

用浊度法预测香蕉汁中混浊活性蛋白质和多酚

王素雅, 王 璋, 许时婴
(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 本研究采用浊度仪测香蕉汁混浊活性(HA)蛋白和多酚含量。为减少内源性蛋白和多酚的影响, 分别用聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl polypyrrolidone, PVPP)和膨润土吸附多酚和蛋白质。将单宁酸加入 PVPP 处理与未处理香蕉汁中, 果汁浊度变化与蛋白质含量呈线性相关, 在蛋白质含量相同情况下, PVPP 处理果汁的浊度较未处理样品小。热处理添加适量明胶的香蕉汁可反映果汁中 HA 多酚的含量, 膨润土处理与未处理系列样品的浊度与其 HA 多酚含量呈线性相关。浊度法可用于测定香蕉汁中 HA 蛋白和 HA 多酚。

关键词: HA 蛋白; HA 多酚; 单宁酸; 明胶; 浊度

Haze-active Protein and Polyphenols in Banana Juice Assessed by Turbidimetry

WANG Su-ya, WANG Zhang, XU Shi-ying
(College of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The paper studied how to determine haze-active (HA) protein and polyphenols in banana juice by turbidimetry. The amount of haze-active protein in banana juice was determined by adding tannic acid to induce haze. Turbidity of banana juice was essentially in linear relationship with protein concentration. PVPP treatment prior to tannic acid addition appeared to remove endogenous polyphenols and resulted in slightly weaker response. Adding gelatin to banana juice induced haze in response to content of haze-active polyphenols. At an appropriate gelatin concentration turbidity of banana juice was nearly in linear relationship with polyphenols concentration. Bentonite treatment prior to gelatin addition appeared to remove endogenous protein and resulted in weaker response. The results showed that turbidimetry could be used to determine HA protein and HA polyphenols.

Key words: haze-active protein; haze-active polyphenols; tannic acid; gelatin; turbidity

中图分类号: O65

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)08-0076-05

澄清果汁在储藏过程中会出现混浊(haze)或二次沉淀(sediment), 不仅影响果汁的感官品质, 而且会影响消费者对果汁营养物质的吸收利用, 从而降低其商品价值。大量的研究表明, 酚类、蛋白质、高价阳离子、果胶、阿拉伯聚糖等是造成果汁二次混浊的原因, 但最常见、最难控制的因素是蛋白质与多酚相互作用产生大分子聚合物^[1]。

饮料中蛋白质含量低, 其中仅有少量蛋白与混浊形成有关, 而且其成分可能与众不同, 脯氨酸或羟脯氨酸含量较高, 因此许多普通的蛋白质分析方法可能并不适于分析混浊活性(haze active, HA)蛋白^[2]。比浊法的优点在于它仅对能与 HA 多酚发生反应并形成混浊的那部分蛋白质产生响应。然而, 该方法的准确程度可能受到内源性 HA 多酚的影响, 因为饮料二次混浊的程序

不仅取决于 HA 蛋白和 HA 多酚的数量, 而且与两者之间的比例有关^[3], 故内源性多酚会影响测定结果。作为一种多酚吸附剂, PVPP 可以同时吸附类黄酮和单宁类物质, 对 HA 多酚具有良好的吸附作用, 而对 HA 蛋白质的影响则较小。膨润土分子能与蛋白质吸附结合, 可有效地除去 HA 蛋白, 广泛用于果汁和果酒的澄清中。用 PVPP 吸附内源性多酚可减少内源 HA 酚类对浊度法测定 HA 蛋白的干扰, 从外加单宁酸后热处理果汁的浊度变化, 可预测饮料中 HA 蛋白量。相反, 用膨润土吸附内源性蛋白质后添加明胶, 可以预测饮料中 HA 多酚含量。

本文通过测定不同条件下香蕉汁的浊度变化, 探讨浊度法在预测澄清型香蕉汁 HA 蛋白和 HA 多酚中的应用可行性, 并为进一步研究香蕉汁 HA 蛋白和 HA 多酚奠

收稿日期: 2003-11-03

作者简介: 王素雅(1969-), 女, 在读博士, 讲师, 研究方向为食品生物技术。

定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

广东芝麻香蕉 购于无锡市农贸市场; PVPP、膨润土为分析纯; 单宁酸、明胶等为化学纯。

1.2 实验方法

1.2.1 总酚含量的测定 Folin-Ciocalteu 法^[4]。

1.2.2 总蛋白含量的测定 Coomassie-blue 法^[5]。

1.2.3 浊度测定 浊度仪(A24 型浊度仪, 无锡光明浊度仪厂)测定, 去离子水调零。

1.2.4 HPLC 测定香蕉汁中的多酚

取 50ml 香蕉汁, 用 25ml 的乙酸乙酯萃取 4 次, 有机相合并后用无水硫酸钠干燥 30min, 滤纸过滤后在 35℃ 以下水浴中旋转蒸发, 剩余物用 2ml 甲醇/水(50:50)溶解, 取 20 μ l 注入 HPLC(Agilent 1100 系列)。

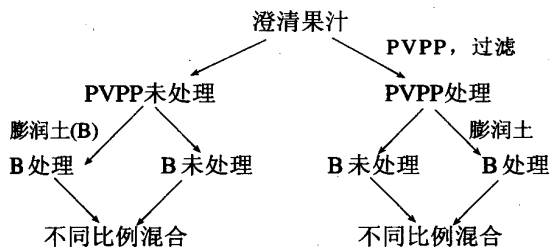
色谱条件: Phenomenex Jupiter C₁₈ 柱(100 \times 4.6mm), 0~40min 0.2% 乙酸溶液, 40~60min 0.2% 乙酸 80% 和乙腈 20%, 梯度洗脱。

1.2.5 澄清型果汁经 PVPP 预处理后加入单宁酸^[6]

将澄清后的果汁分成 2 份, 将 PVPP(10.0g/L)加入到其中 1 份, 混合物搅拌 30min 后静置过夜, 过滤除去 PVPP。将 PVPP 处理及未处理样品分别分成 2 份, 其中一份用 2.0g/L 膨润土处理。膨润土处理及未处理的样品按不同比例混合形成不同蛋白梯度的香蕉汁(操作过程如下)。将 50mg/L 单宁酸加入每份样品中, 在 80℃ 放置 30min, 测定其浊度的变化。

1.2.6 澄清型果汁经膨润土预处理后加入明胶^[6]

将澄清后的果汁分成 2 份, 其中 1 份加入膨润土 2.0g/L, 预处理后过滤除去膨润土。将处理与未处理样品再分成 2 份, 其中 1 份加入 PVPP10.0g/L 处理, 混合 30min 后静置过夜, 过滤去除 PVPP。PVPP 处理与未处理的样品按不同比例混合形成不同的多酚梯度, 加入 100mg/L 明胶, 在 80℃ 放置 30min, 测定其浊度的变化。



用 PVPP 去内源性多酚的操作方法

2 结果与讨论

2.1 温度对香蕉汁二次混浊的影响

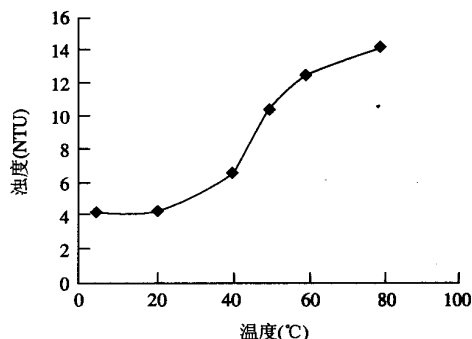


图1 不同温度对香蕉汁浊度的影响

将等量香蕉汁分别置于不同温度 2h, 测定每个样品的混浊度, 结果表明温度对香蕉汁二次混浊影响显著。从图 1 可知, 20℃, 2h 香蕉汁混浊较 4℃ 略高, 但 40~60℃ 热处理香蕉汁二次混浊产生速率明显加快, 最高温度(80℃)产生最大二次混浊, 该结果说明香蕉汁在 20℃ 以下产生二次混浊比较缓慢。不同温度处理后香蕉汁中总蛋白和总酚的含量见图 2, 随着处理温度提高, 总蛋白与总酚含量逐渐减少, 在 40~60℃ 间蛋白质含量减少较多, 高于或低于此范围蛋白质含量减少均较平缓。80℃ 热处理 2h, 蛋白质含量减少了 25%。在整个温度范围内总酚含量几乎平稳减少, 总量减少 15% 左右, 较蛋白质少。在香蕉汁浊度快速增加(40~60℃)时, 蛋白质和总酚含量减少较快, 说明香蕉汁中的部分蛋白质与多酚相互作用而产生混浊, 即澄清香蕉汁的二次混浊与蛋白质和多酚有直接关系。该试验结果也表明在低温条件下, 香蕉汁产生二次混浊较少, 随着温度升高, 二次混浊程度加重, 为避免二次混浊的出现, 香蕉汁应尽可能储藏在较低的温度下。

2.2 pH 对香蕉二次混浊的影响

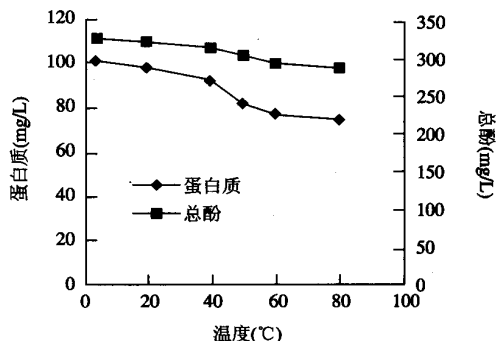


图2 温度对香蕉汁蛋白质和多酚的影响

天然香蕉汁的 pH 值约在 4.7 左右, 用 2.0mol/L 盐酸或 2.0mol/L NaOH 调节香蕉汁的 pH 值后在 80℃ 热处理

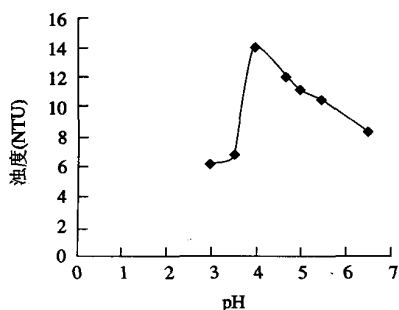


图3 热处理对不同pH香蕉汁浊度的影响

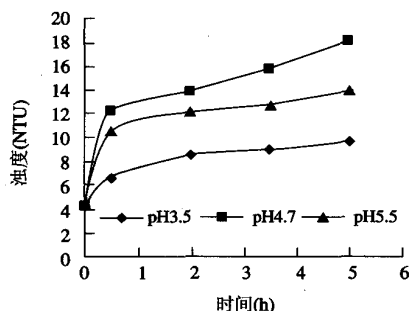


图4 热处理对香蕉汁混浊形成的影响

30min, 各样品的浊度见图3。由图可知, 香蕉汁在pH4.0附近热稳定性最差, 样品出现最大混浊度, 偏离该pH值, 香蕉汁浊度均减小。在蛋白质和多酚含量不变的前提下, pH4.0香蕉汁产生的混浊是pH3.0的2倍。这种情况与啤酒形成最大二次混浊在pH4.0~4.2相似^[7], 而与苹果汁最大混浊在pH3.0不同^[8]。Siebert等认为饮料在不同pH值条件下产生二次混浊程度不同, 主要因为HA蛋白质的等电点不同, pH值高于或低于蛋白质等电点时, 蛋白质静电荷增加, 从而导致分子间静电排斥作用增强, 减少蛋白与多酚分子之间的交联作用^[7]。香蕉汁在天然pH下较容易出现混浊, 可能表明香蕉汁中HA蛋白的等电点在pH4.0附近。图4反映了三个pH水平香蕉汁热处理过程中混浊发生的历程, 所有样品的浊度均随热处理时间的延长而增加。其中pH4.7天然香蕉汁的浊度增加最大, 而整个热处理过程中pH3.5香蕉汁的浊度增加最为缓慢。

图5和图6描述了热处理过程中不同pH香蕉汁中蛋白质和总酚含量的变化, 其中pH4.7香蕉汁中蛋白质和总酚减少最多, 此结果也表明蛋白质与总酚结合物是形成香蕉汁二次混浊的重要物质。尽管不同pH香蕉汁在热处理过程中浊度变化差别显著(pH4.7香蕉汁的浊度为pH3.0的2倍), 其总蛋白和总酚含量有所差别, 但三个pH水平总变化趋势相似, 其中5h处理使总蛋白减少30%左右, 此结果与热处理苹果汁蛋白变化情况相近^[8]。由于长时间热处理会造成蛋白质变性, 而蛋白质变性可能

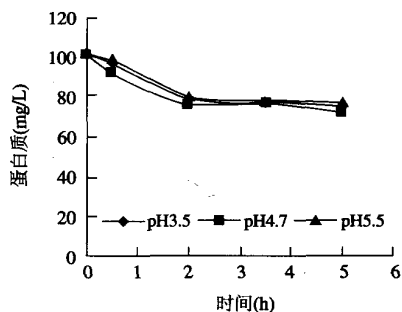


图5 热处理对不同pH香蕉汁蛋白质含量的影响

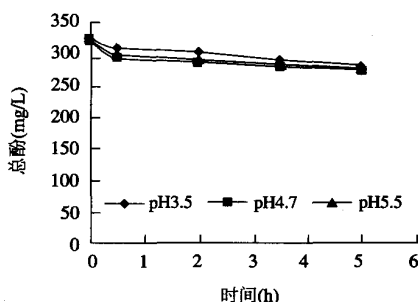


图6 热处理对不同pH香蕉汁总酚含量的影响

使非HA蛋白变成HA蛋白与HA多酚发生聚合, 也可能使HA蛋白失活而不能与HA酚类结合, 即热处理是非选择性的, 因此, 用考马斯亮兰法不能精确测定HA蛋白。

2.3 内源HA蛋白的估计

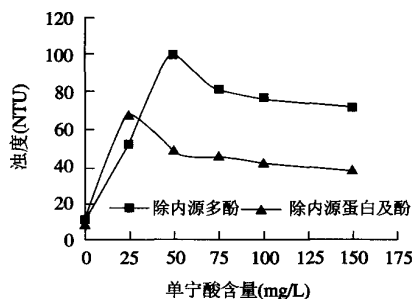


图7 单宁酸对香蕉汁混浊的影响

用PVPP除去内源性多酚后, 将处理香蕉汁分成两份, 其中一份用膨润土吸附蛋白质(吸附后果汁中蛋白质减少62.3%)。将两种处理样品分别分为几份, 加入不同量的单宁酸, 混合后放置在80℃水浴中反应30min, 处理样品的混浊度变化见图7。由图可知, 两种处理香蕉汁的浊度在单宁酸含量低时快速增加, 达到最大值后又渐次减小。除去内源蛋白及多酚的香蕉汁最大浊度远小于保留内源蛋白的样品, 并且最大浊度所耗单宁酸(25mg/L)比保留内源蛋白质的样品少(50mg/L)。这

一结果符合 Siebert^[3]等人提出的多酚-蛋白质作用模型, 即当 HA 多酚与蛋白质结合点等于 HA 蛋白质与多酚结合的位点时, 多酚与蛋白质间形成大的网状结构, 产生的胶体颗粒大而具有最大光散射。当 HA 蛋白多于 HA 多酚或者 HA 多酚多于 HA 蛋白质时, 两者之间就不能形成大网络系统, 使颗粒减小, 光散射较小而浊度降低。由于多酚类物质自身可以氧化聚合成多聚物而产生混浊, 在除去内源蛋白及多酚的样品中也表现出一定的浊度, 两条曲线之间的浊度差应当是由内源 HA 蛋白质引起的。

2.4 香蕉汁内源 HA 蛋白与浊度变化的关系

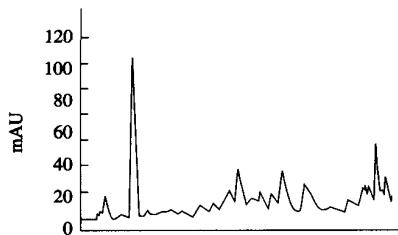


图8 PVPP 未处理香蕉汁中酚类的 HPLC 图

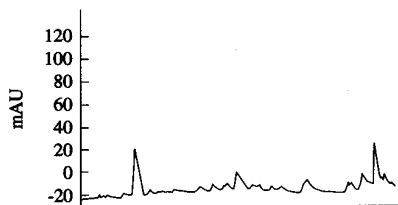


图9 PVPP 处理香蕉汁中酚类的 HPLC 图

由于对香蕉汁中内源 HA 蛋白质和 HA 多酚含量不清楚, 而两者的比例对浊度产生很大影响^[3]。为了减少内源性多酚和蛋白质的影响, 研究中采用 PVPP 或膨润土分别除去内源多酚或蛋白质, 然后加入外源 HA 物质——单宁酸或明胶, 由热处理造成香蕉汁浊度的变化来探讨其内源性 HA 蛋白和 HA 多酚类物质。用 10g/L PVPP 和 2g/L 膨润土联合处理香蕉汁可得到蛋白质浓度梯度增加的两个系列, PVPP 未处理系列中含有天然酚类化合物而 PVPP 处理样品中较少(图 8 和图 9)。将相同质量的单宁酸(50mg/L)加入至 PVPP 处理与未处理的两个系列并进行热处理, 香蕉汁的混浊度随样品中膨润土未处理部分的比例(即内源蛋白质含量)的增加而线性增加(图 10), PVPP 处理系列样品的浊度增加速率较未处理系列小, 可能因为 PVPP 处理造成部分与天然酚类结合的香蕉混浊活性蛋白被吸附^[6]。比较 PVPP 处理与未处理样品在 y 轴上的截距, 可知 PVPP 处理香蕉汁的浊度(10.21)较 PVPP 处理样品的浊度(6.43)之差主要由内源性多酚引起的。

添加外源性 HA 多酚——单宁酸后, 香蕉汁中 HA

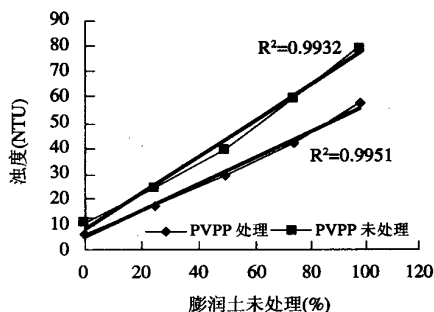


图10 蛋白质浓度对香蕉汁浊度的影响

蛋白质与其相互作用出现混浊, 浊度的变化与蛋白质含量呈线性关系, 相关系数 R^2 大于 0.99, 说明香蕉汁的浊度变化与内源 HA 蛋白含量相关性良好, 可以用该方法估计香蕉汁中的 HA 蛋白含量。

2.5 香蕉汁内源 HA 多酚与浊度变化的关系

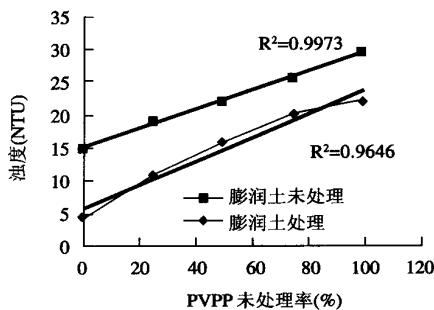


图11 多酚对香蕉汁浊度的影响

因 PVPP 可以吸附多酚类物质, 用 PVPP 处理后的香蕉汁中总酚含量显著降低, 将 PVPP 处理与未处理的样品按不同比例混合, 可以得到总酚含量不同的香蕉汁。当外加混浊活性蛋白明胶(100mg/L)后, 香蕉汁的浊度随多酚含量的增加而增加, 并呈线性关系。膨润土处理样品在总酚含量相同的情况下浊度明显下降, 说明膨润土吸附香蕉汁中的内源 HA 蛋白。膨润土未处理香蕉汁系列在 y 轴上的截距(浊度)为 14.86, 而膨润土预处理系列最小浊度 4.37, 两者之差主要是由内源性 HA 蛋白质所引起的。

添源性明胶后, 香蕉汁内源 HA 多酚与其相互作用出现混浊, 浊度的变化与 HA 多酚含量基本呈线性相关, 相关系数 R^2 大于 0.95, 说明该方法可用于估计香蕉汁中的 HA 多酚的含量。

3 结论

在储藏过程中, 香蕉汁的混浊稳定性与温度相关, 低温可以延迟混浊的出现, 而高温造成果汁浊度大大增加, 并进一步产生大量的二次沉淀, 引起感官品质降低。

杨梅叶提取物抗氧化活性的研究

夏其乐, 陈健初, 吴丹
(浙江大学食品系, 浙江 杭州 310029)

摘要: 本文从杨梅叶中提取酚类物质, 用化学发光法测定了提取物对羟自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子($\text{O}_2\cdot^-$)的清除作用, 同时将提取物添加到油脂中, 研究其抑制物油脂氧化的能力。结果显示, 杨梅叶提取物具有很强的抗氧化活性, 并且随时期变化有较大差异, 但总的来说与酚类物质的含量存在正相关性。

关键词: 杨梅叶; 总酚; 化学发光; 抗氧化

Study on Scavenging Efficacy of Phenols Extraction of *Myrica Ruba* Leaf

XIA Qi-le, CHEN Jian-chu, WU Dan
(College of Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Phenols extraction from *Myrica Ruba* leaf to investigate the scavenging ability to $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$ of the extract was studied in this article. At the same time, adding lipid to the extract in order to study the antioxidant ability on lipid oxidation. The results showed. The extract of *Myrica Ruba* leaf had powerful antioxidation, and its efficacy was different in different periods but showed direct time correlation.

Key words: *Myrica Ruba* leaf; total phenols; chemiluminescence; antioxidation

中图分类号: S662.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)08-0080-04

杨梅(*Myrica.Ruba* Sieb.et Zucc)为杨梅科杨梅属植

物, 为我国特产, 主要分布于长江流域以南, 浙江、江苏、福建等省为主要产区。杨梅叶中含多种酚类化合物, 主要由黄酮类化合物及原花色素类化合物组成, 这两类化合物组成, 这两类化合物均有显著的生理活性^[1]。有研究者从杨梅叶中分离和制备了4种黄酮醇甙和1

收稿日期: 2003-11-08

作者简介: 夏其乐(1979-), 在读硕士, 研究方向为食品工艺及综合利用。

香蕉汁的pH值也影响果汁的稳定性, 天然香蕉汁在储藏中容易出现较严重的混浊现象。

使用PVPP和膨润土除去香蕉汁中内源性多酚或蛋白质, 然后外加明胶或单宁酸, 用浊度仪测定香蕉汁浊度变化与内源HA蛋白和HA多酚含量的关系, 结果表明香蕉汁中HA蛋白和HA多酚含量均与浊度线性相关, 表明浊度法可用于估计香蕉汁中HA蛋白和HA多酚。

参考文献:

- [1] 葛毅强, 蔡同一, 胡小松. 果汁二次混浊研究的新进展[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(9): 46-50.
- [2] Siebert K J. Protein-polyphenol haze in beverages[J]. Food Tech, 1999, 53(1): 54-57.
- [3] Siebert K J, Troukhanova N V, P Y Lynn. Nature of polyphenol-protein interactions[J]. J Agric. Food Chem, 1996, 44: 80-85.

- [4] Dugh C S, Amerine M A. Methods for analysis of musts and wines (Second Edition). Awidley-interscience publication [M]. John Wiley & Sons, 1998. 203-206.
- [5] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [6] Siebert K J, Lynn P Y. Haze-active protein and polypheols in apple juice assessed by turbidimetry[J]. J Food Sci, 1997, 62(1): 79-84.
- [7] Siebert K J, Carrasco A, Lynn P Y. Formation of protein-polyphenol haze in beverages[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44: 1997-2005.
- [8] Wu L-C, Siebert K L. Characterization of haze active protein in apple juice[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(13): 3828-3834.