性,本文在糖化、液化的不同阶段添加普鲁兰酶,并与 α -淀粉酶及糖化酶相结合,对芭蕉芋淀粉的降解情况进行试验研究,以为芭蕉芋淀粉制备燃料乙醇提供基础数据。

2. 材料与方法

2.1. 主要原材料

α -淀粉酶:上海晶抗生物工程有限公司,10,000单位

糖化酶:南宁庞博生物工程有限公司,20,000单位

普鲁兰酶:上海鼎好生物科技有限公司,2000单位

酿酒高活性干酵母:山东伟多丰生物技术有限公司

芭蕉芋淀粉:购于昭通市农贸市场。

2.2. 仪器设备

分析天平、台式高速离心机、分光光度计、可控温电炉、恒温水浴锅、酸度计、容量瓶、三角瓶、

滴定、电热鼓风干燥箱等。

2.3. 测定项目及方法

还原糖、总糖检测：采用菲林试剂直接滴定法[14] [15]测定糖化前后和发酵后 10 mL 料液中还原糖和总糖含量。根据还原糖含量推算淀粉含量[16]。

低聚糖的测定：采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法[17]。

粗蛋白含量：采用海能全自动凯氏定氮仪测定芭蕉芋淀粉中蛋白质含量[18]。

粗脂肪含量：利用索氏抽提法测定[19]。

水分、灰分含量：采用常规测定方法[10]测定。

pH：采用 pH 计直接测定法测量糖化后和发酵后的料液 pH 值。

酒精体积分数的测定：取 100 mL 芭蕉芋发酵料，置于 500 mL 圆底烧瓶中，加 100 mL 水进行蒸馏，用 100 mL 容量瓶收集馏出液体，并定容至 100 mL，采用比重瓶法测定酒精体积分数[20]。

2.4. 试验方法

2.4.1. 不同阶段添加普鲁兰酶的作用效果

首先通过预实验确定了淀粉酶和糖化酶适合用量分别为 5 μg 及 150 μg 芭蕉芋淀粉。在此基础上共设 4 个处理方式，即在不同阶段按普鲁兰酶 30 μg 芭蕉芋淀粉添加：A 组在淀粉酶液化前首先加入；B 组与淀粉酶同时加入；C 组与糖化酶同时加入；以不加入普鲁兰酶为对照(CK)。具体试验方法为：A 组将芭蕉芋淀粉与水按 1:3 的量调成淀粉糊，在搅拌下水浴加热至 90 $^{\circ}\text{C}$ 糊化，冷却至 60 $^{\circ}\text{C}$ 时加入普鲁兰酶(30 μg 芭蕉芋淀粉)，保持 30 min；再将温度升高至 70 $^{\circ}\text{C}$ ，加入 α -淀粉酶(5 μg 芭蕉芋淀粉)，保持 30 min；最后将温度降低至 60 $^{\circ}\text{C}$ ，加入糖化酶(150 μg 芭蕉芋淀粉)，保持 30 min。B 组将木薯淀粉与水按 1:3 的量调成淀粉糊，在搅拌下水浴加热至 90 $^{\circ}\text{C}$ 糊化，再降低到 70 $^{\circ}\text{C}$ 时加入淀粉酶(5 μg 芭蕉芋淀粉)和普鲁兰酶(30 μg 芭蕉芋淀粉)，保持 30 min；再将温度降低至 60 $^{\circ}\text{C}$ ，加入糖化酶(150 μg 芭蕉芋淀粉)，保持 30 min。C 组将芭蕉芋淀粉与水按 1:3 的量调成淀粉糊，在搅拌下水浴加热至 90 $^{\circ}\text{C}$ 糊化，再降低到 70 $^{\circ}\text{C}$ 时加入淀粉酶(5 μg 芭蕉芋淀粉)，保持 30 min；再将温度降低至 60 $^{\circ}\text{C}$ ，同时加入糖化酶(150 μg 芭蕉芋淀粉)和普鲁兰酶(30 μg 芭蕉芋淀粉)，保持 30 min。D 组为 CK 组不添加普鲁兰酶。各阶段结束后取样测定还原糖和总糖含量。

2.4.2. 添加不同剂量普鲁兰酶的降解效果

通过不同阶段添加普鲁兰酶的作用效果，确定了在液化前添加普鲁兰酶对芭蕉芋淀粉的降解效果更好。在 500 ml 三角瓶中，将芭蕉芋淀粉与水按 1:3 的量调成淀粉糊，在搅拌下水浴加热至 90 $^{\circ}\text{C}$ 糊化，冷却至 60 $^{\circ}\text{C}$ 时加入普鲁兰酶(设定添加的普鲁兰酶量分别为 0 μg , 5 μg , 10 μg , 15 μg , 20 μg , 25 μg , 30 μg , 35 μg 和 40 μg)，保持 30 min；再将温度升高至 70 $^{\circ}\text{C}$ ，加入 α -淀粉酶(5 μg 芭蕉芋淀粉)，保持 30 min；最后将温度降低至 60 $^{\circ}\text{C}$ ，加入糖化酶(150 μg 芭蕉芋淀粉)，保持 30 min；冷却至 32 $^{\circ}\text{C}$ 左右，按 0.5%添加安琪酵母，按 2%添加尿素和磷酸二氢钾并拌匀[21]，瓶口塞上发酵栓，于 32 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中进行酒精发酵 60 h。发酵结束检测还原糖含量，总糖含量以及酒精质量分数。

3. 结果与分析

3.1. 原料基本特性测定结果

以购买于农贸市场的芭蕉芋淀粉为原料，经测定其基本成分如表 1 所示。

Table 1. Composition of *Canna edulis Ker* starch**表 1.** 芭蕉芋淀粉的成分

化学组成	粗淀粉	粗蛋白	粗纤维	粗脂肪	含水量	灰分
含量(%)	63.32	3.69	3.21	0.35	11.2	2.74

由表 1 可以看出, 实验所用原料中的粗淀粉含量较高, 达 60% 以上。同时还含有蛋白、纤维和脂肪等, 其中脂肪含量较低, 仅占 0.35%。据文献报道[5], 芭蕉芋淀粉的磷和结合磷含量接近于马铃薯淀粉, 比玉米淀粉略高。

3.2. 不同阶段添加普鲁兰酶对糖含量的影响

以芭蕉芋淀粉为原料发酵制备乙醇的过程中, 不同的处理阶段添加普鲁兰酶 30 μg , 即分别在淀粉酶液化前加入(A 组)、与淀粉酶同时加入(B 组)以及与糖化酶同时加入(C 组), 对照组不添加普鲁兰酶, 各阶段结束后分别测定体系中的还原糖和总糖含量, 结果如表 2、表 3 所示。

Table 2. Reducing sugar content of adding pullulanase to treat *Canna edulis Ker* starch at different stages (%)**表 2.** 不同阶段添加普鲁兰酶处理芭蕉芋淀粉后还原糖含量(%)

组别	60℃水浴 30 min	60℃水浴 30 min (液化)	60℃水浴 30 min (糖化)
A	1.87	8.81	12.67
B	1.45	8.47	12.49
C	1.45	8.36	12.31
CK	1.45	8.19	11.22

从表 2 可以看出, 在芭蕉芋淀粉降解工艺中添加普鲁兰酶后, 体系中还原糖含量均高于对照组, 其中 A 处理(液化前添加普鲁兰酶)的还原糖含量增加较明显, 糖化后还原糖含量比对照组提高了 1.45%。这说明在液化前添加普鲁兰酶, 对芭蕉芋淀粉进行预处理, 更有助于后续糖化酶对淀粉的降解。

Table 3. Total sugar content of adding pullulanase to treat *Canna edulis Ker* starch at different stages (%)**表 3.** 不同阶段添加普鲁兰酶处理芭蕉芋淀粉后体系中总糖含量(%)

组别	60℃水浴 30 min	60℃水浴 30 min	60℃水浴 30 min
A	10.16	12.43	14.15
B	10.32	12.82	14.16
C	10.53	12.67	14.35
CK	8.92	12.12	14.13

从表 3 可以看出, 在芭蕉芋淀粉降解工艺中添加普鲁兰酶后, 总糖含量有明显提高, 在前两阶段 C 处理组中的总糖含量最高, B 处理组次之, 经过糖化阶段后, B 处理组中总糖含量最高, C 处理组次之。可以看出, 普鲁兰酶的添加能提高体系中总糖的含量, 但添加顺序对体系中总糖含量变化的影响并不明显。

从表 2 和表 3 可以看出, 添加普鲁兰酶后, 体系中还原糖和总糖含量都有不同程度的提高, 其添加的顺序对体系还原糖含量有很大的影响, 而对总糖含量影响并不明显。从经济性和实用性的角度考虑, B 处理比较合理, 即在液化阶段, 添加普鲁兰酶对芭蕉芋淀粉进行降解的效果最好。

3.3. 普鲁兰酶添加量对芭蕉芋淀粉糖化及酒精体积分数的影响

为了进一步确定普鲁兰酶对芭蕉芋淀粉降解效果的影响, 采取在液化阶段同时添加不同用量的普鲁兰酶(0 μg 、5 μg 、10 μg 、15 μg 、20 μg 、25 μg 、30 μg 、35 μg 和 40 μg), 再糖化并继续发酵产乙醇, 结束后对体系中还原糖、总糖含量以及酒精质量分数进行了测定, 结果见表 4。

Table 4. Effects of the addition amount of pullulan on the conversion rate of reducing sugar, total sugar and alcohol in the system

表 4. 普鲁兰酶添加量对体系还原糖、总糖和酒精质量分数的影响

普鲁兰酶(μg)	还原糖(%)	总糖(%)	酒精质量分数
0	9.02	11.72	6.9
5	9.79	12.02	7.2
10	9.88	12.08	7.4
15	10.09	12.17	7.6
20	10.17	12.21	7.9
25	10.25	12.27	8.1
30	10.31	12.33	8.2
35	10.31	12.39	8.2
40	10.30	12.4	8.1

从表 4 中可以看出, 随着普鲁兰酶用量的增加, 体系中还原糖含量也在增加, 普鲁兰酶用量在 0 μg 至 10 μg , 体系中还原糖含量缓慢增加; 当用量在 10 μg 至 20 μg , 体系中还原糖含量增幅最为明显; 当用量 20 μg 至 30 μg , 体系中还原糖含量缓慢增加, 并在此范围内达到还原糖含量达到了最大值; 超过 30 μg 时, 体系中还原糖含量降低。普鲁兰酶的添加, 对体系中总糖的影响趋势与对还原糖的类似, 但没有对还原糖的影响明显。普鲁兰酶的添加, 对酒精质量分数的影响较明显, 与不添加普鲁兰酶发酵的结果相比, 提高了 1.3。因此, 考虑成本问题, 普鲁兰酶最适用量 20 μg 至 30 μg 之间。

4. 结论

- 1) 在液化前添加普鲁兰酶有助于芭蕉芋淀粉的降解。
- 2) 添加普鲁兰酶的量过少, 达不到理想效果, 糖化率偏低, 若普鲁兰酶添加过多, 将会增加成本。本实验条件下, 普鲁兰酶的最适用量为 30 μg 芭蕉芋淀粉, 可使还原糖的含量达到 10.31%, 比对照组提高 1.29%, 发酵结束后的酒精质量分数提高了 1.3。
- 3) 普鲁兰酶辅助双酶法可有效提高芭蕉芋淀粉的降解率。

基金项目

云南省国际科技特派员项目(2015IA022); 云南省农村能源工程重点实验室基金项目(2017KF03); 云南省科技富民强县计划(2014EA006)和昆明市科技计划项目(2014-01-A-G-02-3059)联合资助。

参考文献

- [1] 张娟, 唐文凭, 王正武, 史贤明. 芭蕉芋淀粉和直链淀粉提取、分离、鉴定及含量测定[J]. 食品科学, 2008(9): 303-306.
- [2] Lan, X.H., Zhang, J.J., Wu, J.H., *et al.* (2016) Application of Two-Phase Lamellar Model to Study the Ultrastructure of Annealed Canna Starch: A Comparison with Linear Correlation Function. *International Journal of Biological Macro-*

- molecules*, **93**, 1210-1216. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.017>
- [3] Wu, T.X., Wang, F., Tang, Q.L., *et al.* (2010) Arrowroot as a Novel Substrate for Ethanol Production by Solid State Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Biomass & Bioenergy*, **34**, 1159-1164. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.03.002>
- [4] Zhang, J., Wang, Z.W. and Shi, X.M. (2010) Effect of Microwave Heat/Moisture Treatment on Physicochemical Properties of *Canna edulis*, Ker Starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**, 653-664.
- [5] Juansang, J., Puttanlek, C., Rungsardthong, V., *et al.* (2012) Effect of Gelatinisation on Slowly Digestible Starch and Resistant Starch of Heat-Moisture Treated and Chemically Modified *Canna* Starches. *Food Chemistry*, **131**, 500-507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.013>
- [6] Srichuwong, S., Isono, N., Jiang, H.X., *et al.* (2012) Freeze-Thaw Stability of Starches from Different Botanical Sources: Correlation with Structural Features. *Carbohydrate Polymers*, **87**, 1275-1279. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.004>
- [7] 孟亚萍, 吴凤凤, 徐学明. 芭蕉芋淀粉对米粉理化性质及粉丝品质的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 33-38.
- [8] 刘桂香, 诸葛斌, 诸葛健. 利用芭蕉芋葡萄糖浆发酵生产甘油[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(6): 150-151.
- [9] 吴天祥, 丁重阳, 杨海龙, 曹建平, 章克昌. 芭蕉芋原料酒精固态发酵工艺条件的初探[J]. 酿酒, 2003(2): 71-73.
- [10] Huang, Y.H., Jin, Y.L., Fang, Y., *et al.* (2013) Simultaneous Utilization of Non-Starch Polysaccharides and Starch and Viscosity Reduction for Bioethanol Fermentation from Fresh *Canna edulis* Ker. Tubers. *Bioresource Technology*, **128**, 560-564. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.134>
- [11] 张盼盼. 耐高温 α -淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌中的表达及酶学性质的研究[D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- [12] 余飞, 邓丹雯, 顾振宇. 普鲁兰酶处理条件对淀粉增抗效应的规律研究[J]. 食品科技, 2008, 33(8): 28-31.
- [13] 刘程玲, 胡煜莹, 王力翹, 王鲁峰. 普鲁兰酶酶解处理红薯淀粉及其性质研究[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(2): 6-11.
- [14] 鲁佰成, 罗虎, 孙振江, 李永恒, 许旺发, 梁坤国. 大米-木薯混合发酵制备燃料乙醇的研究[J]. 轻工科技, 2017, 33(1): 5-6+74.
- [15] 马欣娟, 吕慧威, 孙玉梅. 接种量对草莓酒发酵特性的影响[J]. 中国酿造, 2019(5): 123-126.
- [16] Lin, T.Y. (2000) Conjugated Linoleic Acid Concentration as Affected by Lactic Cultures and Additives. *Food Chemistry*, **69**, 27-31. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00218-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00218-6)
- [17] 吴淑华, 张喆浩, 范玉艳, 马成业. 酶水解豌豆纤维粉制备低聚糖工艺优化[J/OL]. 食品科学, 2019: 1-11. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20181218.1335.064.html>, 2019-09-05.
- [18] 王定发, 陈松笔, 周汉林, 周璐丽, 侯冠彧. 5种木薯茎叶营养成分比较[J]. 养殖与饲料, 2016(6): 48-50.
- [19] 中华人民共和国卫生部、中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.5-2003 食品中蛋白质的测定方法[S]. 2003-08-11.
- [20] 王福荣. 等. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1980: 25-27.
- [21] 田光亮, 赵春雷, 尹芳, 等. 改进的双酶法工艺下酵母培养时间与发酵时间及营养物质对木薯出酒率的影响[J]. 现代农业科技, 2011(7): 357-359.