

文章编号:1673-1689(2007)05-0061-05

## 麦芽制造过程中酚类物质及其相关酶类的变化

孔维宝<sup>1,2</sup>, 樊伟<sup>3</sup>, 陆健<sup>1,2</sup>, 赵海锋<sup>1,2</sup>, 董建军<sup>3</sup>, 单连菊<sup>3</sup>, 林艳<sup>3</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 青岛啤酒股份有限公司, 山东 青岛 266061)

**摘要:** 研究了 3 种典型国产啤酒大麦在麦芽制造过程中(包括浸麦、发芽和干燥)酚类物质及其相关酶类(苯丙氨酸解氨酶:phenylalanine ammonia-lyase, PAL、过氧化物酶:peroxidase, POD 和多酚氧化酶:polyphenol oxidase, PPO)的变化, 分析了制麦过程中酚类物质含量的变化与酶活力和制麦工艺之间的关系, 讨论了大麦发芽过程中苯丙氨酸解氨酶在合成酚类物质方面的作用及过氧化物酶对根芽生长和制麦损失的影响。

**关键词:** 麦芽制造; 酚类物质; 苯丙氨酸解氨酶; 过氧化物酶; 多酚氧化酶; 制麦损失

**中图分类号:** Q 55; TS 262

**文献标识码:** A

## Changes of Phenolic Compounds and Related Enzymes during Barley Malting

KONG Wei-bao<sup>1,2</sup>, FAN Wei<sup>3</sup>, LU Jian<sup>1,2</sup>, ZHAO Hai-feng<sup>1,2</sup>,

DONG Jian-jun<sup>3</sup>, SHAN Lian-ju<sup>3</sup>, LIN Yan<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Tsingtao Brewing Co. Ltd., Qingdao 266061, China)

**Abstract:** Phenolic compounds and related enzymes in barley influence its growth and brewing processes. In this study, the changes of phenolic compounds, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) activities during malting (including steeping, germination and kilning) with three domestic barley varieties were investigated, and the relationships between changes of phenolic content and enzyme activities and malting technics were analysed. The functions of PAL on biosynthesis of phenolic compounds and the effects of peroxidase activity on root growth and malting loss were also discussed.

**Key words:** malting; phenolic compounds; phenylalanine ammonia-lyase (PAL); peroxidase (POD); polyphenol oxidase (PPO); malting loss

大麦中的酚类物质(如酚酸类、黄酮类和聚黄烷类)及其相关酶类(如酚类合成酶——苯丙氨酸解氨酶 (EC 4. 3. 1. 5, phenylalanine ammonia-

lyase, PAL)和酚类氧化酶——过氧化物酶 (EC 1. 11. 1. 7, peroxidase, POD), 多酚氧化酶 (EC 1. 14. 18. 1, polyphenol oxidase, PPO)在其生长、细胞壁

收稿日期:2007-01-15.

基金项目:江苏省高技术研究计划项目(BG2006306).

作者简介:孔维宝(1981-),男,甘肃永靖人,发酵工程专业硕士研究生.

通讯作者:陆健(1968-),男,江苏太仓人,教授,工学博士,主要从事发酵工程专业领域研究. Email: jlu@jiangnan. edu. cn

物质的合成和抗病害等方面起重要作用,同时对谷物产品质量和啤酒酿造有重要影响<sup>[1]</sup>。

大麦是重要的啤酒酿造原料,因含有谷皮,所以其中酚类物质的含量较高,约占干重的0.1%~0.3%。在啤酒酿造中,酚类化合物是重要的内源性抗氧化剂,为啤酒提供还原力<sup>[2]</sup>。但是,由于酚类物质易与蛋白质结合,为成品啤酒的非生物混浊造成潜在危害<sup>[3]</sup>。啤酒中简单酚类物质的存在使其具有收敛性和醇厚感,聚合多酚则带来粗糙的苦味。而大麦中的酚类氧化酶(如POD和PPO)可酶促氧化内源性酚类底物,影响啤酒的色泽、风味和过滤特性<sup>[4]</sup>。近年来,风味稳定性一直是啤酒酿造领域内重要的研究课题。氧对啤酒风味稳定性的危害已得到业内人士的普遍接受,但在生产中即使采用严格的无氧酿造和包装技术,仍然不能很好地改善啤酒的风味。于是人们开始关注,许多风味老化前驱物质的产生可能在酿造的上游阶段(如制麦和糖化阶段)已经发生<sup>[5]</sup>。本文以3种典型的国产啤酒大麦为原料,研究了酚类物质及相关酶在麦芽制造过程(浸麦、发芽和干燥)中的变化,分析了酚类物质含量与酚类酶活性及制麦工艺之间的关系,讨论了PAL在发芽期间对合成酚类物质的作用,及POD对根芽生长和制麦损失的影响,希望能为深入认识这些物质对啤酒酿造的影响提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

实验用大麦均为2005年收获,大麦品名及常规指标见表1。Folin-Ciocalteu(FC)试剂、各种酚类标样、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)和Trolox均为Sigma公司产品,丙酮、甲醇、乙醇、L-苯丙氨酸、愈创木酚、邻苯二酚、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、香兰素、盐酸、AlCl<sub>3</sub>均为分析纯试剂由上海国药集团公司提供。

表1 大麦样品常规指标

Tab.1 Specifications of barley samples

| 指标    | 甘啤3号<br>(GAN3) | 甘啤4号<br>(GAN4) | 港啤1号<br>(KA-4B) |
|-------|----------------|----------------|-----------------|
| 水分/%  | 13.1           | 13.8           | 13.7            |
| 蛋白质/% | 12.9           | 9.4            | 13.9            |
| 淀粉/%  | 53.8           | 55.9           | 51.2            |
| 千粒重/g | 46             | 48             | 45              |
| 发芽势/% | 95             | 97             | 90              |
| 发芽力/% | 97             | 99             | 94              |
| 收获年份  | 2005           | 2005           | 2005            |

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 制麦工艺

浸麦和发芽温度均为15℃,相

对湿度均为95%;浸麦采用浸6h断9h,浸7h断9h,浸5h(共36h);发芽时间为5d,发芽期间每8~10h翻麦一次;麦芽干燥工艺为40℃8h,55℃8h,65℃3h,85℃3h(共22h)。

**1.2.2 酚类物质的提取与测定** 称取1.00g经冷冻干燥的细粉样品于15mL具盖离心管中,加10mL体积分数80%丙酮溶液(含0.1%醋酸),充N<sub>2</sub>密封后在30℃超声波水浴中提取1h,每隔10min在振荡器上振荡1min,提取液以10000×g离心10min,取上清液在40℃水浴中旋转蒸发至干,残余物用甲醇定容至10mL,所得样品充N<sub>2</sub>后在-20℃冰箱中保存待测酚类物质含量。

游离总多酚(FPC)的测定采用Folin-Ciocalteu法<sup>[6,7]</sup>。将250μL样品加到1.25mL新鲜稀释10倍的FC试剂中,摇匀反应2min后加入1mL7.5%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液,摇匀1min后加水至5mL,室温放置2h后在760nm下测定A<sub>760</sub>,以没食子酸为标样。羟基肉桂酸含量测定参考文献<sup>[7,8]</sup>;儿茶素、黄酮类物质的测定参考文献<sup>[9]</sup>。

**1.2.3 大麦酚类酶的提取** 称取5.00g经冷冻干燥的细粉样品,置于100mL预冷烧杯中,加50mL0.05mol/LpH8.8的硼酸钠-盐酸缓冲液,4℃搅拌提取1h;提取液以10000×g4℃离心20min,取上清液用提取缓冲液定容至50mL,保存于4℃冰箱中待测PAL。POD和PPO酶液的提取用0.05mol/LpH6.0的磷酸缓冲液,其中加0.5gPVPP,其它条件同上。

**1.2.4 大麦酚类酶的测定** PAL的测定以50mmol/L L-苯丙氨酸为底物(pH8.8),酶活表示为:37℃下,每小时使A<sub>290</sub>增加0.01为1U,酶活表示为U/g绝干大麦<sup>[10]</sup>;POD的测定以15mmol/L愈创木酚和4.4mmol/LH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>为底物(pH6.0),以25℃下,3.0mL反应液中每分钟使A<sub>470</sub>增加1为1U,酶活表示为U/g绝干大麦<sup>[11]</sup>;PPO的测定以50mmol/L邻苯二酚为底物(pH4.5),以25℃下,3.0mL反应液中每分钟使A<sub>410</sub>增加0.01为1U,酶活表示为U/g绝干大麦<sup>[12]</sup>。

**1.2.5 大麦常规指标及制麦损失计算** 见参考文献<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 麦芽制造过程中酚类物质的变化

制麦过程中游离多酚及不同酚类物质的变化见图1。由图(图1A)可知,在浸麦过程中,FPC含量在不同品种大麦之间的变化不同,甘啤3号和甘

啤4号大麦的含量降低,而KA-4B的略有升高。发芽过程中,FPC含量呈增长趋势,发芽结束时,甘啤3号、甘啤4号和KA-4B绿麦芽中的含量分别为2.60、2.42、2.54 mg/g,比原大麦中的含量平均提高33%左右。绿麦芽经干燥后,FPC含量均呈下降趋势,干燥后甘啤3号、甘啤4号和KA-4B麦芽中的含量分别为2.42、2.35和2.15 mg/g,比原大麦的2.24、2.00和1.84 mg/g均有所提高。浸麦过程中,3种大麦的HI含量均略有下降,发芽期间均呈现增长趋势,而且在发芽前4 d增长较快,甘啤3号的含量最高(图1B)。麦芽干燥后和绿麦芽中的HI含量相比均有下降,干燥后麦芽中的HI含量比原大麦增长2倍左右。黄酮类物质的含量在浸麦和发芽过程中的变化波动较大,增长不太明显(图

1C)。浸麦过程中甘啤3号的黄酮含量明显下降,而甘啤4号和KA-4B的变化不大;发芽结束时甘啤3号和KA-4B的黄酮含量均有升高,而甘啤4号的含量几乎无变化;在麦芽干燥后,黄酮含量显著上升,甘啤3号、甘啤4号和KA-4B麦芽中的含量比原大麦分别增长1.6、2.0和1.8倍。制麦过程中儿茶素含量的变化见图1D。浸麦结束后,甘啤4号和KA-4B的儿茶素含量略有升高,而甘啤3号的含量下降。发芽第1天3种绿麦芽中儿茶素的含量均升高,而在随后的2~4 d中,均呈下降趋势,第5天含量又呈上升趋势。发芽结束时,绿麦芽中儿茶素含量比原大麦略有增长。干燥过程中儿茶素含量呈增长趋势,干燥结束时其含量比原大麦平均增长22%左右。

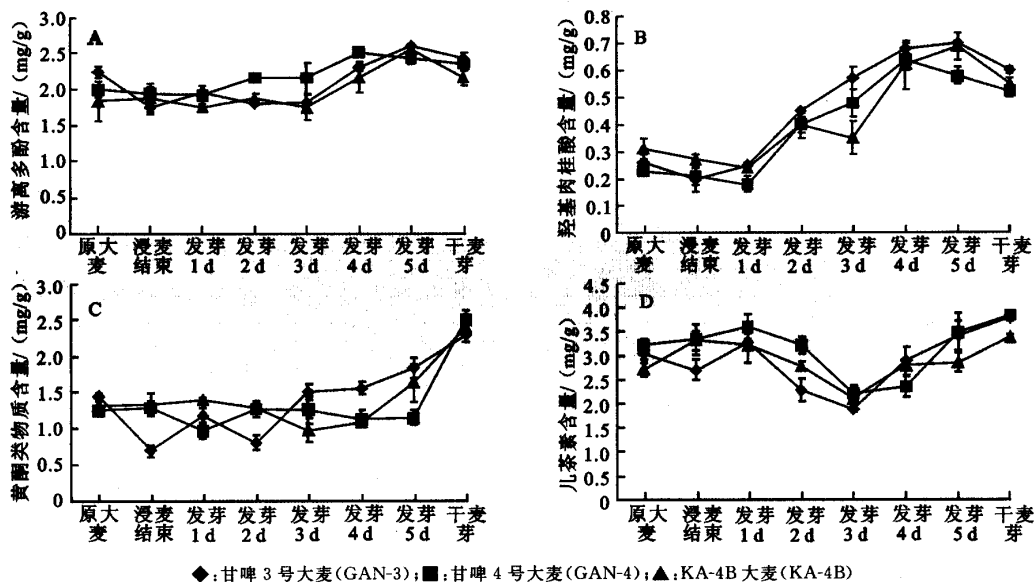


图1 制麦过程中酚类物质含量的变化

Fig. 1 Changes of phenolic compounds during malting

## 2.2 麦芽制造过程中酚类酶的变化

浸麦过程中,PAL和POD的活性略有下降,而PPO的活性呈增长趋势(见图2)。而且不同品种间PPO的增长趋势也不同,其中KA-4B大麦的PPO活性在浸麦中变化不明显,甘啤3号的增幅最大(见图1A)。发芽过程中,3种酶的活性均呈现增长趋势。发芽结束时,甘啤3号、甘啤4号和KA-4B绿麦芽中PAL的活性为原大麦的5倍左右;POD的活性分别为原大麦的35、26和43倍;PPO的活性分别为原大麦的2倍左右。发芽期间,甘啤4号的PAL活性均高于甘啤3号和KA-4B,甘啤3号的POD活性均高于甘啤4号和KA-4B,而PPO的活性在品种间波动较大,变化规律不明显。麦芽干燥过程中,3种酶的活性均呈现下降趋势。其中

PAL的活性下降较低,3个品种麦芽的PAL活性约为原大麦的4倍左右,说明大麦PAL的耐热性较高;甘啤3号、甘啤4号和KA-4B干麦芽中POD的活性为原大麦的16、11和19倍,说明麦芽POD的活性高、耐热性强;PPO的活性略高于原大麦中的活性,表明麦芽PPO的活性虽然较低,但具有较强的热稳定性。

## 2.3 大麦发芽过程中根芽的生长与制麦损失

从图3可以看出,发芽期间不同大麦的根芽生长能力不同。3种大麦品种间,甘啤3号的生根能力最强,发芽期间根的长度增幅最大,甘啤4号次之,KA-4B的生根能力最弱。从图4可知,甘啤3号大麦的风干和绝干制麦损失最大,甘啤4号次之,KA-4B的最小。不同品种大麦的制麦损失存在

显著差异( $P<0.05$ )。

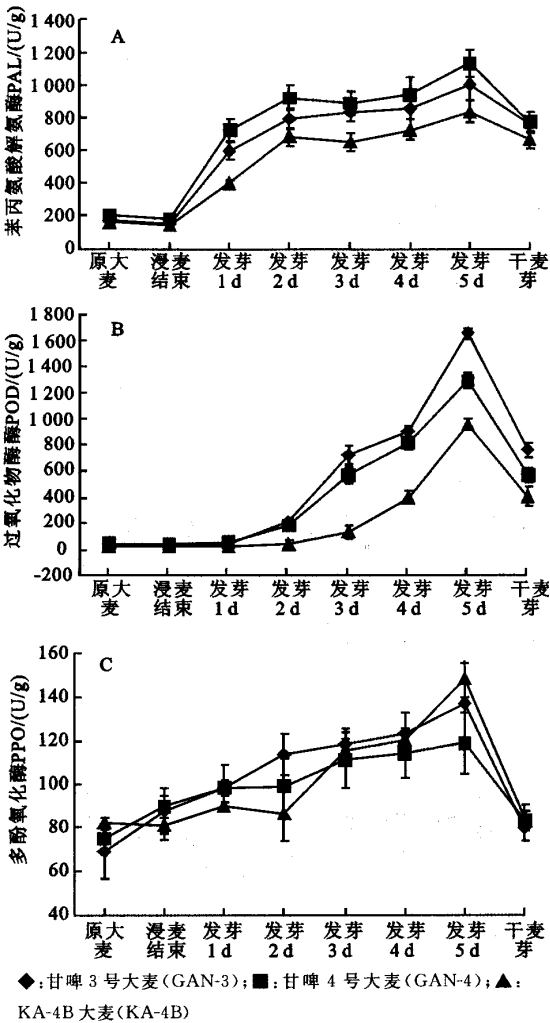


图 2 制麦过程中酚类酶的变化

Fig. 2 Changes of phenolic enzymes during malting

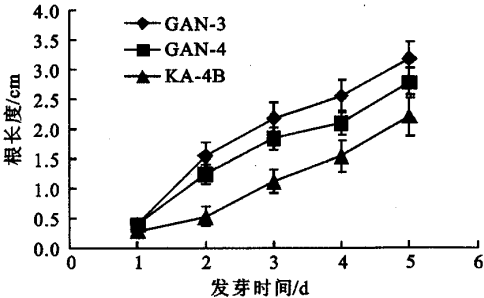
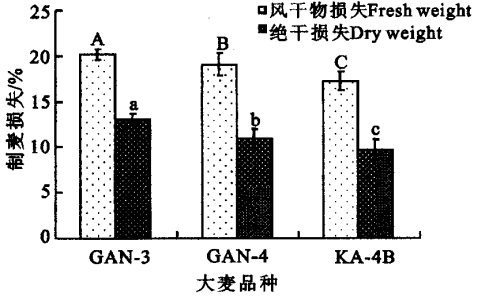


图 3 大麦发芽过程中根长的变化

Fig. 3 Changes of root length during barley germination

3 结 语

酚类物质在植物的生长中起重要作用,如参与细胞壁的合成、根的形成、抗病害、抗 UV-辐射、抗



不同大小写的字母代表在  $P<0.05$  水平上存在显著差异

图 4 不同品种大麦的制麦损失

Fig. 4 Malting loss of different barley varieties

胁迫和信号传导等<sup>[14]</sup>。在浸麦过程中,大麦谷皮中的酚类物质会溶出一部分进入浸麦水。由图 1 可以看出,FPC 含量和 HI 的含量呈下降趋势,而黄酮类物质和儿茶素含量在浸麦过程中的变化在品种间存在差异。发芽过程中,FPC 含量和 HI 的含量不断增长,黄酮类物质的含量变化不太明显,而且不呈规律,而儿茶素含量在发芽的 2~4 d 一直呈下降趋势,在第 5 天呈明显的上升趋势。这说明发芽过程中,一方面随着各种水解酶的不断合成和麦芽中淀粉、蛋白质的不断溶解,酚类物质从谷皮、糊粉和胚乳中不断溶出。另一方面结合酚类合成酶 PAL 的显著增长趋势(图 2A)分析,酚类物质含量的升高也和 PAL 的合成作用有关<sup>[1,10]</sup>,但本实验分析表明,发芽过程中大麦 PAL 活性的升高和 FPC 含量的增长间不存在显著的相关性,这可能与同时存在酚类氧化酶有关。发芽过程中儿茶素含量的降低可能与 POD 和 PPO 的氧化、参与细胞壁物质的合成和根芽的生长有关。

麦芽干燥过程中,FPC 含量和 HI 的含量总体呈下降趋势,而黄酮类物质和儿茶素含量呈增长。FPC 含量和 HI 的含量呈下降可能是由于在麦芽的凋萎阶段(40 ℃)氧化酶在氧化酚类物质方面起作用,而高温焙焦(85 ℃)对酚类物质有热降解作用,尤其是对低分子的酚酸物质有明显的影响(不同干燥温度段的数据未给出)。麦芽干燥过程中,黄酮类物质含量经历了低温凋萎阶段的上升和高温焙焦阶段的下降,而儿茶素含量则经历了凋萎阶段的下降和焙焦阶段的上升。分析认为,麦芽干燥过程中,酚类物质含量的变化可能与低温凋萎阶段麦芽的高温溶解、酚类氧化酶类的作用及焙焦阶段的热降解的综合作用有关。

麦芽制造过程中,根芽的生长是造成制麦损失的重要因素之一。由图 3 和图 4 可以看出,甘啤 3 号的生根能力最强,发芽期间根的平均长度比甘啤

4号和KA-4B的要长,由此而造成甘啤3号的制麦损失最高。POD在植物体的生长过程中起着重要的作用,如参与细胞壁物质的合成和木质化等生理活动<sup>[15, 16]</sup>。关于POD与植物生根关系的研究报道较多。Kakkar等<sup>[17]</sup>指出,在菜豆胚轴切段生根时POD的活性显著升高;黄卓烈等<sup>[18]</sup>在研究萘乙酸处理桉树插条后过氧化物酶活性及其同工酶变化与插条生根的关系时发现,在扦插生根的不同阶段,插条内的POD活性呈现规律性的变化,POD同工酶谱带也随生根的进程出现增多的现象。由此可见,植物根的形成与POD的活性有密切关系。

本实验的相关性分析表明,甘啤3号、甘啤4号、KA-4B 3种大麦发芽期间POD活性的增长和根长的变化呈显著的正相关性, $r$ 值分别为0.932( $P < 0.05$ )、0.961( $P < 0.01$ )、0.937( $P < 0.05$ ),而且3种绿麦芽和干麦芽中POD的活性与绝干制麦损失呈显著的正相关性,相关系数 $r$ 分别为0.988和0.993( $P < 0.05$ )。分析认为:大麦POD活性与制麦过程中麦芽根的生长和制麦损失有密切关系。大麦中的酚类物质及相关酶类对麦芽和麦汁质量的影响,以及POD活性对绿麦芽生根能力的影响机理正在进一步研究当中。

## 参考文献(References):

- [1] Dicko M H, Gruppen H, Traor A S, et al. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use [J]. *Biotechnology Molecular Review*, 2006, 1(1): 21—38.
- [2] Whittle N, Eldridge H, Bartley J. Identification of the polyphenols in barley and beer by HPLC/MS and HPLC/Electrochemical detection [J]. *Journal of Institute of Brewing*, 1999, 105(2): 89—98.
- [3] Mikyska A, Hrabak M, Haskova D, et al. The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavor and haze stability [J]. *Journal of Institute of Brewing*, 2002, 108(1): 78—85.
- [4] Billaud C, and Nicolas J. Main oxidoreductases involved in the malting and brewing technological processes [J]. *Sci des Aliment*, 2001, 21: 83—131.
- [5] Stephenson W H, Biama J P, Miracle R E, et al. Laboratory-scale studies of the impact of oxygen on mashing [J]. *Journal of Institute of Brewing*, 2003, 109 (3): 273—283.
- [6] Singleton V L, and Rossi J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent [J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, 16, 144—158.
- [7] Maillard M N, Soum M H, Boivin P, et al. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content [J]. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 1996, 29: 238—244.
- [8] Bonoli M, Verardo V, Marconi E, et al. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 5195—5200.
- [9] 王福荣. 生物工程分析与检验 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- [10] Koukol J, and Conn E E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare* [J]. *Journal of Biology Chemistry*, 1961, 236: 2692—2698.
- [11] Chance B, Maehly M. in: S P Colowick, N O Kaplan (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 2 [M]. New York: Academic Press, 1955, 764.
- [12] Waite J H. Calculating extinction coefficients for enzymatically produced o-quinones [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 75: 211—218.
- [13] 管敦仪. 啤酒工业手册 [M] (修订版). 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [14] 陈伟, 叶明志, 周洁. 植物酚类物质研究进展 [J]. 福建农业大学学报, 1997, 26(4): 502—508.  
CHEN Wei, YE Min-zhi, ZHOU Jie. Advances on plant phenolics [J]. *Journal of Fujian Agricultural University*, 1997, 26 (4): 502—508 (in Chinese).
- [15] Duroux L, and Welinder K G. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2003, 57: 397—407.
- [16] Ingham L M, Parker M L, and Waldrom K W. Peroxidases: Changes in soluble and bound forms during maturation and ripening of apples [J]. *Physiol Plant*, 1998, 102: 93—100.
- [17] Kakkar R K, Rai V K. Changes in peroxidase and IAA oxidase activity of *Phaseolus vulgaris* hypocotyl cuttings during root initiation and emergence [J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1986, 24(6): 381—383.
- [18] 黄卓烈, 李明, 谭绍满, 等. 萘乙酸处理桉树插条后过氧化物酶活性及其同工酶变化与插条生根的关系研究 [J]. 植物研究, 2002, 22(3): 296—300.  
HUANG Zhuo-lie, LI Ming, TAN Sao-man. Study on the relationship between the changes of activities and isoenzymes of peroxidase and the rooting of eucalyptus cuttings after treatment with naphthylacetic acid [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2002, 22(3): 296—300 (in Chinese).

(责任编辑:杨萌)