

脯氨酰内肽酶水解啤酒蛋白的研究

周丽娜¹, 张 鹭¹, 路福平², 杨 迪², 向先长²

1(齐齐哈尔大学生命科学与工程学院, 黑龙江齐齐哈尔, 161006)

2(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津, 300457)

摘 要 将脯氨酰内肽酶(PEP)添加在啤酒后酵液中,通过冷混浊实验分析脯氨酰内肽酶对啤酒非生物稳定性的影响。结果表明,添加 5mg/L 的脯氨酰内肽酶就能有效地提高啤酒的非生物稳定性;采用 75%硫酸铵沉淀啤酒蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果显示,啤酒蛋白电泳图谱的分布主要表现为 8~14.4 ku 的窄带和 35~45 ku 的宽带,而经脯氨酰内肽酶处理的啤酒蛋白电泳图谱中 8~14.4 ku 的条带消失,说明此蛋白被脯氨酰内肽酶水解。

关键词 啤酒蛋白,脯氨酰内肽酶,冷混浊,SDS-PAGE 电泳

啤酒本身是不稳定的胶体溶液,在生产和贮存过程中常会出现一些非生物混浊或沉淀,影响啤酒的外观。大量的研究表明,啤酒的非生物混浊主要是由啤酒中蛋白质和多酚之间的反应引起的。多年来,酿造者延缓啤酒混浊形成与发展的主要措施是严格控制原料和生产工艺,添加非生物稳定剂等,其中添加非生物稳定剂是比较有效的做法,如加入与啤酒蛋白起作用的稳定剂(硅胶、单宁、酶等),与啤酒多酚起作用的稳定剂(甲醛、PVPP 等)以及抗氧化剂等^[1,2]。

脯氨酰内肽酶(prolyl endopeptidase, PEP)是特异性水解氢键结合区域的多肽链中脯氨酸残基羧基端肽键的丝氨酸蛋白酶^[3]。引起啤酒混浊的蛋白质主要是富含脯氨酸残基的蛋白质,脯氨酰内肽酶可以水解此类蛋白质。近年来,人们较多采用木瓜和菠萝蛋白酶制剂作为啤酒的稳定剂^[4],而采用脯氨酰内肽酶作为啤酒稳定剂的很少^[5]。文中主要研究脯氨酰内肽酶对啤酒非生物稳定性的影响及对啤酒蛋白的作用效果。

1 材料与方法

1.1 仪 器

垂直板电泳仪、磁力搅拌器(北京六一厂);浊度仪 HZ013(丹麦);721 分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.2 试 剂

脯氨酰内肽酶[EC3.4.21.26](DSM 公司);Z-Gly-Pro-pNA(BACHEM 公司);中分子量蛋白质 Marker(上海生物工程技术公司);考马斯亮蓝 G-250

(美国 Sigma 公司);标准牛血清蛋白(中国医学科学院血液学研究所);透析袋(Solarbio 公司);丙烯酰胺, N,N'-甲叉双丙烯酰胺, SDS, 过硫酸铵, TEMED(四甲基乙二胺)(瑞典安玛西亚公司);(NH₄)₂SO₄, 柠檬酸, Na₂HPO₄ 等均为分析纯试剂。

1.3 分析方法

1.3.1 啤酒蛋白质的测定

Bradford 法^[6]。

1.3.1.1 考马斯亮蓝试液配制

考马斯亮蓝 100 mg 溶于 50 mL 95% 乙醇,再加入 100 mL 85% H₃PO₄, 加水稀释至 800 mL, 过滤备用。

1.3.1.2 标准曲线制作

精密称取牛血清蛋白 10 mg, 于 100 mL 容量瓶中定容, 制得 100 mL 的牛血清蛋白标准品溶液。取具塞试管 6 支, 分别加入牛血清蛋白标准液 0.00、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80 mL, 均补加水至 1.0 mL, 分别加入考马斯亮蓝试液 4 mL, 立即混匀, 放置 5 min, 于 595 nm 波长处测定吸光度, 以牛血清蛋白浓度(mg/mL)对吸光度作图, 得标准曲线。

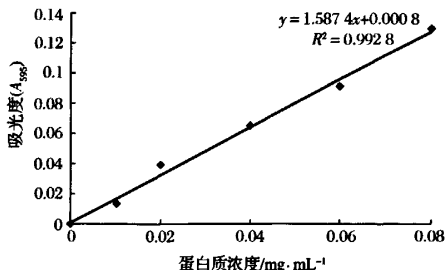


图1 牛血清白蛋白标准曲线

1.3.1.3 啤酒样品测定

第一作者: 硕士(路福平教授为通讯作者)。

收稿日期: 2007-08-06, 改回日期: 2007-11-12

将啤酒样品稀释 10 倍,取 1 mL 稀释液于具塞刻度试管中,加入考马斯亮蓝试液 4 mL,混匀,放置 5 min,于 595 nm 处测定吸光度,以不加牛血清白蛋白溶液为空白。根据牛血清白蛋白标准曲线得出相应的浓度,计算出样品中蛋白质的含量。

1.3.2 脯氨酰内肽酶活性的测定^[7]

取 100 μ L 酶液,加入 1.0 mL 柠檬酸/磷酸氢二钠缓冲液(pH 5.0)和 250 μ L 2 mmol/L 的 Z-Gly-Pro-pNA 溶液,摇匀,37℃ 分别反应 0、10、20、30、45、60、75、90 和 120 min。测定反应前后溶液在 410 nm 处的吸光度。在上述条件下,每分钟分解 Z-Gly-Pro-pNA 释放 1 μ mol pNA 的酶量,定义为 1 个酶活单位(U/mL)。通过 ΔA_{410} 计算脯氨酰内肽酶活性。

$$U/mL = \frac{\Delta A}{\min} \times \frac{U \times 10^6}{\gamma \cdot v \cdot \beta}$$

A/min,吸光度变化;V,反应体系体积(mL); 10^6 ,将 mol 换算成 μ mol; γ ,摩尔消光系数(cm^2/mol); v ,样品量(mL); β ,比色杯光程(cm)。

1.3.3 啤酒浊度的分析

分别对过滤后的后酵液,经 5 mg/L 脯氨酰内肽酶处理后的后酵液,以及二者在 0℃ 下保存 48 h 后的样品,采用文献^[8,9]中所描述的方法进行浊度分析。

1.3.4 啤酒蛋白分子量的测定

啤酒蛋白的提取:将啤酒后酵液 500 mL 过滤,加入 2.5 mg 的脯氨酰内肽酶,37℃ 恒温水浴 1 h,75% 饱和度的硫酸铵盐析过夜,8 000 r/min 离心 20 min,用 5 mL 柠檬酸/磷酸氢二钠缓冲液(pH 5.0)溶解沉淀,4℃ 透析过夜。

SDS-PAGE 电泳:配制 12% 的分离胶 10 mL,4% 的浓缩胶 4 mL,缓冲液及方法见参考文献^[10]。

1.4 实验方法

1.4.1 沉淀啤酒蛋白硫酸铵饱和度的确定

将啤酒后酵液过滤,取上清液分成 15 份,每份 50 mL,分别加入硫酸铵使饱和度达到 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%,磁力搅拌器搅拌 5 min,4℃ 冰箱过夜。8 000 r/min 离心 20 min,用 5 mL 柠檬酸/磷酸氢二钠缓冲液(pH 5.0)溶解沉淀,4℃ 透析过夜。啤酒上清液和沉淀中总蛋白用 Bradford 法分析^[11,12]。

1.4.2 脯氨酰内肽酶添加量的确定

以不同添加量将脯氨酰内肽酶添加在过滤后的后酵液和经脯氨酰内肽酶处理的后酵液中,37℃ 恒温

水浴 1 h,测定 SASPL 值(10 mL 啤酒样品中所添加饱和硫酸铵溶液的极限毫升数),确定脯氨酰内肽酶的最适添加量^[13]。

2 结果与讨论

2.1 沉淀啤酒蛋白硫酸铵饱和度的确定

按方法 1.4.1 将啤酒后酵液进行样品处理,对其上清液和沉淀中蛋白浓度进行测定,结果如图 2。由图 2 可知,随着硫酸铵饱和度的增加,啤酒中的沉淀蛋白增多,当硫酸铵饱和度达到 75% 时,沉淀的啤酒蛋白趋于稳定,达到 0.371 mg/mL,占总蛋白的 91.5%。

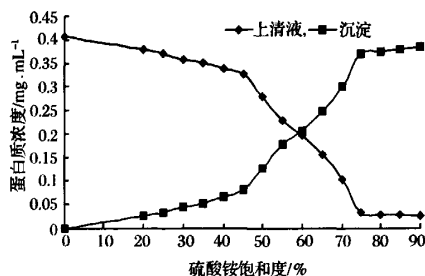


图2 不同硫酸铵饱和度上清液和沉淀中蛋白质含量

2.2 脯氨酰内肽酶活性的测定

由图 3 可知,在 0~10 min 脯氨酰内肽酶活力逐渐上升;10~60 min 的酶活力略微下降,下降趋势缓慢;60~120 min 的酶活由 4.02 U/mL 迅速下降到 0.62 U/mL。可见在初反应阶段,脯氨酰内肽酶保持了较高的活性,但随着反应时间的增加,酶活降低。当反应时间为 10 min 时,脯氨酰内肽酶酶活达到最大值为 5.04 U/mL。

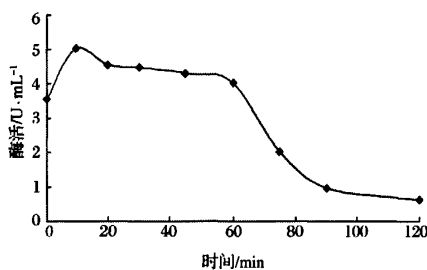


图3 不同反应时间脯氨酰内肽酶活力变化

2.3 脯氨酰内肽酶添加量的确定

由图 4 可知,脯氨酰内肽酶添加量在 0~5 mg/L 时,SASPL 值随着脯氨酰内肽酶添加量的增加而增加,当脯氨酰内肽酶添加量达到 5 mg/L 以后,SASPL 值趋于稳定。SASPL 值越高,则残留于啤酒液中

易引起混浊的高分子量蛋白质越少,啤酒的胶体稳定性也越强。因此确定脯氨酰内肽酶最适添加量为 5 mg/L。

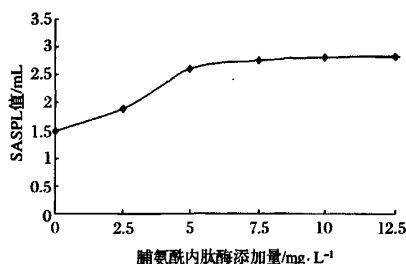
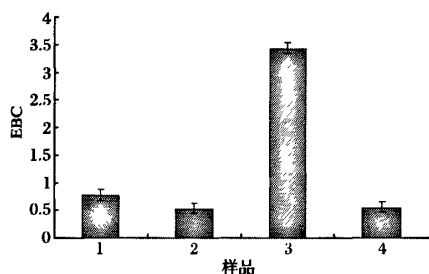


图4 不同脯氨酰内肽酶添加量的 SASPL 值

2.4 脯氨酰内肽酶添加对啤酒冷混浊的作用

由图5中1,2对比可知,后酵液经脯氨酰内肽酶处理后,样品的浊度下降。由3,4对比可知,未经过脯氨酰内肽酶处理的样品,在0℃下保存48h后,浊度上升较多,而经过脯氨酰内肽酶处理过的样品的浊度几乎不变。说明处理后的样品中啤酒冷混浊蛋白含量很少,没有出现明显的冷混浊现象。可见,在啤酒生产中添加脯氨酰内肽酶是减少啤酒冷混浊现象的一种有效手段。



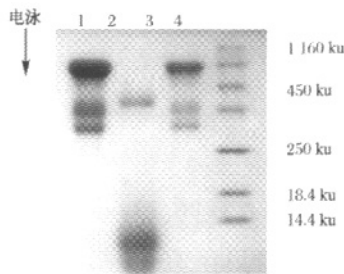
1—后酵液;2—经 PEP 处理的后酵液;3—后酵液 0℃保存 48 h
4—PEP 处理的后酵液 0℃保存 48 h

图5 啤酒样品的浊度分析

2.5 啤酒蛋白分子量的测定

将脯氨酰内肽酶处理的啤酒蛋白和未经脯氨酰内肽酶处理的啤酒蛋白进行蛋白电泳。由图6可知,酶的分子质量为66 ku、35 ku和25~35 ku。未经脯氨酰内肽酶处理的啤酒蛋白分子质量为8~14.4 ku和35~45 ku,其中分子质量为35~45 ku的蛋白为泡沫蛋白,分子质量8~14.4 ku的蛋白为混浊活性蛋白^[14,15]。在啤酒里,混浊活性蛋白主要起源于富含脯氨酸的α醇溶蛋白(大麦醇溶蛋白)。加入脯氨酰内肽酶经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,啤酒蛋白中8~14.4 ku的蛋白条带完全消失,说明混浊活性蛋白被脯氨酸蛋白内肽酶完全水解,又因为混浊活

性蛋白富含脯氨酸,可初步说明脯氨酸蛋白内肽酶能够特异性地切割蛋白质和肽链碳端的脯氨酸残基。



1—经脯氨酰内肽酶处理的啤酒蛋白;2—未经脯氨酰内肽酶处理的啤酒蛋白;3—脯氨酰内肽酶;4—蛋白 Marker

图6 SDS-PAGE 电泳图

3 结 论

(1)确定沉淀啤酒蛋白的最适硫酸铵饱和度为75%,此时沉淀的啤酒蛋白占总蛋白91.5%。

(2)通过测定,经脯氨酰内肽酶处理的后酵液的浊度下降很多,即使在0℃下保存48h后,浊度也不会上升很多,说明在啤酒生产上使用脯氨酰内肽酶能够很好的减少啤酒冷混浊现象,有效地提高啤酒的非生物稳定性,提高啤酒的质量和档次。

(3)经过 SDS-PAGE 电泳分析可知,脯氨酰内肽酶水解的蛋白是啤酒样品中分子量8~14.4 ku的混浊蛋白。

参 考 文 献

- 郝爱军,冯丽萍.影响啤酒非生物稳定性的因素讨论[J].山西食品工业,2003,6(4):28~29
- 宋常欣,陈玲.啤酒非生物稳定剂的应用和比较[J].食品与发酵工业,2001,27(4):79~80
- 李民,陈常庆.脯氨酰内肽酶研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2000,27(2):171~174
- Robinson E E, Maxwell L S R, Thorpe G H G. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence[J]. Free Radical Res, 1997, 26: 315
- 田宗奇,敖国峰.脯氨酸特效内切蛋白酶应用试验[J].啤酒科技,2006,(1):60~61
- 刘小华,张美霞,于春梅.考马斯亮蓝法测定壳聚糖中蛋白的含量[J].中国交通医学杂志,2006,20(2):159~160
- Luppo Eneds, Peter Dekker. Extracellular prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(20):7950~7957
- 张英,程劲松. SIGRIST 浊度仪的应用性研究[J]. 酿酒科技, 2006, (8): 33~34, 36
- Lopez, Michel, Luppo. Method for the prevention or reduc-

- tion of haze in beverages. EP 1326 957 B1, 2003, 15~16
- 10 陈亚飞, 孙宇, 高丰衣. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛇毒抗瘤蛋白的相对分子质量[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(5): 300~303
 - 11 Bradford, M. M. Anal. Biochem [J]. 1976, 72: 248
 - 12 杨桂兰, 郭学平. Lowry法和Bradford法测定玻璃酸钠中蛋白质含量的比较[J]. 中国生化药物杂志, 2002, 24(3): 131~133
 - 13 战 胜, 田国林. 利用 SASPL 值提高啤酒胶体稳定性[J]. 酿酒科技, 2000, (4): 64~65
 - 14 侯进飞, 向先长, 王晓媛, 等. 啤酒冷混浊蛋白的分析及硅胶、PVPP吸附效果比较[J]. 酿酒科技, 2006, (12): 44~47
 - 15 张峻炎, 田亚平, 陆 健. 啤酒泡沫稳定性与蛋白酶的关系[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(9): 51~56

Study on Hydrolysis of the Protein in Beer by Prolyl Endopeptidase

Zhou Lina¹, Zhang Lu¹, Lu Fuping², Yang Di², Xiang Xianchang²

1(Life Science and Engineering College, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

2(Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT Non-biological stability was analyzed by cold haze trial through adding the prolyl endopeptidase (PEP) to the fermented wort. The results showed that 5 mg/L prolyl endopeptidase could effectively improve non-biological stability of beer. The proteins in beer were precipitated with 75% ammonium sulfate, and analyzed by SDS-PAGE. The results showed that proteins in the beer was composed of 8~14.4 ku and 35~45 ku bands. The disappearance of the band 8~14.4 ku in the sample when added prolyl endopeptidase indicated that the protein in the beer was hydrolysed by Prolyl endopeptidase.

Key words proteins in beer, prolyl endopeptidase, cold haze, SDS-PAGE electrophoresis

行业动态

“高活力 α -乙酰乳酸脱羧酶的研制与应用”获国家科技进步奖

2008年1月8日,在北京召开的国家科学技术奖励大会上,南宁市“高活力 α -乙酰乳酸脱羧酶的研制与应用”科技成果项目获得2007年“国家科学技术进步奖二等奖”。 α -乙酰乳酸脱羧酶(α -Acetolactate Decarboxylase, ALDC)是啤酒制造工业一种重要的酶制剂,对缩短啤酒发酵周期、提高啤酒产量和质量效果明显。该科技项目由南宁市科技局连续多年重点立项实施的和大力扶持,南宁邦尔克生物技术有限责任公司联合广西大学、南宁中诺生物工程有限责任公司等公司共同承担。

2001年,该项目作为中南六省区唯一优秀产业化成果参加了国家“863”计划15周年成就展,2006年同时获得南宁市及广西科学技术进步奖一等奖。

1997年,“ α -乙酰乳酸脱羧酶”被列入国家“863”计划项目,2000年被列入国家火炬计划项目,2005年起草制定ALDC(α -乙酰乳酸脱羧酶)国家标准,其技术水平达到国际先进水平,拥有自主知识产权,获国家发明专利。目前,该项目已形成年产60t规模,累计实现产值7296万元,纳税786万元,成为国内最大 α -乙酰乳酸脱羧酶生产企业,填补了国内空白。

该项目在我国150多家啤酒企业广泛推广使用,国内市场占有率超过60%,使产品价格从1997年以前3000元/kg,降至现在的500元/kg,使我国啤酒产业每年直接受益达8000万元以上,直接贡献效益超过10亿元,间接受益累计超过20亿元,提高了我国啤酒工业的国际竞争力,为我国民族啤酒工业的发展做出了巨大贡献,并先后出口到比利时、英国、德国、奥地利、巴西、越南等20多个国家。

帝斯曼与Roquette联手开发生物基丁二酸

荷兰生命材料技术公司帝斯曼(DSM)表示,该公司将与法国的淀粉、衍生物及多羟基化合物生产商Roquette公司联手开发生物可再生丁二酸的发酵生产技术,并使其投入商业化生产。

为此,两公司将在法国Lestrem地区建设1家丁二酸生产示范厂。该厂将生产生物基高性能材料,并于2009年投产运行。帝斯曼表示,此项技术试车成功后将在2年内扩大生产规模。此项生产技术采用可再生的能源,通过发酵法生产生物基丁二酸,可节约能源30%~40%,同时减少CO₂的排放量。

目前,丁二酸多作为原油和天然气的衍生物生产制得,主要用于制药、食品和汽车工业,也可作为一些高性能聚合物生产的中间体使用。