

不同温度、pH 值对 β -葡聚糖酶活力的影响研究

彭 维 杨幼慧 孙远明

(华南农业大学食品学院,广东 广州 510640)

摘 要: 采用 DNS 比色法测定不同温度和 pH 值对 β -葡聚糖酶活力的影响,研究结果表明 β -葡聚糖酶最适反应温度为 50 ℃,最适 pH 值为 4.8。在 pH 2.0 和 pH 8.0 的缓冲液中浸泡 4 h 后,酶活分别保留了 73 %和 64 %。说明 β -葡聚糖酶能够耐受较强的酸碱性环境。

关键词: 啤酒; pH 值; 温度; β -葡聚糖酶

中图分类号:TS262.5;TS261.4

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2011)01-0031-02

Study on the Effects of Different Temperature and Different pH values on β -glucanase Activity

PENG Wei, YANG You-hui and SUN Yuan-ming

(Food Science College of South China Agriculture University, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: The effects of different temperature and different pH value on β -glucanase activity were investigated by DNS colorimetry. The results showed that the optimum temperature for β -glucanase was at 50 ℃ and the optimum pH value was 4.8. Soaping in buffering liquid (pH=2 and pH=8) for 4 h, β -glucanase activity remained by 73 % and by 64 % respectively, suggesting that β -glucanase could tolerate strong acid environment and strong alkaline environment.

Key words: beer; pH value; temperature; β -glucanase

啤酒生产过程中 β -葡聚糖是影响啤酒过滤和增加过滤成本的突出问题。开发和应用能够降解啤酒中的大分子聚合物(如多糖、蛋白质)的酶制剂已成为当前国内外啤酒行业研究的热点之一^[1]。啤酒酶在麦汁糖化生产中的应用效果已有许多报道,但在使用过程中由于常出现酶活不稳定现象^[2-3],对生产造成影响,本文特对啤酒酶中的主要酶种 β -葡聚糖酶的部分酶学性质进行探索,重点研究温度和 pH 值对 β -葡聚糖酶活力的影响,旨在为该酶的保存及在实际生产中的应用提供指导^[4-5]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

β -葡聚糖酶:由湖南利尔康生物有限公司提供。

1.2 试剂

柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、3,5-二硝基水杨酸、0.1 % 葡萄糖标准液; β -葡聚糖酶购于美国 Sigma 公司。

1.3 主要仪器与设备

紫外可见分光光度计,恒温数显水箱,电子天平,酸度计,电热蒸汽灭菌锅。

1.4 酶活的测定^[6-7]

1.4.1 测定方法;采用 DNS 法

1.4.2 酶活单位定义

在 50 ℃、pH 4.8 条件下,1 min 分解浓度为 10 mg/mL 的 β -葡聚糖底物产生 1 μ mol 产物(以葡萄糖计)所需的酶量为一个国际单位。

1.4.3 酶活力测定

取 0.5 mL 底物与待测酶液一起置于 50 ℃水浴中,预热 5 min。取 0.5 mL 待测酶液依次定时间加入到底物中,水浴 15 min,冷却 5 min。于 540 nm 下读取吸光值。查其标准曲线,DNS 比色法计算酶活力(IU/g)

酶活力(IU/g)=(葡萄糖等量值/180/15/0.5) $\times$ n

式中:180 是将葡萄糖相对分子量,15 指 15 min 反应时间,0.5 指加入 0.5 mL 待测酶液,n 为稀释倍数。

1.5 最适反应温度及不同温度对酶活的影响研究

①设计不同的反应温度,分别为 40 ℃、50 ℃、60 ℃、65 ℃、70 ℃、75 ℃和 80 ℃;

②在 100 ℃蒸汽中分别处理 1 min、2 min 和 3 min;

③在 4 ℃冰箱中分别放置 1 d、5 d、10 d 和 15 d。

分别测定 β -葡聚糖酶活力,由其变化情况测其最适反应温度及热稳定性。

收稿日期:2010-12-01

作者简介:彭维(1980-),男,湖南人,工程师,在读博士。

1.6 最适 pH 值及不同 pH 值对酶活的影响研究

①配制不同 pH 值(2.0、3.5、4.0、4.8、5.0、6.0、7.0、8.0)的缓冲液,使酶与底物在不同 pH 值条件下反应;

②将 β -葡聚糖酶在不同 pH 值缓冲液中浸泡 4 h;分别测定 β -葡聚糖酶的酶活。由酶活的变化情况测其最适 pH 值及在不同酸碱条件下的稳定性。

2 结果与分析

2.1 温度对 β -葡聚糖酶活力的影响

不同反应温度对 β -葡聚糖酶活力的影响见图 1,不同反应温度下所测酶活以酶样品中最大吸光度的酶活为 100,其他酶活以此为标准,表示为最大酶活的相对值。由图 1 可看出,在 pH 4.8 及反应温度为 15 min 条件下,当温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 时, β -葡聚糖酶酶活达到最大,这与一般 β -葡聚糖酶最适温度范围为 40~50 $^{\circ}\text{C}$ 相符。温度由 50 $^{\circ}\text{C}$ 依次上升至 60 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$ 时,酶活力基本上趋于稳定,保持在 90% 以上。但是,当温度由 70 $^{\circ}\text{C}$ 上升至 75 $^{\circ}\text{C}$ 时,相对酶活由 90.3% 骤然下降到 18.6%,酶失活现象非常严重。因此,可视 75 $^{\circ}\text{C}$ 为该 β -葡聚糖酶反应的极端高温。

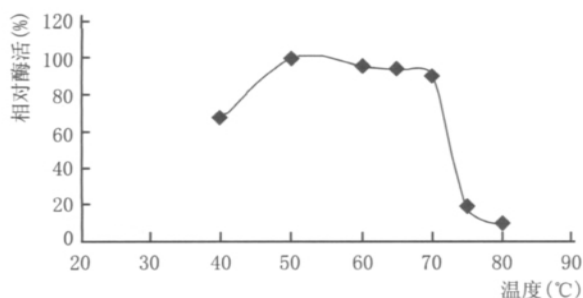


图 1 温度对 β -葡聚糖酶活力的影响

在 100 $^{\circ}\text{C}$ 蒸汽中处理不同时间以及在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置不同时间后酶活的变化情况分别见表 1 和表 2。

表 1 100 $^{\circ}\text{C}$ 蒸汽处理不同时间对酶活的影响

项 目	蒸汽处理时间 (min)			
	0	1	2	3
酶活 (IU/g)	1000	966	899	834

表 2 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置不同时间对酶活的影响

项目	时间 (d)				
	0	1	5	10	15
酶活 (IU/g)	1000	1000	999	998	998

由表 1 和表 2 可以看出, β -葡聚糖酶在 100 $^{\circ}\text{C}$ 蒸汽下处理 3 min 后,酶活仍保留了 83.4%;而在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 15 d 以后,酶活基本保持不变。说明 β -葡聚糖酶无论是在高温下还是在低温下,都具有较好的稳定性。

2.2 pH 值对 β -葡聚糖酶活力的影响

不同反应 pH 值对 β -葡聚糖酶活力的影响以及在

不同 pH 值缓冲液中浸泡 4 h 对酶活的影响情况分别见图 2 和图 3,在最适温度下,以吸光度最大酶样的活力为 100,其他酶活以此为标准,表示为最大酶活的相对酶活。

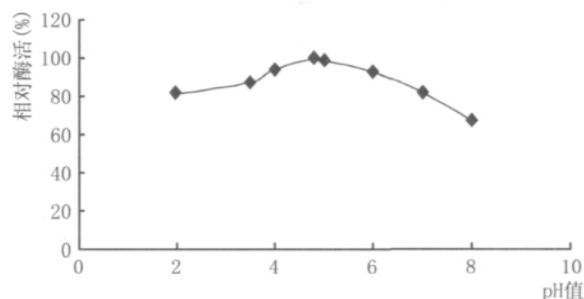


图 2 pH 值对 β -葡聚糖酶活力的影响

由图 2 可以看出,pH 在 4~6 之间时, β -葡聚糖酶的活力趋于稳定,即在此 pH 值范围对酶活的影响不大。当 pH 值由 5 下降至 2 时,酶活仍保留了 81.2%,而当 pH 值由 5 上升至 8 时,相对酶活由 100% 下降至 67%,即酶失活率为 33%。

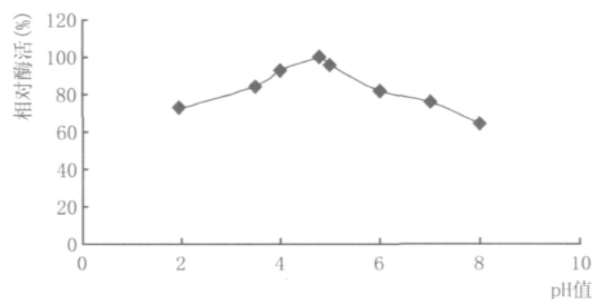


图 3 不同 pH 值缓冲液中浸泡 4 h 对酶活的影响

由图 3 可见, β -葡聚糖酶在 pH 为 2 和 8 的缓冲液中浸泡 4 h 后,酶活分别为最大酶活的 73% 和 64%。该 β -葡聚糖酶对碱性环境的抵御能力较对酸性环境的抵御能力稍差。

3 讨论

任何影响蛋白质的因素都会影响酶制剂的变性。酶制剂的活性会随温度的升高而增加,但当温度升高到一定程度时,又使酶变性而丧失活性^[8]。普通酶制剂的最适温度为 30~45 $^{\circ}\text{C}$,超过 60 $^{\circ}\text{C}$ 时酶会变性而丧失活性。而此 β -葡聚糖酶系引进的丹麦优良菌种所产,具有较强的稳定性。实验结果表明,该酶的最适反应温度为 50 $^{\circ}\text{C}$,在 100 $^{\circ}\text{C}$ 蒸汽中处理 3 min 后,酶活保留 83.4%;在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下与底物反应 15 min 后(反应 pH 值为 4.8),酶活保留 90.3%;在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 15 d 后,酶活基本保持不变。

pH 值对酶活性也有影响,在其他条件不变时,酶在一定的 pH 范围内活性最高。一般酶活性的最适 pH 值接近

(下转第 36 页)

实际操作将其列入表5。

表5 浓香型白酒配料与入窖温度的关系 (%)

项 目	旺季 (14~18 ℃)	淡季 (20 ℃以上)	平季 (17~19 ℃)
入窖淀粉浓度	19~22	16~19	18~20
入窖酸度	1.7~1.8	2.0	1.9
水分含量	53 左右	56	54
辅料(糠)用量	23~25	20~22	22~24
曲药用量	23~25	20~22	22~24

3 浓香型白酒生产中有关入窖温度控制的工艺控制要点

3.1 坚持“低温入窖”的工艺控制原则

地温在 20 ℃ 以下时,入窖温度为 16~18 ℃;地温在 20 ℃ 以上时,入窖温度平地温或低于地温 1~2 ℃。

3.2 合理配料

根据入窖温度确定入窖糟醅的酸度、淀粉、水分的大小。

3.3 根据发酵周期调整入窖温度

发酵周期不同,入窖温度亦应在相应范围内调整:一般而言,发酵周期长,入窖温度应降低,反之则高。

3.4 甑间入窖温度控制

甑与甑之间的入窖温度应基本一致,相差在 1 ℃ 之内,温度要求均匀、准确。

3.5 面糟入窖温度控制

地温在 20 ℃ 以下时,第一甑糟醅(窖底)应高于规定温度 3~5 ℃ 入窖,有利于升温;面糟入窖温度也可适当提高 1~2 ℃,这样能起到保温产酒效果,对保障糟醅正常发酵有好处。

3.6 夏季性生产入窖温度控制

夏季生产因气温高,入窖温度能低则低,一般平地温或低 1~2 ℃ 为宜,多数厂采用停产检修或调整为夜间生产的办法,而不能采用违背规律地强行降温,这是因为:

①通过延长摊凉时间,降温会造成淀粉糊化后的逆转,从而造成淀粉无法被利用;

②热季摊凉,晾糟机上糟醅层较薄,若停机吹凉,会使淀粉老化程度加重;

③摊凉时间过长,水分大量损失,会造成入窖水分不足;

④摊凉时间过长,会使杂菌感染多,从而造成窖内发酵升温猛,升酸幅度大,产、质量下降。

4 小结

入窖温度是浓香型白酒生产工艺控制的关键。在实际生产中,由于生产环境的不同,生产工艺参数亦有变化。只有通过对浓香型白酒发酵微生物系统的进一步研究认识,才能理解浓香型白酒传统工艺之精髓,从而结合实践经验,在生产中根据糟醅实际状况,把握入窖温度这一关键控制要素,使浓香型白酒生产达到优质高产的目的。
(未完待续)

参考文献:

- [1] 张文学,乔宗伟,胡承,王忠彦.PCR 技术对浓香型白酒糟醅细菌菌群的解析[J].四川大学学报,2005,(5):82-87.
- [2] 周庆伍.白酒固态发酵温度变化与产、质量关系的研究[J].酿酒,2008,(6):62-64.
- [3] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,1998.
- [4] 李大和.白酒勾兑技术问答[M].北京:中国轻工业出版社,2006.
- [5] 赖登辉.浓香型白酒生产中“增己降乳”科学、合理性的研究[J].酿酒,2007,(5):4-7.

(上接第 32 页)

中性(6.5~8.0),但也有例外,如胃蛋白酶的最适 pH 值为 1.5,而 β -葡聚糖酶的最适 pH 值大多偏酸性(4~5)。实验结果表明, β -葡聚糖酶的最适 pH 值为 4.8,在 pH 值 4~6、温度 50~60 ℃ 时作用效果最佳。 β -葡聚糖酶在 pH2 和 pH8 的缓冲液中浸泡 4 h 后,酶活分别保留 73 % 和 64 %,受 pH 值影响较小,酶活相对比较稳定。

参考文献:

- [1] 顾国贤.酿造酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1996.
- [2] 陆健.酿造微生物木聚糖酶的研究[D].无锡:江南大学,2002.
- [3] 陈日云.啤酒的稳定化处理[J].啤酒科技,2010,(2):58.
- [4] Magdalena wrobel-Kwiatkowska,Katarzyna Lorenc-Kukula,Michal Starzycki,Jan Oszmianski,Ewa Kepczynska,Expression of β -1,3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi

[J].Physiological and Molecular Plant Pathology 2004,(65): 245-256.

- [5] Tere sa Sanchez-Ballesta,M.Jose Gosalbes,M.Jesus Rodrigo,Antonio Granell,Lorenzo Zacarias.Characterization of a β -1,3-glucanase from citrus fruit as related to chilling-induced injury and ethylene production[J].Postharvest Biology and Technology 2006,(40):133-140.
- [6] 徐斌.啤酒工业的原辅材料与啤酒酿造质量[J].啤酒科技,2004,(10):7-16.
- [7] 李永仙,尹象胜,陆健,顾国贤.刚果红法测定麦汁和啤酒中的 β -葡聚糖[J].无锡轻工业大学学报,1997,7(1):8-13.
- [8] 邹东恢,江洁. β -葡聚糖酶的开发与应用研究[J].农产品加工学刊,2005,(8):7-9.