

利用高效液相系统分析啤酒泡沫中蛋白质的分布

董建军¹ 郝俊光^{1,2} 贾士儒³

1(青岛啤酒科研中心, 青岛 266061) 2(江南大学生物工程学院, 无锡 214036)

3(天津科技大学生物工程学院, 天津 300222)

摘 要 介绍了国外啤酒泡沫蛋白的研究概况, 并阐述了利用分子筛层析柱对啤酒泡沫蛋白的检测技术, 通过实验初步得出泡沫多肽主成分的分子分布情况。

关键词 啤酒, 泡沫, 蛋白, 高效液相, 分子筛

啤酒中蛋白质的含量和分布是啤酒胶体稳定性和啤酒泡沫质量的关键影响因素, 而啤酒中蛋白质的组成和特性一直是啤酒界的研究热点和关注重点。目前, 国内这方面的研究工作尚处于起步阶段。青岛啤酒科研中心利用高效液相系统和分子筛层析原理对啤酒泡沫中蛋白质分布进行了初步研究。文中在对此研究工作进行介绍的同时还综述了国外啤酒界在泡沫蛋白方面的研究进展。

1 啤酒泡沫与多肽关系的概述^[1,2]

对泡沫多肽的研究分歧一直贯穿于泡沫活性多肽研究工作的始末。一般可分为 2 种学术意见, 一种是蛋白质的粘附性, 另一种理论则认为, 啤酒的某种、某类蛋白质造就了优质的泡沫稳定性, 其基本特性是疏水性。啤酒中多肽可以以不同的结构形式存在, 只有那些具有外部疏水特性的蛋白才具有表面活性^[1,2]。

近年来备受关注的是脂转移蛋白质(lipid transfer protein/LTP1^[3~5]。Bech 等指出, 这种大麦衍生蛋白质是啤酒泡沫的主要组成部分。制麦和糖化对麦汁的 LTP1 的水平并无影响。他们指出, LTP1 会在麦汁煮沸过程中以一种更利于泡沫稳定性的形式存在, 通过 SDS-PAGE 电泳可以证实, 其平均分子量约为 10 000 u 左右, 且谱带较模糊, 而对应的大麦的 SDS-PAGE 电泳的 LTP1 谱带清晰。Bech 认为, 可能是麦汁中的 LTP1 在煮沸过程中存在形式发生

变化, 从而在啤酒中以多种形式存在, 故其在电泳过程中迁移率和表现形式上都有所改变。LTP1 的抗体仅仅与 LTP1 作用, 不会因啤酒类型的不同而有所改变。Bech 等应用核磁共振分光法也证明了这一结论。

Lusk 及其合作者使用泡沫塔方法分离啤酒泡沫, 得到分子量分别为 4×10^4 u 和 1.2×10^4 u、 1×10^4 u 的蛋白质馏分, 按不同比例进行泡沫重组实验, 探讨不同泡沫蛋白的作用。他们发现, 添加异 α -酸、 CO_2 、乙醇和无机离子以后, LTP1 产生的泡沫稳定性最佳; 同时按上述思路对 40 ku 的蛋白质进行泡沫重建时, 仅仅产生了一定的泡沫稳定性, 而来源不明的分子量为 12 ku 的蛋白质并不具备起泡性^[6]。

Yokio 和 Maeda^[1]等用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀法和离子交换法得到啤酒蛋白质, 经过不同物化特性分析后得出了 4×10^4 u 分子量的蛋白质是重要的泡沫蛋白的结论, 并将其与大麦中的蛋白质 Z 联系起来。Douma^[1,5]等证明 40 ku 的蛋白是啤酒蛋白中组成泡沫壁的最佳物质, 可显著地增强泡沫稳定性, 并且分子质量为 8 ~ 18 ku 的多肽具有辅助的泡沫增进功能。这个结论说明, 蛋白质之间的相互作用在啤酒泡沫稳定性方面是非常重要的。Holleman 及其合作者认为, 从啤酒中除去 40 ku 的蛋白质对泡沫性并没有影响, 而且 Gibson 等使用缺乏 Z4 蛋白的芬兰大麦变种 Pirkka 生产的啤酒亦具有良好的啤酒泡沫也验证了这一观点。Sheehan 及 Evans 指

第一作者 硕士研究生, 应用研究员。

收稿时间 2003-09-02, 改回时间 2004-09-02

出,泡沫稳定性(由Rudin法评价)与麦芽Z4含量有良好的相关性,但与LTP1无关,种种结论的并存和争论,使人们对泡沫蛋白的构成和特性的认识产生混乱。

与认定泡沫特性主要由某一种蛋白质决定的观点不同,另一种观点则认为,良好的泡沫性能取决于不同蛋白质间的协同作用。Mohan等证实了对泡沫的构成有特殊作用的2种低分子量的蛋白质及另一种分子量相对较高的蛋白质(或许产生于酵母)在泡沫中并存,3者共同支持了泡沫的稳定性这一观点。Sarker等曾对模拟模型系统进行研究,发现在牛血清蛋白溶液中添加低含量的阿拉伯半乳聚糖时,会使泡沫稳定性增强,这可能是由泡沫中的粘性成分或泡沫中的蛋白质与戊聚糖发生间接作用引起的,而添加多量的阿拉伯半乳聚糖时,又会降低泡沫稳定性,可能是因其阻碍了蛋白质顺利进入气泡壁的缘故。Clark实验室对阴离子BSA和阳离子溶菌酶间的相互作用进行了研究,提出了离子与不同蛋白质间的相互作用决定了部分啤酒泡沫特性的观点。

Onishi及其合作者曾在大量论述中提出啤酒多肽的疏水性是泡沫稳定性的决定因素的观点。她只研究最上层啤酒泡沫的部分情况,并努力纯化从泡沫中提取的蛋白质,使通常不会进入泡沫的多肽在研究范围中含量最小化。她将分离到的蛋白质按对疏水性和泡沫稳定性的改变能力分为5组,并进行了相应的SDS-PAGE分子量检测,发现不同组的蛋白质有着相似的蛋白质模式。因此她认为,在泡沫稳定性方面疏水性较其分子质量更为重要。泡沫单克隆抗体与大麦醇溶蛋白有一个交叉反应,这表明至少啤酒中有一些多肽来自于大麦贮存蛋白,而且发芽过程使多肽的疏水性增加。另一种相反的理论则认为,这种泡沫稳定性多肽不是由制麦过程的蛋白质水解产生的,而只是转变为另一种更有利于泡沫活性的形式。还有研究表明,藻酸丙二醇酯(PGA)可能通过增强啤酒多肽的疏水性来提高泡沫的稳定性。

Slack等用疏水柱对啤酒的蛋白质和大麦的

水溶性物质进行了分离检测。发现疏水性最强的蛋白质形成的泡沫稳定性最强,而亲水性最强的蛋白质形成的泡沫稳定性最差。该结论对分子量在5 ku~30 ku的蛋白质非常适合,但当蛋白质分子量大于50 ku时该差别降低。

Ishibashi等应用酶联免疫反应(ELISA)得出与Onishi类似的结论^[7],并发现泡沫蛋白在麦汁煮沸和发酵期间水平下降,原因是蛋白质通过沉淀和泡沫的不可逆析出而损失。过滤也会通过吸附作用造成疏水性多肽的损失。Kakui等确立了几种泡沫多肽的单克隆抗体谱,并应用这些抗体发现浸麦过程中一些泡沫多肽的含量上升而在发芽、醅焦阶段则下降,但Onishi等则发现所有的多肽在制麦期间均呈下降趋势。

对泡沫脂粘蛋白(lipid binding protein/LBP)的研究,是泡沫研究工作的又一新的热点。这些蛋白质的存在最早是在研究小麦面粉的过程中发现的,尤其在富含嘌呤嘧啶的小麦中含量较多。研究人员发现,只要加入几毫克这样的蛋白质就可抵消由类脂物和脂类物质造成的泡沫不稳定性。在实际生产中,应用LBP提高泡沫稳定性的首选就是使用藻酸丙二醇酯。另外,应用鱼胶来增强啤酒泡沫,也是其脂粘能力的体现。

最近,Ishibashi用抗体来研究混浊敏感蛋白和泡沫蛋白的关系,发现泡沫抗体仅对泡沫蛋白专一作用,而混浊蛋白抗体对二者均能作用,从而认定泡沫蛋白也能参与啤酒混浊。Ishibashi证实,混浊敏感蛋白和泡沫蛋白在整个酿造过程中均有所损失,尤其是在煮沸、发酵、过滤阶段。

2 利用高效液相系统分析啤酒泡沫中蛋白质的分布

2.1 实验仪器与药品

AKTAexplorer 10 蛋白质自动纯化仪、HiPrep sephacryl 26/60 s-100 HR 分子筛柱,均购于Amersham公司。BSA(Mr 67 000)、Ovalbumin(Mr 43 000)、Ribonuclease A(Mr 13 700)、Aprotinin(Mr 6

512) Vitamin B₁₂(Mr 1 355) Cytidine(Mr 243), 购于 SIGMA 公司。

2.2 啤酒泡沫的收集

对啤酒泡沫的分析通常采用泡沫塔技术和泡沫塔模拟技术(分液漏斗分离) 2 种^[5], 文中采用后者。即在 4℃ 下 将 500 mL 酒加入 2 L 的分液漏斗中 , 充入 N₂ , 使泡沫达到 1.8 L 后 , 停止通气 , 泡沫自动回落 20 min , 排掉酒液 , 收集上层泡沫约 10 mL , 作为泡沫 1 (foam₁)。

重复上述操作 , 得到泡沫 , 向泡沫中添加体积分数为 5% 的乙醇 , 恢复至 500 mL , 再使泡沫达到 1.8 L 后 , 停止通气 , 泡沫自动回落 20 min , 排掉酒液 , 收集上层泡沫约 10 mL , 作为泡沫 2 (foam₂)。

2.3 柱层析条件

缓冲液 0.15 mol/L NaCl + pH 4.5 的醋酸钠混合溶液 ; 流速 0.5 mL/min 检测波长 280 nm ; 测定温度 25℃ ; 上样量 1 mL ; 样品处理 过 0.45 μm 的滤膜。

2.4 实验结果

2.4.1 啤酒原液实验结果

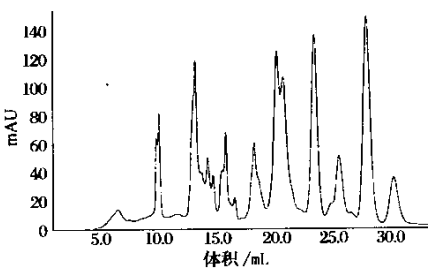


图 1 啤酒原液的分子筛紫外 280nm 吸光度图谱

表 1 啤酒原液的分子筛紫外 280 nm 处吸光度图谱的特征分析表

最大的 7 个峰的保留时间/min	积分面积 (mAU × mL)	峰高 (mAU)	峰数 /个	总积分面积 (mAU × mL)
13.30	87.816 0	119.289	21	934.746 0
18.35	53.811 3	60.836		
20.35	80.8952	125.375		
20.89	87.703 0	107.369		
23.61	93.604 9	137.393		
25.75	57.269 2	51.321		
28.18	99.321 5	114.873 0		

2.4.2 foam₁ 的实验结果

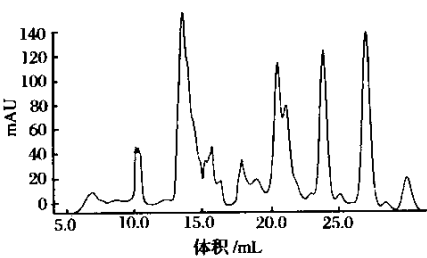


图 2 foam₁ 的分子筛紫外 280 吸光度图谱

表 2 foam₁ 的分子筛紫外 280 吸光度图谱的特征分析表

最大的 7 个峰的保留时间/min	积分面积 (mAU × mL)	峰高 (mAU)	峰数 /个	总积分面积 (mAU × mL)
13.39	164.5239	155.995	21	2000.121
15.55	22.6027	46.834		
17.72	22.6713	35.693		
20.34	72.4344	114.718		
20.96	54.8621	80.390		
23.69	77.8466	124.665		
26.83	90.7665	139.106		

2.4.3 foam₂ 的实验结果

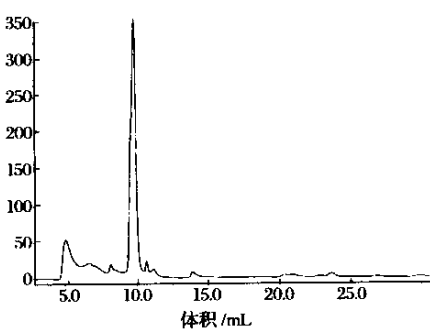


图 3 foam₂ 的分子筛紫外 280nm 吸光度图谱

表 3 foam₂ 的分子筛紫外 280 nm 吸光度图谱的特征分析表

最大的 7 个峰的保留时间/min	积分面积 (mAU × mL)	峰高 (mAU)	峰数 /个	总积分面积 (mAU × mL)
5.04	44.573 3	54.127	18	358.929 2
6.73	29.569 1	21.597		
8.17	13.193 3	19.726		
9.98	157.705 6	358.231		
10.68	6.570 9	24.147		
11.16	8.560 8	13.028		
13.68	6.157 5	8.667		

2.4.4 标准蛋白质的理想图谱

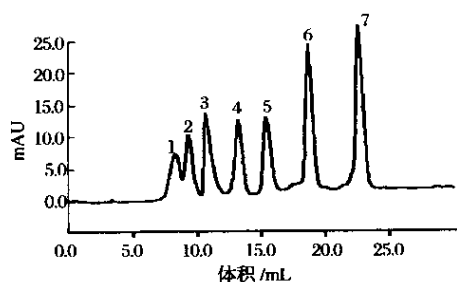


图4 标准蛋白质的分子筛紫外 280 nm 处吸光度图谱

标准蛋白质检测的实验条件:BSA 8 mg/L (前 2 个联体峰)、Ovalbumin 2.5 mg/L (峰 3)、Ribonuclease A 5 mg/L (峰 4)、Aprotinin 2 mg/L (峰 5)、Vitamin B₁₂ 0.1 mg/L (峰 6)、Cytidine 0.1 mg/L (峰 7)。缓冲液 0.15 mol/L NaCl + pH 4.5 的醋酸钠混合溶液;流速 0.5 mL/min;检测波长 280 nm;测定温度 25℃;上样量 0.5 mL。

3 讨论

foam₁ 的蛋白质含量明显高于原液的量,且高分子部分明显富集,保留体积 13.39 mL 处蛋白质的含量几乎是原酒的 2 倍,但 foam₁ 与原酒的蛋白质整体分布基本一致,均为 21 个峰,只不过各峰所占的比例不一样。Foam₂ 与 foam₁ 和原液相比,蛋白质含量明显降低,可能是被稀释一次的缘故。保留体积 9.98 mL 处蛋白质的含量几乎占据了总蛋白质含量的 45%。从分子质量的分布来看,好像与标准蛋白质图

谱中的 Ovalbumin 的分布不对应[不对应的原因可能是啤酒蛋白质是复杂的糖蛋白,其柱层析行为很可能因为糖蛋白间的相互作用而偏离典型蛋白(如 Ovalbumin)的轨迹],但进一步的电泳实验证实该处的蛋白质分子量为 4.3 万,与报道的蛋白质 Z 的分子量接近,可以断定蛋白质 Z 就是泡沫蛋白的主成分,本结论与 Yokio、Maeda、Douma 等得出“4 万分子量的蛋白质是重要的泡沫蛋白、该蛋白质在大麦中体现为蛋白质 Z”的结论相一致^[1,5],本研究中不能确定啤酒中蛋白质 LPT1 的明显存在和在啤酒泡沫中的明显富集。

参考文献

- 1 Harles W Bamforth. Brewing matters to a head: the status of research on beer foam [J]. European Brewery Convention Monograph, 1998, 27, 1 ~ 21
- 2 郝俊光,谢彬,赵英. 影响啤酒泡沫的因素和工艺控制要点 [J]. 中国啤酒, 2003(7): 26 ~ 29
- 3 Evan D E. The impact of malt derived protein on beer foam quality [J]. Journal of The Institute of Brewing, 1995 (2): 171 ~ 177
- 4 Vaag Pia. 17 ku foam protein [P]. PCT, IB99/01597, WO 00/14237
- 5 Gloria Garcia-casado. Isolation and characterisation of LPT1 and protein Z as beer allergen [J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 647 ~ 649
- 6 Lance T Lusk. Independent role of beer proteins, melanoidins and polysaccharides in beer foam [J]. ASBC, 1995, 3: 93 ~ 103
- 7 Juliet A Kauffman. Immunological characterisation of barley polypeptides in lager foam [J]. J Sci Food Agric, 1994, 66: 345 ~ 355

Research on the Composition of Beer Foam by High Performance Liquid Chromatography

Dong Jianjun¹ Hao Junguang^{1,2} Jia Shiru³

¹ Research Center of Tsingtao Brewery Group Company, Qingdao, Shangdong, 266061)

² School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, 214036)

³ College of Bioengineering, Tianjin Virersity of Science and Technology, Tianjin, 300222)

ABSTRACT The research progress on beer foam by size-exclusion column with HPLC is reported. In this paper, we found that protein z maybe play a leading and positive role in foam because protein z is rich in beer foam.

Key words beer, head, protein, high performance liquid chromatography (HPLC), size exclusive column