

大麦制麦酶系中果胶酶的性质及形成机理

赵长新 窦少华 孙付保 张春玲

(大连轻工业学院生物与食品工程学院, 大连, 116034)

摘要 实验采用凝胶层析法从绿麦芽中分离、提纯出果胶酶, 并对其性质、形成机理进行了研究。结果表明: 在麦汁中果胶酶最适 pH 值为 4.5, 而纯果胶酶的最适 pH 值为 4.0; 低浓度的 NaCl、CaCl₂ 对果胶酶具有激活作用。果胶酶的形成机理与其他水解酶基本相同, 其形成依赖于赤霉素, 受胚所分泌的赤霉素刺激, 同时, 亦是多种因素(如大麦麦芽中抑制蛋白、金属盐等)共同作用的结果。

关键词 制麦酶系, 果胶酶, 形成机理

在啤酒的酿造过程中, 从制麦到糖化乃至啤酒发酵, 进行了一系列的生理、生化变化。这些变化都是在酶的参与下完成的^[1]。因此, 了解大麦和麦芽中的酶系对酿造优质啤酒具有重要的意义。大麦中的酶系非常复杂, 未发芽的大麦整个水解酶系活化酶含量少, 活性低; 发芽后由于发生了一系列的复杂的生理、生化反应, 各种酶的活性都得到了较大的增长。目前普遍认为: α -淀粉酶形成机制为大麦发芽后, 胚合成大量的赤霉素, 其中最多是 GA₁, 另外还有 GA₃、GA₈、GA₁₇、GA₁₉ 等^[2]。大麦酶系中的果胶酶与纤维素酶类似, 是一类多组分复合酶, 一般包括原果胶酶, 果胶酯酶, 果胶水解酶等^[3], 它们共同作用于果胶物质。果胶酶能加速淀粉颗粒的释放, 这对提高麦芽的浸出率是十分重要的。

1 实验材料和设备

1.1 实验材料

垦啤-2 号二棱大麦: 黑龙江省友谊县北大荒麦芽集团提供的新品种。

1.2 实验试剂

赤霉素; H₂O₂; 商品 Sephadex G-100; 硫酸铵; 醋酸以及其他分析纯。

1.3 实验仪器

WLB-78-C 型电子微量泵(浙江新昌国泰仪器厂); BS-100A 自动部分收集器(上海东电

讯仪器厂); 冰箱(青岛海尔集团); 研钵; 凝胶柱; 离心机。

2 实验分析与检测方法

2.1 去胚大麦的培养

(1) 取去胚大麦 2g, 用 1% H₂O₂ 灭菌 10 min 后, 清洗 30 min。

(2) 把处理好的大麦放入已灭菌好的培养皿中, 每个培养皿内分别放置 2 张新化一号滤纸。

(3) 吸取 8 mL 含有 0.3 μ L/L 的赤霉素无菌水(赤霉素先溶于少量酒精中, 后放入无菌水), 注入培养皿中, 16℃ 暗处培养 48 h。

(4) 吸取 8 mL 不含赤霉素无菌水, 注入另一培养皿中, 作为对照实验。

2.2 粗酶液的提取

把培养好的去胚大麦用研钵磨碎后分几次用 10 mL 0.02 mol/L pH5.0 HAc-NaAc 缓冲液冲洗数次, 并用双层滤纸过滤, 取滤液测酶活。

2.3 果胶酶酶活的测定方法

参见文献 [4]。

3 实验结果与讨论

3.1 凝胶层析法提纯麦芽中的果胶酶

(1) 葡聚糖凝胶的前处理^[5, 6]

将商品 Sephadex G-100 倒入使用的洗脱液中, 用水力浮选法除去过细颗粒, 常温下浸泡溶

第一作者: 学士, 副教授。

收稿时间: 2003-10-10

胀 24 h 后放在沸水浴中,将浮于洗脱液中的凝胶逐渐升温至沸腾,以杀死葡聚糖凝胶中的细菌、霉菌,排除葡聚糖凝胶内部保藏着的气泡,冷却待用。

(2) 装柱

装柱是凝胶层析中一个关键的操作步骤。首先向柱(1.6 cm×20 cm)中加入约 1/3 高度的洗脱液,在搅拌下将烧杯中的凝胶悬浮液倾入柱中,待底面上沉淀起的凝胶柱床后打开柱的出口,随着下面水的流出上面的不断的加凝胶悬浮液这样凝胶颗粒便连续缓慢沉降,待沉积面到距柱的顶端约 3~5 cm 处停止装柱。新柱装成后继续用洗脱缓冲液平衡,一般用 3~5 倍柱床体积的洗脱液在恒压下流过柱即可。

(3) 样品预处理

取发芽四天的麦芽(16℃、浸 3 断 12)粉碎,双层滤纸过滤后加入(NH₄)₂SO₄ 粉末,使其饱和度达到 30%,于冰箱中过夜。第 2 d 取出离心(2 000 r/min,下同),除去沉淀,然后向上清液中继续加入(NH₄)₂SO₄ 粉末,使之饱和度达到 80%,冰箱中放置过夜后离心,取沉淀置于透析袋中用醋酸缓冲液透析两天,离心取上清液备用。

(4) 样品上柱及洗脱

样品上柱前,将柱床表面存留较多的洗脱液用吸管吸去,留下高于柱床表面 2 cm 的体积,打开出口使洗脱液流至距柱床表面 1~2 mm 时关闭出口。取 1 mL 待测样品,用滴管加入约 4 cm 柱高洗脱液,然后接洗脱瓶开始洗脱。洗脱液为 0.2 mol/L pH5.0 的醋酸缓冲液,流速为 3 mL/15 min,3 mL/管,用自动部分收集器收集,紫外分光光度计下于 280 nm 处测定每管 OD 值。以管号为横坐标,以 OD 值为纵坐标,洗脱曲线如图 1 所示:

在微生物或其他植物中,果胶酶一般有果胶酸酶、果胶酶和果胶酯酶等组成^[7],但是由洗脱曲线可以看出,在整个洗脱过程中虽然出现了几个蛋白酶峰,但是通过酶活测定仅有一个峰具有果胶酶活性,说明麦芽中可能只存在一种果胶酶,在第 52 管,果胶酶酶活最大,取酶峰处酶液备用。

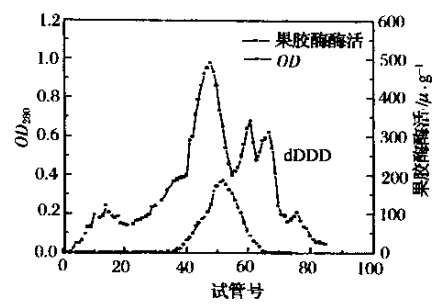


图 1 果胶酶的洗脱曲线

3.2 果胶酶形成机理

表 1 不同条件下大麦中果胶酶酶活

酶活	大麦 (未培养)	去胚大麦 (未培养)	去胚大麦 (培养)	去胚大麦* (GA ₃ 下培养)
果胶酶酶活 /μ·g ⁻¹	12.7	10.3	10.1	19.8

* 赤霉素浓度为 0.3 μL/L

从表 1 可以看出,果胶酶在未发芽大麦中就存在,主要分布在糊粉层及胚乳中,约占大麦酶活的 22.4%。果胶酶存在胚中,其活性非常低。未加 GA₃ 的去胚大麦 16℃ 下培养 48 h 后,酶活基本未变,甚至有所降低,然而与其相对照的实验,在加入 0.3 μL/L GA₃ 后酶活增长了将近一倍,这说明了大麦果胶酶的形成也依赖于赤霉素的作用,也是在赤霉素的刺激下,由糊粉层分泌产生。

3.3 影响麦芽中果胶酶酶活的因素

(1) 发芽时间、浸麦方式对麦芽果胶酶酶活的影响

由图 2 可以看出,果胶酶在未发芽的大麦中活性低,发芽 2 d 后,酶活迅速增加,第 5 d 达到最大值,这一规律并不受浸麦方式的影响。但是,果胶酶最大酶活收浸麦方式影响较大,断水时间过短或过长,都不利于最大酶活的形成,这说明了果胶酶的形成与麦芽吸水量和吸氧量有关。断水时间短,虽然增加了麦芽吸水量,但是麦芽因缺氧,代谢减慢,抑制了酶的形成;断水时间较长,既可以增加麦芽吸水量又可以增加麦芽吸氧量,促进酶的形成;断水时间过长(如 16 h),麦芽又因每次断水后期缺水,抑制了酶的形成。

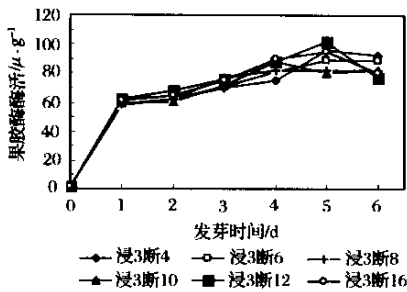


图2 麦芽果胶酶活随时间、浸麦方式的变化曲线

(2) pH 对果胶酶酶活的影响

称取细粉麦芽 10.0 g ,分别加入 0.02 mol/L pH 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液 100 mL 40℃ 搅拌 (100 r/min) 保温 1 h ,以双层滤纸过滤 ,弃去最初滤液 20 mL 后 ,取 0.1 mL 滤液测酶活。结果见图 3。

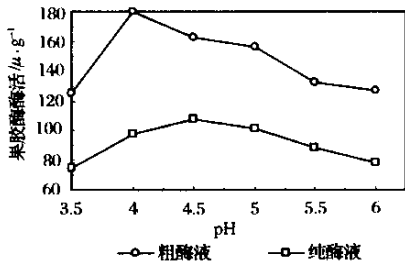


图3 pH 对果胶酶酶活的影响

由图 3 可见 ,麦芽中果胶酶酶活随 pH 升高而增大 ,当达到某一值时 ,酶活又开始下降。麦芽中果胶酶在麦汁中最适 pH 在 4.5 左右 ,而对于纯麦芽果胶酶酶活最适 pH 在 4.0 左右。

(3) 麦芽干燥、糖化温度对果胶酶酶活的影响

绿麦芽干燥工艺及糖化工艺均按实验室获得的最佳工艺进行 ,对于国产垦啤-2 号大麦来说 ,实验室确定的最佳干燥工艺为 :35℃ (2 h) → 45℃ (4 h) → 55℃ (5 h) → 65℃ (4 h) → 75℃ (3 h) → 80℃ (2 h) 干燥时间共 20 h。结果见图 4。

从图 4 可以看出 ,麦芽中果胶酶对温度不稳定 ,酶活受干燥温度、糖化温度影响较大。绿麦芽经 83℃ 焙焦后酶活损失 36.35% ;按最佳糖化工艺糖化 ,糖化温度达 65℃ ,酶活损失

19.84% ,70℃ 时酶活降低 38.46% ,78℃ 时 ,酶活损失 72.94% ,煮沸后果胶酶全部失活。

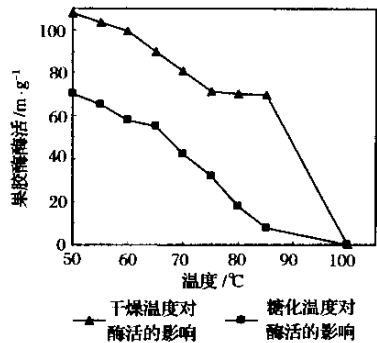


图4 麦芽干燥及糖化温度对果胶酶酶活的影响

(4) 金属盐对果胶酶酶活的影响

称取细粉麦芽 10.0 g ,分别加入或不加 70 μL/L NaCl 和去离子水 100 mL ,40℃ 搅拌 (100r/min) 保温 1 h ,双层滤纸过滤 ,弃去最初滤液 20 mL 后 ,取 0.1 mL 滤液测酶活。果胶酶酶活结果见表 2。

表 2 不同条件下果胶酶酶活 u/g

1#	2#	3#	4#	5#	Ca ²⁺ (50 μL/L)
98.3	104.2	168.2	179.3	111.9	101.6

1# 为直接糖化后所得粗酶液 ,3#、4# 为纯酶 ,4# 测酶活之前加入 NaCl ;5# 为透析后粗酶液 (已恢复沉淀前的体积) 并加入 NaCl ;2# 为糖化时已加入 NaCl。

从表 2 中可以得出一下结论 (1) 糖化时加入适当浓度的 NaCl、Ca²⁺ ,可以提高麦汁中果胶酶的活性 (2) 从 3#、4# 实验对比可以看出 ,NaCl 直接作用于麦芽果胶酶本身 ,说明了适当浓度的 NaCl 对果胶酶具有激活作用 (3) 与 1# 比较而言 ,5# 麦汁经透析后酶活增加了 13.84% ,这说明了麦芽中亦存在着抑制果胶酶酶活的物质 ,透析后由于除去了这些物质 ,酶活而增加。至于这些抑制物的性质以及它们与麦芽果胶酶的连接方式有待于进一步的研究。

4 结 论

本实验采用凝胶层析法从绿麦芽中分离、

提纯出果胶酶,并对其性质、形成机理进行了研究。结果表明:

(1)在麦汁中果胶酶最适 pH 值为 4.5,而纯果胶酶最适 pH 值为 4.0。

(2)果胶酶形成机理与其他水解酶基本相同,其合成依赖于赤霉素,受胚所分泌的赤霉素刺激,由糊粉层细胞合成;另外,大麦、麦芽中抑制蛋白的存在,亦影响其形成,因此果胶酶的形成是多种因素共同作用的结果。

(3)果胶酶对热不太稳定,83℃ 焙焦后酶活损失 36.35%,按最佳糖化工艺糖化,糖化温度达 65℃,酶活损失 19.84%;70℃ 时损失 38.46%;78℃ 时损失 72.94%。

(4)低浓度的 NaCl、CaCl₂ 对果胶酶具有激活作用。

参 考 文 献

- 1 管敦仪. 啤酒工业手册 [M]. 北京:中国轻工业出版社. 1998 20~28
- 2 余叔文、汤章城. 植物生理与分子生物学 [M]. 第二版. 北京:科学技术出版社. 1998 439~458
- 3 张树政. 酶制剂工业 [M]. 北京:科学技术出版社. 1984 595~655
- 4 中山大学. 生物化学导论 [M]. 北京:人民教育出版社. 1978 53~54
- 5 李建武、余瑞元等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京:北京大学出版社. 1994 47~57
- 6 袁净明. 凝胶层析法及其应用 [M]. 北京:科学技术出版社. 1975 50~92
- 7 胡学志. 酶制剂生产技术 [M]. 北京:化学工业出版社. 1994 374~381

Characterization and Formation Mechanism of Pectinase in the Malt Enzyme System

Zhao Changxin Dou Shaohua Sun Fubao Zhang Chunling

(College of Biology and Food Engineering , Dalian Institute of Light Industry , Dalian , 116034)

ABSTRACT In this experiment , pectinase was purified from malt by Gel chromatography. Its enzyme property and formation mechanism were studied. It is indicated that the optimal pH of crude pectinase in mash is about 4.5 while the pure pectinase in HAc-NaAc solution is 4.0. The pectinase activity was activated by low concentration of sodium chloride and calcium chloride. Like the other hydrolysis enzyme , the formation of pectinase depends on an active gibberellin hormone in germination embryo which diffused to the aleurone cell to cause the formation and secretion of pectinase. Its formation was affected by several factors such as the barley , malt inhibitors and metal ions.

Key words malt enzyme system , pectinase , formation mechanism

我国发布 2 项食品标签新标准

《预包装食品标签通则》和《预包装特殊膳食食品标签通则》2 项强制性国家标准将于 2005 年 10 月 1 日实施。新标准不允许利用产品名称混淆食品的真实属性而欺骗消费者。如“橙汁饮料”中的“橙汁”和“饮料”标签上必须使用同一字号。对于消费者关心的甜味剂、防腐剂、着色剂,新标准要求必须标示具体的名称。如要求不能只标示防腐剂、甜味剂,必须标明苯甲酸钠、糖精等。较长时间贮存不易变质的包装食品,如乙醇含量 10% 以上的饮料酒、食醋、食盐、固态糖等,可以免除标示保质期。新标准还允许符合一定条件的一般食品和特殊膳食食品标示营养素含量水平声称、营养素含量比较声称和营养素作用声称。新标准还明确了营养成分的标示方法及转基因食品的标示要求。