

# 小麦芽部分阿魏酸酯酶酶学性质的研究

张文华

(包头轻工职业技术学院生物工程学院, 内蒙古包头 014035)

**摘要:**以脱淀粉麦麸作为底物测定小麦阿魏酸酯酶的酶活,探讨了小麦阿魏酸酯酶的部分酶学性质。结果表明,阿魏酸酯酶最适反应温度为 35 ℃,酶活为 0.126 U/g;最适反应 pH 为 6.0,酶活为 0.125 U/g;在 25~35 ℃保存 120 min 比较稳定,存活率在 97.9% 以上;60 ℃保温 120 min,酶的存活率仅为 4.6%,基本失活;65、70、75 ℃保存时,分别在 80、20、10 min 的时候,酶失活;阿魏酸酯酶在 pH5.5~pH6.0 条件下保存最稳定。 $\text{Ca}^{2+}$  对酶活力有显著的激活作用; $\text{Hg}^{+}$  和 EDTA 对酶活力有显著的抑制作用。

**关键词:**小麦芽,阿魏酸酯酶,酶学性质

## Study on some enzyme property of feruloyl esterase from wheat malt

ZHANG Wen-hua

(Baotou light industry vocational technical college, Baotou 014035, China)

**Abstract:** Taking de-starched wheat bran as substrate, the enzyme activity of feruloyl esterase in wheat malt were confirmed and some enzyme property was discussed as follows: the optimal temperature and pH were 35 ℃ and 6.0, the enzyme activity were 0.126 U/g and 0.125 U/g respectively. The survival rate was above 97.9% after 120 min incubating between 25~35 ℃. The enzyme was basically inactivated by incubating for 120 min at 60 ℃ and the survival rate was only 4.6%. The enzyme was inactivated in 80, 20, 10 min respectively by incubating at 65, 70, 75 ℃. Feruloyl esterase had high stability when incubated in pH 5.5~6.0.  $\text{Ca}^{2+}$  was significantly increased the enzyme activity,  $\text{Hg}^{+}$  and EDTA showed significantly inhibitory effect on the enzyme activity.

**Key words:** wheat malt; feruloyl esterase; enzymatic properties

中图分类号: TS261.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)19-0177-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.19.029

阿魏酸酯酶 (Feruloyl esterase, FAE, E.C.3.1.1.73) 是一种羧酸酯酶,它是一种胞外酶,1991年 Faulds<sup>[1]</sup>首次从橄榄色链霉菌 (Streptomyces olivochrom-ogenes) 中分离出来,其可以水解阿魏酸甲酯、阿魏酸乙酯、多糖阿魏酸酯等中的酯键,将阿魏酸游离出来<sup>[2-3]</sup>。在小麦中,阿魏酸主要以酯键连接到存在于细胞壁阿拉伯木聚糖的阿拉伯糖残基上,还有一部分以阿魏酸二聚体的形式连接到阿拉伯木聚糖聚合物上,阿魏酸酯酶可以打断阿魏酸与细胞壁多糖的连接,高效降解多糖并获得低聚糖及阿魏酸<sup>[4-5]</sup>。

小麦作为原料已经越来越广泛地被用在啤酒行业中。在小麦啤酒中,4-乙炔基愈创木酚(4-VG)可以使小麦啤酒呈现出丁香味,是不可或缺的香味物质,也是该类啤酒全面风味评价的主要特色成分<sup>[6]</sup>。现在,4-VG已经成为小麦啤酒生产厂家风味检测的重要控制指标之一。只有小麦啤酒中的4-VG含量 > 2.5 mg/L 的时候,小麦啤酒才可以表现出以4-VG为主体的香气成分<sup>[7]</sup>,然而很多小麦啤酒的4-VG含量并没有达到 2.5 mg/L。啤酒中的4-VG是由其前

体物质阿魏酸经过脱羧反应后产生的。啤酒中4-VG的产生一般通过两种途径:啤酒酿造过程中的高温热反应产生(麦汁煮沸、巴士杀菌等);小麦啤酒在发酵过程中,上面酵母会产生苯丙烯酸活性脱羧酶 PAD1 (Pof1),这种酶会作用于阿魏酸发生脱羧反应产生4-VG<sup>[6,8]</sup>。

因此,要提高小麦啤酒中的4-VG含量,就要提高其前体阿魏酸的量,而阿魏酸主要是通过其自身的阿魏酸酯酶酶解产生的。所以,了解小麦中的阿魏酸酯酶的酶学性质,可以更好地在制麦、糖化过程控制相关参数,从而提高阿魏酸酯酶的酶活进而提高成品麦汁中阿魏酸的含量,以提高啤酒中的4-VG含量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

鲁麦-21 烟台农科院;阿魏酸、木瓜蛋白酶 (10000 U/g)、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  上海晶纯生化科技股份有限公司;  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{HgCl}_2$  sigma; 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶液 (80000 U/g) 诺维信酶制剂有限公司; 甲醇

收稿日期: 2014-08-07

作者简介: 张文华 (1974-), 女, 本科, 讲师, 研究方向: 微生物技术与应用方面, E-mail: zhang.yanhui123456@163.com。

禹王化工有限公司;盐酸 莱阳市康德化工有限公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠 天津巴斯夫化工有限公司;麦麸 市场。

EBC-LF 麦芽标准粉碎机 北京卓川电子科技有限公司;AL204 电子天平 梅特勒-托利多有限公司;UV-260 紫外分光光度计 日本岛津;数显水浴锅 金坛市金南仪器有限公司;超声波清洗器 上海生析超声仪器有限公司;高速台式冷冻离心机 湘仪离心机。

## 1.2 实验方法

1.2.1 小麦芽的制备 小麦制麦工艺参照 Jin 等人的方法<sup>[5,9]</sup>,小麦芽的糖化与分析参照啤酒麦芽<sup>[10]</sup>分析方法。

1.2.2 脱淀粉麦麸的制备 脱淀粉麦麸(DSWB)的制备:将麦麸和水 1:6 混合,在 90 °C 糊化 30 min,按照 0.3% 的添加量添加耐高温  $\alpha$ -淀粉酶,作用 30 min 左右(利用碘液检验淀粉是否反应完全,如变蓝则继续反应,直到碘液检测不变蓝为止),沸水灭酶 10 min;将反应液冷却至 60 °C,按照 0.5% 的添加量添加木瓜蛋白酶酶解 30 min,沸水灭酶 10 min,将处理完的麦麸烘干磨碎过 60 目筛备用<sup>[11-12]</sup>。

### 1.2.3 阿魏酸酯酶酶活测定

1.2.3.1 标准曲线的绘制 精密称取阿魏酸标准品 0.1 g(0.0001 g),用甲醇定容至 100 mL 得到 1 g/L 的标准贮备液,再用甲醇配制成 0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.01 g/L 的标样溶液。用紫外分光光度计于 320 nm 处进行测定<sup>[5]</sup>。

1.2.3.2 阿魏酸酯酶的制备 将成品麦芽磨碎,磨筛孔 0.2 mm<sup>[13]</sup>。准确称取 5 g(0.0001 g)麦芽粉于研钵中,加入 50 mL 预冷的 0.05 mol/L, pH6.0 的磷酸盐缓冲液,在研钵中均匀碾磨 20 min 后,于 4 °C, 10000 r/min 离心 15 min,收集上清液,再过 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤,即得粗酶液<sup>[14]</sup>。

1.2.3.3 阿魏酸酯酶酶活测定 取 0.1 g DSWB 于 25 mL 比色管中,加入 pH6.2 磷酸缓冲液 3.9 mL, 35 °C 水浴保温 5 min 后,加入 0.1 mL 粗酶液,准确反应 60 min,沸水浴 3 min 终止反应。对照为 0.1 mL 粗酶液加入到 3.9 mL 磷酸盐缓冲液中沸水浴 3 min,再加入 0.1 g DSWB 反应 60 min。反应液终止反应后,冷却,加入 1 mL 无水酒精,混匀,离心(10000 r/min, 5 min),上清液在 320 nm 下测定吸光度<sup>[15-16]</sup>。

1.2.3.4 酶活性单位(U)的定义以及计算 阿魏酸酯酶酶活单位表示为在测定条件下,每克干麦芽每分钟在 320 nm 处水解 DSWB 催化生成 1  $\mu$ mol 阿魏酸为一个活力单位<sup>[14]</sup>。计算公式如下:

$$\text{阿魏酸酯酶酶活 (U/g)} = M/60 \times 50000/B \times 1/m \times 1/(1-m_1/100)$$

式中: $M$ :反应 60 min 在 320 nm 处的阿魏酸增加量( $\mu$ mol); $60$ :酶反应时间(min); $m$ :提酶所需麦芽的质量(g); $50000$ :提酶所需缓冲液的体积( $\mu$ L); $B$ :使用麦芽酶浸出液的体积( $\mu$ L); $m_1$ :100 g 麦芽的含水量(g)。

### 1.2.4 小麦芽中阿魏酸酯酶酶学性质的研究

1.2.4.1 最适反应温度的确定 分别将上述 1.2.3.3 中的温度改为 25、30、35、40、45、50 °C,测定阿魏酸酯酶的酶活,找到其最适反应温度。

1.2.4.2 最适反应 pH 的确定 分别将上述 1.2.3.3 中的 pH 改为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0,测定阿魏酸酯酶的酶活,找到其最适反应 pH。

1.2.4.3 温度对酶稳定性的影响 分别将粗酶液储藏在 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70 °C 下 120 min,前 40 min,每 10 min 取样在最适温度和 pH 条件下测定酶活,后 80 min 每隔 20 min 取样在最适温度和 pH 条件下测定酶活,未做温度处理的酶活作为 100% 作图<sup>[17]</sup>。

1.2.4.4 pH 对酶稳定性的影响 分别向 100  $\mu$ L 粗酶液中加入 900  $\mu$ L 不同 pH 的缓冲液(3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0),在 37 °C 下保温 10 min 后再加入 pH 6.0 的缓冲液 3000  $\mu$ L 和 0.1 g DSWB 作为底物,测定阿魏酸酯酶的酶活<sup>[14]</sup>。

1.2.4.5 金属离子对酶稳定性的研究 分别向酶液中加入金属离子( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{+}$ )和 EDTA 的储备液,使金属离子的终浓度达到 5 mmol/L,将酶液在 37 °C 保温 10 min 后,在最适温度及 pH 下测定阿魏酸酯酶的酶活<sup>[18]</sup>。

1.2.5 数据处理 文中实验结果为 3 次平行实验的平均值。采用 dps 7.05 数据处理软件进行数据分析。差异性采用 Turkey 法进行多重比较,置信水平 95% ( $\alpha = 0.05$ )。各实验图表结果中,具有相同字母表示两者无显著差异( $p > 0.05$ ),没有相同字母表示两者存在显著性差异( $p < 0.05$ ),字母顺序按均值大小排列。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦芽指标分析

经测定,成品小麦芽指标:水分 5.88%,糖化时间 4 min,色度 5.90 EBC,浊度 2.69 EBC,粘度 1.50 cP, pH6.01,酸度 0.90,氨基氮 135.46 mg/L,库值 37%,适合小麦啤酒酿造。

### 2.2 阿魏酸标准曲线

从图 1 可以看出,阿魏酸的质量浓度与吸光值的关系公式为  $Y = 0.0106x + 0.0005$ ,  $R^2 = 0.9990$ 。

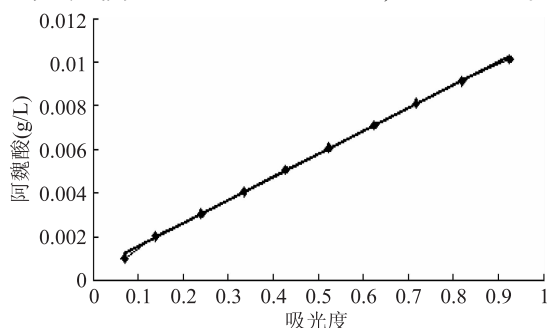


图 1 阿魏酸标准曲线图

Fig.1 Feruloyl acid standard curve

### 2.3 阿魏酸酯酶最适反应温度

从图2可以看出,阿魏酸酯酶在25~35℃,随着温度的升高酶活增大,到35℃的时候,酶活达到最大为0.126 U/g;35~50℃,随着温度的升高,酶活开始下降;35℃阿魏酸酯酶酶活力达到最大值,并且酶活之间有显著性差异。因此,35℃为阿魏酸酯酶的最适反应温度。在麦汁糖化过程中,可以将糖化温度设置在35℃附近,这样可以极大促进阿魏酸的生成。

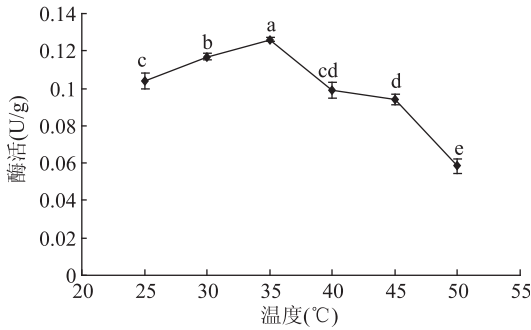


图2 温度对阿魏酸酯酶酶活的影响  
Fig.2 Effect of temperature on feruloyl esterase enzyme activity

## 2.4 阿魏酸酯酶最适反应 pH

从图3可以看出,阿魏酸酯酶在pH4.0~pH6.0时,随着pH的增大酶活增大,在pH为6.0时,达到最大,阿魏酸酯酶酶活为0.125 U/g;pH6.0~pH7.0时,随着pH的增大酶活变小,pH6.0时的酶活与其他pH下的有显著性差异。因此,阿魏酸酯酶的最适反应pH为6.0。由于麦汁糖化过程中糖化醪的pH恰好在5.8~6.0之间,这对于阿魏酸的生成是非常有利的。

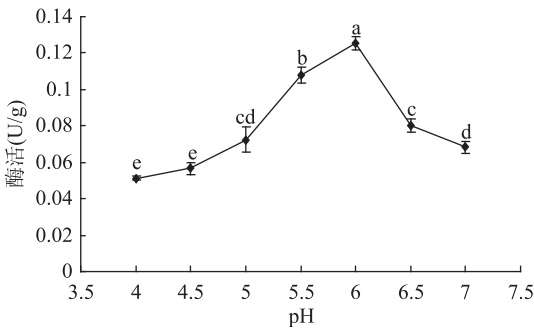


图3 pH对阿魏酸酯酶酶活的影响  
Fig.3 Effect of pH on feruloyl esterase enzyme activity

## 2.5 不同温度对阿魏酸酯酶酶活稳定性的影响

从图4可以看出,当阿魏酸酯酶保存在25、30、35℃的时候,酶活损失较小,在保存120min后,酶的存活率分别是99.0%、99.9%、97.9%,阿魏酸酯酶基本没有失活,这说明在25~35℃范围内,酶的保存性很好,酶活损失不大;当阿魏酸酯酶保存在40℃以上时,酶的失活情况开始加速,40℃保存120min后,酶的存活率为87.5%,失活率超过10%;当阿魏酸酯酶保存在45、50、55℃时,酶活损失迅速,酶的存活率分别为74.0%、56.0%、33.9%,45℃至50℃酶的存活率减少了18%,50℃至55℃酶的存活率减少了22.1%,阿魏酸酯酶的失活速度加快;当阿魏酸

酯酶在60℃保存120min后,酶的存活率仅仅为4.6%,与55℃相比,减少了29.3%,酶基本失活;当阿魏酸酯酶在65、70、75℃保存时,分别在80、20、10min的时候,酶失活。尽管在60℃以上条件下,阿魏酸酯酶失活速度加快,但是麦汁在糖化过程中,温度会从低温至高温依次递增,适当延长低温段的糖化时间,会延缓阿魏酸酯酶的失活,也会进一步增加麦汁中阿魏酸的含量。

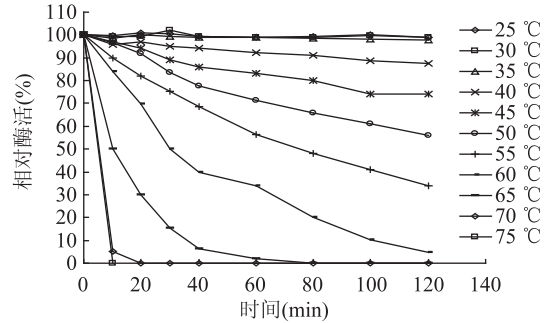


图4 不同温度、时间对阿魏酸酯酶稳定性的影响  
Fig.4 Effect of different temperature and time on the stability of feruloyl esterase

## 2.6 不同pH对阿魏酸酯酶酶活稳定性的影响

从图5可以看出,阿魏酸酯酶在不同pH条件下的稳定性有很大差异,当pH在3.0~pH5.5的时候,阿魏酸酯酶的稳定性随pH的升高而缓慢升高;pH5.5~pH6.0的时候,阿魏酸酯酶的稳定性最好;当pH在6.0~8.0的时候,阿魏酸酯酶的稳定性随着pH的升高而急剧下降,pH8.0的时候,酶的存活率仅为pH6.0的37.0%。麦汁糖化的初始pH接近6.0,随着糖化的进行,pH略有下降,但变化不大,而阿魏酸酯酶在pH6.0左右的时候稳定性最好,这也确保了在糖化过程中,阿魏酸酯酶不会因为pH的变化而稳定性降低。

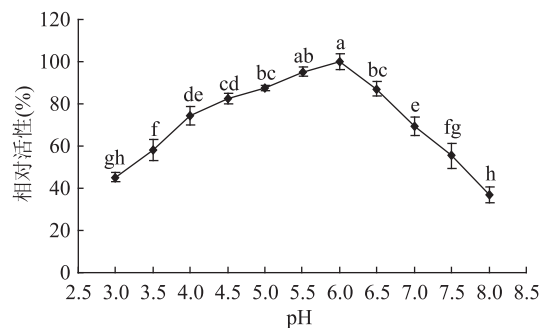


图5 pH对阿魏酸酯酶稳定性的影响  
Fig.5 Effect of pH on the stability of feruloyl esterase

## 2.7 金属离子对阿魏酸酯酶酶活的影响

从表1可以看出,Ca<sup>2+</sup>对阿魏酸酯酶的激活作用最为明显,可以使阿魏酸酯酶的酶活上升至154.9%;Mg<sup>2+</sup>对阿魏酸酯酶的激活作用较小,仅仅上升至105.4%,并且与空白并没有显著差异;其余金属离子对阿魏酸酯酶均有不同程度的抑制,其中Hg<sup>+</sup>对阿魏酸酯酶的抑制作用最为明显,可以使阿魏酸酯酶的酶活下降至14.0%;EDTA对于阿魏酸酯酶的抑制也较强,可以使阿魏酸酯酶酶活下降至55.1%。

表1 金属离子对阿魏酸酯酶酶活的影响

Table 1 The effect of metal ion on feruloyl esterase enzyme activity

离子浓度 (5 mmol/L)	空白	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Fe <sup>2+</sup>
相对酶活(%)	100.15 ± 1.38 <sup>b</sup>	154.87 ± 4.61 <sup>a</sup>	105.37 ± 2.00 <sup>b</sup>	57.59 ± 1.84 <sup>f</sup>	67.26 ± 1.78 <sup>e</sup>	73.87 ± 3.28 <sup>cd</sup>
离子浓度 (5 mmol/L)	Zn <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Hg <sup>+</sup>	EDTA
相对酶活(%)	68.13 ± 0.90 <sup>de</sup>	30.10 ± 1.12 <sup>g</sup>	26.17 ± 1.15 <sup>g</sup>	75.52 ± 0.79 <sup>c</sup>	14.03 ± 1.66 <sup>h</sup>	55.13 ± 1.60 <sup>f</sup>

### 3 结论

3.1 小麦阿魏酸酯酶的最适温度为 35 ℃, 酶活为 0.126 U/g; 最适 pH 为 6.0, 酶活为 0.125 U/g。

3.2 小麦阿魏酸酯酶在 25~35 ℃ 保存 120 min 比较稳定, 存活率在 97.9% 以上; 60 ℃ 保温 120 min, 酶的存活率仅为 4.6%, 基本失活, 65、70、75 ℃ 保存时, 分别在 80、20、10 min 的时候, 酶失活; 阿魏酸酯酶在 pH5.5~pH6.0 条件下保存最稳定。

3.3 Ca<sup>2+</sup> 对阿魏酸酯酶有强烈的激活作用; Hg<sup>+</sup> 对阿魏酸酯酶有强烈的抑制作用; EDTA 对于阿魏酸酯酶的抑制也较强。

### 参考文献

[1] Faulds CB, Williamson G. The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from streptomyces olivochromogenes[J]. J Gen Microbiol, 1991, 137: 2337-2345.

[2] Sindhu Mat hew, T Emilia Abraham. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2004, 24(2-3): 59-83.

[3] 王洪川, 陈洪章. 高产阿魏酸酯酶菌株的筛选及其固态发酵的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 11-14.

[4] Mattila P, Kumpulainen J. Determination of free and total phenolic acids in plant derived foods by HPLC and diode array detection[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 3660-3667.

[5] 王丹. 小麦与麦芽中阿魏酸及其阿魏酸酯酶的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010.

[6] 崔云前, 曹小红, 王春玲, 等. 发酵行业 4-乙炔基愈创木酚和 4-乙基愈创木酚研究进展[J]. 中国酿造, 2009(4): 14-17.

[7] 王晓会, 王憬, 王欣, 等. 小麦啤酒中特征香气组分 4-乙炔基愈创木酚测定方法的建立和应用[J]. 啤酒科技, 2012(12):

6-9.

[8] 张乃斌. 上面发酵高 4-VG 含量青稞啤酒工艺的研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2013.

[9] Jin Y H, Zhang K L, Du J H. Effects of wheat protein content on endosperm composites and malt quality[J]. J Inst Brew, 2008, 114(4): 289-293.

[10] QB/T 1686-2008. 啤酒麦芽[S]. 2008.

[11] 欧仕益, 李炎, 高孔荣. 麦麸膳食纤维清除羟自由基的研究[J]. 营养学报, 1999, 21(2): 191-195.

[12] 赵娟. 阿魏酸酯酶基因的克隆与表达及在植物纤维材料降解中的应用[D]. 济南: 山东大学, 2012.

[13] Sovrano S, Buiaiti S, Anese M. Influence of malt browning degree on lipoxygenase activity[J]. Food Chemistry, 2006, 99(4): 711-717.

[14] Nele Vanbeneden, Tom Van Roey, Filip Willems, et al. Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing[J]. Food Chemistry, 2008, 111: 83-91.

[15] G Mukherjee, R K Singh, A Mitra, et al. Ferulic acid esterase production by streptomyces sp[J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 211-213.

[16] W Zeng, H Z Chen. Air pressure pulsation solid state fermentation of feruloyl esterase by Aspergillus niger[J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 1371-1375.

[17] 王聪, 杜金华, 张开利, 等. 小麦芽脂肪酶酶学性质以及制麦过程的酶活变化[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(5): 105-110.

[18] Ahmed Eid Fazary, Suryadi Ismajji, Yi-Hsu Ju. Biochemical studies on native and cross-linked aggregates of Aspergillus awamori feruloyl esterase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 44: 240-248.

(上接第 176 页)

[14] 罗惠波, 张宿义, 卢中明. 浓香型白酒黄水的应用探索[J]. 酿酒科技, 2004, 1: 40-41.

[15] 张宿义, 卢中明, 周军. 黄酒调味液在白酒调味中的应用[J]. 酿酒科技, 2002, 2: 45-46.

[16] 陈帅, 刘琨毅, 郑佳, 等. 基于响应面法优化酿酒黄水酶促酯化条件的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 205-209.

[17] 陈帅, 赵金松, 郑佳, 等. 红曲与产酯酵母酯化黄水代谢物的特征[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 1-5.

[18] Gao X L, Cui C, Zhao H F, et al. Changes in volatile aroma

compounds of traditional Chinese-type soy sauce during moromi fermentation and heat treatment[J]. Food Sci Biotechnol, 2010, 19(4): 889-898.

[19] 王世宽, 潘明, 徐艳丽, 等. 浓香型大曲发酵过程中霉菌消长情况的研究[J]. 中国酿造, 2010, 29(1): 42-45.

[20] 李振权, 蔡静平, 黄淑霞, 等. 不同生理状态霉菌对储粮品质危害性的研究[J]. 粮油加工, 2007, 7: 96-98.

[21] 陈帅, 郑佳, 刘琨毅, 等. 红曲酯化酶促反应及其代谢产物特征[J]. 食品与发酵工业, 2011, 38(2): 47-51.