

大麦及其发芽过程中热稳定性蛋白的研究

赵淑娟¹, 杜立群^{1,2}, 王 晋¹, 王枝梅¹, 赵长新¹

(1. 大连工业大学生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034; 2. 大连獐子岛渔业集团股份有限公司, 辽宁 大连 116001)

摘 要: 大麦热稳定性蛋白对啤酒的口感风味、泡沫及胶体稳定性等品质起着主要的作用, 利用 Bradford 法和 SDS-PAGE 电泳技术对大麦及其发芽过程中的热稳定性蛋白组成进行了分析和比较。结果显示, 大麦发芽过程中部分热稳定性蛋白条带逐渐消失, 热稳定性醇溶蛋白在发芽过程中遭受蛋白水解其含量最终有所减少, 热稳定性水溶蛋白在发芽过程结束时其蛋白含量有所增加。从而根据大麦或麦芽中的热稳定蛋白组成及其含量预测啤酒中的蛋白组成, 以便改进制麦和酿造技术, 获得高质量的麦芽和啤酒。

关键词: 啤酒酿造; 大麦; 热稳定性蛋白; 发芽; 电泳

中图分类号: TS262.5 ; TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2009)04-0021-04

Study on Heat-stable Protein in Barley and in Its Germination Process

ZHAO Shu-juan¹, DU Li-qun^{1,2}, WANG Jin¹, WANG Zhi-mei¹ and ZHAO Chang-xin¹

(1. College of Biology & Food Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034;

2. Zhangzidao Fishery Co. Ltd. Group, Dalian, Liaoning 116001, China)

Abstract: Heat-stable protein in barley plays important roles in the formation of beer flavor, beer taste, beer foam and beer colloid stability. The heat-stable protein in barley and in its germination process was analyzed by Bradford method and sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results showed that some heat-stable protein profiles disappeared gradually during barley germination, and heat-stable hordein proteins were exposed in proteolytic process which would reduce its content, by contrast, the content of heat-stable water-soluble protein increased by the end of barley germination. Therefore, beer protein profile could be predicted according to heat-stable protein profile in barley or malt so that malt-making and beer-brewing techniques could be improved to produce high-quality malt and beer.

Key words: beer-brewing; barley; heat-stable protein; germination; SDS-PAGE

大麦作为啤酒酿造的重要原料, 其品质的优劣在很大程度上决定着啤酒的质量, 而蛋白质作为大麦主要成分之一, 对麦芽与成品啤酒的质量起着非常重要的作用。大麦中蛋白质占带皮大麦总重量的 8%~15%, 醇溶蛋白是大麦中发现的最丰富的蛋白(40%~50%)^[1], 根据其溶解特性可分为清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白, 一般认为清蛋白的含量较低, 占总蛋白的 3%~5%, 球蛋白的含量在胚乳中含量较高, 占总氮的 10%~20%, 而谷蛋白占 35%~45%。大麦中部分蛋白质由于其结构及功能上的特性赋予其良好的热稳定性和内蛋白水解酶抗性, 并成为决定啤酒的口感风味、泡沫及胶体稳定性等品质指标的主要因素^[2~4]。大麦热稳定蛋白比较重要的是蛋白质 Z 和 LTP1(磷脂转移蛋白), 它们与啤酒中其他蛋白对啤酒泡沫形成和稳定有主要作用^[5~6], 蛋白质 Z 能够增强泡沫稳定性并可能参与啤酒的冷浑浊的生成^[7]。

本论文利用 Bradford 法和 SDS-PAGE 对大麦及其

发芽过程中热稳定性蛋白及其含量做了分析和测定, 并比较了大麦及发芽过程中 4 类热稳定蛋白的组成及含量变化, 为制麦及啤酒生产中的质量改进提供了方法和依据。

1 材料与方法

1.1 材料和设备

大麦与麦芽: Schooner、Prestige、Gairdner、Metcalf、甘啤二号、甘啤三号、垦啤二号, 均由中粮麦芽(大连)有限公司惠赠。

试剂: SDS-PAGE 低分子量蛋白质标准(TIAN-GEN), 牛血清白蛋白, 丙烯酰胺, 甘氨酸(Amresco), SDS, 过硫酸铵, TEMED, 其余试剂均为国产分析纯。

仪器: ZPS-250H 智能恒温恒湿培养箱(黑龙江东拓仪器制造有限公司), Unic-7200 分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司), JM-250 型小型电泳仪(大连捷迈科

基金项目 国家科技部“十一五”科技支撑项目(2007BAK36B01)。

收稿日期: 2008-12-22

作者简介 赵淑娟(1980-), 女, 内蒙古人, 硕士研究生, 助教, 主要从事蛋白质分离与纯化方面的研究。

通讯作者 赵长新(1955-), 男, 甘肃宁夏人, 教授, 硕士生导师, E-mail: zhaochangxin@126.com。

贸有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 微型制麦工艺

Steep: W6-D12-W4-D2, 水温 16 °C (其中: W 代表湿浸, D 代表干浸);

Ger: 15 °C-15 °C-15 °C-15 °C (96 h);

RevertAir(KRL%): 30 %-30 %-50 %-50 %。

发芽期间每日翻麦 1 次, 保持适当湿度, 使麦芽含水率不低于 40 %。原麦记为发芽 0 h, 每隔 24 h 取样, 液氮研磨并保存于 -20 °C。

1.2.2 热稳定性蛋白的提取

称取经过液氮研磨的大麦与麦芽粉 1 g (扣除水分的绝干重量), 置于塑料离心管中, 加入 10 mL 去离子水, 置于 60 °C 水浴中提取 1 h, 离心 15 min 取上清液, 作为水溶蛋白 (清蛋白); 在沉淀中再添加 5 % (w/v) NaCl 溶液 10 mL, 重复提取过程, 上清液为盐溶蛋白 (球蛋白); 在沉淀中再添加 70 % vol 乙醇 (含少量巯基乙醇) 溶液 10 mL, 重复提取过程, 获得醇溶蛋白; 剩余的沉淀中添加 0.2 % 的 NaOH 溶液 10 mL, 重复提取过程, 获得碱溶蛋白质 (谷蛋白)。将上述 4 种蛋白粗提液置于沸水浴 (100 °C) 30 min, 离心弃去沉淀, 上清液即为大麦热稳定蛋白提取液。

1.2.3 热稳定蛋白质含量测定及 SDS-PAGE

蛋白质含量测定应用 Bradford 法, 使用牛血清白蛋白作为标准蛋白。电泳使用 12 % 分离胶 (80 mm×80 mm×1 mm), 5 % 浓缩胶 (胶高 8 mm), 电泳凝胶使用考马斯亮蓝 R250 染色^[8]。

2 结果与分析

2.1 大麦及其发芽过程中热稳定性水溶蛋白(图 1、图 2)

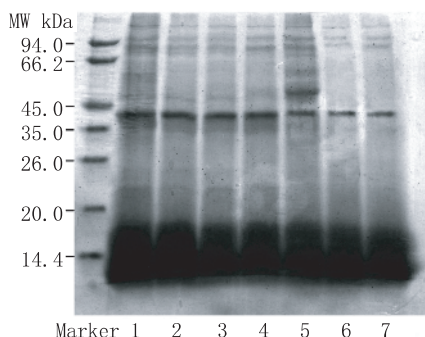


图 1 不同品种大麦热稳定水溶蛋白 SDS-PAGE 图谱

从图 1 可以看出, 不同品种大麦的热稳定性水溶蛋白分子量主要集中在 43 kDa 与 5~20 kDa 两部分, 前者 43 kDa 处条带为大麦蛋白质 Z, 后者 10 kDa 的条带主要为 LTP1, 其余 <15 kDa 的多肽大部分为大麦淀粉酶抑制剂^[9]。同时出现少量分子量为 72 kDa 的冷混浊蛋白片段, 其中 5 号大麦 (国产甘啤二号) 出现一条 50 kDa 的醇溶蛋白 D 片段条带。大麦蛋白质 Z 是胚乳中主要的清蛋白, 是一种疏水性糖蛋白, 在大麦和麦芽中蛋白质 Z 包括 Z4 和 Z7 两种异构体, 前者占蛋白质 Z 总量的 80 %^[10]。LTP1 是由大麦糊粉层分泌的球蛋白, 最初被称作淀粉酶 / 蛋白酶抑制剂 (PAPI)^[11], 是一种分子量为 9.7 kDa 的糖蛋白, 包含 91 个氨基酸残基组成的 4 个 α 螺旋片段^[12]。

白, 是一种疏水性糖蛋白, 在大麦和麦芽中蛋白质 Z 包括 Z4 和 Z7 两种异构体, 前者占蛋白质 Z 总量的 80 %^[10]。LTP1 是由大麦糊粉层分泌的球蛋白, 最初被称作淀粉酶 / 蛋白酶抑制剂 (PAPI)^[11], 是一种分子量为 9.7 kDa 的糖蛋白, 包含 91 个氨基酸残基组成的 4 个 α 螺旋片段^[12]。

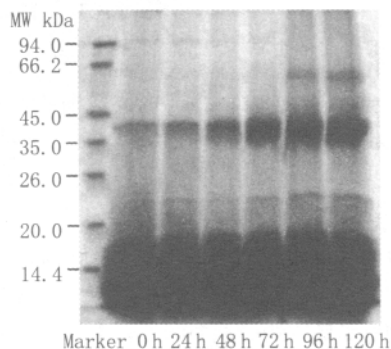


图 2 大麦发芽过程热稳定水溶蛋白 SDS-PAGE 图谱

从图 2 可以看出, 蛋白质 Z 含量随发芽过程持续增加, 能够看到该条带颜色加深, 主要是因为大麦蛋白质 Z 在胚乳中以“自由”(20 %~30 %)和“结合”(70 %~80 %)两种形式存在, 发芽过程中随着胚乳的溶解, 后者不断释放成为“自由”形式。在发芽后期出现一条原麦中没有发现的 57 kDa 条带, 此蛋白与在水稻 (*Oryza sativa*) 中发现的蛋白 P0529E05.3 相类似^[13]。在 20~26 kDa 之间出现一条不清晰带, 此蛋白为盐溶蛋白, 具体结构和特性目前还不清楚。

2.2 大麦及其发芽过程中热稳定性盐溶蛋白

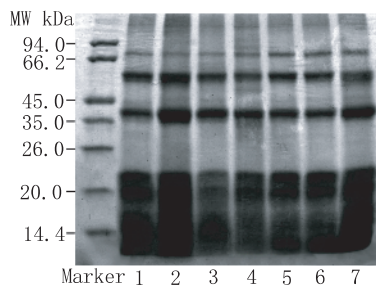


图 3 不同品种大麦热稳定盐溶蛋白 SDS-PAGE 图谱

从图 3 可以看出, 不同品种大麦的热稳定性盐溶蛋白分子量主要集中在 72 kDa、57 kDa、43 kDa 与 5~23 kDa 4 部分。其中少量分子量为 72 kDa 的蛋白为冷混浊蛋白片段, 43 kDa 处条带为大麦蛋白质 Z, 小分子量蛋白中 10 kDa 的条带主要为 LTP1, 其余 <15 kDa 的多肽大部分为大麦淀粉酶抑制剂。

从图 4 可以看出, 随着发芽的进行, 条带 72 kDa 和 57 kDa 的蛋白逐渐消失, 是在浸麦结束后被蛋白酶分解所致。小分子蛋白 18~23 kDa 的条带也逐渐消失, 43 kDa 蛋白条带与 5~18 kDa 的蛋白条带发芽结束后仍然保留存在。

2.3 大麦及其发芽过程中热稳定性醇溶蛋白

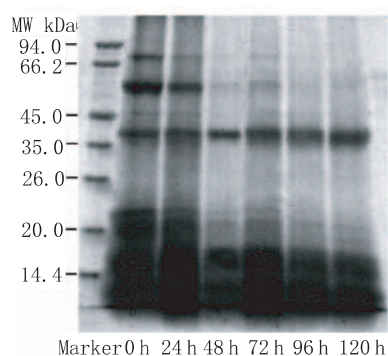


图4 大麦发芽过程热稳定盐溶蛋白 SDS-PAGE 图谱

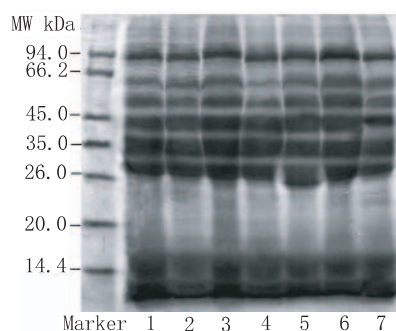


图5 不同品种大麦热稳定醇溶蛋白 SDS-PAGE 图谱

从图5可以看出,热稳定性醇溶蛋白分子量主要集中在94 kDa、60 kDa、54~26 kDa与18~5 kDa 4部分。其中94 kDa为碱溶蛋白,54~26 kDa条带比较浓重,属于B和C醇溶蛋白,是大麦热稳定醇溶蛋白的主要部分,并与麦芽质量密切相关。分子量为54~60 kDa的条带蛋白是C大麦醇溶蛋白,不含半胱氨酸,可能含甲硫氨酸。分子量为12~16 kDa的条带蛋白是A大麦醇溶蛋白,是疏水蛋白,其氨基酸组成与小麦的CM可溶蛋白组成相似。分子量为36~45 kDa的条带蛋白是B大麦醇溶蛋白,富含硫氨基酸,是单体通过分子内二硫键连接形成的混合物,也可能含有分子间二硫键形成的聚合物。

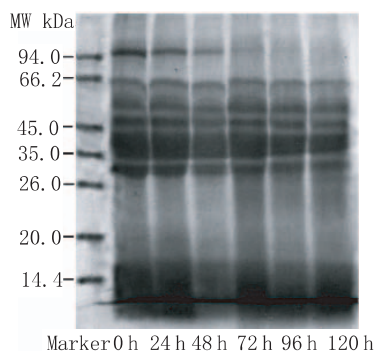


图6 大麦发芽过程热稳定醇溶蛋白 SDS-PAGE 图谱

从图6可以看出,随发芽过程持续增加,94 kDa条带逐渐消失,60 kDa与54~26 kDa条带颜色逐渐变淡,说明在发芽的过程中部分B和C大麦醇溶蛋白被分解成小分子的多肽。

2.4 大麦及其发芽过程中热稳定性碱溶蛋白

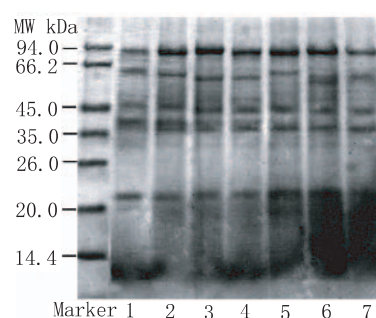


图7 不同品种大麦热稳定碱溶蛋白 SDS-PAGE 图谱

从图7可以看出,不同品种大麦的热稳定性碱溶蛋白分子量主要集中在94 kDa、60 kDa、50 kDa、43 kDa与5~23 kDa 5部分。其中43 kDa处条带为大麦蛋白质Z,有些模糊的50 kDa处条带为醇溶蛋白D片段条带,是由5号基因长臂上的Hor3基因座编码的,含多量甘氨酸。热稳定性碱溶蛋白质主要是高分子量的大麦贮存蛋白,而低分子量的条带相对含量非常低,其中国产的5~7号大麦低分子量蛋白高于进口的1~4号大麦。

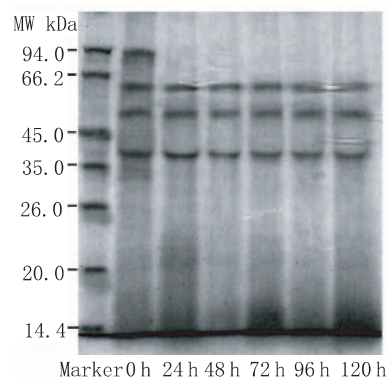


图8 大麦发芽过程热稳定碱溶蛋白 SDS-PAGE 图谱

从图8可以看出,随发芽过程的延长,能够看到高分子量的94 kDa条带浸麦结束后消失,其他3种高分子蛋白在发芽过程中基本没有变化。碱溶蛋白富含谷氨酸和脯氨酸,并含有较多的甘氨酸,是由通过二硫键连接的多肽单体组成,这些特殊的结构导致大部分高分子量的碱溶蛋白具有良好的热稳定性。

2.5 大麦及其发芽过程中热稳定蛋白含量

Bradford法测定的不同品种大麦热稳定性蛋白含量如图9所示,大麦热稳定醇溶蛋白含量最高,国产大麦其含量高于进口大麦,主要原因是国产大麦总蛋白含量也高于进口大麦(1~7号大麦总蛋白测定结果分别为11.2%、10.8%、11.9%、11.4%、13.5%、13.0%和12.6%)。大麦热稳定性碱溶蛋白含量最低,略低于大麦热稳定水溶蛋白。实验观察发现,与大麦总蛋白比较,盐溶蛋白热处理后沉淀较少,能够耐受较高温度而不变性,水溶蛋白、碱溶蛋白与醇溶蛋白在加热处理后沉淀较多,

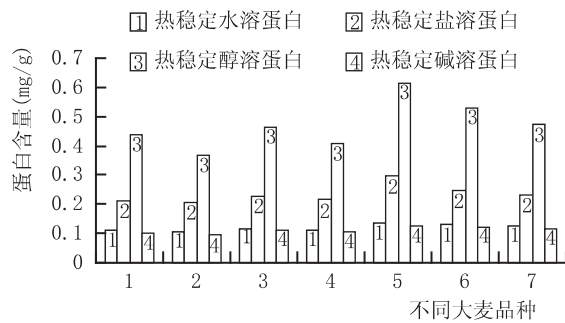


图 9 不同大麦品种热稳定性蛋白含量

且水溶蛋白沉淀最明显,可能蛋白存在的环境介质在加热的过程中有可能影响蛋白质的热稳定性。

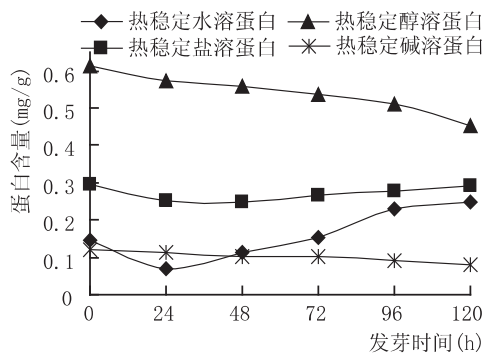


图 10 大麦发芽过程中热稳定性蛋白含量变化

原麦及发芽各阶段热稳定性蛋白含量结果(图 10)可以看出,热稳定性水溶蛋白含量在浸麦的 24 h 内急剧下降,而后逐渐上升,发芽结束时其含量明显高于原麦中含量,其主要源于部分醇溶蛋白萌发过程的酶解。热稳定性盐溶蛋白在浸麦的 24 h 内下降,随着发芽过程的进行其含量逐渐增加,最终发芽结束后热稳定盐溶蛋白与原麦含量相当。热稳定性醇溶蛋白含量随着发芽的进行,其含量明显降低,且浸麦的 24 h 内下降最明显,最终发芽结束时热稳定醇溶蛋白含量明显下降。热稳定性碱溶蛋白随着发芽的进行其含量逐渐下降,发芽结束时其热稳定碱溶蛋白含量有小幅度的降低。

3 结论

3.1 大麦经过发芽结束后所存在的热稳定性蛋白质主要有:分子量为 43 kDa 与 5~23 kDa 的热稳定性水溶蛋白与盐溶蛋白部分,分子量为 60 kDa、26~54 kDa 与 5~18 kDa 热稳定性醇溶蛋白部分,分子量为 60 kDa、50 kDa、43 kDa 与 5~23 kDa 热稳定性碱溶蛋白部分。其中分子量为 43 kDa 热稳定蛋白溶解性很强,4 类蛋白中均存在此种蛋白,分子量为 60 kDa 的蛋白仅存在与醇溶与碱溶蛋白之中。

3.2 大麦发芽过程中热稳定性水溶蛋白有所增加,其中蛋白质 Z 增加尤为明显,热稳定盐溶蛋白条带为 72 kDa

和 57 kDa 的蛋白逐渐消失,热稳定醇溶蛋白与碱溶蛋白的 94 kDa 条带逐渐消失。热稳定醇溶蛋白含量随着发芽的进行不断下降,热稳定性水溶蛋白含量随着发芽的进行最终有所增加。

参考文献:

- [1] Osman, A. M., Coverdale, S. M., Cole, N., Hamilton, S. E., Jersey, J., & Inkerman, P. A. Characterization and assessment of the role of barley malt endoproteases during malt and mashing [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2002, 108: 62-67.
- [2] Kapp G R, Bamforth C W. The foaming properties of proteins isolated from barley[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2002, 82: 1276-1281.
- [3] Evans D E, Robinson L H, Sheehan M C, Tolhurst R L, Hill A, Skerrett J S, Barr A R. Application of immunological methods to differentiate between foam-positive and haze-active proteins originating from malt[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemistry, 2003, 61: 55-62.
- [4] Evans D. E., & Sheehan, M. C. Do not be fobbed off: The substance of beer foam - a review[J]. Journal of American Society of Brewing Chemistry, 2002, 60: 47-57.
- [5] Ferreira I. M. P. L. V. O., Jorge, K., Nogueira, L. C., Silva, F., & Trugo, L. C.. Effects of the combination of hydrophobic polypeptides, iso-a-acids, and malto-oligosaccharides on beer foam stability[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 53: 4976-4981.
- [6] Nierop, S. N. E., Evans, D. E., Axcell, B. C., Cantrell, I. C., & Rautenbach, M. Impact of different wort boiling temperatures on the beer foam stabilizing properties of lipid transfer protein 1[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2004, 52: 3120-3129.
- [7] Sorenson S. B., Bech L. M., Muldbjerg et al. Barley lipid transfer protein 1 is involved in beer foam formation[J]. Tech Q. Master Brew. Assoc. Am. 1993, 30: 136-145.
- [8] 薛洁. 大麦蛋白质的组成研究[J]. 酿酒科技, 2003, (4): 67-69.
- [9] M. Alison Dunn, Alison Morris, Peter L. Jack et al. A low-temperature-responsive translation elongation factor 1 α from barley [J]. Mol Gen Genet, 1991, 229: 389-394.
- [10] Evans D. E., Nischwitz R., Stewart D. C., et al. The influence of malt foam-positive proteins and non-starch polysaccharides on beer foam quality[J]. European Brewing Convention: Symposium on Beer Foam Quality, 1999, 27: 114-125.
- [11] Leiper K. A., Stewart G. G., & McKeown, I. P. Beer polypeptides and silica gel. Part II. Polypeptides involved in foam formation[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2003, 109: 73-79.
- [12] Lindorff-Larsen K., & Winter J. R. Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases[J]. FEBS Letters, 2001, 488: 145-148.
- [13] Perrocheau L., Rogniaux H., Boivin P., et al. Probing heat-stable water-soluble proteins from barley to malt and beer[J]. Proteomics, 2005, 5: 2849-2858.