

制麦及糖化过程中过氧化物酶的研究

刘 军, 陆 健, 顾国贤

(江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 采用 Sigma 方法, 测定两种蛋白质含量不同的“甘啤三号”大麦在浸麦、发芽、焙燥以及糖化过程中过氧化物酶的变化, 并研究不同焙燥工艺对过氧化物酶活性的影响。同时研究了该酶的基本性质。结果表明: 浸麦结束时酶活增加了 1 倍, 发芽结束时增加了 4~5 倍, 延长 45~65 ℃ 阶段时间可以有效降低酶活, 保持 20 h 后, 两种成品麦芽过氧化物酶活力分别为 682 u/g, 761 u/g。麦芽中过氧化物酶最适作用条件为 pH6.0, 温度 20 ℃。

关键词: 大麦; 麦芽; 过氧化物酶; 制麦; 糖化

中图分类号: S512.31 ; Q55 ; TQ920.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286 (2005) 05-0069-04

Study on Peroxidase Changes during Malting and Mashing

LIU Jun, LU Jian and GU Guo-xian

(Bioengineering College of Jiang'nan University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

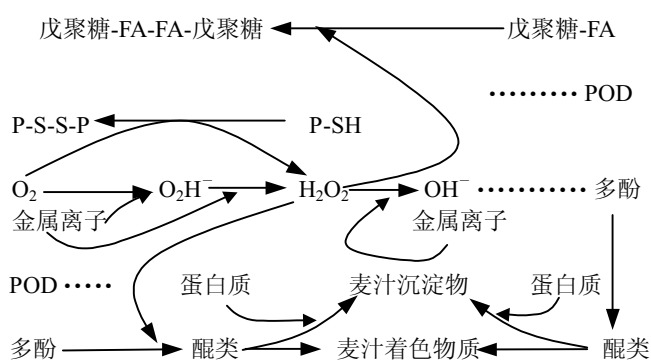
Abstract: Peroxidase changes during barley (two kinds of “Ganpi No.3” barley of different protein contents) preparation (including barley steeping, germination and boiling) and mashing were studied by Sigma method. Besides, the effects of different boiling techniques on peroxidase activity and the essential properties of peroxidase were also studied. The study results suggested that the peroxidase activity increased one time than before after barley steeping and 4~5 times than before after germination, the prolong of 45~65 ℃ stage could effectively reduce peroxidase activity, and after 20 h maintenance, peroxidase activity of the two kinds of malt were 682 u/g and 761 u/g respectively. The optimal action conditions for peroxidase in malt were pH as 6.0 and temperature at 20 ℃. (Tran. by YUE Yang)

Key words: barley; malt; peroxidase; malting; mashing

过氧化物酶 (peroxidase, POD) 是一类性质比较稳定的氧化还原酶类, 在大麦中少量存在。从图 1 可以看出, 制麦和糖化过程中氧气的进入, 受到金属离子催化, 使整个反应链启动, 生成活性较高的 O_2H^- 和 OH^- , 在过氧化氢存在的情况下, 过氧化物酶氧化多酚, 生成醌类物质, 导致糖化过程中麦汁色度增加, 产生沉淀, 从而降低麦汁质量。

另外, 麦芽中的过氧化物酶, 在糖化过程中, 部分失活, 残余过氧化物酶在过氧化氢存在时, 进一步以多酚类物质为底物, 进行氧化, 带来不利影响^[3]。多酚类物质的减少, 一定程度上降低麦汁还原力, 使麦汁“内源性”抗氧化能力降低, 进而影响啤酒的风味稳定性。

国产啤酒大麦“甘啤三号”由于其优良的品质, 已经成功地用于啤酒酿造。由于施肥、气温和收割前雨水等



POD: 过氧化物酶, P(protein): 蛋白质, FA(ferulic acid) 阿魏酸
 O_2H^- : 过氧化氢根离子, $-S-S-$: 二硫键, OH^- : 氢氧根离子, $-SH$: 巯基

图 1 过氧化物酶作用路线^[1,2]

的影响, 大麦蛋白质含量和发芽率有一定的差异。本文采用两种蛋白质含量不同的“甘啤三号”大麦 (见表 1)

收稿日期: 2004-11-18

作者简介: 刘军 (1979-), 男, 安徽六安人, 硕士研究生。

为实验样品,研究过氧化物酶在浸麦、发芽、焙燥和糖化过程中的变化及该酶的一些酶学性质。

表 1 两种“甘啤三号”大麦的基本指标 (%)

甘啤三号	产地	千粒重(g)	水分	发芽率	蛋白质含量(绝干)
A	甘肃	42	10.5	87	11.8
B	甘肃	43	11	96	13.1

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

“甘啤三号”大麦,焦性没食子酸,过氧化氢(30%)。

1.2 实验仪器

BGT-8A 全自动糖化仪,UV-2100 型紫外可见光分光光度计(UNICO),WP-I 型大麦工艺实验机,凯式定氮仪(FOSS TECATOR)。

1.3 实验方法

1.3.1 过氧化物酶的提取^[4,5]

准确称取 5.0 g 大麦或者麦芽样品于研钵中,加入少量石英砂和 20 mL 的 pH6.0 磷酸盐缓冲液,研磨,再转移到烧杯中,磁力搅拌 1 h。取上清液进行离心(8000 r/min)15 min,得到酶提取液。操作在低温(4℃)下进行。

1.3.2 过氧化物酶的测定^[6]

依据过氧化物酶在过氧化氢存在下,催化氧化焦性没食子酸生成红紫脣精的原理,用分光光度计测定逐渐增加的红紫脣精浓度,测定酶活。

酶活力定义为:20℃时 10 s 内催化焦性没食子酸生成 1 μg 红紫脣精所需酶量为 1 个单位酶活。

用移液枪将 20℃的 0.32 mL pH6.0 磷酸盐缓冲液、0.16 mL 过氧化氢溶液、0.32 mL 焦性没食子酸溶液和 2.10 mL 蒸馏水加入 1 cm 比色皿中,混匀。加入 0.10 mL 的酶液,再次混匀,按动秒表计时。于 420 nm 处以空白值为参比测定吸光度,每次间隔 10 s,直至每 10 s 内的吸光度增大值达到稳定为止。空白中不加入酶液,而是加入 0.10 mL 的磷酸盐缓冲液。

酶活力 = $(E_{420} \times 3.0) / (E_w \times 0.012)$ (单位/g·绝干计,下同)

式中 E_{420} ——每 10 s 420 nm 处吸光度增加值;

3.0——反应液体积 (mL);

0.012——1 μg 红紫脣精/mL 的吸光度;

E_w ——0.1 mL 酶液相当于样品重量 (g)。

1.3.3 制麦工艺

1.3.3.1 浸麦与发芽工艺 (表 2)

表 2 浸麦与发芽工艺

项目	时间(h)	工艺
浸麦	30	17℃ 浸 4 断 8 浸 5 断 8 浸 5
发芽	96	16℃ 48 h, 18℃ 24 h, 20℃ 24 h, 控制湿度 90%, 温度变化±0.5℃

1.3.3.2 焙燥工艺 (表 3)

焙燥工艺都是采用了 7 段法,工艺 1、2、3 的焙燥总时间分别为 27 h、28 h、24 h,45~65℃阶段时间分别为 19 h、20 h、16 h。目的在于研究总焙燥时间以及 45~65℃阶段时间对麦芽过氧化物酶活力的影响。

1.3.4 协定糖化^[7]

参见“啤酒工业手册”(中册)。

1.3.5 POD 最适作用 pH 的测定

20℃条件下,测定过氧化物酶在不同 pH 值缓冲液中的活力。pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5,定义测定的最高酶活为 100,计算其他 pH 值下酶活相对百分比,确定最适作用 pH 值。

1.3.6 POD 最适作用温度的测定

在 pH6.0 时,测定不同温度下过氧化物酶的活力。温度分别为:10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃,定义测定的最高酶活为 100,计算其他温度下酶活相对百分比,确定最适作用温度。

1.3.7 POD pH 稳定性的测定

20℃条件下,测定过氧化物酶在不同 pH 值(4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5)缓冲液中保留一定时间(5 h、10 h、15 h)后的酶活力,定义最高酶活值为 100,计算相对酶活力。

1.3.8 POD 温度稳定性的测定

pH6.0 测定 POD 在不同温度下(30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、85℃)保温 5 h、10 h、15 h 后残留的酶活,定义最高酶活值为 100,计算相对酶活力。

2 结果与讨论

2.1 浸麦过程中 POD 研究 (图 2)

由图 2 知道,在浸麦过程中,两种“甘啤三号”大麦过氧化物酶活力都呈增加趋势。有文献报道^[8,9],在浸麦和发芽过程中,α-淀粉酶的增长和过氧化物酶的增长呈现了共增趋势。浸麦结束时,两种“甘啤三号”大麦的酶

表 3 焙燥工艺

项目	温度(℃)	时间(h)	温度(℃)	时间(h)	温度(℃)	时间(h)	温度(℃)	时间(h)	温度(℃)	时间(h)	温度(℃)	时间(h)	温度(℃)	时间(h)
工艺 1	40	4	45	10	50	4	60	2	65	3	75	2	85	2
工艺 2	40	4	45	8	50	5	60	3	65	4	75	2	85	2
工艺 3	40	4	45	10	50	3	60	1	65	2	75	2	85	2

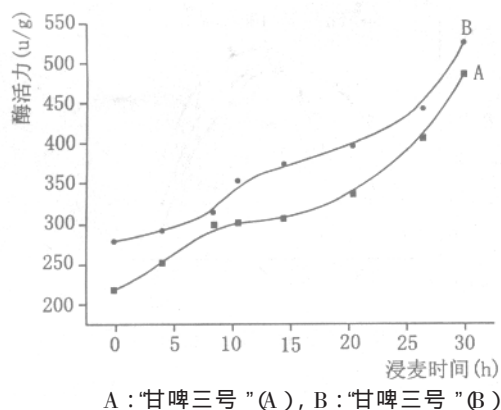
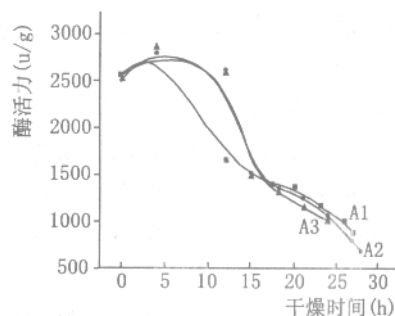
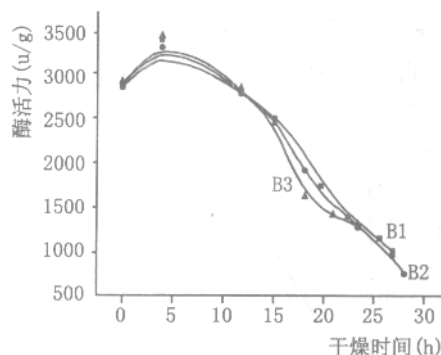


图2 浸麦过程中酶活变化曲线



A1, A2, A3: “甘啤三号”(A) 焙燥工艺 1, 2, 3

图4 焙燥过程中酶活变化曲线

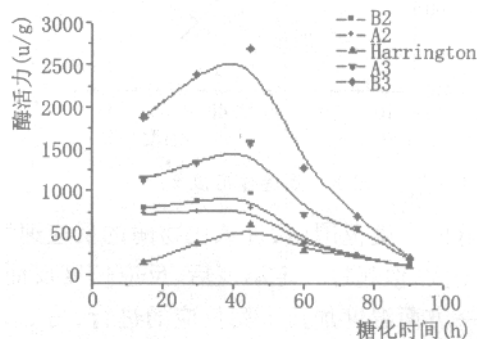


B1, B2, B3: “甘啤三号”(B) 焙燥工艺 1, 2, 3

图5 焙燥过程中酶活变化曲线

与商品麦芽(“甘啤三号”)对比,本实验室制得成品麦芽(工艺2的两种麦芽)POD酶活较低,商品麦芽中POD酶活一般在800~1000 u/g之间。而进口麦芽(Harrington和Stirling)在600~700 u/g。

2.4 糖化过程中POD变化情况的研究(图6)



A2, A3: “甘啤三号”(A) 焙燥工艺 2, 3

B2, B3: “甘啤三号”(B) 焙燥工艺 2, 3

图6 糖化过程中的变化

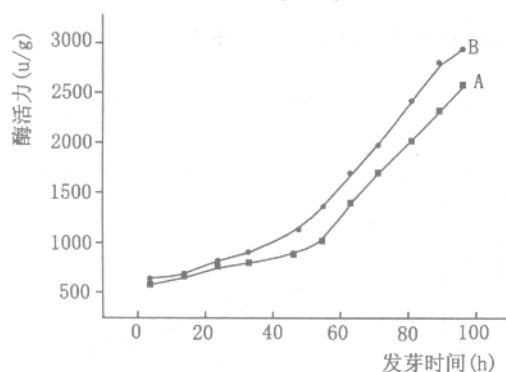
由图6可看出,随着糖化进行,过氧化物酶活都呈现出先增加再降低的趋势。前40 min内,B3麦芽过氧化物酶活迅速增高,其他麦芽的变化比较平缓;其中,Harrington麦芽中该酶活力最低,糖化过程中变化最平缓。

2.5 麦芽放置过程中POD变化

麦芽放置过程中,过氧化物酶活力会增加。研究显示,“甘啤三号”(A)在放置一个月后,过氧化物酶活力从

活都增加到2倍左右,对“甘啤三号”(A)来说,过氧化物酶活从217 u/g增加到484 u/g,“甘啤三号”(B)的酶活从278 u/g增加到523 u/g。

2.2 发芽过程中POD研究(图3)



A: “甘啤三号”(A), B: “甘啤三号”(B)

图3 发芽过程中酶活变化曲线

由图3知,发芽过程中,前50 h内,酶活增加比较缓慢;此后,过氧化物酶活力迅速增加。发芽结束时,两种“甘啤三号”过氧化物酶活力都相应增加了4~5倍(相对浸麦结束时),发芽结束,“甘啤三号”(A)中过氧化物酶活增加到2564 u/g,“甘啤三号”(B)的酶活也增加到2915 u/g。

2.3 焙燥过程中POD研究(图4,图5)

由图4,图5可以看出,从焙燥开始到结束,过氧化物酶活力都先上升后下降。这是因为在焙燥开始阶段,温度不高,绿麦芽中含有一定水分,没有达到过氧化物酶失活温度。此后,温度升高,麦芽中水分丢失,过氧化物酶活力降低,酶活力下降幅度随着焙燥工艺不同也有差异。焙燥结束时,对于“甘啤三号”(A)麦芽来说,3种工艺的成品麦芽过氧化物酶活分别为876 u/g,682 u/g以及1003 u/g;而对于“甘啤三号”(B)麦芽而言,麦芽过氧化物酶活分别为1004 u/g,761 u/g和1260 u/g,即延长45~65℃阶段时间,成品麦芽过氧化物酶活降低。工艺2酶活降低幅度最大,工艺1次之,工艺3最小。

682 u/g 增加到 725 u/g (工艺 2), 增加百分比为 6.3 %, 从 1003 u/g 增加到 1143 u/g (工艺 3), 增长率为 14.0 %; 对“甘啤三号”(B)来说, 过氧化物酶活力从 761 u/g 增加到 800 u/g (工艺 2), 同时从 1260 u/g 增加到 1880 u/g (工艺 3), 相应的增长率分别为 5.1 % 和 49.2 %; Bennett.C.Nwanguma 和 McLellan 等的研究也有相似的结论^[10]。

采用“甘啤三号”(A)工艺 2 成品麦芽进行 POD 的酶学性质研究。

2.6 POD 最适作用 pH

分别测定过氧化物酶在不同 pH 值缓冲溶液中的酶活力, 见图 7。由图 7 可知, 在 pH6.0 时, 过氧化物酶活力最高。

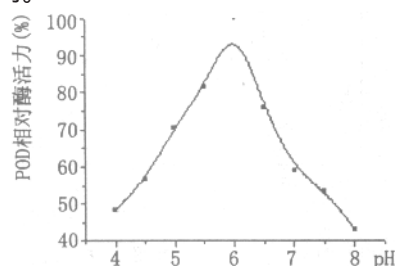


图 7 最适作用 pH

2.7 POD 最适作用温度 (图 8)

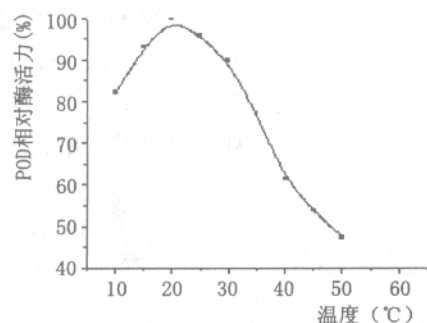


图 8 最适作用温度

在较低的温度范围内, 过氧化物酶的反应速度随温度升高而增大, 但超过一定温度后, 反应速度反而下降, 这是由于一方面温度加速了酶反应的进行, 另一方面随着温度的升高, 同时加速了酶蛋白的变性。由图 8 知, 温度为 20 °C 时, 过氧化物酶活力最高, 50 °C 时, 酶活力降低到 47.3 %。

2.8 POD pH 稳定性 (图 9)

将提取的过氧化物酶溶液分成 8 份, 分别置于不同的 pH 溶液中保温 5 h, 10 h, 15 h, 然后再调整到 pH6.0 进行酶活测定, 结果见图 9。从图 9 中看出, 在 pH6.0 时, 过氧化物酶活力较稳定, 分别保温 5 h, 10 h, 15 h, 对应的残留酶活分别为 97 % 92 % 90 %; pH7.5 时, 对应的残留酶活力为 40 %, 16 % 5 %; pH4.0 时, 分别为 16

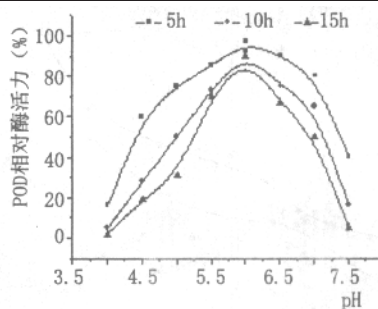


图 9 POD 的 pH 稳定性

% 5 % 2 %。

2.9 POD 温度稳定性

先将过氧化物酶液迅速升高到对应的温度, 保温到相对应的时间后, 迅速降温, 然后再于 20 °C pH6.0 条件下测定酶活力, 见图 10。由图 10 中可知, 30 °C 保温 5 h, 10 h, 15 h 后, 对应的残留酶活分别为 90 % 83 % 80 %; 温度为 80 °C 时, 保温 5 h, 10 h, 15 h 后, 对应的酶活分别为 7 % 3 % 2 %; 85 °C 时分别为 1 % 0.5 % 0。

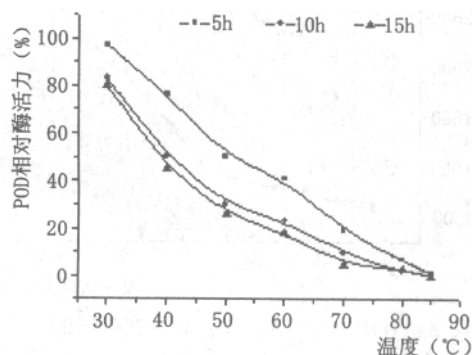


图 10 POD 的温度稳定性

3 结论

麦芽中过氧化物酶的最适作用条件为 pH6.0, 温度 20 °C, 性质较稳定。在制麦过程中, 过氧化物酶活力增加。发芽结束时酶活增加了 10 倍左右 (相对于大麦来说), 对“甘啤三号”(A)来说, 过氧化物酶活从 217 u/g 增加到 2564 u/g, “甘啤三号”(B)的酶活从 278 u/g 增加到 2915 u/g。糖化开始阶段, 酶活力有所增加, 随着温度升高, 酶活逐渐降低。适当改变焙燥阶段的工艺, 可以控制过氧化物酶活力, 初步认为, 一般成品麦芽中的过氧化物酶含量在 1000 u/g 以下比较合适。研究认为, 蛋白质含量高的大麦, 从制麦开始到成品麦芽其酶活也相对较高。成品麦芽在放置一定时间后, 过氧化物酶活力有一定程度的增加。相对于进口麦芽来说, 国产大麦麦芽的酶活较高, 可能与大麦的品质和制麦工艺有关。对过氧化物酶的分离、纯化及其动力学性质的研究, 目前正在进行中。

(下转第 76 页)

多酚、 β -葡聚糖、糊精、铁离子等。对原酒和脱醇酒中的这些成分进行分析,结果见表 10。高分子蛋白质是啤酒非生物浑浊的主要因素之一,原酒和脱醇酒的蛋白质隆丁区分测定结果如图 1。戊聚糖为不发酵性糖,是非淀粉多糖的一种,它通过共价交联形成凝胶体,进而影响啤酒的稳定性,同时它还具有较强的吸水性和持水性,可以与蛋白质竞争水分,使水与蛋白质结合的氢键断裂,促进多酚、铁离子等与蛋白质的结合。脱醇前后戊聚糖的测定结果见表 10。

表 10 啤酒中影响非生物稳定性的理化指标分析 (% , w/w)

项目	总多酚	铁离子	总蛋白质	β -葡聚糖	戊聚糖
原酒	0.0074	0.95×10^{-7}	0.058	0.070	9.01×10^{-4}
脱醇酒	0.0072	1.06×10^{-7}	0.056	0.069	6.95×10^{-4}

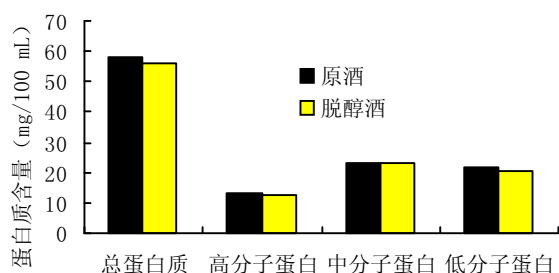


图 1 脱醇前后蛋白质隆丁区分

由表 10 可知,戊聚糖下降了 22.94%,与戊聚糖分

子量相当的 β -葡聚糖几乎没有下降,可见所用膜材质对戊聚糖有较大的吸附。影响啤酒非生物稳定性的各项指标除铁离子以外,其他均有不同程度的下降,由此可以推断经反渗透法得到的脱醇酒的非生物稳定性将有所提高。

3 结论

3.1 运用反渗透法可以脱去普通啤酒中大部分的乙醇,使酒精度达到 0.5% (v/v) 以下的无醇标准。

3.2 反渗透法脱醇,对啤酒的挥发性风味物质和非挥发性风味物质均有较高的保留。挥发性风味物质风味差别评价除乙酸异戊酯外,其余均为“无差别”。非挥发性风味物质总量损失率在 10% 以内。

3.3 在反渗透过程中,溶质、溶剂和膜材质发生交互作用,各种物质的透过率不仅与分子大小有关,还与分子结构、分子极性等有关。

参考文献:

- [1] 管敦仪.啤酒工业手册(中册)[M].北京:中国轻工业出版社,1985.
- [2] 李永仙.刚果红法测定麦汁和啤酒中的 β -葡聚糖[J].无锡轻工大学学报,1997,(1) 8-13.
- [3] 李胤.Douglas 法快速测定啤酒中的戊聚糖[J].酿酒,2003,30(4) 60-62.
- [4] 发酵工业,1996,4(23): 1-7.
- [5] Betriebsinterne Mitteilung der FA[M].Sigma Chemical Company,St.Louis,USA,1982.
- [6] 管敦仪.啤酒工业手册(中册)[M].北京:轻工业出版社,1983.108-109.
- [7] Christopher J.Antrobus, Peter J.Large, C.W. Bamforth. Changes in the Cationic Isoenzymes of Peroxidase during the Malting of Barley, I: Tissue Location Studies[J]. Journal of the Institute of Brewing, 1997,(103):227-231.
- [8] Christopher J.Antrobus, Peter J.Large, C.W. Bamforth. Changes in the Cationic Isoenzymes of Peroxidase During the Malting of Barley, II: The Effect of Gibberellic and Abscissic Acids[J]. Journal of the Institute of Brewing, 1997,(103): 233-237.
- [9] Bennett C.Nwanguma, Michael O.Eze. Heat Sensitivity, Optimum pH and Changes in Activity of Sorghum Peroxidase during Malting and Mashing[J]. Journal of the Institute of Brewing, 1995, 275-276.

(上接第 72 页)

参考文献:

- [1] W.H.Stephenson, J.P.Biawa, R.E.Miracle and C.W.Bamforth. Laboratory-Scale Studies of the Impact of Oxygen on Mashing[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2003, 109(3): 273-283.
- [2] Robert Muller R. The Formation of Hydrogen Peroxide during Oxidation of Thiol-containing Proteins[J]. Journal of the Institute of Brewing, 1997,(103):307-310.
- [3] Simon P.Clarkson, Peter J.Large, Charles W. Bamforth. A Two-substrate Kinetic Study of Peroxidase Cationic Isoenzymes in Barley Malt[J]. Phytochemistry, 1992, 31(3):743-749.
- [4] Simon P.Clarkson, Peter J.Large, Charles W.Bamforth. Oxygen-scavenging Enzymes in Barley and Malt and Their Effects During Mashing[J]. Journal of the Institute of Brewing, 1992,(98):111-115.
- [5] 廖惟,等.啤酒生产过程中的氧化还原酶系的研究[J].食品与

新疆首批白酒酿造技师通过鉴定

本刊讯 2005 年 3 月 28 日至 4 月 3 日,新疆酿酒工业协会(全国轻工行业特有工种职业技能鉴定站)在新疆三台酒业有限责任公司开展了自治区首批白酒酿造工职业技能培训和等级鉴定工作。来自新疆三台酒业、肖尔布拉克酒业、伊力特实业股份公司、新安酒业、新疆第一窖古城酒业、新疆白粮液酒业公司、赛里木酒业公司等企业的 36 名学员参加了本次培训与鉴定考核。

全国轻工行业特有工种职业技能鉴定总站张立文主任亲自到疆监考,本次鉴定合格者由国家劳动和社会保障部颁发全国通用的白酒酿造技师等级证书。经过理论考试和实际操作考核,学员们的业务水平都得到了很大提高。

今后,新疆酿酒工业协会将逐渐开展白酒、葡萄酒、啤酒、果露酒的初级工、中级工、高级工、技师的职业技能培训与鉴定工作。(江砂)