

啤酒中蛋白质及其测定方法研究进展

朱玉魁¹, 李琳¹, 刘国琴^{1,2}, 李冰¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640) (2. 广州珠江啤酒集团有限公司, 广东 广州 510308)

摘要: 啤酒中蛋白质对啤酒品质的各方面有着很大的影响, 尤其是对啤酒泡沫和浑浊的形成。本文在叙述啤酒泡沫和浑浊蛋白质性质的基础上探讨了啤酒中蛋白质的测定方法, 给酿造者提供选择合适的方法来测定和控制啤酒中的蛋白质, 以此来提高啤酒的品质。

关键词: 啤酒; 泡沫; 浑浊; 蛋白质

中图分类号: TS207.3; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)04-0390-04

Research Progress of the Proteins in Beer and their Analysis Methods

ZHU Yu-kui¹, LI Lin¹, LIU Guo-qin^{1,2}, LI Bing¹

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangzhou Zhujiang Brewery Group Company, Guangzhou 510308, China)

Abstract: Proteins in beer had greatly influence on the quality of beer, especially the forming of foam and haze. The analysis methods for proteins in beer were reviewed in this paper to provide dereferences for the measurement and control of the proteins in beer and improve the beer quality.

Keywords: beer; foam; haze; protein

啤酒中蛋白质影响着啤酒的品质的各个方面, 尤其是对啤酒泡沫和浑浊的影响^[1]。因此, 啤酒中蛋白质的测定对酿造者来说十分重要。啤酒中的蛋白质主要来自于原料大麦, 但是由于在制麦、糖化和麦芽汁煮沸过程中蛋白质水解程度的差异, 它已经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部分或完全没有三维结构的多肽链而已。国外的研究者很早已经开始对啤酒中蛋白质的测定进行研究, 其中一些方法经过改进已经用在测定啤酒中的蛋白质^[2]。例如: Kjeldahl 法, 分光光度计法, 双缩脲法, 考马斯亮蓝法, 活性蛋白法, ELISA 等。研究证实蛋白质是啤酒泡沫和浑浊的主要组成部分, 对啤酒的非生物稳定性有着重要的作用。本文在论述啤酒泡沫和浑浊中的蛋白质性质的基础上, 着重总结和分析比较用来测定蛋白质的几种方法, 从而使酿造者能在实际生产中选择合适的方法来控制啤酒中的蛋白质含量, 以此来提高啤酒的稳定性, 达到提高啤酒质量的目的。

1 啤酒泡沫蛋白质

泡沫称为“啤酒之花”, 说明泡沫是啤酒重要质量特性之一。啤酒泡沫的性质包括起泡能力、泡沫外观、

收稿日期: 2007-10-26

基金项目: 广东省自然科学基金研究团队项目 (05200617); 广东省科技计划项目 (2007B020801001)

泡沫持久性和泡沫挂杯性四方面^[3]。经过长期的研究发现影响啤酒泡沫的因素很多, 主要有蛋白质、异 α -酸、CO₂、脂肪酸、醇等物质。而蛋白质和异 α -酸是啤酒泡沫的主要组成成分: 其中蛋白质主要来自于原料大麦中, 但是经过发芽、糖化和煮沸已经发生分解, 已经不是原来的蛋白质, 且大部分蛋白质都和糖类紧密地结合在一起, 故可以看作是糖蛋白。而异 α -酸则是啤酒花中的 α -酸在一定条件下发生异构化而形成的^[4]。

在啤酒蛋白质的研究中, 研究者还发现, 并不是所有的大麦蛋白质都对啤酒泡沫起作用。只有一部分特定的大麦蛋白质与啤酒泡沫形成有关, 这些蛋白质被称为“发泡蛋白”, 又称“泡沫活性蛋白”。它有几个明显特征: 1、主要来源于大麦蛋白中的清蛋白和球蛋白类。2、多以糖蛋白形式存在, 其比例大致是蛋白质占 70%, 糖类占 30%, 且大多数具有疏水性。3、蛋白质分子量大于 10000 Da, 主要是 15~1000 kDa 之间的高分子区间^[5]。Lusk 等人通过试验对啤酒泡沫中的主要蛋白质进行了测定, 最后得到了三种从啤酒泡沫中分离出来的蛋白质: 分子量为 10 kDa 的大麦脂转移蛋白; 来自于蛋白质 Z 的分子量为 40 kDa 的蛋白质和分子量为 12 kDa 的蛋白质。Lusk 等人还认为分子量为 10 kDa 的脂转移蛋白在发芽和酿造发生了微小的改性而变成了影响泡沫稳定性的主要蛋白质; 而 12

kDa 的蛋白质则单独存在对泡沫稳定性没有作用^[6]。Leiper 通过研究认为啤酒中主要有 3 类蛋白质：与泡沫有关的蛋白质 Z、脂转移蛋白质和与啤酒浑浊相关的 15~32 kDa 的醇溶蛋白残片^[7]。而在国内对啤酒中蛋白质的测定的研究报道不是很多。其中周志娟、郝俊光等人利用 SDS-PAGE 电泳对啤酒生产中的蛋白质进行了研究，最后发现制麦和糖化过程是蛋白质变化最明显的阶段，蛋白质的分布和含量呈下降趋势；所检测到的泡沫中蛋白质为 43 kDa 和 7~14 kDa 的蛋白带，7~14 kDa 的蛋白可能是含醇溶蛋白的酶解残片^[8]。此外，郝俊光等人最近还采用 MS 分析方法对啤酒泡沫中可能存在的蛋白质进行了测定，最后在样品啤酒的泡沫中发现了约 30 种蛋白质，还有两种与泡沫稳定性有关的醇溶蛋白质^[9]。

2 啤酒浑浊蛋白质

啤酒是一种成分复杂、稳定性不强的胶体溶液，在贮存过程易产生浑浊沉淀等现象。此外啤酒的非生物稳定性也主要指的是由于非生物原因而引起的啤酒浑浊。因此，正确的认识啤酒浑浊现象的机理以及一些性质对酿造者是十分重要的。

啤酒浑浊分为冷浑浊和永久浑浊。在 1959 年第 7 届欧洲酿造协会的冷浑浊研讨会上，将啤酒冷却至 0 °C 时形成浑浊，再升温至 20 °C 时又复溶，浑浊消失，定义为冷浑浊，它是一种受温度影响的可逆性浑浊；而升温至 20 °C 或以上时不能复溶，浑浊不消失的，定义为永久混浊^[10]。长期的研究发现：由于啤酒中的蛋白质和多酚相互作用，从而导致了啤酒浑浊。同时 Siebert 提出了一种蛋白-多酚作用模式，Chapon 也阐述了一种蛋白-多酚平衡理论，二者都认为蛋白-多酚浑浊的出现主要是由于浑浊敏感蛋白和浑浊敏感多酚的过量或不均衡引起的^[11]。对啤酒中蛋白质的研究一直在进行着，但是至今还没有把啤酒中所有的蛋白质组分全部鉴定出来。对于目前可以分离出来的蛋白质而言也不是所有的蛋白质都是浑浊敏感蛋白，只有富含脯氨酸的蛋白质才易与浑浊敏感多酚作用，这已经在国外学术界达成共识。国外对此研究起步远远早于我国，其中对浑浊敏感蛋白研究最早也较多的是 Asano 等人^[1]。早在 1982 年 Asano 等人就从产生浑浊的啤酒中分离出了多种易引起浑浊的敏感多肽，这些敏感多肽主要来于醇溶蛋白，而且富含脯氨酸，还认为醇溶蛋白不是浑浊蛋白的唯一来源，白蛋白和球蛋白也可能引起浑浊。此外，他们认为除了脯氨酸的含量外，脯氨酸在蛋白中的序列和蛋白质的三维空间结

构也对蛋白质浑浊活性有一定的影响^[12]。在前几年他们又发现并且阐述蛋白质和多酚的比率同样的也对啤酒浑浊产生很大的影响。

3 蛋白质测定方法

蛋白质测定的常用方法是 Kjeldahl 法（凯氏定氮法），如果用此方法来测定啤酒中的蛋白质，它实质上是测定了所有的氨基酸，这样会在辨别啤酒中高分子量蛋白质之间的差异性时有一定的局限性^[13]。因此，对于测定啤酒中的蛋白质，应该根据目的的需要选择合适的测定方法。到目前为止，测定啤酒中的蛋白质（主要是啤酒泡沫和浑浊中的蛋白质）方法主要有：紫外吸收法（UV）、浑浊敏感蛋白法（HA）、考马斯亮蓝法（CBB）、高压液相色谱（HPLC）、电泳（Electrophoresis）、ELISA 等。

3.1 紫外吸收法(UV)

此方法主要是在 280 nm 波长处，对三种氨基酸即色氨酸、酪氨酸和半胱氨酸有吸收。也就是说只有当测定的蛋白质中含有此三种氨基酸或者其中的几种，就可用此方法准确地测定。而在啤酒的酿造过程中，其中部分的色氨酸被破坏掉，会影响到结果。另外，Siebert 等人通过实验还发现啤酒中的单宁酸和表儿茶酸在 280 nm 波长处也有很强的吸收，这使最后的结果变得不准确，且表儿茶酸的影响大于单宁酸。

3.2 考马斯亮蓝法（CBB）

1976 年由 Bradford 建立的考马斯亮蓝法，是根据蛋白质与染料剂相结合的原理设计的，是定量测定微量蛋白浓度的快速、灵敏的方法。主要是考马斯亮蓝 G-250 染料在酸性溶液中与蛋白质结合，使染料的最大吸收峰的位置由 465 nm 变为 595 nm，溶液的颜色也由棕黑色变为兰色。通过测定 595 nm 处光吸收的增加量可知与其结合蛋白质的量。Lewis 等人利用此方法对啤酒中的蛋白质的特异性进行了测定。最后发现此法能够真正反映啤酒蛋白，即分子量大于 2000 Da 的多肽。因为与考马斯亮蓝反应的成分与孔隙体积洗脱下来的组分一致。Sedmak 和 Grossberg 认为考马斯亮蓝能够结合分子量为 5700 Da 的胰岛素和多肽，但是不与分子量小于 2000 Da 的寡肽结合^[13]。因此用该法来测定的只是啤酒中的高分子蛋白，而这些高分子蛋白则对啤酒的泡沫和物理稳定性具有很大的贡献。另外该法操作简单，使用试剂少，速度快，精确度高。然而 Compton 等人研究发现该方法只对含有芳香族氨基酸和碱性氨基酸的多肽有反应^[14]。而啤酒浑浊中的蛋白质中的芳香族氨基酸和碱性氨基酸含量很

少,因此如果用此方法来测定浑浊中的蛋白质时就有较大的偏差。

3.3 浑浊敏感蛋白法(HA)

前面知道,啤酒中浑浊敏感蛋白质不同于其它的蛋白质,因此很多常规的啤酒蛋白质测定方法研究不适合浑浊敏感蛋白。Thompson 和 Forward 采用了一种在加入单宁酸的基础上使啤酒浑浊,从而来测其浊度,而且浑浊形成的程度应该与蛋白质的浓度成一定的比例,使之能够与多酚结合产生浑浊,这被定义为敏感蛋白,相对应的方法被称为浑浊敏感蛋白法。该法原理是单宁与蛋白有较大的亲和性,在啤酒老化过程中,会与蛋白形成浑浊,改变了酒中原来的蛋白-多酚平衡,使那些敏感蛋白被单宁沉淀出来,进一步改变了酒液浊度。本法以单宁消耗量对应的浊度来表示啤酒中敏感蛋白的含量。然而由于不同啤酒中蛋白质和多酚的比率不同,响应也就有所不同,这就会导致浑浊物质的总量和浊度间的非线性响应^[15]。因此,国内一些研究者认为该法由于受到啤酒中多酚的影响,只能相对地评价蛋白稳定性,而且不是测定啤酒中浑浊蛋白的绝对值。但是对于相同条件下生产的啤酒可以进行有效的比较。

3.4 高压液相色谱法(HPLC)

最近几年来,高压液相色谱(HPLC)技术也被广泛地应用于蛋白质的分离和测定^[16]。由于蛋白质的大小、形状、电荷、疏水性、功能等特性以及蛋白质的来源、实验要求等可以选择不同的HPLC模式来分离目标蛋白质。同时,在HPLC分析蛋白质中着重发展HPLC检测器,从而使其检测蛋白质的灵敏度以及其它性能都得到了很大的提高。此外,为了使蛋白质的检测更加准确方便,人们研究了各种HPLC联用技术^[17]。目前常用的比较成功的联用技术主要有:高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)、高效液相色谱-毛细管电泳(HPLC-CE)、高效液相色谱-等速电泳(HPLC-ITP)、高效液相色谱-电感耦合等离子体原子发射光谱(HPLC-ICP-AES)。Luciana 等人采用HPLC对啤酒中的碳水化合物和蛋白质等进行了分析测定,得到了啤酒中糖类和蛋白质的含量顺序^[18]。国内单连菊等人通过采用HPLC测定了啤酒浑浊的主要组分蛋白质和多酚分析得到了老化、强化和新鲜啤酒浑浊中蛋白质含量之间关系^[19]。董建军等人也采用了高压液相系统对啤酒泡沫中蛋白质的分布进行了分析,通过实验初步得出泡沫多肽成分的分子分布情况^[20]。

3.5 电泳(Electrophoresis)

1809年俄国物理学家Pechе首先发现了电泳现象,但直到1937年瑞典的Tiselius建立了分离蛋白质的界面电泳之后,电泳技术才开始应用。20世纪60-70年代,当滤纸、聚丙烯酰胺凝胶等介质相继引入电泳以来,电泳技术得以迅速发展。目前,此方法已经被广泛地应用于啤酒蛋白检测,主要涉及有一维电泳、二维电泳、毛细管电泳、SDS-PAGE等技术。国外很早已经有采用电泳方法来检测啤酒中蛋白质的报道

S.Gorinstein 等人采用SDS-PAGE分析纯生啤酒中的蛋白质,最后分得到了五种不同区段的蛋白质^[21]。Sonia Cortacero 等人则采用了毛细管电泳法对啤酒的组成进行分析,待测样品可以直接注入到管内,大大地减少了一些前处理,提高了检测速度和灵敏度^[22]。国内周志娟等人利用SDS-PAGE电泳研究了啤酒生产过程中蛋白质的动态变化,发现制麦和糖化过程是蛋白变化最明显的阶段,蛋白的分布和含量整体呈下降趋势^[8]。何国庆等人采用SDS-PAGE对啤酒泡沫蛋白进行有效分离,通过酵母蛋白酶A对啤酒泡沫蛋白的水解作用及电泳检测发现,酵母蛋白酶A对啤酒泡沫蛋白中的脂肪转运蛋白有水解作用^[23]。

3.6 酶联免疫吸附法(ELISA)

啤酒中的蛋白质主要来自于麦芽且是影响啤酒泡沫和胶体稳定性的主要因素。然而目前还没有一种方法能够比较准确地分析啤酒中泡沫和浑浊中的蛋白质,因此人们需要一种有用的方法能够在酿造过程中评价这些蛋白质和麦芽的质量,鉴于此目的,Y. Ishibashi 等人提出了酶联免疫吸附法(ELISA)来测定泡沫和浑浊中的蛋白质^[24]。利用此法来测定蛋白质时需要对所测定的泡沫或者浑浊蛋白质进行纯化,然后在已经确定的ELISA系统中进行测定。Y. Ishibashi 等人最后测得泡沫蛋白和浑浊蛋白的水平与泡沫持久性和浑浊稳定性比用传统方法更复合、一致,而且还能根据测定的蛋白质来评价麦芽的质量。最近T.Kakui 等人又改进此法,采用了单克隆抗体Sandwich-酶联免疫吸附法来检测啤酒泡沫中活性蛋白,使泡沫活性蛋白的检测极限得到了很大的提高,也是泡沫活性蛋白的含量与泡沫的附着力有更高的相关性^[25]。不过,暂时还未在国内见到采用该方法来测定啤酒蛋白质方面的文献报道。

4 展望

目前,中国的啤酒产量已经居世界第一位,而且中国每年的啤酒销量也一直在上升。与此同时,国内啤酒厂的规模也在不断地壮大,竞争也更加激烈。啤

酒已经由以前的熟啤酒发展到现在的纯生啤酒, 从由单一的由大麦酿造的啤酒发展到现在由小麦酿造的小麦啤酒, 还有果蔬啤酒的出现, 因此如何提高啤酒的品质已经成为各个酿造者关注的焦点, 控制啤酒中的蛋白质的含量是提高品质的一个重要因素。而关键一步就是选择测定啤酒蛋白质方法, 但是单一的测定方法会有一些的局限性, 这样势必会影响到测定结果的准确性, 这样就推动了多种测定方法结合在一起用来测定。例如, 江南大学采用的 SDS-PAGE 和 MS 结合的方法, 得出较好的结果。因此, 多种方法结合在一起来测定啤酒中的蛋白质将会被酿造者和一些研究者所青睐。

参考文献

- [1] Asano, K., Shinagawa, K., Hashimoto, N. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation [J]. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 1982, 40:147-154
- [2] Williams, K. M., Fox, P., and Marshall. T. A comparison of protein assay for the determination of the protein concentration of beer [J]. *J. Inst. Brew.*, 1995,101:365-369
- [3] 徐同兴,胡叔平,王智方.啤酒生产[M].上海:上海科学普及出版社,1985
- [4] 顾国贤.酿造酒工艺学(第二版)[M].北京:中国轻工业出版社,2000
- [5] 张峻炎,杨策,田亚平,等.啤酒泡沫蛋白质的初步分离及测定[J].*酿酒*,2002,29(5):66-67
- [6] Lance. T. Lusk, Henry Goldstein, and David Ryder. Independent role of beer proteins, melanoidins and polysaccharides in foam formation [J]. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 1995, 53(3):93-103
- [7] Leiper K A, et al. Beer polypeptides and silica gel. Part II. Polypeptides involved in foam formation[J]. *J. Inst. Brew.*, 2003,109(1):73-79
- [8] 周志娟,郝俊光,李崎,等.利用 SDS-PAGE 电泳对啤酒生产过程中蛋白质动态变化的研究[J].*酿酒*,2005,32(3):59-62
- [9] Junguang Hao, Qi Li, Guoxian Gu, et al. Identification of the major proteins in beer foam by Mass Spectrometry following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 2006,64(3):166-174
- [10] 林英辉,郭瑞涵,翁益平.论啤酒主要浑浊的形成机理[J].*啤酒科技*,2003,10:10-11
- [11] Sibert, K. J., and Lynn, P. Y. Comparison of polyphenol interactions with PPVP and haze-protein [J]. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*,1998,56:24-31
- [12] Sibert, K. J., and Lynn, P. Y. Effect of protein-polyphenol ratio on the size of haze protein [J]. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*,2000,58(3):117-123
- [13] 黄淑霞,余俊红,史缓英,等.考马斯亮蓝法测定啤酒中的高分子量蛋白质[J].*啤酒科技*,2006,8:59-62
- [14] Compton. S. J., and Jones, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay [J]. *Anal. Biochem.*, 2000,151:369-374
- [15] 郝俊光,万海涛,和强,等.介绍一种快速测定啤酒浑浊敏感蛋白的方法[J].*酿酒*,2002,29(4):23-26
- [16] Luke Toll Ey, James W jorgenson , M arthur Mosel Ey. Very High Pressure Gradient LC/ MS/ MS [J]. *Analytical Chemistry*, 2001,73 : 2985 - 2991
- [17] 林炳承,邹雄,韩培祯.高效液相色谱在生命科学中的应用[M].济南:山东科学技术出版社,1996
- [18] Luciana C. Nogueira, Filipe Silva, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira et al. Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. *Journal of Chromatography A*,2005, 1065:207-210
- [19] 单连菊,张沛,程玉杰.高压液相色谱(HPLC)测定啤酒混浊中主要成分[J].*酿酒科技*,2000,2:73-74
- [20] 董建军,郝俊光.贾士儒.利用高效液相系统分析啤酒泡沫中蛋白质的分布[J].*食品与发酵工业*,2004,30(3):102-105
- [21] S. Gorinstein, M. Zemser, F. Vargas-Albores et al. Proteins and amino acids in beers, their contents and relationships with other analytical data[J]. *Food Chemistry*, 1999,67:71-78
- [22] Sonia Cortacero, Miguel Herna, Antonio Segura et al. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods [J]. *Trends in Analytical Chemistry*,2003,22:440-455
- [23] 何国庆,王肇悦,刘中山.啤酒泡沫阳性蛋白的电泳分离及其与酵母蛋白酶A的关系[J].*农业生物技术学报*,2005,13 (5): 686-687
- [24] Y. Ishibashi, Y. Terano, N. Fukui et al. Development of a new method for determining beer foam and haze proteins by using the immunochemical method ELISA[J]. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*,1996,54(3):177-182
- [25] T. Kakul, Y. Ishibashi, A. Miyake et al. Development of monoclonal Antibody Sandwich-ELISA for determination of beer foam-active proteins [J]. *J.Am.Soc.Brew.Chem.*,1998, 56(2):43-46