

文章编号:1673-1689(2010)06-0905-07

啤酒中异- α 酸和蛋白质含量对啤酒泡持性的影响

张吉磊¹, 郑飞云¹, 郝俊光², 李崎^{*1}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 青岛啤酒股份有限公司 科研中心, 山东 青岛 266101)

摘要: 研究以 11°P 不同品牌的啤酒为研究对象, 分别利用国标法、反相高效液相色谱法(RP-HPLC 法)、二喹啉甲酸法(BCA 法)和十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(SDS-PAGE 技术)检测了啤酒泡持性、异- α 酸含量、泡沫蛋白质的浓度及蛋白质 Z 与脂转移蛋白(LTP)含量。结果显示, 异- α 酸中的异合葎草酮及总蛋白质含量与泡持性关系较密切, 但是单一蛋白质 Z 或 LTP 含量与泡持性不太密切。

关键词: 啤酒; 泡沫; 泡持性; 异- α 酸; 蛋白质

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

Effect of Iso- α acid and Protein Content in Beer on Beer Foam Retention

ZHANG Ji-lei¹, ZHENG Fei-yun¹, HAO Jun-guang², LI Qi^{*1}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, 214122, China; 2. Tsingtao Brewery Co. Ltd, Qing dao 266101, China)

Abstract: This study use 11°P different brands of beer as model to investigate the effect of iso- α acid and protein content on the beer foam stability. The beer foam stability, iso- α acid content, the concentration of foam protein and protein Z and lipid transfer protein (LTP) content were determined by the national standard method, reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC method), bicinchoninic acid method (BCA method) and sodium dodecyl sulfate Sodium - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE method). The results showed that in the iso-co-humulus which was part of iso- α acids and the total protein content have more closely relationship with the foam stability, but the content of a single protein Z, or LTP holding of less closely with the foam stability. This research provides an alternative methods to improve the foam retention time.

Key words: beer, foam, foam stability, iso- α acid protein

泡沫作为啤酒的重要特征之一, 是评价啤酒质量的一个非常重要的方面。啤酒中的泡沫充满 CO₂ 可使啤酒具有清凉爽口、散热解暑并保持啤酒

的杀口力的作用^[1]。按照欧洲酿造协会的规定, 啤酒泡沫的性质包括起泡能力、泡沫外观、泡沫持久性和泡沫挂杯性 4 方面。在所有的泡沫特性中, 泡

收稿日期: 2009-11-20

基金项目: 国家“十一五”科技支撑重点项目(2008BAI63B06); 国家 863 计划项目(2006AA020204); 国家“十一五”重大科技支撑项目(No. 2007BAK36B01)。

* 通信作者: 李崎(1971—), 女, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生工发酵方面的研究。Email: liqi@jiangnan.edu.cn

沫的稳定性作为一个主要的综合性特征,常被作为研究啤酒泡沫质量的关键指标^[2]。有报道^[3]说啤酒泡持性与啤酒中蛋白质和异- α 酸含量有关,但是啤酒泡沫中的蛋白质包括蛋白质Z和LTP等^[4-5],异- α 酸也包括异葎草酮、异合葎草酮和异加葎草酮^[6-7],泡持性究竟与哪些物质有关,至今没有明确报道。本研究测定了不同啤酒的泡持性、异- α 酸和蛋白质含量,希望找到影响啤酒泡持性的物质。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品 市售原麦汁质量分数为11°P的7种啤酒,其中2种为国内品牌,5种国外品牌。

1.1.2 主要试剂 丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、考马斯亮蓝G-250、TEMED、蛋白质marker、二喹啉甲酸(BCA)、重蒸水。

1.1.3 主要仪器 高效液相色谱仪:Waters公司产品,低温高速离心机:Eppendorf公司产品;恒温水浴锅,垂直板电泳仪;分液漏斗。

1.2 方法

1.2.1 啤酒泡持性的测定 根据国标GBT 4928-2008啤酒分析方法“7.2秒表法”。

1.2.2 啤酒中异- α 酸的测定 啤酒除气,用85 mg/L磷酸调啤酒pH至2.5。首先10 mL甲醇过SPE C₁₈柱,再依次用10 mL超纯水,20 mL啤酒样品通过,接着通过6 mL的磷酸水(0.2 mL 85%的磷酸于100 mL超纯水),再用10 mL甲醇混合物(甲醇:水:85%的磷酸按体积比为50:50:0.2配制)分两次洗柱子。最后,样品被洗提用4 mL酸性甲醇(加0.1 mL 85%磷酸于100 mL色谱纯级甲醇)分两次洗柱,洗脱液转移至5 mL容量瓶中,用酸性甲醇在20℃下定容至刻度,充分混匀。用0.45 μ m有机滤膜过滤,存于样品管中,用高效液相色谱仪测定其中的异- α 酸含量。流动相为甲醇:水:磷酸(85%):EDTA-Na(0.1 mol/L)体积比为750:240:10:1,体积流量为1 mL/min,柱温为35℃,检测波长为270 nm,进样体积为10 μ L^[8]。

1.2.3 啤酒泡沫蛋白的收集 为了模拟消费者在实际饮用时啤酒泡沫的情况,研究采用分液漏斗分离收集啤酒泡沫,具体过程为:将整瓶啤酒酒样沿漏斗边缘匀速倾倒入2 L分液漏斗,加盖5 s后打开出样阀让酒残液放至恰有泡沫流出,速度控制在60 s内放完,立即关闭阀门,泡沫自然坍塌后得到泡沫生成液^[9]。

啤酒泡沫生成液以1:3(V:V)比例加4℃丙

酮,混匀,在4℃冰箱放置1 h,4 000 r/min离心10 min,收集沉淀,风干即可。加体积分数4%乙醇复溶并定容到25 mL。

1.2.4 BCA法测定泡沫蛋白浓度 BCA法是Lowry法的改进,原理:在碱性环境下蛋白质分子中的肽键结构能与Cu²⁺络合并将Cu²⁺还原成Cu⁺,BCA试剂敏感特异与Cu⁺结合形成稳定的蓝紫色复合物,在562 nm处有最大光吸收值,颜色深浅与蛋白质浓度成正比,可根据吸收值大小计算蛋白质含量。以牛血清白蛋白作为标准品^[10]。

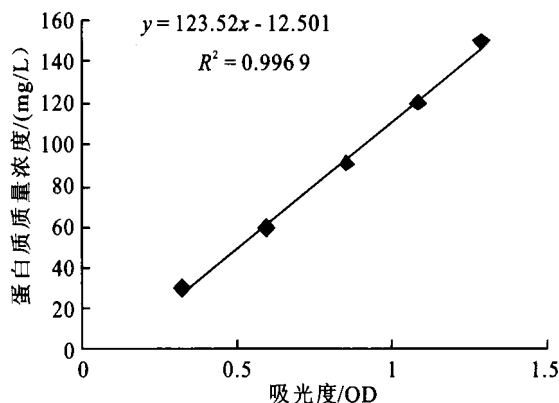


图1 BCA法测蛋白浓度的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of BCA measured protein concentrations

1.2.5 SDS-PAGE分离泡沫蛋白 蛋白质样品与样品缓冲液(3.55 mL双蒸水,1.25 mL浓缩胶缓冲液,2.5 mL甘油,2.0 mL 10% SDS,0.2 mL 0.5 mg/L溴酚蓝,0.5 mL β -巯基乙醇)以1:1(V:V)混合,100℃加热5 min,分离胶浓度为15%,加样量为10 μ L。浓缩胶电压为80 V,分离胶电压为200 V。当溴酚蓝跑到距离分离胶下边缘1 cm时结束电泳。把胶放入考马斯亮蓝G-250染色剂(0.04%考马斯亮蓝G-250溶于3.5%过氯酸,加体积分数20%甲醇溶液)中染色1 h,加入脱色液中脱色过夜,拍照得到电泳图^[11]。

2 结果与分析

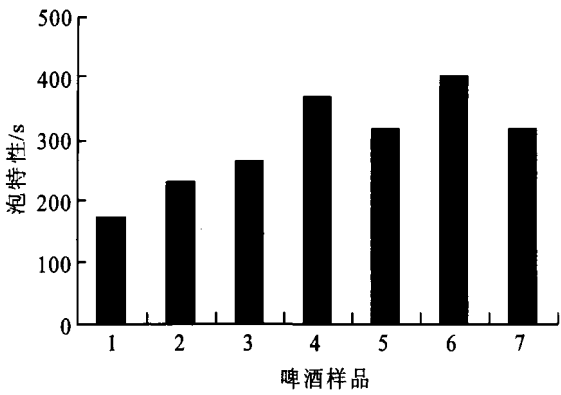
2.1 啤酒泡持性的测定

根据方法1.2.1啤酒泡持性测定方法测得啤酒样品的泡持性,结果见图2。

从图2可以看出,国外啤酒的泡持性普遍的比国内的高。国外品牌啤酒的泡持性普遍在300 s以上,最高的可以达到400 s。而国内品牌啤酒的泡持性在200~270 s。

2.2 啤酒中异- α 酸的测定

异- α 酸是麦汁煮沸时 α 酸异构化形成的,赋予啤酒爽快的苦味。啤酒苦味85%~95%来源于

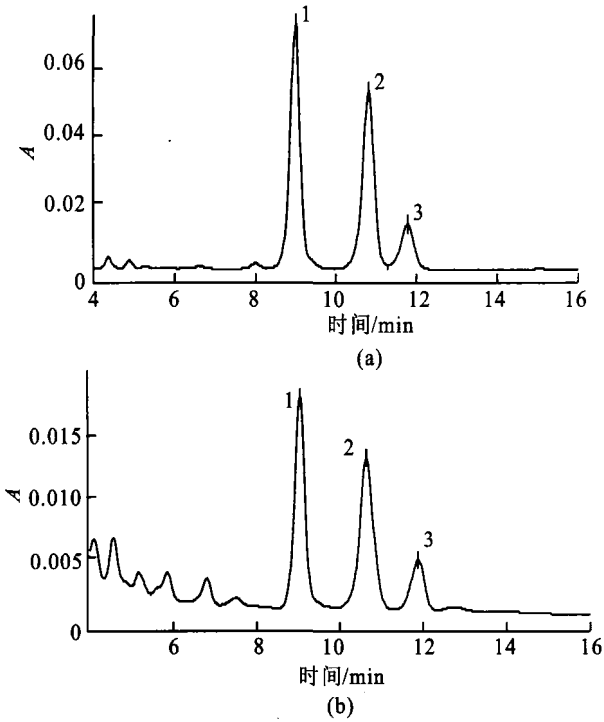


其中 2 和 3 号为国内品牌,1 和 4~7 为国外品牌。

图 2 啤酒的泡持性

Fig. 2 Foam stability of beer samples

异-α 酸。国内外很多研究证实异-α 酸可以增强啤酒的泡沫性能^[12]。异-α 酸可分为异葎草酮、异合葎草酮、异加葎草酮。实验利用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定了啤酒样品中的异葎草酮、异合葎草酮、异加葎草酮及异-α 酸的含量,见图 3。



1-异合葎草酮,2-异葎草酮,3-异加葎草酮。(a) 为标样异-α 酸色谱图,(b) 为啤酒样品异-α 酸色谱图

图 3 标样及啤酒中异-α 酸的色谱图

Fig. 3 Iso-α-acid chromatogram of standard samples and beer

表 1 啤酒样品中异-α 酸质量浓度

Tab. 1 Iso-α acid content of beer samples

样品	异合葎草酮 质量浓度/ (mg/L)	异葎草酮 质量浓度/ (mg/L)	异加葎草酮 质量浓度/ (mg/L)	异-α 酸 质量浓度/ (mg/L)
1	2.314	3.835	0.997	7.146
2	3.522	3.114	1.000	7.636
3	5.034	4.630	1.600	11.264

续表 1

样品	异合葎草酮 质量浓度/ (mg/L)	异葎草酮 质量浓度/ (mg/L)	异加葎草酮 质量浓度/ (mg/L)	异-α 酸 质量浓度/ (mg/L)
4	7.390	1.952	0.422	9.764
5	4.090	7.932	1.865	13.887
6	7.215	9.00	2.460	18.675
7	3.150	6.140	1.545	10.835

从表 1 可以看出,国外的啤酒中酒花的添加量普遍的比国内的添加量高,异-α 酸质量浓度几乎是国内的两倍,这与国内的消费人群的口味有关。下面考察了啤酒中异合葎草酮、异葎草酮、异加葎草酮和异-α 酸的含量与泡持性的关系

由图 4 到图 7 可以看出,异合葎草酮与泡持性的关系相对来说最大(R^2 为 0.686),说明啤酒泡持性与异合葎草酮质量浓度有较大关系,从图 8 的化学结构图可以看出异-α 酸的 3 种组成成分的差别只在于 R 基,异葎草酮的为异丁基,异合葎草酮的为异丙基,异加葎草酮的为 2-甲基-丁基。R 基不同,导致对啤酒泡持性的影响差别很大,具体原因需要进一步研究。

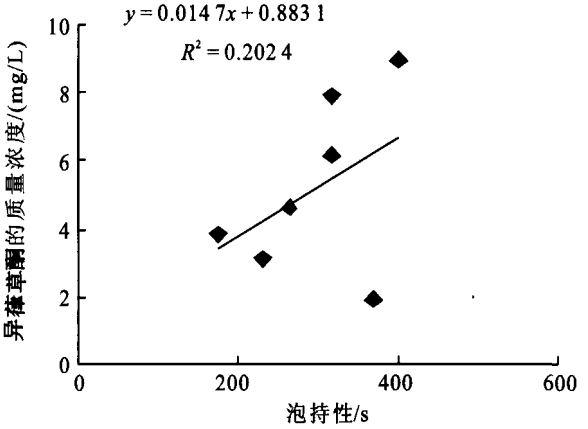


图 4 泡持性与异葎草酮质量浓度的关系

Fig. 4 Relationship between foam stability and the content of iso-humulus

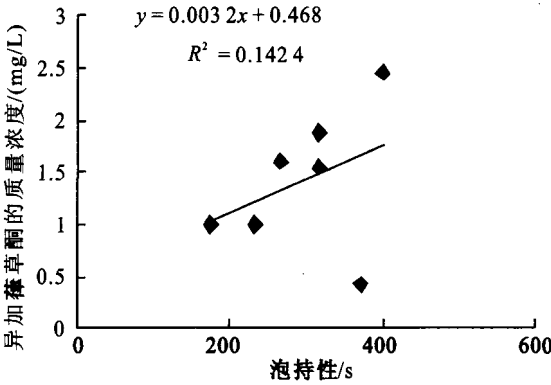


图 5 泡持性与异加葎草酮含量的关系

Fig. 5 Relationship between foam stability and the content of iso-ad-humulus

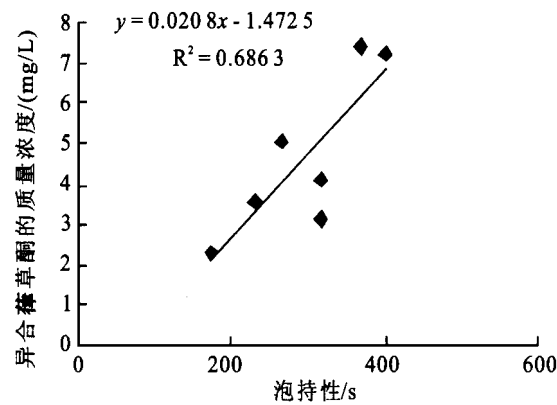


图 6 泡持性与异合葎草酮质量浓度的关系

Fig. 6 Relationship between foam stability and the content of iso-co-humulone

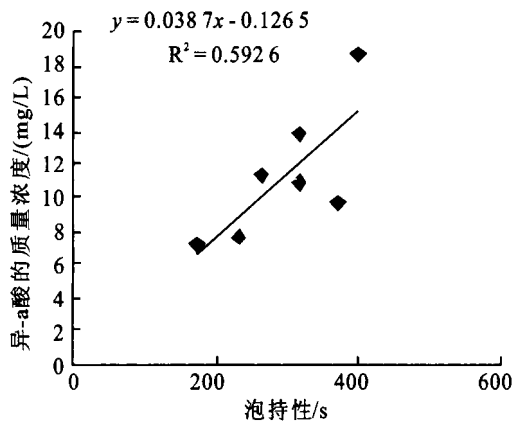


图 7 泡持性与异-α 酸质量浓度的关系

Fig. 7 Relationship between foam stability and the content of iso-α acid

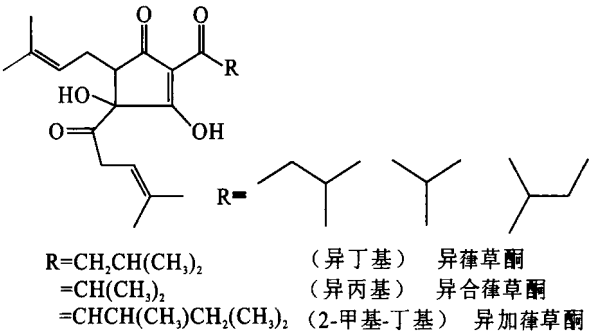


图 8 异-α 酸的三种成分的化学结构图^[13]

Fig. 8 Chemical structure of the three Iso-α acid composition

2.3 BCA 法测定泡沫蛋白的浓度

测蛋白质浓度主要有 Bradford 法(考马斯亮蓝法)、Lowry 法(Folin-酚法)、二喹啉甲酸(BCA)法等。Bradford 法的弊端是做标线用的牛血清白蛋白会与考马斯亮蓝剧烈反应,导致它对未知待测样品蛋白质浓度的测定过低。Lowry 法的弊端是干扰物质较多。BCA 法是 Lowry 法的改进法,所受干扰物质较少^[14]。用 BCA 法测得的样品的蛋白质浓度见表 2。考察蛋白质浓度与啤酒泡持性的关系见图 9。

表 2 样品的蛋白质浓度		
Tab. 2 The protein content of samples		
样品	吸光度/OD	样品中蛋白质质量浓度/(mg/mL)
1	0.131	0.368
2	0.102	0.010
3	0.203	1.257
4	0.153	0.640
5	0.224	1.516
6	0.256	1.912
7	0.273	2.122

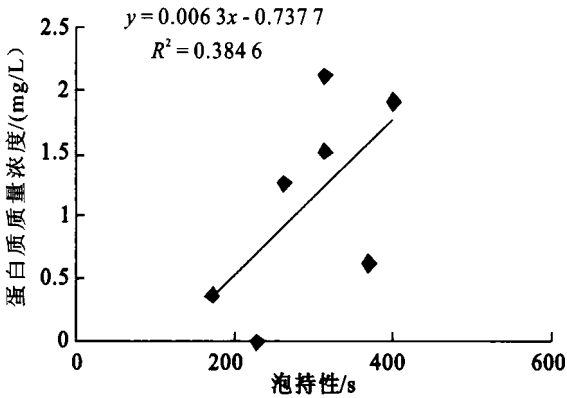


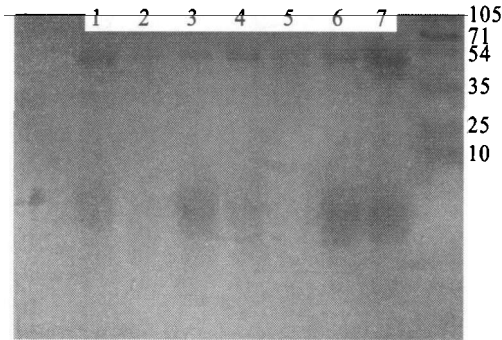
图 9 啤酒的泡持性与蛋白质质量浓度的关系

Fig. 9 Relationship between protein content and Beer foam stability

上图可以看到,啤酒的泡持性与蛋白质质量浓度是有一定关系的,蛋白质质量浓度高,泡持性高。

2.4 SDS-PAGE 分离测定泡沫蛋白

啤酒样品经过方法 1. 2. 3 得到啤酒泡沫蛋白,再根据方法 1. 2. 5 进行电泳,得到电泳图,见图 10。



图中泳道从左向右依次为啤酒样品 1-7 和蛋白质 mark

图 10 啤酒泡沫蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 10 SDS-PAGE gel electrophoresis of beer foam protein

蛋白质 mark 的相对分子质量为 105 000、71 000、50 000、35 000、25 000、16 000。从电泳图可以看到基本只有两条带,分别为蛋白质 Z(相对分子质量大约为 40 000)和 LTP(分子量大约为 9 000),对

电泳图用 gel-Pro analyzer 软件进行分析,得到下图 11。

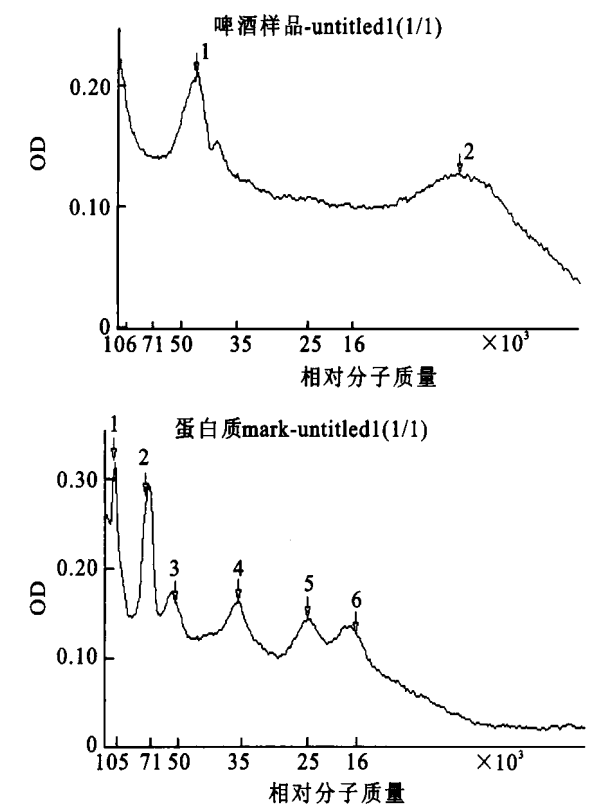


图 11 gel-pro analyzer 处理电泳图后得到样品和 mark 的条带图

Fig. 11 Samples and mark the strip chart after gel-pro analyzer dealing with the gel electrophoresis

可以看出啤酒泡沫蛋白的基本是由相对分子质量为 40 000 和相对分子质量为 10 000 的两种蛋白质组成,分别为蛋白质 Z 和 LTP。对蛋白质 Z 和 LTP 的含量进行分析得到表 3:

表 3 样品中蛋白质 Z 和 LTP 的比例
Tab. 3 Ratio of protein Z and LTP of samples

样品	蛋白质 Z 比例(%)	LTP 比例(%)	蛋白质 Z: LTP	蛋白质 Z 质量浓度 (mg/mL)	LTP 质量浓度 (mg/mL)
1	35.624	64.376	0.553	5.119	9.250
2	49.462	50.538	0.979	0.400	0.408
3	19.342	80.658	0.240	20.535	85.635
4	23.760	76.240	0.312	5.936	19.046
5	91.107	8.8933	10.245	69.077	6.743
6	20.403	79.597	0.256	16.251	63.40
7	62.878	37.122	1.694	93.943	55.462

分析蛋白质 Z 和 LTP 的浓度与泡持性的关系,结果见图 11~14。

关于蛋白质与啤酒泡持性的关系一直有两种观点^[15]:1 是特定分子量的蛋白质如蛋白质 Z 或者 LTP 决定泡沫的泡持性;2 是蛋白质的疏水性决定泡沫的泡持性。由图 12 到图 14 可以看出蛋白质 Z

和 LTP 含量与啤酒的泡持性的关系不是很大。

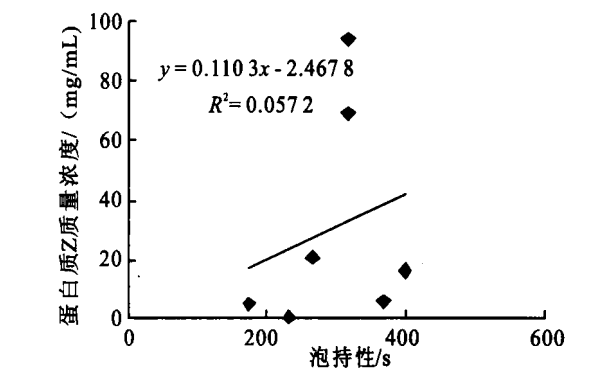


图 12 蛋白质 Z 质量浓度与泡持性的关系
Fig. 12 Relationship between protein Z content and foam stability

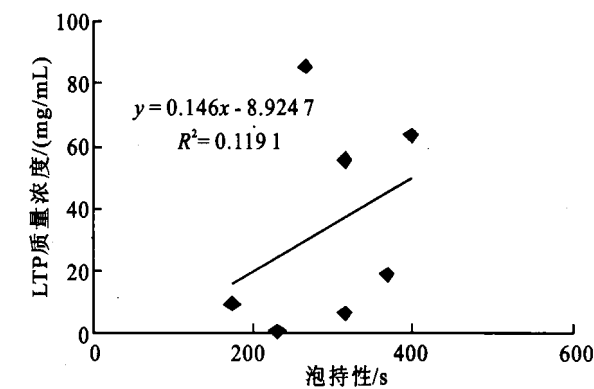


图 13 LTP 质量浓度与泡持性的关系
Fig. 13 Relationship between LTP content and foam stability

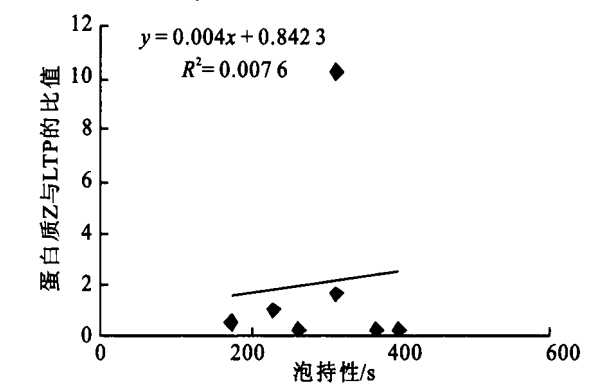


图 14 蛋白质 Z:LTP 与泡持性的关系
Fig. 14 Relationship between the ratio of protein Z and LTP and foam stability

啤酒是个复杂的体系,在研究异合葎草酮与泡持性的关系时实际上也包含了蛋白质对泡持性的影响,同样在研究蛋白质对泡持性的关系时也包含了异合葎草酮对泡持性的影响。在这种情况下,单纯计算简单相关系数,显然不能准确反映事物之间的相关关系。用 Spss Statistics 17.0 软件对泡持性、异合葎草酮质量浓度和蛋白质质量浓度进行偏相关分析,通过偏相关分析可以得出啤酒中异合葎草酮的质量浓度与泡持性的偏相关系数为 0.907,蛋白质质量浓度与泡持性的偏相关系数为 0.808,可以

看出蛋白质的质量浓度与泡持性有一定的关系,由于样品中异合葎草酮质量浓度的差异,影响了蛋白质的质量浓度与泡持性的关系。

3 讨论

异- α 酸对啤酒泡持性的影响是通过其与蛋白质的结合,以增加泡沫的表面张力来达到的。异- α 酸包括异葎草酮、异合葎草酮、异加葎草酮3种,这3种物质的区别在于酰基侧链不同,异葎草酮的为异丁基,异合葎草酮的为异丙基,异加葎草酮的为2-甲基-丁基,其中异合葎草酮与啤酒泡沫的泡持性关系最大。说明异丙基与蛋白质的结合可以很大程度上增加泡沫的表面张力,提高泡沫的泡持性。

用BCA法测得了啤酒泡沫中蛋白质的质量浓度,然后跑SDS-PAGE电泳,通过电泳图,可以看到啤酒泡沫中的蛋白质主要有蛋白质Z和LTP,和已

报道的一致^[16-20]。利用gel-proanalyzer软件对电泳图的处理,得到蛋白质Z和LTP的质量浓度。啤酒泡沫的泡持性与啤酒中的蛋白质质量浓度是有一定关系的,但是泡沫性分别与蛋白质Z和LTP质量浓度的关系不大,说明啤酒泡沫的泡持性不是简单的与蛋白质Z和LTP的含量有关。由于蛋白质Z包括蛋白质Z₁和蛋白质Z₇,LTP包括LTP1和LTP2,是否啤酒泡沫的泡持性与其中的一个或者几个有关还要进一步的研究。

啤酒的泡沫是一个复杂的体系,其中蛋白质是作为基本骨架,异合葎草酮和金属离子等通过一定的作用力结合到蛋白质上,共同维护泡沫的表面张力。在酿造过程中,蛋白质大多都被糖基化变成糖蛋白,糖蛋白的质量浓度多少可能与泡持性有关。蛋白质中自由巯基的质量浓度,表面疏水性的大小可能与泡持性也有关系。这些工作将在后续的实验研究中一一研究。

参考文献(References):

- [1] 颜坤琰,刘景文. 世界啤酒大典[M]. 重庆:重庆出版社, 2001.
- [2] 叶俊华,张俊炎,陆建. 啤酒泡沫泡持性测定的研究进展[J]. 酿酒, 2003, 30(1): 38—39.
YE Jun-hua, ZHANG Jun-yan, LU Jian. The progress of study on menswration of beer foam stability[J]. *Liquaor-making*, 2003, 30(1): 38—39. (in Chinese)
- [3] Rubens Mattos, Roberto H, Moretti. Beer drinkability-A Review[J]. *MBAA TQ*, 2005, 42(1): 13—15.
- [4] Kenneth A L, Graham G S, Ian P M. Beer polypeptides and silica gel. Part II polypeptides involved in foam formation [J]. *Inst Brew*, 2003, 109(1): 73—79.
- [5] Kakui T, Ishibashi Y, Miyake A, et al. Development of monoclonal antibody sandwich-ELISA for determination of beer foam-active proteins[J]. *American Society of Brewing Chemists*, 1998, 56 (2): 43—46.
- [6] David W, Diffor Sam T. The effect of isohumulone/isocohumulone ratio on beer head retentin. [J]. *American Society of Brewing Chemists*, 1978, 36(2): 63—65.
- [7] Diedrich harms, Frank Nitzsche. High-performance separation of unmodified and reduced hop and beer bitter compounds by a single high-performance liquid chromatographic method[J]. *American Society of Brewing Chemists*, 2001, 50(1): 28—31.
- [8] 李崎,周天,顾国贤. 固相萃取-高效液相色谱法测定啤酒中的异构化(-酸[J]. 色谱, 2007, 30(6): 532—535.
LI Qi, ZHOU Tian, GU Guo-xian. Determination of isomerized α -Acid in beer using solid phase extraction-high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2007, 30(6): 532—535. (in Chinese)
- [9] 叶俊华. 啤酒泡沫蛋白的性质研究和制备[D]. 无锡:江南大学生工学院硕士论文, 2004.
- [10] John M Walker. The protein protocols hendbook, 2nd Edition[M]. Totowa, New Jersey: Humana press. 2003.
- [11] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社, 1999.
- [12] Krodialik E, Ambriziak W. The relationship between polypeptides and foaming during fermentation[J]. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 2007, 40: 368—373.
- [13] Alfi Khatib, Erica G. Wilson, Hye Kyong Kim, et al. NMR assignment of iso- α -acids from isomerised extracts of humulus lupulus L. cones[J]. *Phytochemical Analysis*, 2007, 18: 371—377.
- [14] Richard J Simpson. Protein and proteomics: A Laboratory Manual[M]. Beijing: Science Press, 2003.
- [15] 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.
DONG Jian-jun, HAO Jun-guang, JIA Shi-ru. Research on the composition of beer foam by high performance liquid chromatography[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2004, 30(3): 102—105. (in Chinese)
- [16] Kakui T, Ishibashi Y, Miyake A, 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.
- [17] Okada Y, Imure T, Takoi K, et al. The influence of barley malt protein modification on beer foam stability and their relationship to the barley dimeric R-amylase inhibitor-I (BDAI-I) as a possible foam-promoting protein[J]. *Agric Food Chem*, 2008, 56: 1458—1464.
- [18] Kordialik E, Bogacka W, Ambroziak. The relationship between polypeptides and foaming during fermentation[J]. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 2007, 40: 368—373.

(责任编辑:杨萌)