

新型啤酒稳定剂对啤酒蛋白质吸附特性的研究

唐栋健¹, 郑飞云¹, 马军涛², 成贵², 朱林江¹, 李永仙^{*1}, 李崎¹

(1. 江南大学 教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 溧阳市鸿智新材料科技有限公司, 江苏 常州 213000)

摘要: 研究了新型啤酒稳定剂 BFSA 对啤酒蛋白质的吸附特性, 初步探讨了 BFSA 吸附蛋白的作用机理。FT-IR 图谱分析可知, BFSA 表面含有 Si-O-Si 键, 且含有 O-H 键。研究了时间、温度、蛋白质浓度对 BFSA 吸附的影响, 发现吸附平衡时间在 1 h 左右, BFSA 吸附啤酒蛋白质量随温度的降低而升高, 随着初始蛋白质浓度的升高而升高。研究了 BFSA 吸附啤酒蛋白质的吸附等温线、动力学和热力学模型, 发现 BFSA 对啤酒蛋白质的吸附等温线更符合 Freundlich 方程; 对啤酒蛋白质的吸附过程更符合准二级动力学方程; 由热力学参数 $\Delta G > 0$ 说明啤酒蛋白质在 BFSA 表面的吸附为非自发的, $\Delta H < 0$ 说明吸附过程是放热的, $\Delta S < 0$ 说明吸附是熵减过程; 活化能 (E) 为 26.28 kJ/mol 表明 BFSA 吸附啤酒蛋白质是物理吸附; 吸附过程放热为 6.62 kJ/mol 表明该吸附过程的主要作用力可能是范德华力、氢键和疏水作用。

关键词: BFSA; 啤酒蛋白质; 吸附; 动力学; 热力学

中图分类号: TQ 424.22 文献标志码: A DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.01.011

Research on the Adsorption Character of New Beer Stabilizer to Beer Protein

TANG Dongjian¹, ZHENG Feiyun¹, MA Juntao², CHEN Gui², ZHU Linjiang¹, LI Yongxian^{*1}, LI Qi¹

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Hongzhi New Material Technology (Liyang) Co., Ltd 213000, China)

Abstract: Research on the adsorption character of BFSA to beer protein and adsorption mechanism of BFSA. FT-IR spectrum analysis showed that the surface contained not only Si-O-Si bond, but also O-H bond. Research on the influence of adsorption time, temperature and protein concentration on BFSA, the result showed that adsorption equilibrium time was 1 h and the adsorption amount of BFSA decreased with temperature increased and increased with protein concentration increased. The adsorption isotherm, kinetics and thermodynamics of protein on BFSA surface were studied by batch equilibrium experiments; The result showed the adsorption of BFSA was fitted to Freundlich isotherm equation; The adsorption process followed the pseudo-second-order kinetic model; The thermodynamic parameters were obtained as $\Delta G > 0$ indicated that the adsorption was a

收稿日期: 2016-09-29

基金项目: 国家 863 计划(2013AA102106-03); 国家自然科学基金项目(31271919, 31571942, 31301539, 31601558, 31601445); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD); 江苏省自然科学基金项目(BK20150159); 江苏基础研究资助项目(JUSRP51306A, JUSRP51402A & JUDCF13008)。

* 通信作者: 李永仙(1964—), 女, 硕士, 高级工程师, 主要从事发酵工程研究。E-mail: yxli@jiangnan.edu.cn

引用本文: 唐栋健, 郑飞云, 马军涛, 等. 新型啤酒稳定剂对啤酒蛋白质吸附特性的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(01): 68-73.

non-spontaneous process, $\Delta H < 0$ indicated that the adsorption was exothermic, $\Delta S < 0$ indicated that the adsorption was an entropy-decreasing process; The values of E was 26.28 KJ/mol indicated that the adsorption process was physical adsorption; The heat release of adsorption was 6.62 KJ/mol implied that Van der Waals forces hydrogen bond and hydrophobic bond were responsible for the binding of protein with BFSA.

Keywords: BFSA, beer protein, adsorption, kinetics, thermodynamics

引起啤酒非生物浑浊的因素主要有蛋白质—多酚浑浊、葡聚糖糊精浑浊、酒花树脂浑浊以及草酸钙结晶沉淀等,其中大部分浑浊来自于蛋白质—多酚浑浊^[1]。通过氨基酸分析发现,啤酒混浊蛋白脯氨酸含量较高,且蛋白质所含脯氨酸摩尔含量越高越容易形成浑浊物质^[2]。啤酒生产过程除了严格控制生产工艺和原料外,还经常添加非生物稳定剂来控制啤酒混浊。目前市场上广泛使用的稳定剂有PVPP、硅胶、单宁酸等,这些稳定剂可除去啤酒中的混浊活性蛋白质或混浊活性多酚^[3]。作者所用新型啤酒稳定剂(BFSA)系基于特殊处理的硅藻土,但其吸附特性和作用机理尚不完全明确。

通过对BFSA吸附的啤酒蛋白质进行氨基酸分析以及对BFSA吸附蛋白质过程进行吸附等温线、吸附动力学和吸附热力学分析,初步探究了BFSA吸附啤酒蛋白质机理。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

SHZ-B 水浴恒温振荡器:上海博讯医疗设备厂产品;凯氏定氮仪:瑞士 FOSS 公司产品;真空抽滤机:VACUUBRAND 公司产品;NEXUS 傅里叶变换红外光谱仪:美国尼高力仪器公司产品;安捷伦液相色谱仪:美国安捷伦公司产品。

作者使用的新型啤酒稳定剂 BFSA 化学成分(质量分数): SiO_2 (90.42%)、 Al_2O_3 (1.95%)、 Fe_2O_3 (1.33%)、其他(6.3%)。

1.2 研究方法

1.2.1 红外光谱分析 取少量 BFSA 与 KBr 混合研磨粉碎,压片后样品放入傅里叶变换红外光谱仪进行 FT-IR 分析。

1.2.2 振荡吸附实验 100 mL 已知蛋白质质量浓度的除气啤酒中加入 0.05 g BFSA,置于振荡水浴锅中,振荡速度 150 r/min,5、15、25、35 °C 下振荡

15、30、45、60、75、90 min 后取样,真空抽滤机抽滤后消化并使用凯氏定氮仪测定其吸附容量。

1.2.3 啤酒蛋白质浓度测试方法

取 5 mL 除气啤酒,放入消化管加 4~5 滴浓硫酸 220 °C 消化 100 min,然后加 5 g 定氮催化剂和 12 mL 浓硫酸 420 °C 消化 100 min 并使用凯氏定氮仪测定啤酒蛋白质质量浓度。

1.2.4 BFSA 吸附蛋白质氨基酸分析 600 mL 已知蛋白质质量浓度的除气啤酒中加入 0.3 g BFSA,20 °C 振荡吸附 1 h,干燥后称取一定质量的 BFSA,HCl 水解后用氨基酸分析仪测定 BFSA 吸附蛋白质的氨基酸组成。

1.2.5 吸附等温线、动力学、热力学的实验方法 采用 1.2.2 振荡吸附实验,测定啤酒初始蛋白浓度对 BFSA 吸附的影响,此数据用于吸附等温线分析;测定吸附时间和吸附温度对 BFSA 吸附的影响,此数据用于吸附动力学分析和吸附热力学分析。

2 结果与讨论

2.1 BFSA 红外光谱分析

图 1 为 BFSA 的红外光谱图,在 3 428 cm^{-1} 附近存在 OH 伸缩振动,1 093 cm^{-1} 附近存在 Si-O 反对称伸缩振动,793 cm^{-1} 附近存在 Si-O 对称伸缩振动,467 cm^{-1} 附近存在 Si-O-Si 反对称弯曲振动^[4],以上数据尤其是 OH 伸缩振动明确了 BFSA 中羟基的存在,对氢键作用的可能性提供了基础。

2.2 BFSA 吸附啤酒蛋白质的氨基酸分析

由于啤酒混浊蛋白质富含脯氨酸^[2],因此可通过对 BFSA 所吸附的蛋白质进行氨基酸分析来评价其对混浊敏感蛋白质的吸附专一性。脯氨酸含量的越高,说明 BFSA 对混浊敏感蛋白质的吸附专一性就越高。如图 2 所示,啤酒中蛋白质脯氨酸质量分数为 7.53%,而 BFSA 吸附蛋白质的脯氨酸质量分

数增加至 9.71%，表明 BFSA 对啤酒混浊敏感蛋白有较好的吸附选择性。

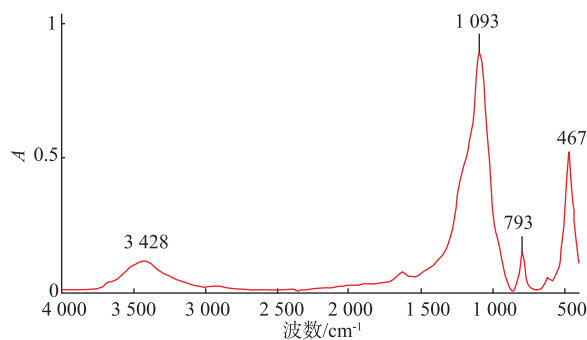


图 1 BFSA 红外光谱图
Fig. 1 FT-IR of BFSA

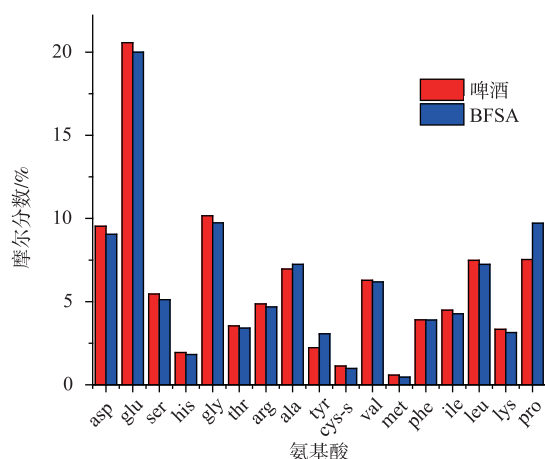


图 2 BFSA 吸附啤酒蛋白质的氨基酸分析

Fig. 2 Amino acid of beer protein adsorbed with BFSA

2.3 BFSA 吸附影响因素分析

2.3.1 吸附时间和温度对 BFSA 吸附的影响 在啤酒蛋白质质量浓度为 2 980 mg/L，吸附剂用量 0.5 g/L，体系 pH 为 4.3 的条件下，考察吸附时间和温度对 BFSA 吸附啤酒蛋白质的影响。结果如图 3 所示，当吸附时间小于 1 h 时，BFSA 的吸附容量随着时间的增加而增加，当吸附时间大于 1 h 时，BFSA 的吸附容量几乎无变化，该吸附过程在 1 h 作用达到平衡。

2.3.2 啤酒蛋白质质量浓度对 BFSA 吸附的影响 吸附剂用量为 0.5 g/L，体系 pH 为 4.3，吸附时间为 1 h，吸附温度为 20 °C 条件下，分别将蛋白质质量浓度为 5 525 mg/L 的啤酒稀释 20、10、5、2.5、1.25 倍，得到蛋白质质量浓度为 276.25、552.5、1 105、2 210、4 420、5 525 mg/L，并加入少量酸调节使溶液 pH 不变，考察初始啤酒蛋白质质量浓度对 BFSA 吸附容量的影响。结果如图 4 所示，BFSA 吸附容量随着质

量浓度的增加而升高，在啤酒蛋白质初始质量浓度较小的情况下，BFSA 吸附容量迅速增加，当蛋白质质量浓度上升到一定浓度后，BFSA 吸附容量增加缓慢。

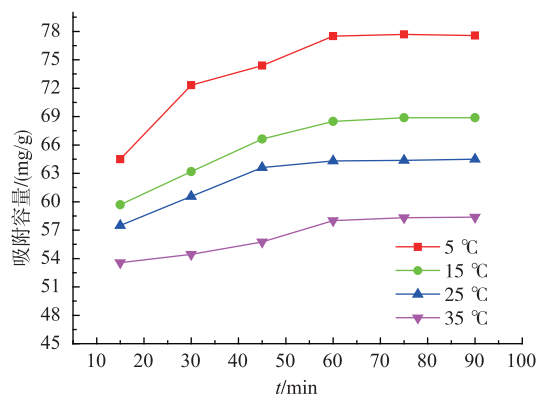


图 3 吸附时间和吸附温度对 BFSA 吸附的影响

Fig. 3 Effect of adsorption time and temperature on BFSA

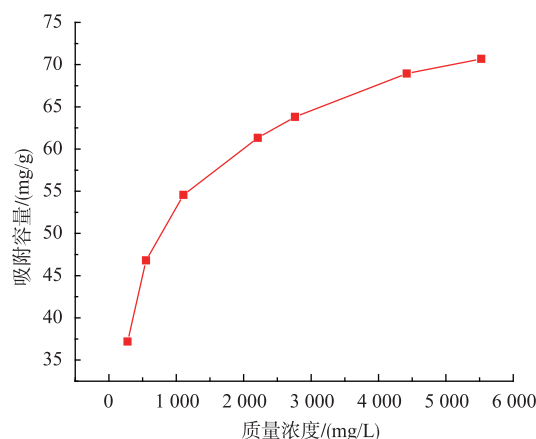


图 4 啤酒蛋白质质量浓度对 BFSA 吸附的影响

Fig. 4 Effect of beer protein concentration on BFSA

2.4 BFSA 吸附机理探究

2.4.1 吸附等温线分析 图 5 为 BFSA 对啤酒蛋白质的平衡吸附等温线，采用式(1)和式(2)对 2.3.2 实验数据进行拟合，拟合得到的等温线参数经计算后列于表 1 中^[5-6]：

$$\text{Langmuir 模型: } Q_e = Q_m b C_e / (1 + b C_e) \quad (1)$$

$$\text{Freundlich 模型: } Q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (2)$$

式中， Q_e 为平衡吸附量 (mg/g)； Q_m 为饱和吸附量 (mg/g)； C_e 为吸附后啤酒蛋白质溶液的平衡质量浓度 (mg/L)； b 为 Langmuir 吸附常数 (L/g)； K_F 为 Freundlich 吸附常数 (mg/g)·(L/mg)^{1/n}； n 为 Freundlich 吸附常数，无因次。

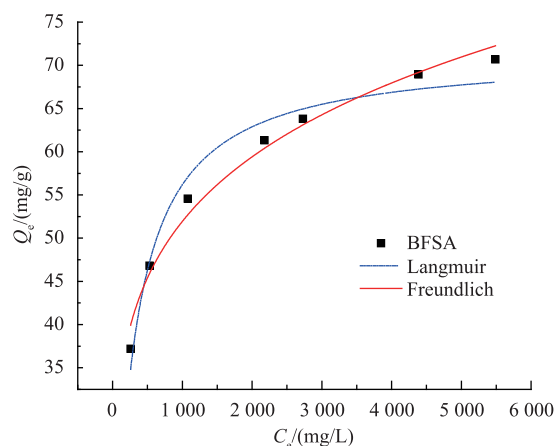


图5 BFSA 吸附啤酒蛋白质的吸附等温线

Fig. 5 Adsorption isotherm of beer protein on BFSA

对比 2 种吸附等温线方程的相关系数 R^2 , Freundlich 方程更符合 BFSA 对啤酒蛋白质吸附过程,说明吸附过程更接近于多分子层吸附理论。Freundlich 吸附方程式中 $1/n < 1$ 时吸附比较容易进行, $1/n > 1$ 时则表明吸附困难^[7]。

BFSA 对啤酒蛋白质的吸附容量可由 Langmuir 等温线模型中的单层饱和吸附量 Q_m 值表示。由 Langmuir 参数可知, 20 °C 时 BFSA 对啤酒蛋白质的平衡吸附量为 71.40 mg/g。另一个重要参数-吸附平衡参数 R_L 由式(3)计算得到:

$$R_L = 1 / (1 + bC_0) \quad (3)$$

式中: b 为 Langmuir 常数; C_0 为啤酒初始蛋白质质量浓度 (mg/g); R_L 为无因次参数, $R_L = 0$ 表明吸附不可逆; $0 < R_L < 1$ 表明吸附有利于向吸附方向进行, R_L 越小越有利于吸附的进行^[8]; $R_L = 1$ 表明吸附处于一个线性平衡状态; $R_L > 1$ 表明吸附有利于向解析方向进行。

图 6 表明,随着啤酒蛋白质初始质量浓度的升高, R_L 在逐渐降低,说明啤酒蛋白质质量浓度越高越有利于吸附的进行。

2.4.2 吸附动力学分析 研究了不同温度和时间对 BFSA 吸附的影响, 吸附初始时 BFSA 对蛋白质的吸附速率很快, 随着时间增加吸附速率开始减小, 这可能是因为吸附初期 BFSA 表面的空余吸附位点较多且啤酒溶液的蛋白质质量浓度比 BFSA 表面大, 因此吸附初期速率较快。随着吸附的进行, BFSA 表面活性位点逐渐减少, 导致吸附速率开始降低^[9-13]。采用式(4)和式(5)拟合图 7 数据, 拟合曲线如图 7 所示, 计算得到的准一级、二级动力学参数如

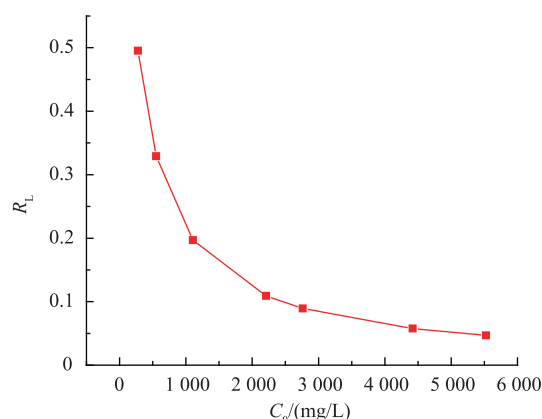


图6 R_L 与 C_0 的关系曲线

Fig. 6 Curve of R_L and C_0

表 2 所示:

$$\text{准一级动力学模型: } Q_t = Q_e (1 - e^{-k_1 t}) \quad (4)$$

$$\text{准二级动力学模型: } Q_t = Q_e^2 K_2 t / (1 + Q_e K_2 t) \quad (5)$$

式中: Q_t 为 t 时刻吸附量 (mg/g); Q_e 为平衡吸附量 (mg/g); K_1 为一级动力学速率常数 (min^{-1}); K_2 为二级动力学速率常数 ($\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$)。

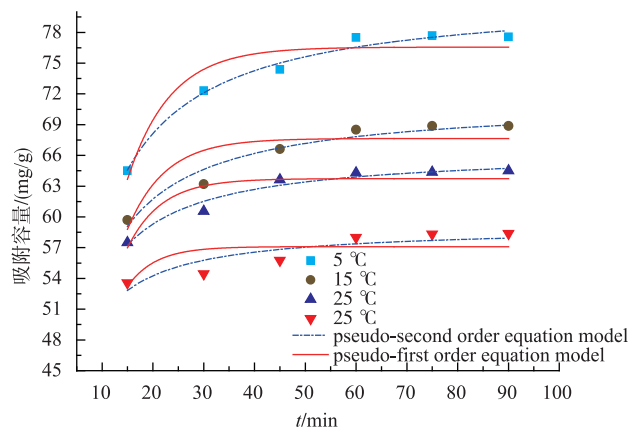


图7 不同温度下 BFSA 对啤酒蛋白质的准一级、准二级动力学方程拟合

Fig. 7 Fitting the adsorption kinetics curve of beer protein on BFSA by two models in different temperatures

由表 1 中模型相关系数 R_2 可以看出, 准二级动力学方程 R_2 值更高, 因此实验范围内 BFSA 吸附啤酒蛋白质更加符合准二级动力学方程。

2.4.3 吸附热力学分析 由于 BFSA 吸附过程更符合准二级动力学方程, 所以根据式(6)Arrhenius 公式所作的 $\ln K_2 \sim 1/T$ 关系图, 以 $\ln K_2$ 为纵坐标, $1/T$ 为横坐标, 直线回归后所得到的斜率就是 $-E/R$, 如图 8 所示, 因此可以计算得到 BFSA 吸附啤酒蛋白质的

表 1 BFSA 吸附啤酒蛋白质动力学参数

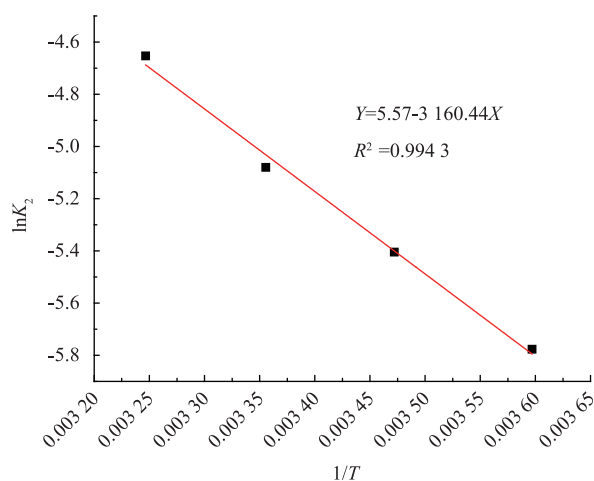
Table 1 Adsorption kinetics parameters of beer protein on BFSA

$T/^{\circ}\text{C}$	Pseudo-first-order model			Pseudo-second-order model		
	$Q_t/(\text{mg/g})$	K_1	R^2	$Q_t/(\text{mg/g})$	K_1	R^2
5	76.56	0.118 8	0.889 9	81.61	0.003 097	0.983 6
15	67.65	0.135 5	0.713 8	71.35	0.004 495	0.945 7
25	63.73	0.149 8	0.765 9	66.48	0.006 217	0.954 3
35	57.10	0.179 3	0.469 2	57.71	0.009 533	0.751 9

活化能,计算结果见表 3 对吸附而言,物理吸附活化能较低 E 值在 5~40 kJ/mol 左右,化学吸附的活化能较高在 40~800 kJ/mol 左右。如表 4 所示,BFSA 对啤酒蛋白质的吸附的 E 值为 26.28 kJ/mol,说明吸附过程是物理吸附^[15]。

$$\ln K = \ln K_0 + (-E/RT) \quad (6)$$

式中: K 为二级动力学速率常数; K_0 为指前因子; E 为 BFSA 吸附啤酒蛋白质活化能(kJ/mol); R 为摩尔气体常数(8.314J/(mol·K)); T 为啤酒溶液温度(K)。

图 8 BFSA 对啤酒蛋白质吸附的 $\ln K_2 \sim 1/T$ 关系图Fig. 8 $\ln K_2 \sim 1/T$ plots for adsorption of beer protein on BFSA

通过计算吸附自由能(ΔG),焓变(ΔH)和熵变(ΔS)研究啤酒蛋白质在 BFSA 表面的吸附热力学,3 个热力学参数之间的关系如式下:

$$\lg(q_t/C_T) = \Delta S/2.303R - \Delta H/2.303RT \quad (7)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8)$$

式中: q_t 为在 t 时刻 BFSA 对啤酒蛋白质的吸附量(mg/g); C_T 为在 t 时刻啤酒蛋白质的质量浓度(mg/L); ΔS 为熵变(J/mol·K); ΔH 为焓变(kJ/mol); ΔG 为吉布斯自由能(kJ/mol)。

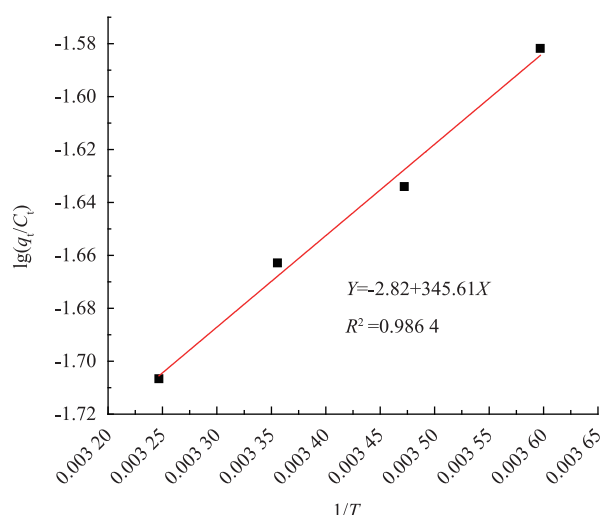
图 9 BFSA 对啤酒蛋白质吸附的 $\lg(q_t/C_T) \sim 1/T$ 关系图Fig. 9 $\lg(q_t/C_T) \sim 1/T$ plots for adsorption of beer protein on BFSA

图 9 是根据式(7)所作的 BFSA 对啤酒蛋白质吸附的 $\lg(q_t/C_T) \sim 1/T$ 关系图, $\lg(q_t/C_T) \sim 1/T$ 呈线性关系,直线斜率为 $-\Delta H/2.303RT$,直线截距为 $\Delta S/2.303R$,因此直线回归后可得到吸附焓 ΔH 和吸附熵 ΔS ,并得到吉布斯自由能 ΔG ,计算结果如下表 2。

表 2 BFSA 吸附啤酒蛋白质热力学参数

Table 2 Adsorption thermodynamics parameters of beer protein on BFSA

$T/^{\circ}\text{C}$	$\Delta G/(\text{kJ/mol})$	$\Delta H/(\text{kJ/mol})$	$\Delta S/(\text{J/mol} \cdot \text{K})$	$E/(\text{kJ/mol})$
5	8.39	-6.62	-54.00	26.28
15	8.93			
25	9.47			
35	10.01			

由表 4 可知, ΔH 为负值,说明 BFSA 吸附啤酒蛋白质过程是放热的,吸附温度越低越有利于吸附。 ΔS 表示的是系统内微观粒子的混乱度,吸附过程中系统内部混乱度的降低用系统的熵值的降低来表示,由上表可知 BFSA 吸附啤酒蛋白质的过程

是熵减的过程,说明吸附过程中系统的混乱度在降低。 $\Delta G > 0$ 表明 BFSa 吸附啤酒蛋白质过程是非自发的。

吸附放热大小标志着不同的吸附作用力,吸附作用力的种类可分为:化学键力大于 60 kJ/mol,配体交换和离子作用力为 40 kJ/mol,氢键力为 2~40 kJ/mol,范德华力小于 4.4~8.8 kJ/mol,疏水作用力 4 kJ/mol。由表 4 得到的 ΔH 为 -6.62 kJ/mol 可知该吸附过程放热为 6.62 kJ/mol,主要作用力可能是范德华力和氢键和疏水作用力。范德华力是普遍存在的力,结合 BFSa 的表面官能团对可能存在的氢键和疏水作用进行如下推论:(1)脯氨酸是亚氨基酸,上面的 N 原子含有一对孤对电子,更容易形成氢键,故吸附过程是 BFSa 表面的羟基与脯氨酸上面的 N 原子形成氢键;(2)BFSa 表面含有 Si-O-Si,非极性

官能团具有疏水性,而由于氨基酸链中高比例脯氨酸会使蛋白结构变得松散和有序,会呈现出最大的疏水性结合表面,因此吸附过程也可能是 BFSa 表面疏水官能团与富含脯氨酸蛋白之间的疏水作用。

3 结 语

通过 FT-IR 测定表明 BFSa 表明含有 OH 官能团和 Si-O-Si 疏水官能团,通过 BFSa 吸附啤酒蛋白质氨基酸分析,发现 BFSa 对啤酒混浊敏感蛋白有较好的吸附选择性。

通过吸附等温线、动力学和热力学分析,同时结合氨基酸分析,BFSa 吸附啤酒敏感蛋白机理推论如下:(1)BFSa 表面羟基和富含脯氨酸蛋白之间的氢键作用;(2)BFSa 表面 Si-O-Si 与富含脯氨酸蛋白之间的疏水作用。

参考文献:

- [1] LIN Xiaorong, LU Jian. Study on the adsorption selectivity of polyphenol and silicagel to haze active protein in beer [J]. **China Brewing**, 2006(7): 21-24. (in Chinese)
- [2] SIEBERT K J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, Stabilization and analysis [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1999, 47(2): 353-362.
- [3] LI Juxiu, KARL J S, PENNY L. Study on the effect of different types silica gels treatment on haze-active protein and foam-active protein in beer[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2008, 8(6): 91-96. (in Chinese)
- [4] LI Zhe, WANG BaiNian. Study on adsorption property of modified diatomite to phenolic wastewater [J]. **Inorganic Chemicals Industry**, 2015, 47(12): 56-59. (in Chinese)
- [5] LANGMUIR I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids [J]. **Journal of American Chemical Society**, 1916, 38(11): 2221-2295.
- [6] AKAR S T, OEZCAN A S, AKAR T, et al. Biosorption of a reactive textile dye from aqueous solutions utilizing an agro-waste[J]. **Desalination**, 2009, 249(2): 757-761.
- [7] TSAI W T, CHANG Y M, LAI C W, et al. Adsorption of basic dyes in aqueous solution by clay adsorbent from regenerated bleaching earth[J]. **Applied Clay Science**, 2005, 29(2): 149-154.
- [8] HALL K R, EAGLETON L C, ACRIVOS A, et al. Pore- and solid-diffusion kinetics in fixed-bed adsorption under constant-pattern conditions[J]. **Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals**, 1966, 5(2): 587-594.
- [9] KAVITHA D, NAMASIVAYAM C. Experimental and kinetic studies on methylene blue adsorption by coir pith carbon[J]. **Bioresource Technology**, 2007, 98(1): 14-21.
- [10] CHOWDHURY S, MISHRA R, SAHA P, et al. Adsorption thermodynamics, kinetics and isosteric heat of adsorption of malachite green onto chemically modified rice husk[J]. **Desalination**, 2011, 265(1-3): 159-168.
- [11] HO Y S, MCKAY G. Pseudo-second order model for sorption processes[J]. **Process Biochemistry**, 1999, 34(5): 451-465.
- [12] HO Y S, MCKAY G. The sorption of lead(II) ions on peat[J]. **Water Research**, 1999, 33(2): 578-584.
- [13] ZHOU Hongying, LI Na, WANG Xuesong. Study on the mechanism of Pb (II) and Cu (II) biosorption by two brown algae[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(1): 53-60.
- [14] NOLLET H, ROELS M, LUTGEN P, et al. Removal of PCBs from wastewater using fly ash [J]. **Chemosphere**, 2003, 53(6): 655-665.