

啤酒泡沫稳定性与蛋白酶的关系

张峻炎 田亚平 陆 健 李 崎 顾国贤

(江南大学酿酒科学系,无锡,214036)

T526 A

摘 要 大量的文献资料证实,未经巴氏灭菌的纯生啤酒会有一定量的蛋白酶活力残留,继而破坏了泡持性蛋白质 Z(PrZ),使啤酒的泡沫稳定性变差。目前研究者发现主要是蛋白酶 A(PrA)在起作用,许多人已建立了测定微量 PrA 和 PrZ 的方法。人们设想寻找一种抑制剂,能够添加到蛋白酶 A 活性偏高的纯生啤酒中,抑制 PrA 对泡沫蛋白的降解,但这一工作仍有待进一步研究。文中介绍了国内外在此方面的研究概况。

关键词 蛋白酶 A,蛋白质 Z,泡沫稳定性

我国的纯生啤酒越来越受到人们的重视和青睐,由于其独特的风味,它必将成为今后啤酒消费的主流。纯生啤酒在包装前未经过巴氏灭菌,因而由酵母分泌的少量蛋白酶活性得以存留下来,继而在啤酒储存及货架寿命中对泡持性蛋白进行降解,从而使纯生啤酒的泡沫变得较差。许多的实验已证实这其中起主要作用是蛋白酶 A(Proteinase A,简称 PrA, E.C.3.4.23.8)^[1]。为了提高啤酒泡沫的稳定性,人们对蛋白酶和泡沫蛋白 Z 进行了大量的研究,积极寻找蛋白酶 A 含量与泡沫稳定性之间的关系。

一般说来,啤酒酿造过程中蛋白酶主要有 3 个来源。(1)是来源于麦芽,在大麦发芽时会有自然蛋白酶产生,它可以降解蛋白质产生足够的有泡沫稳定性的多肽^[2]。但此酶在经过麦汁煮沸后它也就被除去,不会有所残留。(2)是个来源于人为添加的蛋白酶,如木瓜蛋白酶就是啤酒中应用最广的蛋白水解酶^[3],这主要是用于控制啤酒中的高分子质量蛋白质,提高啤酒的非生物稳定性。在添加时应做到不对形成泡沫核心的蛋白质有不利影响为好,但据报道,木瓜蛋白酶耐热性很强,在 70℃ 处理 2 h 后仍存有 45% 的酶活力^[4],因而会在生啤酒和熟啤酒中都有残

留,这一定会对啤酒泡沫产生不利影响。(3)是来源于酵母,酵母含有多种蛋白酶,主要的有蛋白酶 A(PrA)、蛋白酶 B 和羧肽酶 Y。其中主要是 PrA 降解了泡沫蛋白质,影响了纯生啤酒的泡持性。因而,现在人们更多的是对这类蛋白酶进行了大量的研究。

一般说来,PrA 量的多少与原料、酵母的自溶、发酵工艺、酵母菌株有很大关系。过高的酵母接种量会导致酵母的过分生长和发酵液中的高蛋白酶活。麦汁中溶解氧的含量也必须维持在一个特定的水平,以阻止 PrA 的释放,与发酵条件相比,酵母活力更为强烈的影响着 PrA 的含量^[5]。

目前,这方面的研究国内尚未见报道,国外研究报道较多,象丹麦嘉士伯,日本三得利,的研究所在这方面研究较多,另外美国、英国、德国等也进行了大量的研究。他们在以下几个方面进行了探索。

1 酵母及啤酒中蛋白酶的测定方法

为了弄清蛋白酶含量与泡沫稳定性之间的关系,就必须先建立一个测定蛋白酶活力的方法。在对不同方法的探索过程中,研究者们都是以底物的改变为主要思路,以解决方法的灵敏度为最终目的。表 1 列出了蛋白

第一作者:硕士研究生。

收稿时间:2002-03-27

酶测定方法的发展过程。

表 1 啤酒及酵母蛋白酶测定方法的发展

年份 (年)	酶种类	酶来源	底物	参考文献
1917	总蛋白酶	焙烤酵母	酪素	[6]
1958	酸性蛋白酶	焙烤酵母	酸性血红蛋白	[7]
1967	蛋白酶 A	焙烤酵母	酸性血红蛋白	[8]
1980	蛋白酶 A	酿酒酵母	酸性血红蛋白	[6]
1983	酸性蛋白酶	纯生啤酒	酸性血红蛋白	[9]
1983	蛋白酶 A	焙烤酵母	荧光底物	[10]
1993	蛋白酶	纯生啤酒	试卤灵标记酪素	[11]
90 年代	蛋白酶 A	纯生啤酒	荧光底物	[12]

根据这些研究资料来看,测定啤酒中 PrA 活力难度最大,因为它的活力一般只有 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ TU(酪氨酸活力)左右,目前只有荧光底物法能够达到这一灵敏度要求,该方法的检测限一般可达到几 nmol/L 的荧光物质(如 AMC 等)。如果再将荧光底物法与 HPLC 技术相结合,就可以不需任何样品预处理步骤或添加任何别的试剂就能测出商品生啤酒中的 PrA 含量。

但由于这种底物很难配备,也难以工业推广,目前有许多人正尝试采用以下的一些思路来进行测定:(1)先浓缩纯化后测定,这种方法的收得率和可信度问题需要很好的解决。有人尝试用过反渗透膜将发酵液进行了约 100 倍的浓缩后,测定结果尚令人满意,这对工厂测定有一定借鉴作用。(2)间接测定法,由总蛋白酶活推测 PrA 的量,或直接建立总酸性蛋白酶与泡持性的关系。比如使用微量量热器,利用酶生化反应过程中的热量交换引起的热量变化来间接测定蛋白酶活力,取得了较好的效果。(3)使用 HPLC,以纯的蛋白酶 A 为标样测定,此方法有一定可行性,但尚需尝试。总之,如何建立一个能在工厂广泛应用的方法是一个迫切的课题。

在研究酵母 PrA 性质过程中,PrA 活力的测定可以采用 DFP 方法,DFP 是一种蛋白酶抑制剂,它能抑制除 PrA 外的几种主要酵母蛋白酶,在将 DFP 添加到反应体系中就可以专一的测出 PrA 的活力。本实验室已建

立了这种方法,实验结果表明该方法完全适用于酵母 PrA 活力的测定。

2 酿酒酵母蛋白酶的分离纯化及特性的研究

在 19 世纪末之前人们就已在酵母中发现了蛋白酶,从 20 世纪 20 年代开始对酶特性进行了研究。在 20 世纪 70 年代,发现了 8 种酵母蛋白酶:PrA 和 B,羧肽酶 Y 和 S,3 种氨基肽酶和 1 个单一的二肽酶。在 80 年代中期,由于生色底物测定技术的发展,已知的酵母蛋白酶数量增加到约 40 种。

很明显,要对主要的 3 种液胞蛋白酶活力(PrA 和 B,羧肽酶 Y)进行简单的生化解释是不可能的。我们需要知道它们从胞膜中释放的机理,要弄清楚是不是由于自溶作用而导致了蛋白酶的释放,继而克服了胞质中的抑制剂而开始降解主要的细胞蛋白质。这样我们就可以解释酵母细胞老化和活力下降与蛋白质流失的关系。目前有人设想如图 1 所示的 PrA 释放过程,很有参考意义。

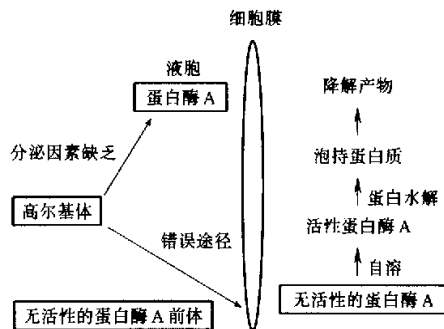


图 1 PrA 的释放机理示意图^[12]

Marianne 等人^[2]研究表明,啤酒发酵液在贮存期 4 周时,PrA 活力最强,而泡持性在 0~6 周内会不断下降,而不同的酵母菌株的释放 PrA 的曲线不尽相同,对泡沫稳定性影响也各不一样。他们将 15 种 Lager 型自溶酿酒酵母的活力进行比较,发现最高与最低的相差达 8 倍之多。Ormrod 等人^[13]的中试

试验证明(1 700 L),慢速冷却比快速冷却产生的酸性蛋白酶活力要低很多。酵母泥的排放时间和贮酒温度对酶活力也有影响,高温比低温所产生的酶活力要高^[20]。

为了研究啤酒酵母蛋白酶的特性,分离纯化过程是不可避免的。纯化流程图:

酶自溶物→(NH₄)₂SO₄盐析→透析→TEAE-Cellulose柱层析→组分离析→透析→TEAE-Cellulose再柱层析→组分离析→透析→DEAE-Cellulose柱层析→可分开蛋白酶A, B, C

蛋白酶 A 是一种酸性蛋白酶,其特性与胃蛋白酶颇为相似,以 HCl-Hb 为底物时,最适 pH 为 3.0,最适温度为 37~45℃,分子质量为 43 000 u 左右,等电点为 4.3~4.4 或更高的数值。PrA 的氨基酸组成以天门冬氨酸为最多,最少的为蛋氨酸,所以有人将它归为天门冬氨酸蛋白酶是有一定道理的^[6]。下面将酿酒酵母的蛋白酶性质与其他蛋白酶的相应性质进行了比较,如胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶和菠萝蛋白酶等(表 2)^[4],这些蛋白酶之间的主要区别就在于它们的耐热性能和在 pH 3.0 下的活力。

表 2 蛋白酶对热稳定性(血红蛋白底物, 20℃)

蛋白酶	pH 值	在保温 120 min 后			
		对 照	50℃	60℃	70℃
酵母蛋白酶	3	100	66	17	0
	6	100	42	13	0
	8	100	0	0	0
木瓜蛋白酶	6	100	100	88	45
菠萝蛋白酶	6	100	92	61	30
无花果蛋白酶	6	100	100	400	71
胃蛋白酶	2	100	47	22	0
胰蛋白酶	8	100	31	10	0

比较而言,酵母蛋白酶是耐热的,于 70℃ 完全失活,60℃ 处理后有最低活力。植物蛋白酶要耐热得多,经 70℃ 处理后仍有 50% 的活力,于 pH6.0 处活力最大。只有胃蛋白酶是个例外,与一种酵母蛋白酶颇为相似。

3 啤酒泡沫蛋白质的研究

啤酒中蛋白类物质含量以 N 计约在 300~800 mg/L 之间,其中主要由大麦所产生。由于在制麦、糖化和麦汁煮沸过程中的蛋白质水解程度的差异,这种物质并不是真正意义上的蛋白质。事实上,这类蛋白类物质只是一系列有一点或完全没有三维结构的多肽链而已。人们对多肽物质在啤酒泡沫上的重要性的认识由来已久,但这一特殊的物质团体对其它的啤酒特性也有着重要作用,如酒体、口感、风味和颜色等。同时它还是形成非生物浑浊的主要前体来源,许多的这些物质都是由蛋白质与其他一些啤酒组分,如酒花酸、多酚化合物和糖类等物质复合而成的。自从 1913 年 Furnrohr 第一个提出蛋白组分对啤酒泡沫的贡献以来,许多人已致力于分离出这些蛋白质组分并研究它们的特性^[14]。近年来通过特定的抗体实验已经知道泡持性蛋白属于蛋白质 Z 类,发现主要是分子质量在 10 000~100 000 u 之间的蛋白质参与了啤酒泡沫的形成^[14]。

啤酒蛋白质 Z(PrZ)是泡沫的重要组成部分,类黑素对啤酒泡持性有一定影响,而多糖对泡沫也有作用,但不如前两者作用大。但 Lance 等人^[15]的实验结果并不支持啤酒 PrZ 是主要的泡持性蛋白的观点,他们从啤酒泡沫中分离出 3 种蛋白质:10 KDa 脂肪转移蛋白质(LTP),被认为是起主要作用的泡持性蛋白质;40 KDa 蛋白质 Z;12 KDa 未知蛋白质,它对啤酒泡沫稳定性没有作用。他们还认为类黑素也有很好的泡持作用,但并不比蛋白质重要,因而啤酒的泡持性在蛋白酶作用前要好得多。然而大部分人还都认为 PrZ 是啤酒泡沫、混浊物的主要蛋白质。PrZ 含量因酿造大麦品种的不同而不同,在用 Western 免疫杂交纯化后进行等电聚焦分析表明 PrZ 的等电点都很偏酸。

对从啤酒中提取的,通过疏水作用层析得到的泡持性多肽进行研究后发现,泡沫稳

定性随着蛋白质分子质量增加和疏水性的增强而增强。一种新的用于提高因缺乏足够保持蛋白的啤酒泡持性的方法已经建立,人们发现水解的液体蛋白产物能赋予啤酒好的泡持性能,而对啤酒的澄清却没有不利影响,而研究结果也表明,鸡蛋白中确有泡持性组分。

啤酒中的泡持性蛋白主要来自于麦芽,而麦芽中泡持性蛋白质主要受大麦品种和产地影响。泡持性蛋白质在发芽期间迅速降低,据说大麦中有一种蛋白质能抑制绿麦芽胞内蛋白酶^[16],这对蛋白质的存留非常有利,而高温焙烤对泡持性蛋白质则不利。由于小麦中的泡持性蛋白质含量较大麦高,所以小麦啤酒的泡持性比大麦啤酒要好。与大麦的泡持性蛋白质相比,小麦的泡持性蛋白质分子质量要小一些,而等电点高一些,泡沫也比大麦啤酒的要细腻一些。选择良好的大麦品种,使其中的 LTP1 含量尽可能高一些(以 LTP1 100~8 000 ng/mL 为好),以提高泡持性。

另外,啤酒泡沫还受到其他因素的影响,如酒花酸、非淀粉类多糖、金属离子、CO₂ 等因素都对泡沫有利,而脂肪和过高浓度的酒精将抑制泡沫稳定性。添加酵母或酵母沉降上清液会对泡沫产生消极影响,这可能就是其中酵母蛋白酶作用的后果。表面张力对泡持性而言也是个重要因素,表面张力越低,泡持性越好^[17]。

由于蛋白质 Z(PrZ)的量比较少,一般的蛋白质分析方法无法测出,所以得借助于非常灵敏的免疫学方法。一般采用酶联免疫吸附法(ELISA)进行测定。测定原理就是用酶标抗体(或抗原)与抗原(或抗体)结合后,酶与底物的反应释放出有色物质,据此有色物质的量再进行蛋白质的定量分析。通过 ELISA 方法可以测定泡沫中的主要 3 种蛋白质:PrZ4、PrZ7、LTP1,测出蛋白质 Z 的量后,我们就可以定量的探讨它与蛋白酶及泡持性之间的关系。

泡沫的测定是个长久的问题,依靠自然

倒酒技术产生泡沫的操作已不再常用,而人工产生的泡沫又与实际指标不符。目前,泡沫测定方法比较多,如 NIBEM 方法、Rudin 方法、EBC 方法等等,国内流行的简便方法是将啤酒于 20℃ 水浴中恒温,于 20℃ 室温倒杯,满杯后目测记录泡沫消失时间,通常泡沫持续 4.5 min 以上较好,此时间称为“泡持性”。还有许多研究者建立了自己的测定方法,这对啤酒交流极为不利,应该创立一个统一的测定方法,而这一方法应最大限度的考虑到测定结果的客观性问题。

4 蛋白酶抑制剂的研究

PrA 和其他蛋白酶在发酵和成熟阶段都会从酵母细胞中释放出来。为了控制影响泡沫的 PrA 的含量,可从以下几个方面着手,(1)选择合适菌株,(2)就是选择合适的发酵和贮酒工艺,(3)寻找对 PrA 的抑制剂。前 2 种方法国内研究得比较多,而蛋白酶 A 抑制剂的研究还是一片空白。如果能找到这样的抑制剂,那么就能将酶的作用降低,自然泡沫蛋白就不会在货架寿命中被降解,啤酒的泡持性也就会得到加强。

目前关于 PrA 的活性中心还没有明确的说法,许多猜想还没有被证实,大部分人认为它的活性中心是含有天冬氨酸和丝氨酸的短肽序列,与胃蛋白酶颇为相似。因而在寻找 PrA 的抑制剂时,胃蛋白酶对我们有很好的借鉴作用。事实也证实胃蛋白酶对泡沫有明显的破坏作用。而胃蛋白酶抑制剂的研究早已进行,并有一定的进展。

一些 PrA 的化学合成抑制剂和生物提取抑制剂如表 3 所示。

从表 3 中可以看出,人们大多研究的是些化学试剂,而真正实用的生物提取抑制剂却少有报道,显然化学试剂一般对啤酒行业并不适用。另外 PrA 不受金属离子的抑制,但需要金属离子的激活^[11],因而通过添加离子的方法无法抑制 PrA 的活力。因此,我们应找到一种卫生安全的非离子型抑制

剂,它要能够直接添加到啤酒中,所以最好从农作物中提取能结合到蛋白酶活性中心上的短肽物质,比如象大豆等农作物便是很好的提取对象。根据国内外的研究报道,大豆蛋白质在人体中只有60%~70%能被吸收,这是因为大豆中有许多种蛋白酶抑制剂抑制了人体中蛋白酶对大豆的降解。目前人们对大

豆胰蛋白酶抑制剂的研究对于PrA抑制剂的研究有着很好的借鉴作用。一般说来,象这样从农作物中提取的抑制剂是安全的,便于在啤酒中推广应用。在找到这种抑制剂后,可以通过质谱分析等手段测出这些短肽的序列及结构,研究它们的抑制机理。

表3 蛋白酶A抑制剂

抑制剂种类	酶活残余率/%		
	蛋白酶A	胃蛋白酶	酵母蛋白酶
DFP(0.01mol/L)	无效	无效	-
EPNP(0.1mol/L)	-	54.38	71.19
PCMB-	无效	97.51	59.48
EDTA(0.01mol/L)	无效	103.96	103.85
DAN(0.1mol/L)	-	57.1	78.54
胃蛋白酶抑制剂(0.001mol/L)	有效	8.15	78.27
I ^A 3(焙烤酵母提取)(4μmol/L)	30.0	-	-

注:DFP为二异丙基氟磷酸,DAN为重氮基乙酰-DL-正亮氨酸甲酯;

EPNP为1,2-环氧-3-(4-硝基苯氧基)丙烷,PCMB为对氯高汞苯甲酸;

EDTA为乙二胺四乙酸。

5 小 结

啤酒与其他饮料的最大区别就是倒入杯中后具有长久不消的、洁白细腻的泡沫。因此,为了解决纯生啤酒的泡沫问题,国内外许多的厂家和研究机构都进行了大量的研究。目前国外普遍都是采用的荧光底物法测定啤酒中的PrA的浓度,用酶联免疫吸附反应研究泡沫蛋白质Z,但他们的的方法如何在工厂推广仍是问题。解决纯生啤酒的泡沫问题可以从多方面着手,比如如何控制好酵母的自溶问题,如何制定一个合适的发酵工艺等,如果在前期就将泡沫问题解决好,那么后期将省事不少。研究PrA抑制剂是个不错的后修饰思路,这对如何保持啤酒良好的泡沫性能非常有用,并且我们只需对那些PrA超标的啤酒添加抑制剂,而合格的可以直接上架出售。在这个探索过程中,首先应确立测定啤酒中PrA活力的方法,并对酵母中的PrA进行纯化分离,然后研究其特性,在熟悉了酵母PrA的性质后,就可以着手寻找啤酒中PrA抑制剂并研究其性质及在啤酒中的应用

前景。如果能将纯生啤酒的泡沫问题解决好,那么将会使我国的纯生啤酒泡沫质量上一个台阶,使口味自然的纯生啤酒更受人们的欢迎。

参 考 文 献

- 1 Hiroto K et al. EBC Congress, 1995, 669~676
- 2 Marianne M et al. EBC Congress, 1993, 357~364
- 3 Hebert J P et al. American Society of Brewing Chemists., Inc., 1978, 36(1):31~38
- 4 Fukal L. Journal of The Institute of Brewing, 1986, 92(4):357~359
- 5 Kagin A et al. Technical Quarterly, 1999, 36(1): 67~70
- 6 Franz M et al. Journal of Biological Chemistry, 1980, 225:12 087~12 093
- 7 Hagihara B et al. J. Biochem. (Tokyo), 1958, 45: 185
- 8 Tadao Hata et al. Agr. Biol. Chem., 1967, 31 (2):150~159
- 9 Dreyer T, Biedermann T et al. Carlsberg Research Communication, 1983, 48:249
- 10 Hideyoshi Y et al. Analytical Biochemistry, 1983: 103, 210~215
- 11 Mochaba F et al. EBC Congress, 1993:533~541

- 12 Hiroto K et al. Journal of the Institute of Brewing, 1999, 105(5):293~300
- 13 Ormrod I H L et al. EBC Congress, 1991: 457~464
- 14 Katsuhiko A et al. American Society of Brewing Chemists, Inc., 1980, 38(4):129~136
- 15 Lance T et al. American Society of Brewing Chemists, Inc., 1995, 53(3):93~103
- 16 Berne L J et al. American Society of Brewing Chemists, Inc., 1997, 55(2):58~64
- 17 Katsuaki M et al. American Society of Brewing Chemists, Inc., 1991, 49(1):14~18

The Relationship between Beer Foam-stability and Proteinase

Zhang Junyan Tian Yaping Lu Jian Li Qi Gu Guoxian

(Dept. of Brewing Science, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, 214036)

ABSTRACT Many data proved that some proteinase remains because the draft beer isn't sterilized by the Pasteurization. The remaining proteinase will destroy the foam protein Z(PrZ) and the foam stability of the beer will be bad. It have found that the main destroying factor is the proteinase A(PrA). The methods for detecting the minim PrA and PrZ quantity have been established. It imagine that a PrA inhibitor can be appended into beer to inhibit the superfluous PrA activity. But such research is still going along. The thesis introduced the researching tenor in this field.

Key words proteinase A, protein Z, foam-stability

《中国粮油学报》2003 年征订启事

《中国粮油学报》是中国粮油学会主办的学术性刊物,已纳入全国食品工业类中文核心期刊,属全国重点期刊之一,并为美国《化学文摘》收录。《中国粮油学报》主要登载谷物、油脂化学方面的学术论文;报道优质粮油品质资源选育、贮藏、加工利用以及品质检测方面的研究成果,它对指导粮油学科的发展,提高粮油资源的深度开发利用水平,具有实用价值。

《中国粮油学报》是国内外公开发行的—级刊物,国内统一刊号:CN11-2864/TS,国际标准连续出版刊号:ISSN 1003-0174。双月刊,逢双月出版,胶版印刷,大 16 开,64 页,每期定价 10 元,全年定价 60 元(含邮费)。自 1996 年以来,每年还出版—期英文增刊,国内订户优惠价 10 元(含邮费)。全套共计 70 元。

订阅者可通过邮局或银行汇款。地址:北京市宣武区报国寺 1 号《中国粮油学报》编辑部,邮政编码:100053,帐户:中国粮油学会,开户银行:北京市商业银行报国寺支行,帐号:201050385-70,电话:010-63038765,传真:010-63049529

欢迎订阅 2003 年《粮食与油脂》

邮发代号:4-675

《粮食与油脂》系由上海市粮食科学研究所、上海市粮油学会主办的有关粮食、油脂、食品综合性专业期刊。主要报道粮油新产品开发、粮油加工新技术、新产品、新工艺、粮油资源综合利用、粮油机械、粮油检测、粮油功能性食品、新型食品添加剂;粮油市场、行情分析、粮油期货、粮油论坛、粮油食品信息等内容。内容着重新颖性、实用性、服务性、可读性。特色鲜明、资料权威、信息丰富、贴近读者。使您了解当前国内外粮油、食品行业发展趋向,获知粮油市场最新商情;把握机遇、共创未来。

《粮食与油脂》月刊,大 16 开,56 页,每月 10 日出版,每期定价 4 元,全年 48 例。邮发代号:4-675,请向全国各地邮局(所)订阅,也欢迎汇款至本刊订阅,本刊发行部常年办理订阅业务。

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎发布广告

地址:上海市外马路 1469 号 邮编:200011

电话:(021)63781733 传真:(021)63773264

电子信箱:Lshyyzh@online.sh.cn