

啤酒蛋白及其理化特性研究进展

韩宇鹏^{1,2},王金晶^{1,2},田金凤^{1,2},李崎^{1,2*}

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,酿酒科学与工程研究室,江苏 无锡,214122)

摘 要 啤酒蛋白是啤酒中的一类重要组成物质,能够对啤酒生产和品质以及消费者健康产生一定的影响。目前,对于国内外啤酒蛋白的研究主要集中于蛋白种类的鉴定以及蛋白含量的测定,但是关于它对啤酒质量以及啤酒特性的影响,并没有较为系统的研究。文中阐述了对于啤酒蛋白的部分研究方法和思路,同时对啤酒蛋白的未来研究方向做出了描述。

关键词 啤酒;啤酒蛋白;结构;理化特性

啤酒是世界销量最大的酒精类饮品,啤酒的色泽,泡沫,口感等是直接体现啤酒品质的重要特性,其中啤酒的泡沫质量是较为直观的体现啤酒品质的重要指标之一。洁白、细腻、优质的泡沫能够给人以优质的口感和愉悦的心情,同时可以防止空气中的氧气所带来的直接氧化和啤酒风味的损失。啤酒泡沫的性质主要包括细腻度,洁白程度,挂杯性,泡持性等^[1],同时啤酒中的 CO₂,金属离子,蛋白质以及其他风味物质等都能够对啤酒泡沫的质量产生影响,其中蛋白质作为啤酒中含量较大的一类风味物质对啤酒泡沫的质量具有较大的影响^[2]。啤酒中蛋白质的含量大约为 2~6 g/L,分子质量主要分布于 5 k~100 kDa。这些蛋白主要来源于原料中的水溶性蛋白及发酵过程中酵母代谢产生的蛋白,其中 50% 左右为大麦乳清蛋白,这些蛋白中的 10% 成为啤酒中的常见蛋白,如脂转移蛋白 LTP,蛋白质 Z 等,它们也是啤酒中最早被确定直接影响泡沫品质的重要蛋白^[3-4]。在啤酒酿造过程中,部分蛋白因环境因素的影响会发生构象的改变,多数蛋白被降解为多肽并最终沉淀或者被酵母利用^[5]。而其中又有部分的蛋白能够在制

麦,糖化和煮沸过程中,与糖类发生糖化反应,如美拉德反应,其产物能够耐受高温^[6]和抗酶解^[7-8],最终对啤酒的色泽、口感及泡沫性能都产生较大的影响^[1,9]。目前,国内外对于啤酒中蛋白的研究仍旧集中于蛋白种类的鉴定和检测,但关于蛋白质的结构和理化特性以及其对于啤酒质量的影响,并没有较为系统的研究。因此文中阐述了对于啤酒蛋白研究的部分思路和方法,同时对于啤酒蛋白未来的研究方向做出了描述。

1 啤酒中的主要蛋白

啤酒中的蛋白主要来源于其谷物原料以及酵母代谢产生的蛋白,同时部分蛋白经过酿造过程中的酶解,修饰等作用,使得啤酒中蛋白类的种类增多,绝大多数蛋白对于啤酒泡沫的稳定性以及啤酒品质都具有较大影响。目前啤酒中的蛋白质根据其特性和对于啤酒的影响主要可以分为以下 6 大类^[10]。

1.1 蛋白质 Z

蛋白质 Z 是啤酒中最主要的蛋白,其来源于大麦中的胚乳,是大麦中主要的乳清蛋白之一。在已知的啤酒蛋白中,它是最早被发现拥有最高表面粘度和弹性的蛋白,同时它又能够抵抗糖化过程中的酶解以及高温的影响,最终对啤酒泡沫的稳定性产生作用^[11]。之前的研究中双向电泳技术被运用到对糖化液和麦汁中的蛋白以及沉淀进行分析,也发现虽然蛋白质 Z 具有较高的热稳定性,但是少量的蛋白质 Z 也会在煮沸过程中通过结合小分子的多肽而沉淀^[12]。HEJGARRD 等^[13]发现蛋白质 Z 由 Z4, Z7 和 Zx 等不同亚型构成,且不同的亚型由大麦中不同的

第一作者:硕士研究生(李崎教授为通讯作者, E-mail: liqi@jiangnan.edu.cn)。

基金项目:江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD);国家创新基金(09C26213203751);江苏省第四期“333 高层次人才培养工程”(BRA2012048);教育部新世纪人才支持计划项目资助(No. NCET-10-0453);国家高技术研究发展计划(863 计划, No. 2012AA021303 和 No. 2013AA102106-03);国家自然科学基金(No. 31271919, No. 31571942 和 No. 31301539);国家重点基础研究发展计划(973 计划, No. 2010CB735706);江苏省自然科学基金(BK20150159)

收稿日期:2015-03-19,改回日期:2016-04-22

染色体编码,而这其中蛋白质 Z4 的含量约为蛋白质 Z 总量的 80%。经研究发现,蛋白质 Z4 和 Z7 分别对于啤酒泡沫的稳定性起着正面和负面的影响^[14]。同时经过研究发现,蛋白质 Z 在制麦过程的第 2 天即被监测到与糖类发生糖化反应,其中 16% 的赖氨酸残基能够发生美拉德反应,且经过修饰的蛋白质 Z 能够对啤酒泡沫的稳定性产生积极的影响。

1.2 脂转移蛋白 LTP

脂转移蛋白 LTP 来源于大麦中的糊粉层,其含量约占啤酒蛋白总量的 1%。虽然其相对含量较低,但对于啤酒影响较大,能够直接影响啤酒的起泡性。研究发现 LTP 由 LTP1, LTP2 两个亚型构成,其分子质量分别为 9 kDa 和 7 kDa,同时其对于啤酒泡沫的起泡能力分别具有正面以及负面的影响。脂转移蛋白的二级结构含有 4 个螺旋线结构,由 4 个二硫键稳定,同时有一个典型的碳端结构,此碳端结构在 LTP 内部形成一个疏水空腔,不同脂类物质如脂肪酸,酰基辅酶 A 等可以与 LTP 在此空腔内进行结合^[15]。LTP 在制麦的第 3 天也被发现发生糖化作用,经过研究发现只有被糖类修饰过的 LTP 才具有起泡能力^[16-17]。部分研究通过运用分子模拟的方法发现酒花中异 α -酸可以吸附于游离的脂转移蛋白 LTP 分子上,加强被吸附 LTP 的泡沫吸附能力而增强啤酒泡沫的稳定性^[18]。

1.3 氯仿/甲醇可溶蛋白

氯仿/甲醇可溶性蛋白主要为 α -淀粉酶/胰蛋白酶抑制剂中的部分蛋白,其中含量最多的为 CM 蛋白。这类蛋白大多能够引起啤酒的浑浊,最终降低啤酒的非生物稳定性。之前的研究中通过采用飞行时间质谱以及双向电泳相结合的方式检测和鉴定啤酒中部分浑浊蛋白,同时啤酒生产过程中硅藻土等过滤助剂的添加能够吸附以及沉淀氯仿/甲醇可溶蛋白^[19-20]。研究过程中还发现这类蛋白主要由中低分子量的蛋白构成,且由于总含量较少,种类又较多,单一蛋白的含量难以满足部分相应的研究,限制了对其认知的发展,因此目前对于氯仿/甲醇可溶蛋白的研究仍处于鉴定识别阶段。

1.4 大麦二聚体 α -淀粉酶抑制剂-1

大麦二聚体 α -淀粉酶抑制剂-1 (BDAI-1) 被认为是既对泡沫有好处同时又能够引起啤酒浑浊的蛋白,其在啤酒生产中还可以阻碍淀粉酶的作用,影响原料的利用率。SALT 等^[21]运用二级质谱分析证明了 BDAI-1 是一种泡沫相关蛋白,同时 IIMURE 等^[22]

又确定 BDAI-1 以及 CMb, BTI-CMb 是引起啤酒浑浊的可能因素。

1.5 醇溶蛋白

醇溶蛋白是大麦中一类重要的贮藏蛋白,其分子质量主要分布于 10 ~ 35 kDa。根据电泳迁移率的不同可将醇溶蛋白分为 B-, C-, D- 和 γ -醇溶蛋白。其中 B-, C- 醇溶蛋白分别占醇溶蛋白总含量的 70% ~ 80% 以及 10% ~ 12%。在制麦过程中,醇溶蛋白已经被酶解为低分子量的多肽,其中分子质量在 23 kDa 和 17 kDa 附近的醇溶蛋白对于泡沫活性有益^[23]。啤酒中的部分醇溶蛋白作为过敏原也可能引起消费者的腹泻^[24]。目前对于醇溶蛋白的研究受限于其经过啤酒酿造后能够完整保留的蛋白较少,同时降解后的多肽又与其他小分子多肽重叠,增加了分离的难度。因此对醇溶蛋白的纯化以及结构特性等的研究都较难进行,关于其对于啤酒以及泡沫的具体影响仍需进一步的研究。

1.6 酵母代谢蛋白

麦汁发酵过程中,由于酵母代谢产生的蛋白也能在啤酒中被检测到。大多数的酵母代谢蛋白对于泡沫以及啤酒具有负面影响,如蛋白酶 A。这类蛋白能够降解啤酒中的泡沫活性蛋白,降低啤酒的非生物稳定性,最终影响啤酒品质。IIMURE 等^[25]通过使用二维电泳技术检测了 11 种啤酒样品,证明了蛋白酶 A 能够分解啤酒中的 LTP1,从而降低啤酒的起泡性。FASOLI 等^[26]确定了啤酒中的 40 种酵母蛋白,其中细胞质中的硫氧还蛋白,烯醇酶和磷酸丙酮异构酶被检测到,这几种蛋白的测定说明随着酵母细胞的损伤,酵母内部影响啤酒稳定性的物质也因此释放,最终影响到啤酒品质。虽然随着技术的发展,通过改善工艺稳定啤酒酵母酿造过程中的生化条件及啤酒风味物质具有一定的可行性,但是对于如何通过工艺的改善控制啤酒酵母老化而引起的啤酒品质的下降仍旧需要进一步的研究。

2 啤酒蛋白的分离与制备方法

蛋白的分离和制备是研究其结构以及性质的前提和关键。常见的啤酒蛋白制备方法主要包括:盐析法,有机溶剂沉淀法,非变性凝胶电泳法等。随着蛋白组学以及基因组学技术的发展,啤酒蛋白的纯化和制备随之得到进一步的发展。

2.1 双向电泳法

双向电泳 (two-dimensional gel electrophoresis,

2DE)是由横向的等电聚焦电泳和纵向的聚丙烯酰胺凝胶电泳构成。双向电泳法目前在啤酒蛋白分析和鉴定中得到很好的发展,其对于啤酒蛋白这种组分为复杂的体系具有较好的分离度,适用于比较分析啤酒酿造过程中蛋白质组成的变化。现阶段随着质谱技术的发展,双向电泳技术与质谱技术结合使用,使得啤酒蛋白的分离和鉴定效率大大提高。TAKASHI等^[25]人利用双向电泳与质谱结合的方式鉴定出了啤酒中的BDAI-1,蛋白质Z,LTP等啤酒蛋白,同时也研究麦汁煮沸过程中蛋白质含量以及组分的变化情况^[27]。XU等^[28]利用双向电泳法研究了啤酒酵母老化过程中酵母细胞内部蛋白质组分的变化情况,分析了部分酵母蛋白与啤酒非生物稳定性的关系。虽然双向电泳技术具有较好的分离度和可视性,但仍存在操作复杂,可重复性较差等缺点,且经过双向电泳技术分离的蛋白因蛋白存在变性和结构的破裂并不能够用于蛋白结构和理化特性的研究。

2.2 高效液相色谱

高效液相色谱技术(high performance liquid chromatography, HPLC)是兼备检测和分离的一种高灵敏技术,具有检测效率高,分离度较好,应用广泛的特点。现阶段制备以及半制备型高效液相色谱的使用,使得检测物质的分离提纯更加的高效。同时高效液相色谱可以与质谱结合使用,使得待检测物质如蛋白的测定更为便捷,同时标准品的标定,可以定量研究待测样品具体的含量。SILVA等^[5]采用RP-HPLC和SDS-PAGE对两种麦芽及其制备的麦汁和啤酒进行了研究,同时跟踪分析了发芽期间以及麦汁和成品啤酒中蛋白质组分的变化情况。PETRY-PODGÓRSKA等^[29]采用MALDI-TOF MS/MS和二维高效液相(2D-HPLC)相结合的方式,通过“鸟枪法”研究监测到制麦过程中部分大麦蛋白的糖化现象,其中检测到约有1/3的大麦蛋白氨基酸残基存在潜在糖化位点。

2.3 基因工程技术

近年来基因工程技术逐渐被用于分子改造和蛋白的制备,随着基因工程技术的发展,逐渐形成了操作简便,应用范围广的特点。通过提取目的蛋白基因,进行同源或异源表达,从而获得大量的重组目的蛋白,尤其适用于啤酒中部分含量较少,提取较为复杂的蛋白。啤酒中蛋白种类繁多,大部分的单一蛋白相对含量较少,部分关键蛋白分离提纯较为困难,通过采用基因工程技术进行体外大量表达,有助于研究

蛋白的结构与功能的关系,方便研究其对于啤酒品质的影响。HAN^[30]等利用基因工程技术,在毕赤酵母表达系统内表达蛋白质Z,发现经过糖基化后的蛋白质Z具有更高的结构稳定性。同时利用筛选基因缺陷型的原料,可用于研究关键物质对于啤酒品质的影响。TAKASHI等^[31]通过筛选1564种大麦样品,得到蛋白质Z4以及Z7单缺以及双缺陷型的大麦品种,用以研究了蛋白质Z4以及Z7对于啤酒泡沫的相互关系。虽然基因技术近年来发展迅速,受限于部分蛋白的种类以及基因序列的认识缺失,利用基因扩增技术获得啤酒中的蛋白仍处于初级阶段。

2.4 蛋白质的化学合成

化学合成是一条快速高效的蛋白质合成方式,同时可以方便引入非天然氨基酸,改变氨基酸侧链的修饰方式,从而对蛋白引入新的活性基团以及改变其结构特性。但是化学合成只适用于氨基酸序列较短的蛋白,同时合成过程中易形成蛋白质聚集体,造成合成的蛋白质复杂化,增加后期纯化和研究的难度。

3 啤酒蛋白结构研究

蛋白质的一级结构为蛋白质的组成基础。蛋白质的二级结构体现了蛋白质肽链局部的稳定构象,同时也体现了氨基酸残基间的氢键构成,是蛋白质高级构象的基础。而蛋白质三级和四级结构则直接决定着蛋白质的功能。

3.1 圆二色谱法

蛋白质的氨基酸残基在远紫外区(190~250 nm)具有光学吸收性,同时具有旋光色散性(ORD)。圆二色谱(circular dichroism, CD)方法利用蛋白质的旋光性通过测量其在紫外吸收区的旋光性,拟合标准蛋白的椭圆率计算出蛋白的二级结构。圆二色谱法具有样品用量少,可回收,时间短的优点。在啤酒酿造过程中,酶的参与以及酿造环境的复杂化,使得蛋白会发生相应的改变,通过使用圆二色谱法可以研究啤酒酿造过程中蛋白结构的变化,推测其结构的特性与最终产品品质之间的相关性。SANDRINE^[32]等通过高效液相分离了啤酒泡沫蛋白LTP1,运用圆二色谱的方法研究了大麦以及麦芽中脂转移蛋白LTP1的二级结构的区别,并发现经过啤酒酿造过程后,部分修饰的发生使得LTP1发生构象的变化,经过修饰后的LTP1才具有了较强的起泡能力^[32]。

3.2 傅立叶变换红外光谱法

蛋白质中不同原子以及官能团具有不同的红

外特性。红外光谱方法研究蛋白质的结构具有用量少,时间短的优点,还可以对固体以及粘度较高的蛋白质进行研究。蛋白质的傅立叶变换红外光谱 (fourier transform infrared spectrometry, FTIR) 中,由于构成蛋白二级结构的氢键在光谱中的酰胺区具有特征峰,其可用于分析蛋白质的结构构成。其中波数在 $1\ 700 \sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 的与蛋白质氨基酸中的羰基键有关的酰胺 I 区以及在 $1\ 570\ \text{cm}^{-1}$ 的与蛋白质 N-H 键在肽面上的弯曲振动相关的酰胺 IV 区对于蛋白质二级结构的分析具有重要意义^[33]。通过分析蛋白的红外光谱,不仅可以结合相关软件拟合蛋白二级结构的相对含量,同时可以预测蛋白中官能团的变化。YUPENG HAN 等^[34]通过采用圆二色谱以及傅立叶变换红外光谱结合的方法,研究麦汁糖化和煮沸过程中蛋白质 Z 的二级结构变化,发现其在啤酒酿造过程中蛋白质 Z 的二级结构主要从 α -螺旋和 β -折叠逐渐转变为 β -转角和无规卷曲结构,且糖类的修饰可能为引起蛋白质 Z 结构变化的主要原因。

3.3 核磁共振法

核磁共振法 (nuclear magnetic resonance method, NMR) 是通过测量缩合反应后氨基酸残基上化学位移的方向预测蛋白质的二级以及三级结构。相比傅立叶变换红外光谱法以及圆二色谱法,核磁共振法对蛋白样品的纯度要求高,用量大,测量周期长,这些因素限制了其在蛋白研究过程中的应用。目前在啤酒蛋白的研究中,使用核磁共振法测定啤酒蛋白结构的研究仍旧较为空白。VADIM 等^[35]通过研究试管中标记蛋白的三级结构,确定了一种蛋白 N 端糖基化的形式。

3.4 X 射线晶体衍射

X 射线晶体衍射 (X-ray crystalline diffraction) 法是研究蛋白质三级以及四级结构的有效方法,它可以测定蛋白质各层次间的结构特性以及其与其他分子间相互作用的情况,如糖类,脂类等。利用晶体衍射的方法也可以测定蛋白的二级结构,但受限于昂贵的实验仪器,蛋白纯品也较难获得,同时当测定分辨率较低时,会影响分子内细节的分析,模糊度也会相应的提高,这些特点都使得此方法并不适合单独测定蛋白质的二级结构。目前,在啤酒蛋白研究中,脂转移蛋白 LTP 的晶体结构已经得到解析,其对于啤酒起泡性的影响通过结构的解析也被进一步确定。

3.5 蛋白质结构模拟预测

由于氨基酸序列测定技术以及计算机技术的迅猛发展,根据氨基酸序列依托已知结构的蛋白质数据库利用计算机软件模拟可以快速有效的推测蛋白质结构,此方法已经成为一种比较有效的蛋白质结构分析手段。通过计算机模拟的方法可以进一步预测蛋白质的功能区间。目前蛋白质结构预测方式主要通过 3 种原理进行,第一类以数据统计为基础,通过已知蛋白质结构与氨基酸残基数的关系,预测蛋白质结构;第二类是以能量最小化的方式进行预测;第三类依托立体化学进行预测。在啤酒蛋白研究中,使用蛋白模拟预测的方式,可以避免晶体衍射法的高额费用和繁琐的步骤,快速有效的研究啤酒中关键蛋白的结构。但是其研究必须依托于具有较高同源性的已知结构蛋白,因此其在啤酒蛋白研究中受到一定程度限制。

4 啤酒蛋白性质研究

4.1 免疫特性研究

有研究表明蛋白质 Z4、脂转移蛋白 LTP1 以及部分浑浊蛋白都是主要的啤酒过敏抗原,能够引起部分消费者的荨麻疹以及 IgE 速发型过敏反应^[2]。因此酶联免疫法能够快速定位和识别啤酒中含量较为微少的抗原或抗体,且具有识别率较高的优点。ISHI-BASHI 等人^[36]采用酶联免疫吸附法测定引起啤酒浑浊的蛋白质。贾娟^[37]应用单克隆抗体 ELISA 法检测啤酒中的蛋白质 Z4 并且成功获得蛋白质 Z4 的单克隆抗体,在检测啤酒泡沫中的蛋白方面的研究得到初步的发展。

4.2 热稳定性研究

啤酒糖化和煮沸过程中温度变化巨大,且原料中的蛋白经过了酿造过程中高温、酶解等,最终形成影响啤酒品质的物质。所以测定啤酒中蛋白质的热稳定性对于提高啤酒品质具有重要意义。示差扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 是最常用的测定蛋白质热稳定性的方法,可以检测蛋白质的燃烧焓以及变性能量和温度, DSC 还有助于研究啤酒中的酶学反应动力学。

4.3 蛋白质二硫键研究

蛋白质中二硫键的存在影响着蛋白质的变性,复性以及功能区间。蛋白质中二硫键的破坏会导致蛋白质功能的丧失以及稳定性的下降。蛋白质的二硫键主要采用 Ellman 分光光度法测定,此方法测定比较简单,成本较低,适合啤酒行业的大规模使用。目

前,啤酒蛋白研究中,对于其二硫键知识较为缺少,因此测定啤酒中蛋白质的二硫键含量对于了解啤酒的浑浊形成以及非生物稳定性都具有很重要的意义。

4.4 蛋白疏水性测定

蛋白质的疏水区域对于维持泡沫的稳定性具有重要作用。经过研究发现,对于啤酒泡沫影响较大的蛋白质 Z 以及脂转移蛋白 LTP 都具有较高的疏水性,且蛋白疏水性对于啤酒泡沫的稳定性和起泡性具有正面影响。DOUMA^[11]测定了与啤酒泡沫稳定性有关的蛋白质的疏水性,同时确定对啤酒泡沫稳定性有关的蛋白质 Z 具有较高的疏水性和黏度。

4.5 蛋白质氨基酸残基的测定

啤酒酿造过程中部分蛋白会被酶降解,部分蛋白质会发生絮凝沉淀,而热稳定性较高的蛋白的氨基酸侧链会发生糖化等修饰,上述反应都与蛋白质氨基酸侧链组成有关。质谱技术作为一种谱学技术在啤酒研究中广泛应用于蛋白种类的鉴定以及氨基酸侧链修饰的研究^[38]。质谱分析具有样品用量少,分析准确,操作方便等特点。现代质谱技术通过与液相,气相等联用,增加了应用范围和准确性。大规模分析软件的应用以及数据库的建立,使得质谱分析敏感程度大大提高。串联质谱的使用使得蛋白质氨基酸残基上的修饰也能够得到检测,质谱技术还可以用于研究蛋白质的磷酸化,二硫键位点等。在啤酒酿造中,部分的蛋白会发生糖化修饰作用,其对最终的产品品质都有重要影响,但是目前对于蛋白糖化位点的检测仍处于起步阶段。ONDREJ 等^[39]运用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS/MS)建立了啤酒中的蛋白以及麦芽低聚糖的指纹图谱。测定蛋白质氨基酸的侧链,可以有助于了解和推测其修饰以及酶的作用位点,有助于建立啤酒蛋白质数据信息库,从而对啤酒成品的稳定性进行预判,最终从实际生产的工艺改善中控制啤酒的品质。

5 啤酒蛋白的未来研究方向

啤酒蛋白组分复杂,其对于啤酒的影响和原理目前还不能明确得知。啤酒泡沫作为一个重要指标,其形成和稳定与啤酒中的蛋白密不可分^[40-41]。因此对于啤酒原料中蛋白的研究,对于改善啤酒质量以及其啤酒泡沫性能都较为重要。过去几年,蛋白组学技术快速发展,啤酒的蛋白和多肽被逐渐鉴定。其中的 LTP1,蛋白质 Z, BTI-CMe, CMb, BDAI-1, 醇溶蛋白等已经成为啤酒和泡沫品质,啤酒浑浊和泡沫喷涌起因

的研究点。但是之前的研究对于各种蛋白在其酿造过程中结构和理化特性的变化涉及较少,尤其是关键蛋白如蛋白质 Z, 蛋白酶 A, 脂转移蛋白 LTP 等。因此使用简单可行的蛋白纯化方式,采用新技术建立可靠的物化特性研究手段,以及研究蛋白的修饰作用,如糖化和糖基化等,对于最终产品质量的控制都具有重要意义。同时收集蛋白在制麦,糖化,煮沸和发酵过程中的数据信息。利用蛋白数据信息库建立其与啤酒质量关系模型。在啤酒生产过程中,通过快速有效的检测啤酒中的蛋白水平,判断啤酒及泡沫的品质,为稳定和提高产品的品质提供依据。

参 考 文 献

- [1] BAMFORTH C. The foaming properties of beer [J]. Journal of the Institute of Brewing, 1985, 91(6): 370-383.
- [2] GARC A-CASADO G, CRESPO J F, RODR GUEZ J, et al. Isolation and characterization of barley lipid transfer protein and protein Z as beer allergens [J]. Journal of allergy and clinical immunology, 2001, 108(4): 647-649.
- [3] ASANO K, SHINAGAWA K, HASHIMOTO N. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation [J]. J Am Soc Brew Chem, 1982, 40(4): 147-154.
- [4] OSMAN A, COVERDALE S, COLE N, et al. Characterisation and assessment of the role of barley malt endoproteases during malting and mashing [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2002, 108(1): 62-67.
- [5] SILVA F, NOGUEIRA L C, GON ALVES C, et al. Electrophoretic and HPLC methods for comparative study of the protein fractions of malts, worts and beers produced from Scarlett and Prestige barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 820-829.
- [6] 庄海宁, 冯涛. 美拉德反应合成蛋白质-多糖复合物及其应用 [J]. 粮食与油脂, 2008(12): 4-7.
- [7] BOB LOV J, PETRY-PODG RSKA I, LAŠTOVIČKOV M, et al. Monitoring of malting process by characterization of glycation of barley protein Z [J]. European Food Research and Technology, 2010, 230(4): 665-673.
- [8] CORTACERO-RAMÍREZ S, HERN INZ-BERM DEZ DE CASTRO M, SEGURA-CARRETERO A, et al. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22(7): 440-455.
- [9] DIDIER M, B N DICTE B. Soluble proteins of beer [J]. Beer in Health and Disease Prevention, 2009: 265-271.
- [10] HIMURE T, SATO K. Beer proteomics analysis for beer

- quality control and malting barley breeding [J]. Food Research International, 2013, 54(1): 1 013 - 1 020.
- [11] DOUMA A, MOCKING-BODE H, KOOIJMAN M, et al. Identification of foam-stabilizing proteins under conditions of normal beer dispense and their biochemical and physico-chemical properties; proceedings of the Proceedings of congress-european brewery convention, F, 1997 [C]. OXFORD UNIVERSITY PRESS.
- [12] IIMURE T, NANKAKU N, KIHARA M, et al. Proteome analysis of the wort boiling process [J]. Food Research International, 2012, 45(1): 262 - 271.
- [13] EVANS D E, HEJGAARD J. The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part I. The effect of germination and kilning on the level of protein Z4, protein Z7 and LTP1 [J]. Journal of the Institute of Brewing, 1999, 105(3): 159 - 170.
- [14] IIMURE T, KIHARA M, ICHIKAWA S, et al. Development of DNA markers associated with beer foam stability for barley breeding [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 122(1): 199 - 210.
- [15] LERCHE M H, KRAGELUND B B, BECH L M, et al. Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: the structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands [J]. Structure, 1997, 5(2): 291 - 306.
- [16] LAŠTOVIČKOV M, MAZANEC K, BENKOVSK D, et al. Utilization of the Linear Mode of MALDI - TOF Mass Spectrometry in the Study of Glycation During the Malting Process [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2010, 116(3): 245 - 250.
- [17] STANISLAVA G. Barley Grain Non-specific Lipid-Transfer Proteins (ns-LTPs) in Beer Production and Quality [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2007, 113(3): 310 - 324.
- [18] EUSTON S, HUGHES P, NASER M A, et al. Molecular Dynamics Simulation of the Cooperative Adsorption of Barley Lipid Transfer Protein and cis-Isocohumulone at the Vacuum-Water Interface [J]. Biomacromolecules, 2008, 9(11): 3 024 - 3 032.
- [19] ROBINSON L H, HEALY P, STEWART D C, et al. The identification of a barley haze active protein that influences beer haze stability: the genetic basis of a barley malt haze active protein [J]. Journal of Cereal Science, 2007, 45(3): 335 - 342.
- [20] FRANCO O L, RIGDEN D J, MELO F R, et al. plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases [J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(2): 397 - 412.
- [21] SALT L J, ROBERTSON J A, JENKINS J A, et al. The identification of foam - forming soluble proteins from wheat (*Triticum aestivum*) dough [J]. Proteomics, 2005, 5(6): 1 612 - 1 623.
- [22] IIMURE T, NANKAKU N, WATANABE-SUGIMOTO M, et al. Identification of novel haze-active beer proteins by proteome analysis [J]. Journal of Cereal Science, 2009, 49(1): 141 - 147.
- [23] SHEEHAN M, SKERRITT J. Identification and characterisation of beer polypeptides derived from barley hordeins [J]. Journal of the Institute of Brewing, 1997, 103(5): 297 - 306.
- [24] GREEN P H, JABRI B. Coeliac disease [J]. The Lancet, 2003, 362(9381): 383 - 391.
- [25] IIMURE T, TAKOI K, KANEKO T, et al. Novel prediction method of beer foam stability using protein Z, barley dimeric α -amylase inhibitor-1 (BDAI-1) and yeast thioredoxin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(18): 8 664 - 8 671.
- [26] FASOLI E, ALDINI G, REGAZZONI L, et al. Les Maitres de l'Orge: the proteome content of your beer mug [J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(10): 5 262 - 5 269.
- [27] PICARIELLO G, MAMONE G, ADDEO F, et al. Novel Mass Spectrometry-Based Applications of the 'Omic' Sciences in Food Technology and Biotechnology [J]. Food Technology and Biotechnology, 2012, 50(3): 286 - 305.
- [28] XU W, WANG J, LI Q. Comparative proteome and transcriptome analysis of lager brewer's yeast in the autolysis process [J]. FEMS Yeast Research, 2014, 14(8): 1 273 - 1 285.
- [29] PETRY-PODG RSKA I, Ž DKO V J, FLODROV D, et al. 2D-HPLC and MALDI-TOF/TOF analysis of barley proteins glycosylated during brewing [J]. Journal of Chromatography B, 2010, 878(30): 3 143 - 3 148.
- [30] HAN Y, WANG J, LI Y, et al. Heterologous expression of *Hordeum vulgare* protein Z4 in *Pichia pastoris* shows increased structural stability [J]. Process Biochemistry, 2016, 51(7): 828 - 837.
- [31] IIMURE T, KIMURA T, ARAKI S, et al. Mutation analysis of barley malt protein Z4 and protein Z7 on beer foam stability [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(6): 1 548 - 1 554.
- [32] J GOU S, DOULIEZ J-P, MOLL D, et al. Evidence of the glycation and denaturation of LTP1 during the malting

- and brewing process [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(10): 4 942 - 4 949.
- [33] 王克夷. 蛋白质导论 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [34] HAN Y, WANG J, LI Y, et al. Circular dichroism and infrared spectroscopic characterization of secondary structure components of protein Z during mashing and boiling processes [J]. Food Chemistry, 2015, 188: 201 - 209.
- [35] SLYNKO V, SCHUBERT M, NUMAO S, et al. NMR structure determination of a segmentally labeled glycoprotein using *in vitro* glycosylation [J]. J Am Chem Soc, 2009, 131(3): 1 274 - 1 281.
- [36] KAKUI T, ISHIBASHI Y, MIYAKE A, et al. Development of monoclonal antibody sandwich-ELISA for determination of beer foam-active proteins [J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 1998, 56(2): 43 - 46.
- [37] 贾娟. 应用单克隆抗体-ELISA 法检测啤酒中泡沫活性 Z4 蛋白质的研究 [D]. 石河子: 新疆农业大学, 2007.
- [38] AIELLO D, DE LUCA D, GIONFRIDDO E, et al. Multistage mass spectrometry in quality, safety and origin of foods [J]. Eur J Mass Spectrom, 2011, 17(1): 1 - 31.
- [39] ŠEDO O, MROV I, ZDRHAL Z. Beer fingerprinting by matrix-assisted laser desorption-ionisation-time of flight mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2012, 135(2): 473 - 478.
- [40] SHOKRIBOUSJEIN Z, DECKERS S M, GEBRUERS K, et al. Hydrophobins, beer foaming and gushing [J]. Cerevisia, 2011, 35(4): 85 - 101.
- [41] HORIUCHI T, FUKUSHIMA D, SUGIMOTO H, et al. Studies on enzyme-modified proteins as foaming agents: effect of structure on foam stability [J]. Food Chemistry, 1978, 3(1): 35 - 42.
- [37] 贾娟. 应用单克隆抗体-ELISA 法检测啤酒中泡沫活

Research progress on structure and physicochemical properties of proteins in beer

HAN Yu-peng^{1,2}, WANG Jin-jing^{1,2}, TIAN Jin-feng^{1,2}, LI Qi^{1,2*}

1(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2(The Laboratory of Brewing Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT Proteins are important components in beer, which can affect both the health of consumers and the quality of beer productions. At present, researches on beer proteins were mainly focused on the identification and quantification of proteins in beer, the researches on its influences on the beer quality and characteristics were limited. In this article, some research methods used for study of beer proteins were presented. Meanwhile, the researches directions on beer proteins were also introduced.

Key words beer; beer proteins; structure; physicochemical properties