

啤酒中疏水性蛋白研究现状与影响啤酒中疏水性蛋白的因素

陶 林¹, 曹 健¹, 王德良², 高家明³, 王丽华²

(1. 河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450001; 2. 中国食品发酵工业研究院, 北京 100027;
3. 中国工业经济联合会, 北京 100083)

摘 要: 表面疏水性(Surface hydrophobicity)是蛋白质三级结构中最重要的一种特性,它影响分子间的相互作用,如蛋白质与蛋白质、蛋白质与脂类等小配位体间的缔合作用或其他大分子间的相互作用。研究发现,啤酒中构成啤酒泡沫最重要的物质为泡沫活性蛋白,它是一类表面疏水性很强的高分子蛋白质。弄清泡沫活性蛋白质具有的泡沫功能及其疏水性大小的原因和本质,对于泡沫蛋白的研制开发、国内啤酒泡沫的普遍匮乏现象的解决等方面具有重要的理论和现实意义。介绍了国内外啤酒中疏水性蛋白方面的研究现状及其发展趋势,对影响啤酒中疏水性蛋白的因素也做了一定概述。

关键词: 啤酒; 表面疏水性; 泡沫活性蛋白; 疏水性蛋白

中图分类号: TS262.5; TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2010)11-0040-04

Research Progress in Hydrophobic Polypeptides in Beer & Its Influencing Factors

TAO Lin¹, CAO Jian¹, WANG De-liang², GAO Jia-ming³ and WANG Li-hua²

(1. School of Bioengineering, He'nan University of Technology, Zhengzhou, He'nan 450001; 2. China National Institute of Food Fermentation Industries, Beijing 100027; 3. China Federation of Industrial Economics, Beijing 100083, China)

Abstract: Surface hydrophobicity is the most important property of the protein tertiary structure, It affects molecular interactions such as the complexes of protein-protein, protein and lipids which are small ligands, and the interactions between other large moleculars. In recent years, the study found that the most important substance for the formation of beer foam is foam-positive proteins which are higher surface hydrophobicity and high-molecular-weight. Accordingly, full understanding of the function of foam-positive proteins and its hydrophobicity nature is of great theoretical and practical significance in the fields including the development of foam-positive proteins and the solution to the lack of foam for homemade beer etc. In this paper, the research progress in hydrophobic polypeptides in beer at home and abroad and its development trend and its influencing factors were introduced.

Key words: beer; surface hydrophobicity; foam-positive proteins; hydrophobic protein

疏水性(hydrophobicity)是一个物理化学名称,意指非极性溶质在极性水中所呈现的“不稳定”状态,并由此引伸出一系列熵和分子重新分布及排列的变化^[1]。即水分子围绕非极性分子排列成一个个水相中的“空穴”,水分子的排列变化制约了它的自由运动,使整个体系的熵降低。这种疏水结构会随温度升高而“融解”,以使熵得到调整^[2]。可见,疏水力是种较强的长距引力,在胶体溶液中起着重要的稳定作用^[3]。

1 疏水性蛋白的发现及研究

20 世纪 70 年代初,Marshall 等观察到屈挠杆菌及生

丝微菌在油、水双相面的疏水性分布,引起了研究者对疏水性在微生物细胞方面的研究兴趣。Rosenberg 等发现微生物细胞表面疏水性能促进微生物粘附于石油表面,进行生长发酵^[4-5]。此外,Wessels 等^[6-7]用担子菌亚门的裂褶菌观察到,一族微小糖蛋白不均匀地分布于菌胞壁外层,它通过微生物细胞表面疏水性的变化来调节细胞生长。此族糖蛋白称为疏水素(hydrophobins),其富含疏水性半胱氨酸。为了更具体地了解疏水性蛋白,研究者对它们的结构及生物物理和生物化学等方面的特性进行了大量的研究。研究发现,疏水蛋白对真菌类的生长和繁殖起

收稿日期:2010-08-31

作者简介:陶林(1984-),男,河南洛阳人,在读硕士研究生。

通讯作者:王德良,中国食品发酵工业研究院,高级工程师,邮箱:wdlpost@163.com。

到非常重要的作用,包括真菌对表面的吸附、稳定性,果肉和空中菌丝的形成,以及对真菌结构的覆盖保护等。

2 啤酒泡沫中的疏水性蛋白

泡沫俗称啤酒之花。泡沫也是啤酒区别于其他酒类的主要特征之一,在啤酒质量指标中占有重要位置。因此,国标 GB4927—2008 将啤酒泡沫作为一项重要感官指标加以考核,并作了具体规定。随着消费者对啤酒知识的不断了解,对啤酒质量提出更高要求。泡沫作为啤酒一项重要质量指标已参与了市场竞争,同时越来越受到消费者重视。多年来,酿造人员对啤酒中多肽进行分析和研究,有几种蛋白质被认为与啤酒泡沫的关系非常密切,其中最主要的是蛋白质 Z (分子量为 43 KDa 的大麦蛋白),另一种则是分子量 9.7 KDa 的脂质转移蛋白(LTP1)^[8-9]。它们位于一定分子量区间内,并具有较强的疏水特性^[10]。其形成稳定泡沫的原因是由于多肽分子的疏水特性而不是分子量大小的观点已被人们广泛接受。

3 啤酒泡沫与多肽关系的概述

啤酒中的多肽可以以不同的形式存在,只有那些具有外部疏水特性的蛋白才具有表面活性^[11-12]。通过对啤酒原液和泡沫形成液成分的分析 and 比较,某一分子区间的蛋白质被研究者公认为是“泡沫活性蛋白”,即形成泡沫及维系泡沫特性的关键因素。

3.1 泡沫活性蛋白概述

啤酒泡沫活性蛋白(foam-positive proteins)指的是含有啤酒泡沫且对啤酒泡沫具有较明显的正作用的蛋白质群体,其主要是一些蛋白肽和低分子的蛋白质^[13],它们位于一定的高分子量区间内,并具有较强的疏水特性^[10]。大量研究结果显示^[14],啤酒中泡沫活性蛋白的唯一来源是麦芽,其是麦芽生产和啤酒酿造时蛋白质分解的含氮物质^[15]。

3.2 泡沫活性蛋白的分类及性质

泡沫活性蛋白,依据分子量分为高分子(MW 35000~50000 Da)蛋白质和低分子(MW 5000~15000 Da)蛋白质。高分子蛋白质和低分子蛋白质主要来源于麦芽^[16];高分子蛋白质主要包括蛋白 Z,低分子蛋白质主要包括脂质转移蛋白 1(LTP1)、大麦醇溶蛋白和谷蛋白的混合组分^[17]等。其中,蛋白质 Z 是最重要的一种泡沫活性蛋白质,包括蛋白质 Z4 和 Z7 两种异构体,Z4 来源于大麦醇溶蛋白质,其相对分子质量为 43276 Da。在大麦和麦芽中,蛋白质 Z4 约占全部蛋白质 Z 的 80 %^[18],所以,针对蛋白质 Z 的研究主要关注蛋白质 Z4。研究表明,糖基化的蛋白质 Z 明显增强了啤酒的泡沫稳定性;在所有的啤酒蛋白中,分子量 40000 Da 的蛋白质具有最大的

表面粘度和弹性特征^[19-21]。脂类转移蛋白(LTP1)是一种分子量约为 9700 Da,能在啤酒泡沫中富集的蛋白质^[22-23]。在煮沸阶段,LTP1 发生不可逆变性变化,从而改变了其免疫反应能力,同时增强了啤酒的泡沫活性^[24]。研究表明,LTP1 具有很强的起泡能力,但其稳定性较差。

3.3 泡沫活性蛋白是区间分子蛋白

泡沫活性蛋白是一类而非单个蛋白质。研究表明^[25],啤酒泡沫中只有分子量介于 10 000~100000 Da 的蛋白质才对啤酒泡沫的产生及其稳定性有明显的效果。主要在 10000~60000 Da 之间的这一部分特定蛋白质被称为泡沫活性蛋白,其有利于啤酒泡沫的形成,其中蛋白质占 65 %、糖占 35 %,因此也被称为糖蛋白^[26]。典型的有蛋白质 Z 及类脂转移蛋白(LTP1),它们多以糖蛋白的形式存在,其中蛋白质约占 70 %。

4 啤酒泡沫中的疏水性蛋白与泡沫稳定的概述

啤酒起泡的过程,就是泡沫蛋白质以疏水端指向泡内亲水端为形式构成泡壁的支架,糖蛋白链具有聚集疏水性氨基酸残基的疏水区域,和被链锁住处于尾端的糖类,使其同时具备亲水特征。在 CO₂ 的促发下,疏水性头朝向泡内,亲水性糖类指向泡外,形成稳定的泡沫构型^[27]。此外,少许异葎草酮起到了与糖类相同的作用,使得发泡蛋白-异葎草酮复合体表面活性增加,泡沫稳定性进一步增强。蛋白质的疏水性是维持泡沫稳定性的一个主要特性。具有较高表面疏水性的蛋白质所形成的泡沫更稳定,而且随蛋白质疏水性的增强而提高^[10]。

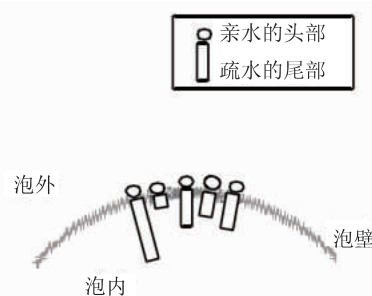


图1 蛋白质泡沫泡壁模拟图

5 泡沫活性蛋白疏水性的研究进展

Bamforth 和 Slack^[15]用疏水作用色谱(HIC)从啤酒中提取、分离了疏水性蛋白质,并研究发现蛋白质的疏水性对发泡具有很重要的作用,泡持性随蛋白质疏水性的增强而提高。泡沫稳定性最理想的啤酒中,疏水性蛋白质在其中的含量较多。Akiko 和 Michael^[28]根据蛋白质的相对疏水性,用 HIC 从啤酒中分离出 5 组泡沫蛋白,泡沫稳定性随各组蛋白质疏水性的增强而提高。用 Bradford 法对疏水性最强的组分进行考马斯亮蓝染色试验发现,

与染料结合的蛋白质所占比例很高,这同时也说明其中多为 MW>5000 的高分子蛋白质。Yokoi 和 Yamashita 等^[29]研究表明,啤酒中蛋白质具有不同的疏水性,且疏水性蛋白质和泡沫的关系较为密切^[30]。麦芽中的蛋白质 Z、LTP1、脂粘蛋白等都是具有表面疏水性的蛋白质,是构成啤酒泡沫稳定性的主要蛋白质组分。这些疏水蛋白质的三级结构对其表面的柔韧特性具有重要作用,使大部分蛋白质在气-液界面上容易展开,气泡内部疏水性残基的暴露促使泡沫形成和稳定。Onishi 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,将分离得到的蛋白质按其疏水性和泡沫稳定性的改变能力分为 5 组,并进行了 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,因此认为在泡沫稳定性方面疏水性较其分子量更为重要^[29]。Slack 等^[15]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。Ishibashi 等^[31]应用酶联免疫反应(ELISA)得出与 Onishi 类似的结论,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。

6 酿造工艺对泡沫稳定性的影响^[33]

泡沫稳定性是啤酒的一个重要的品质特征。尽管有许多因素影响啤酒的泡沫稳定性,但最重要的是啤酒中疏水性多肽的含量。啤酒酵母代谢合成一种蛋白酶 A,发酵过程中会通过破损的细胞进入发酵液。蛋白酶 A 可催化疏水多肽的分解,从而降低啤酒的泡沫稳定性。

6.1 高浓酿造与泡沫稳定性

高浓酿造工艺有许多优点,但高浓酿造啤酒的泡沫稳定性比相应的低浓度啤酒要差。主要原因是高浓酿造过程疏水性多肽的含量减少。

6.1.1 在煮沸锅中,20 °P 和 10 °P 麦汁的疏水性多肽含量水平相近。高浓麦汁所用投料量是低浓麦汁的 2 倍,这意味着高浓酿造糖化过程中疏水性多肽的浸出较差。

6.1.2 高浓麦汁发酵过程中疏水性多肽损失较多,因此,至发酵最终阶段,高浓发酵啤酒的疏水性多肽含量明显低于低浓发酵的疏水性多肽含量。

6.1.3 当高浓啤酒被稀释到低浓啤酒的浓度时,其中的疏水性多肽浓度要比低浓发酵啤酒少 50%。高浓酿造啤酒的泡沫持性比低浓酿造的差,高浓酿造的啤酒中疏水多肽含量较少,但泡沫中多肽的疏水率较大,这两个因素对于泡沫稳定性的影响作用是相反的,发酵过程是疏水多肽含量下降的最重要的阶段,以下两点可以说明为什么

发酵过程疏水性多肽损耗最多。

6.1.3.1 发酵过程中产生的气泡消耗大量的泡沫活性物质,这种现象在高浓酿造过程中更为严重。

6.1.3.2 酵母合成蛋白水解酶,这些酶进入发酵液中会降解其中的蛋白质,从而对啤酒的泡沫稳定性产生负面影响,这个过程一般发生在发酵或贮酒过程中。

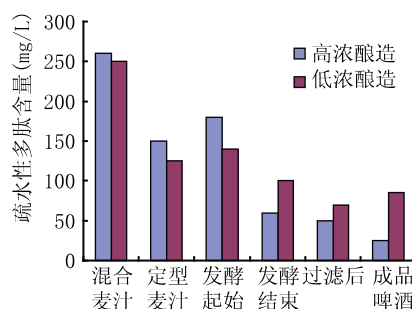


图 2 高浓麦汁(20 °P)和低浓麦汁(10 °P)发酵过程中疏水性多肽含量的变化

6.2 巴氏灭菌与泡沫稳定性

巴氏灭菌啤酒中的蛋白酶被灭活,而未经巴氏灭菌的啤酒中蛋白酶 A 仍具有活性,这使得疏水性多肽被分解,泡沫稳定性下降。

6.3 离心与泡沫稳定性

在发酵之后进行酵母离心,离心过程产生的剪切力促使酵母释放蛋白酶 A,导致疏水多肽含量减少,并使泡沫稳定性下降。

目前,啤酒生产的辅料不断增加。麦芽用量相对减少,同时高浓酿造,离心过滤和膜过滤除菌等取代巴氏灭菌,这些都是对啤酒泡沫稳定性产生负面影响的因素。啤酒中存在如:异 α-酸、蛋白质、金属离子和蛋白黑素等起泡沫因子,这些因子对于泡沫的形成和稳定都具有重要作用。泡沫的骨架是蛋白质,分离出这些蛋白质后认为,多肽的疏水性越强,它的泡沫稳定性越好。

7 展望

疏水性蛋白质已经引起了科学界的广泛关注,目前的研究主要集中在如何实现其在各领域中的具体应用。随着我国纯生啤酒热的悄然兴起和原料选择的多样化,人们对啤酒泡沫中蛋白质的特性提出的问题越来越多,啤酒泡沫蛋白的科研投入也会越来越大。事实上,啤酒泡沫蛋白仍是一个复杂的问题,目前仍是科研人员的一个重要研究课题。对啤酒泡沫内在特性的认知,尤其是泡沫活性蛋白的分布、泡沫活性蛋白疏水性的研究,及其在啤酒中作用机理的认识还十分有限。要解决好这个具有挑战性的问题,仍需要科研工作者进行大量的研究。

参考文献:

- [1] Dill KA. The meaning of hydrophobicity [J]. Science, 1990, 250:297-298.
- [2] Israelachvili JN et al.[J].Science, 1998, 241:798-800.
- [3] Murphy, K. P., Privalov, P. L. & Gill, S. J.[J]. Science, 1990,247:559-561.
- [4] Rosenberg M. Basic and applied aspect of microbial adhesion at the hydrocarbon : water interface[J]. Crit Rev Microbiol, 1991, 18(2): 159-173.
- [5] Gutnick DL et al.[J].J Appl Bacteriol, 1993; 74(Suppl): 125-135.
- [6] Wessels JGH et al.[J].J Gen Microbiol, 1991; 137:2439-2445.
- [7] Gooday GW et al[J]. J Appl Bacteriol, 1993; 74(Suppl): 12-20.
- [8] D. E. Evans & J. Hejgaard[J]. Journal of The Institute of Brewing 1999, (3):38-39.
- [9] 横井成尚,武远航译,啤酒泡沫的重要构成物质-Z 蛋白[J].酿酒科技,1992,(3):38-39.
- [10] Onish. A and Proudlove. M O. Isolation of beer foam polypeptides by hydrophobic interaction chromatography and their partial characterization [J]. J Sci Food Agric. 1994, 65:233-240.
- [11] Harles W Bamforth. Brewing matters to a head: the status of research on beer foam [J]. European Brewery Convention Monograph, 1998, 27:1-21.
- [12] 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.
- [13] Lusk, L, T. Goldstein, H. Ryder, D.[J].Journal of the American Society of Brewing Chemists, 1995:53-93.
- [14] Harles W. Bamforth. Brewing matters to a head: the status of rarch on beer foam [J]. European Brewery Conventiion Monograph 1998:27, 1-21.
- [15] Slack, P., and Bamforth, C. W. The fractionation of polypeptides from barley and beer by hydrophobic interaction chromatography: The influence of their hydrophobicity on foam stability [J]. J. Inst. Brew. 1983, 89:397-401.
- [16] Asano K., Hashimoto N. Isolation and characterization of foaming proteins of beer [J]. J. Am. Soc. Brew. Chem. 1980, 38:129-137.
- [17] Vaag P., Bech M. L., Cameron-Mills V., Svendsen I. Characterization of a beer protein originating from barley [J]. Proc. Congr. Eur. Brew. Conv. 1999, 27: 157-166.
- [18] 叶俊华,顾国贤,陆健.啤酒及其泡沫中蛋白质组分的比较分析[J].无锡轻工大学学报,2003,22(6):46-49.
- [19] Douma, A. C., Mocking-Bode, M., Kooijman, M., Stozenbach, E., Orsel, R., Bekkers, A. C. A. P. A., and Angelino, S. A. G. F. Identification of foam-stabilizing proteins under conditions of normal beer dispense and their biochemical and physiochemical properties [J]. Proc. Congr. Eur. Brew. Conv. 1997, 26:671-679.
- [20] Maeda, K., Yokoi, S. Kamada, K., and Kamimura, M. Foam stability and physiochemical properties of beer [J]. J. Am. Soc. Brew. Chem. 1991, 49:14-18.
- [21] Yokoi, S., Maeda, K., Xiao, R., Kamada, K. and Kamimura, M. Characterization of beer proteins responsible for the foam of beer [J]. Proc. Congr. Eur. Brew. Conv. 1989, 22:593-600.
- [22] Bamforth, C. W. The foaming properties of beer [J]. J. Inst. Brew. 1985, 91:370-383.
- [23] Stowell, K. C. The effect of various cereal adjuncts on head retention properities of beer [J]. Proc. Congr. Eur.Brew. Conv. 1985, 20: 507-513.
- [24] Bech L. M., Vaag P., Heinemann B.,and Breddam K. Throughout the brewing process barley lipid transfer protein 1 (LTP1) is transformed into a more foam promoting form [J]. Proc. Congr. Eur. Brew. Conv. 1995, 25:561-568.
- [25] D. E. Evans & J. Hejgaard[J]. Journal of The Institute of Brewing,1999, (3):159-169.
- [26] 郝俊光,等. 啤酒泡沫蛋白和多肽的研究进展 [J].啤酒科技, 2003,(9):24-26.
- [27] 康明官.特种啤酒酿造技术[M].北京:中国轻工业出版社, 1999.110-115.
- [28] Akiko, O., Michael, O P. Isolation of beer foam polypeptides by Hydrophobic Interaction Chromatography and their partial characterization [J]. Sci Food Agric., 1994, 65:233-240.
- [29] Shigchisa Yokoi, Kazuyuki Yamashita, Naoyuki Kunitake, et al. Hydrophobic beer proteins and their function in beer foam [J]. J. Am. Soc. Brew. Chem. 1994, 52:123-126.
- [30] Mills, E., Kauffman, J A., Morgan, M. R., et al. Immunological study of hydrophobic polypeptides in beer [J]. J. Agric. Food. Chem. 1998, 46:4475-4483.
- [31] Ishibashi, Y., Katui, T., Terano, Y., Hon-no, E., Kogin, A., and Nakatami, K. Application of ELISA to quantitative evaluation of foam-active protein in malting and brewing processes[J]. J. Am. Soc. Brew. Chem. 1997, 55:20-23.
- [32] G.. G.. Stewart; A. Mader; P. Chlup; M. Miedl. The influence of process parameters on beer foam stability[J]. MBAA TQ 2006, 43: 47-51.

茅台北京经销商捐资助学

本刊讯 9月17日,贵州茅台酒股份有限公司北京片区经销商“心系教育、情系后山”捐赠仪式在仁怀市后山民族小学举行。仁怀市委书记房国兴、茅台集团党委书记、总经理袁仁国出席捐赠仪式并分别讲话。来自北京片区的20余名经销商为学校送来了85万元捐款,这笔善款将用于修建后山民族小学综合楼。(小小)