

Ectoine 提高啤酒麦芽中酶的热稳定性的研究

郑 昕 张苓花

(大连海事大学环境科学与工程学院,大连 辽宁 116026)

摘要: 研究了 Ectoine 对啤酒麦芽中淀粉酶、 β -葡聚糖酶和纤维素酶热稳定性的影响。在不同浓度的 Ectoine 存在下,考察比较热处理后的上述 3 种酶的残余酶活性。结果表明,经 80 °C 和 90 °C 热处理 10 min 后,与未添加 Ectoine 的相比,添加 5.0 mmol Ectoine,淀粉酶残余酶活力分别提高了 17.6 % 和 26.8 %,添加 3.0 mmol 的 Ectoine, β -葡聚糖酶残余酶活力分别提高了 25.7 % 和 34.6 %,添加 3.0 mmol 的 Ectoine,纤维素酶残余酶活力分别提高 57.6 % 和 50.8 %。

关键词: 啤酒生产; Ectoine; 麦芽; 淀粉酶; β -葡聚糖酶; 纤维素酶; 热稳定性

中图分类号: TS262.5; TS261.4; Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2009)05-0036-03

Research on the Improvement of the Thermostability of Enzyme in Malt by Ectoine

ZHENG Xin and ZHANG Ling-hua

(Environmental Science and Engineering College, Dalian Maritime University, Dalian, Liaoning 116026, China)

Abstract: The effects of the addition of Ectoine on the thermostability of amylase, β -glucanase and cellulase in malt were studied. The residual enzyme activities of the above three kinds of enzyme after heat treatment were investigated in the presence of different Ectoine content. The results showed that after 10 min heat treatment at 80 °C and at 90 °C, the addition of 5.0 mmol Ectoine could improve the residual amylase activities by 17.6 % and by 26.8 % respectively (compared with that without ectoine addition), the addition of 3.0 mmol Ectoine could improve the residual β -glucanase activities by 25.7 % and by 34.6 % respectively, and the addition of 3.0 mmol Ectoine could improve the residual cellulase activities by 57.6 % and by 50.8 % respectively.

Key words: beer; Ectoine; malt; amylase; β -glucanase; cellulase; thermostability

制麦中发芽过程所形成的丰富酶系会在后续的高温干燥中受热变性,各种酶活性均有不同程度的损失。麦芽酶活性高低直接影响麦芽的酿造性能,因此研究制麦过程中麦芽主要酶在高温下的稳定性具有重要意义。

淀粉酶(Amlase, EC3.2.1.1),主要包括 α -淀粉酶和 β -淀粉酶等,糖化过程中淀粉酶主要用于分解直链淀粉和支链淀粉,产物为麦芽糊精、麦芽糖、葡萄糖等。淀粉酶的热稳定性温度一般小于 75 °C^[1~2]。 β -葡聚糖酶(β -glucanase, EC.3.2.1.73),水解葡聚糖的 β -1,3 键和 β -1,4 键,产物为葡萄糖、二糖以及 β -葡聚糖糊精。制麦过程中未分解的 β -葡聚糖在糖化时溶出,将会引起麦汁粘度升高、过滤困难等现象。 β -葡聚糖酶对温度变化非常敏感,在干燥中酶活力损失很大^[1~2]。纤维素酶(Cellulase, EC 3.2.1.4)在啤酒麦芽中的活性较高,主要用于分解细胞壁的纤维素、半纤维素^[1~2]。上述几种酶在啤酒酿造中有重

要作用,在大麦发芽过程中其酶活力均大幅提高,但进入干燥阶段,温度高于 75 °C,时间 24 h 以上,麦芽水分迅速降低,因此各种酶活力较绿麦芽均有不同程度的损失。其中,淀粉酶活力损失 30 %~50 %; β -葡聚糖酶活力损失为 40 %~60 %;纤维素酶活力损失为 50 %~70 %^[2]。为了降低制麦工艺过程中酶活性的损失,有研究报道,添加 1 %~3 % 的钙离子对淀粉酶具有高温保护作用^[3]。海藻糖等糖类在高温下对 β -葡聚糖酶和纤维素酶都有较好的保护作用等^[4]。关于制麦工艺过程中酶热稳定性保护剂的研究,添加量少、保护效果显著的保护剂的种类研究,具有重要意义。

Ectoine, 即 1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-噁啉羧酸,是一种氨基酸衍生物^[5~8];Galinski 等在一种嗜盐的外硫红螺菌(*Ectothiorhodospira sp.*)中发现了这一种渗透压补偿溶质环状氨基酸,其在高盐诱导下生成,能够维持细胞内

基金项目:国家自然科学基金项目(20776021)。

收稿日期:2009-02-03

作者简介:郑昕,在读博士,副高,研究方向:生物工程。

通讯作者:张苓花,博士生导师,教授,研究方向:生物工程,E-mail:dlzlh@163.com。

外渗透压平衡^[9]。Ectoine 作为一种酶保护剂,能够抵抗高温、冷冻、干燥、高渗等条件^[10];张春宇等人研究了 Ectoine 对糖化酶在逆环境下的保护作用^[11]。Ectoine 用于酶热稳定性的保护,无毒、安全,而且用量少。本文主要研究 Ectoine 对经高温条件处理后的麦芽淀粉酶、 β -葡聚糖酶和纤维素酶的热稳定性的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Ectoine,纯度>95%,购于德国 BIOMOL 公司。大麦麦芽为加麦 metcalfe。

1.2 淀粉酶、 β -葡聚糖酶和纤维素酶粗酶液提取方法

称取 2 g 麦芽,置研钵中加少量石英砂和 2 mL 左右蒸馏水,研成匀浆,无损地转入 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至 100 mL,每隔数分钟振荡 1 次,提取 20 min。3000 r/min 离心 10 min,转至上清液备用^[12]。

1.3 淀粉酶、 β -葡聚糖酶和纤维素酶酶活力测定方法

1.3.1 淀粉酶

淀粉酶活性单位定义:1 g 样品在单位时间内生成还原糖 1 mg(即麦芽糖)的量定义为淀粉酶酶活单位(U)。

淀粉酶活力测定方法见参考文献[12]。

1.3.2 β -葡聚糖酶

β -葡聚糖酶活性单位定义:1 mL 酶液于 50 °C、pH5.0 条件下每分钟水解 1% β -葡聚糖溶液产生 1 μ g 葡萄糖的量定义为 β -葡聚糖酶活力单位 U。

β -葡聚糖酶活力测定方法见参考文献[13]。

1.3.3 纤维素酶

纤维素酶活性单位定义:在 50 °C、pH4.6 条件下,1 min 催化底物水解成 1 μ mol 葡萄糖的酶量(g)。

纤维素酶活力测定方法见参考文献[4]。

1.4 Ectoine 对酶热稳定性保护作用的测定

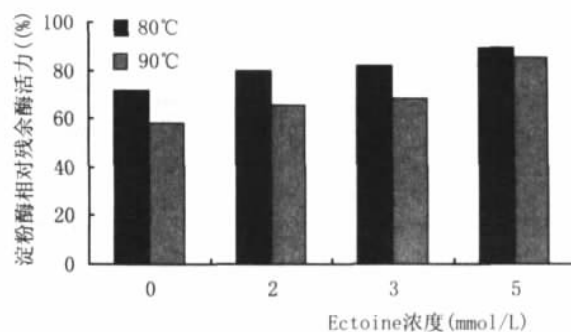
向啤酒麦芽淀粉酶、 β -葡聚糖酶和纤维素酶粗酶液的提取物中分别添加不同浓度的 Ectoine,分别在 80 °C、90 °C 下处理 10 min,恢复至室温后,测定热处理后的残余酶活力(A),同时测定未经热处理的酶活力(不添加 Ectoine)(B)。相对残余酶活力定义为(A/B)100%。

2 结果与讨论

2.1 Ectoine 对淀粉酶热稳定性的保护作用

按方法 1.4 对热处理的粗酶液测定残余酶活性,结果见图 1。

由图 1 可知,与未经热处理的相比,80 °C 和 90 °C 热处理 10 min 后,淀粉酶的相对残余酶活性分别为 71.7% 和 58.1%。在添加 Ectoine 的情况下,其热处理后的淀粉酶残余酶活力得到了一定的提升,特别是当 Ectoine 浓



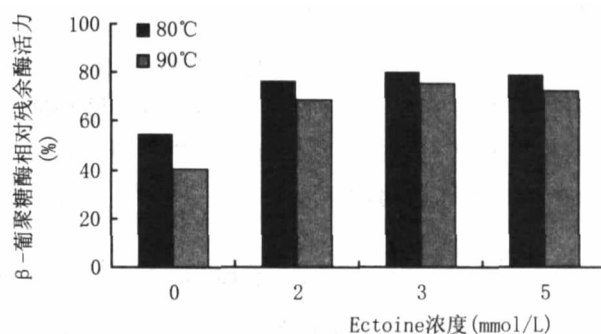
(将未经热处理的、不添加 Ectoine,淀粉酶活力定义为 100%)

图 1 不同浓度 Ectoine 对经 80 °C、90 °C 处理淀粉酶的保护作用

度为 5 mmol/L 时,保护效果最明显,经 80 °C 处理的淀粉酶残余酶活力可提高到 89.3%;经 90 °C 处理的淀粉酶残余酶活力可提高到 84.9%;分别提高了 17.6% 和 26.8%。

2.2 Ectoine 对 β -葡聚糖酶热稳定性的保护作用

采用 β -葡聚糖酶活性测定方法,测定经热处理后的 β -葡聚糖酶粗酶液残余酶活性,结果见图 2。



(将未经热处理的、不添加 Ectoine, β -葡聚糖酶活力定义为 100%)

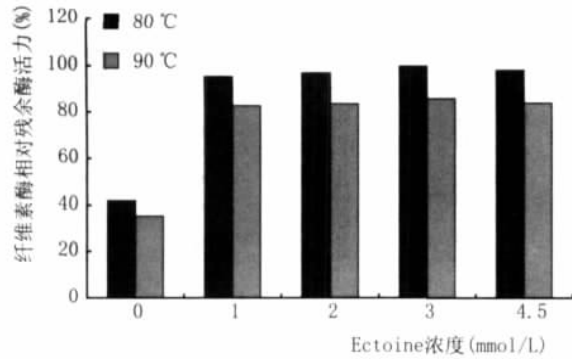
图 2 不同浓度 Ectoine 对经 80 °C、90 °C 处理 β -葡聚糖酶的保护作用

与未经热处理相比,热处理 10 min 后,经 80 °C 的 β -葡聚糖酶的相对残余酶活性为 54.7%;经 90 °C 的 β -葡聚糖酶的相对残余酶活性为 40.5%。添加 Ectoine,其热处理后的 β -葡聚糖酶残余酶活力有了显著的提高。特别是当 Ectoine 浓度为 3 mmol/L 时,保护效果最明显,经 80 °C 处理的 β -葡聚糖酶残余酶活力提高到 80.4%;经 90 °C 处理的 β -葡聚糖酶残余酶活力可提高到 75.1%;分别提高了 25.7% 和 34.6%。

2.3 Ectoine 对纤维素酶热稳定性的保护作用

按 1.4 的纤维素酶活性测定方法,对热处理后的纤维素酶粗酶液测定残余酶活性。测定结果见图 3。

由图 3 可知,与未经热处理的相比,经过 80 °C 和 90 °C 热处理 10 min 后,纤维素酶的相对残余酶活性分别为 42.0% 和 35.2%。通过添加一定量的 Ectoine,对热处理后的纤维素酶残余酶活力起到了一定的提升作用。对



(将未经热处理的,不添加 Ectoine,纤维素酶活力定义为 100%)

图3 不同浓度 Ectoine 对经 80 °C、90 °C 处理纤维素酶的保护作用

添加不同浓度 Ectoine 后的酶活力提升效果进行比较可见,当 Ectoine 的浓度为 3.0 mmol/L 时,对纤维素酶的热稳定性保护效果最明显,经 80 °C 处理的纤维素酶残余酶活力提高到 99.6%,经 90 °C 处理的残余酶活力提高到 86%。分别提高了 57.6% 和 50.8%。

3 结论

3.1 大麦麦芽中的 3 种主要的酶,淀粉酶、 β -葡聚糖酶以及纤维素酶在经过高温处理后酶活力有不同程度的损失,且温度越高损失越明显。在酶的热处理体系中添加 Ectoine 对上述 3 种酶的热稳定性有不同程度的保护作用。

3.2 当 Ectoine 浓度为 5 mmol/L 时,对淀粉酶的保护效果较明显;经 80 °C 处理的淀粉酶残余酶活力和经 90 °C 处理的淀粉酶残余酶活力分别提高了 17.6% 和 26.8%。

3.3 当 Ectoine 浓度为 3 mmol/L 时,经 80 °C 处理的 β -葡聚糖酶残余酶活力和经 90 °C 处理的 β -葡聚糖酶残余酶活力,分别提高了 25.7% 和 34.6%。

3.4 当 Ectoine 的浓度为 3.0 mmol/L 时,对纤维素酶的热稳定性保护效果最好,经 80 °C 处理的纤维素酶残余酶活力和经 90 °C 处理的纤维素酶残余酶活力分别提高了 57.6% 和 50.8%。

参考文献:

- [1] Wolfgang Kunze. 啤酒工艺实用技术[M].北京:中国轻工业出版社,1998.
- [2] 管敦仪. 啤酒工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998.
- [3] 王耀宾,永田进一.无机离子和有机溶质对 α -淀粉酶热稳定性的影响[J].生物工程学报,2004,(20):104-110.
- [4] 杨小民.几种糖对纤维素酶热稳定性影响的研究[J].清华大学学报(自然科学版),2000,(40):51-54.
- [5] Costa, M. S., Santos, H., and Galinski, E. A. An overview of the role and diversity of compatible solutes in bacteria and archaea [J]. Adv. Biochem. Eng Biotechnol., 1998, 61: 117-158.
- [6] Hideki Nakayama, Kazuya Yoshida. Ectoine, the compatible solute of halomonas elongata, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells[J]. Plant Physiology, 2000, 122: 1239-1247.
- [7] Kathryn J. Pflughoeft, Katharine Kierek. Role of ectoine in vibrio cholerae osmoadaptation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 5919-5927.
- [8] Katrin Grammann, Angela Volke, and Hans Jørg Kunte. New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter teaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in halomonas elongata DSM 2581T. Journal of Bacteriology, 2002, 184: 3078-3085.
- [9] GALINSKI E A, PFEIFFERHP, Tru per H G. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidine-carboxylic acid: a novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus ectothiorhodospira[J]. Eur J Biochem, 1985, 149: 135-139.
- [10] LIPPERT K, GALINSKI E A. Enzyme stabilization by ectoin-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 37: 61-65.
- [11] 张春宇,张苓花,等. ECTOINE 对糖化酶在逆环境下的保护作用[J].中国酿造,2006,(6):17-19.
- [12] 西北农业大学. 基础生物化学实验指导[M].西安:陕西科学技术出版社,1986.
- [13] 沈明泉,陆晓雪,等.不同储存条件对木聚糖酶和 β -葡聚糖酶活性的影响[J].上海交通大学学报(农业科学版),2003,(21): 29-33.

酿酒科技杂志社邮购书刊

书刊名	邮购价	书刊名	邮购价
《酿酒科技精选(1980~1985)》	20元/册	《酿酒科技》2008年合订本	200元/套
《酿酒科技》2000年合订本	65元/册	《酿酒科技》2009年(月刊)	180元/年
《酿酒科技》2001年合订本	70元/册	《世界蒸馏酒的风味》	6元/册
《酿酒科技》2002年合订本	75元/册	《中国酒曲》	35元/册
《酿酒科技》2003年合订本	80元/册	《生料酿酒技术》	42元/册
《酿酒科技》2004年合订本	80元/册	《酿酒科技》世纪光盘(1980~2000年)	380元/套
《酿酒科技》2005年合订本	120元/套	《白酒的品评》	26.5元/册
《酿酒科技》2006年合订本	150元/套	《中国名酒鉴赏》	64元/册
《酿酒科技》2007年合订本	190元/套		

需订阅以上书刊者,请直接汇款到本社邮购。地址:贵州省贵阳市沙冲中路58号(550007);电话:(0851)5796163;传真:(0851)5776394;联系人:吴萍。