

# 不同复合酶制剂对麦芽中 PYF 因子酵母超前絮凝活力的影响

钱盛峰<sup>1,2</sup>, 胡维胜<sup>2,3</sup>, 林英辉<sup>2</sup>, 郭瑞涵<sup>2</sup>, 刘月英<sup>1</sup> (1. 厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005; 2. 英博雪津啤酒有限公司, 福建莆田 351111; 3. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

**摘要** 选取 2 种不同复合酶制剂, 采用乙醇沉淀法提取出麦芽中 PYF 因子, 通过模拟糖化条件及添加不同酶量来考察外加酶是否对 PYF 因子具有水解能力。结果发现, 与对照组 PYF 活力值( $F=78.79$ ) 相比, 不同添加量的 2 种复合酶与 PYF 因子作用后 PYF 活力值没有发生显著变化( $P>0.05$ ), 即 PYF 因子是一种结构特殊、复合酶不能水解的多糖大分子。

**关键词** PYF 因子; 复合酶制剂; 水解; 酵母超前絮凝活力

中图分类号 Q814.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)07-02640-02

## Influence of Different Enzyme Preparation on Premature Yeast Flocculation activity of PYF Factor from Malt

QIAN Sheng-feng et al (School of Life Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005)

**Abstract** Through simulating saccharification condition and adding different enzyme amount, the hydrolysis abilities of 2 different kinds of enzyme preparation on PYF factor, which was extracted from malt by ethanol precipitation, were measured and compared. The results showed that compared with the PYF activity value( $F=78.79$ ) of control group, PYF activity value didn't change significantly ( $P>0.05$ ) after 2 kinds of enzyme with different adding amounts acted with PYF factor, namely that PYF factor was a kind of polysaccharide with a higher molecular weight and special structure and couldn't be hydrolyzed by enzyme.

**Key words** PYF factor; Compound enzyme; Hydrolysis; Premature yeast flocculation activity indexes

研究表明, 受采收季节外界环境、制麦工艺等因素的影响, 大麦自身可能会产生一种高分子量的生物多糖或糖蛋白类大分子(简称 PYF 因子), 以抵抗微生物侵袭<sup>[1-2]</sup>。它们具有较强的阳离子性和两亲性, 对热或冷都比较稳定, 不能被麦芽自身酶系水解, 在酿造过程中一直保持活性, 可与酵母上带负电荷的组分结合, 甚至破坏膜的完整性, 从而诱导酵母超前絮凝(Premature Yeast Flocculation)。这必然会影响到酵母回收利用、发酵性能及下游过滤工艺, 严重时会影响成品酒的风味。显然, PYF 麦芽对啤酒酿造不利<sup>[3-4]</sup>。

而在啤酒酿造过程中, 为了促进  $\beta$  葡聚糖、木聚糖、戊聚糖和纤维素、半纤维素及淀粉等高粘度的大分子分解形成小分子聚合物, 降低麦汁粘度, 提高下游过滤效率, 有效提高浸出物的含量, 通常在糖化阶段会适当添加多种混合酶系不同比例搭配组成的复合酶制剂。到目前为止, 尚未见糖化过程中外加复合酶制剂对麦芽中 PYF 因子影响的文献报道。为此, 笔者选取了不同酶制剂厂家的 A 和 B 2 种复合酶, 模拟大生产糖化过程中酶的添加方式, 根据特定酵母絮凝性能的变化规律来考察复合酶是否对 PYF 因子具有降解作用, 以实现从多角度评价复合酶的性能, 探讨 PYF 麦芽潜在可行的调控方式, 为啤酒酿造行业提供理论依据。

## 1 材料与与方法

**1.1 酵母培养基配方** 1% 酵母浸膏、2% 细菌蛋白胨、2.5% 葡萄糖, 超纯水溶解, pH 值自然。

**1.2 酵母培养及酵母悬浮液制备**<sup>[5]</sup> 取斜面挑取 1 环酵母, 接种于 10 ml 液体标准培养基试管, 25 °C 下活化 24 h。摇匀活化后的酵母溶液, 取 1 ml 接种于 10 ml 标准培养基, 12 °C 下培养 72 h, 最后转入装有 500 ml 培养基的三角瓶, 8 °C、180 r/min 下动态培养 125 h。离心收集酵母细胞(5 000 r/min、10 min), 称取沉淀酵母 6 g, 依次用 40 ml 去离子水、0.01 mol/L EDTA-Na 溶液(pH 8.0)、去离子水洗涤。取洗净酵母,

配制成 0.3 g/ml 酵母悬浮液, 并置于 0 °C 下保藏备用。

**1.3 麦芽 PYF 因子提取**<sup>[5]</sup> 按 Analytical-EBC 推荐的方法糖化麦芽制备协定麦汁, 煮沸麦汁, 30 min 后过滤, 向滤液中加入等体积的无水乙醇, 于冰浴上反应 1 h。10 000 g 离心力下离心 15 min, 收集沉淀物, 加入 25 ml 加热的去离子水溶解, 再在相同条件下离心, 去除不溶物, 0.2  $\mu$ m 水相微孔过滤膜过滤, 上清液置于 4 °C 下保存备用。

**1.4 反应条件** A 型复合酶与麦芽 PYF 因子反应条件。取 100 ml 制备的 PYF 因子提取液多份, 模拟糖化条件(未提供具体参数), 适当时刻下向提取液中分别加入 100、150、200  $\mu$ l 0.08 g/ml A 型复合酶水溶液或 10、20、30  $\mu$ l 0.02 g/ml B 型复合酶水溶液, 反应后过滤, 取滤液。以不添加酶制剂的样品为对照。每个试验至少 3 个重复。

**1.5 PYF 因子超前絮凝活力测定**<sup>[6]</sup> 吸取 0.4 ml 待测样品, 加入 50 mmol/L 醋酸钠-醋酸、0.1% 氯化钙、2.3 ml 缓冲液(pH 4.50) 和 0.8 ml 0.3 g/ml 酵母悬浮液, 用封口膜将比色皿密封。上下倒置, 充分混合, 室温放置 30 min。然后, 上下倒置使其充分混合, 使得沉淀絮状物重新悬浮, 选择不含样品的缓冲液作为对照进行调零, 测定前 7 min 内该悬浮液每分钟在波长 600 nm 处对应的吸光度值。PYF 因子活力水平定义为:

$$F = \frac{7 \text{ min 时溶液吸光度值} - \text{初时吸光度值}}{\text{初始溶液吸光度值}} \times 100\% \quad (1)$$

F 值越大, 表示麦芽 PYF 因子超前絮凝活力越高。

**1.6 数据处理** 试验结果均以平均值  $\pm$  标准误的形式表示。使用 SPSS 软件对数据进行显著性分析。

## 2 结果与分析

**2.1 A 型复合酶对 PYF 因子水解程度的影响** 在厂家推荐的酶制剂添加量范围内, 模拟大生产糖化条件对从麦芽中提取的 PYF 因子进行水解。由图 1 可知, 当酶添加量由 0.02% 增加到 0.04% 时, 糖化结束后溶液中 PYF 因子絮凝活力基本保持在同一水平, 絮凝活力值达  $78.37 \pm 0.24$ , 与对照组即不添加 A 型复合酶的 PYF 因子絮凝活力值无显著性差异( $P>0.05$ ), 说明添加该复合酶后 PYF 因子未被降解, 相应

作者简介 钱盛峰(1980-), 男, 福建龙岩人, 硕士研究生, 研究方向: 生物发酵工程。

收稿日期 2007-11-22

地 PYF 因子的酵母超前絮凝活性没有发生变化。

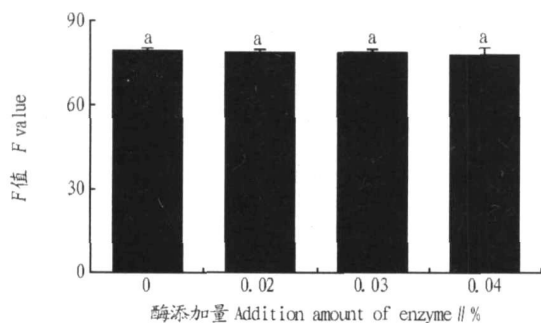


图 1 不同添加量的 A 型复合酶对 PYF 因子水解的影响

Fig.1 Effects of different addition amount of compound enzyme A on hydrolysis ability of PYF factor

2.2 B 型复合酶对 PYF 因子水解程度的影响 在该酶制剂推荐较适宜的添加量范围内进行 PYF 因子水解试验。由图 2 可知, B 型复合酶同 A 型复合酶均不能因其存在而导致 PYF 因子发生水解反应。酶添加量从 0.005% 升高到

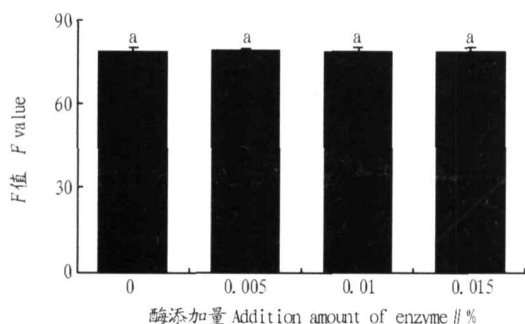


图 2 不同添加量的 B 型复合酶对 PYF 因子水解的影响

Fig.2 Effects of different addition amount of compound enzyme B on hydrolysis ability of PYF factor

0.015%, 溶液中 PYF 因子絮凝活力平均值达  $78.52 \pm 0.30$ , 与对照组 PYF 因子絮凝活力值无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 说明该复合酶不能水解麦芽中诱导酵母超前絮凝的 PYF 因子。

### 3 讨论

啤酒复合酶制剂主要由  $\beta$  葡聚糖酶、木聚糖酶、戊聚糖酶、纤维素酶、中性蛋白酶、淀粉酶等组成, 能促进  $\beta$  葡聚糖、木聚糖、戊聚糖和纤维素、半纤维素及淀粉等大分子的水解, 但对麦芽中 PYF 因子不具有水解作用。因此, 可以推断 PYF 因子不同于这些大分子, 是一种具有特殊结构、不能被麦芽自身酶系和一般复合酶制剂水解的多糖或糖蛋白大分子。从另一个角度来看, 由于 PYF 因子在复合酶的作用下不能被降解为小分子聚集体, 因此有必要利用生物大分子研究的最新技术和现代分离手段实现对异常麦芽中 PYF 因子的分离纯化及其结构表征, 并在此基础上开发出水解 PYF 因子的新型酶制剂, 以避免麦芽 PYF 因子引起的酵母超前絮凝异常发酵, 最终为啤酒酿造行业提供有力的技术支持。

### 参考文献

- [1] NIEROP S N E, CLARKE A C, AXCELL B C. Enzymatic generation of factor from malt responsible for premature yeast flocculation[J]. Yeast, 1993, 12: 207-213.
- [2] AXCEL B C, VAN NIEROP S, VUNDIA W. Malt induced premature yeast flocculation[J]. Tech Q Master Brew Assoc Am, 2000, 37: 501-504.
- [3] HERRERA V E, AXCELL B C. Induction of premature yeast flocculation by a polysaccharide fraction isolated from malt husk[J]. J NST BREW, 1991, 97(5): 359-366.
- [4] NAKAMURA T, CHIBA K, ASAHARA Y, et al. Prediction of barley which causes premature yeast flocculation[J]. Proc Congr Eur Brew Conv, 1997, 26: 53-60.
- [5] KOIZUMI H, OGAWA T. Rapid and sensitive method to measure premature yeast flocculation activity in malt[J]. J Am Soc Brew Chem, 2005, 63(4): 147-150.
- [6] JIBIKI M, SASAKI K, KAGAMI N, et al. Application of a newly developed method for estimating the premature yeast flocculation potential of malt samples [J]. J Am Soc Brew Chem, 2006, 64(2): 79-85.
- [7] 张国只, 陈林海, 杨天佑, 等. 琼脂扩散法测定乳链菌肽效价的优化[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 175-178.
- [8] TURCOTTE C, LACROIX C, KHEADR E, et al. A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 90: 283-293.
- [9] 吴兆亮, 贾永生, 谭相伟, 等. 分光光度法快速测定乳链菌肽效价[J]. 分析化学研究简报, 2006(34): 227-230.
- [10] WANG F, CAO L, HU S A rapid and accurate 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide colorimetric assay for quantification of bacteriocins with nisin as an example[J]. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 2007, 8(8): 549-554.
- [11] BOUKSAM M, FLISS T, MEGHROUS J, et al. Immunodot detection of nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84: 176-184.
- [12] FALAHEE M B, ADAMS M R, DALE J W, et al. An enzyme immunoassay for nisin[J]. J Food Sci and Technol, 1990, 25: 590-595.
- [13] SUAREZ A M, RODRY GUEZ J M, HERNANDEZHE, et al. Generation of polyclonal antibodies against nisin: immunization strategies and immunoassay development[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(6): 2117-2121.
- [14] DAOUDI L, TURCOTTE C, LACROIX C, et al. Production and characterization of anti-nisin monoclonal antibodies: suitability for distinguishing active from inactive forms through a competitive enzyme immunoassay[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2001, 56: 114-119.
- [15] WAHLSTROM G, SARIS P E J. A nisin bioassay based on bioluminescence [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(8): 3742-3745.
- [16] REUNANEN J, SARIS P E J. Microplate bioassay for nisin in foods, based on nisin-induced green fluorescent protein fluorescence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 4214-4218.
- [17] IMMONEN N, KARP M. Bioluminescence based bioassays for rapid detection of nisin in food [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 22: 1982-1987.
- [18] BUDE B B, RASCH M. A comparative study on the use of flow cytometry and colony forming units for assessment of the antibacterial effect of bacteriocins [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 63: 65-72.
- [19] WAITES M J, OGDEN K. The estimation of nisin using ATP-bioluminometry [J]. Journal of the Institute of Brewing, 1987, 93(1): 30-32.
- [20] ROSSANO R, DELFIORE A, DELIA A, et al. New procedure for the determination of nisin in milk [J]. Biotechnology Techniques, 1998, 12(10): 783-786.