

酶解前后可可粉体系的变化

殷露琴 王 璋

(江南大学食品学院,无锡,214036)

摘 要 可可粉在饮料中很不稳定,用纤维素酶、淀粉酶和木聚糖酶对其作用后,其成分、微观结构和带电性质都发生了变化。酶解后可溶性成分增加,这主要来自于多糖的降解和多酚的释放;但是分子质量在 3 0000 u 上下的物质的分布没有发生很大变化;可溶性的粗蛋白和游离氨基酸的变化不明显;淀粉、蛋白质和细胞壁材的含量减少;酶解后可可粉的粒径变小,但是出现了部分聚集;酶解后 CWM 中的果胶的暴露,使得可可粉的 Zeta 电位由 -20.7 mv 下降到 -28.08 mv。

关键词 可可粉,酶,可溶性成分,细胞壁材,微观结构,Zeta 电位

由于可可粉粒子不亲水且自身的体积较大,在以水为介质的饮料体系中很难稳定。前面已经研究了用纤维素酶、淀粉酶和木聚糖酶共同作用于可可粉,来降解在饮料储藏过程中容易形成沉淀的淀粉;破坏细胞壁;降低了可可粉的粒径以及增加可溶性物质的含量;同时酶解的作用使得可可粉变疏松,有利于用均质等物理方法进一步降低可可粉的粒径大小。文中研究了酶解后可可粉的成分、带电性质以及结构的变化。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

主要材料:可可粉,马来西亚可可局提供;纤维素酶(Q21),无锡杰能科酶制剂厂提供;木聚糖酶(Mono BG),Novo 公司提供;酸性淀粉酶(Fungamyl 2500 BG),无锡杰能科酶制剂厂提供。

主要仪器:超级恒温水浴锅;721 型分光光度计;DPM-1-Zeta 电位测定仪,上海市计量局实验工厂;LGJ-10 冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂;GL-20B 冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;扫描电子显微镜,日本日立公司。

1.2 实验方法

酶解工艺:将可可粉和水按照 1:7 的质量比混合,在 100℃煮沸 15 min,然后加入到酶反应器中,在 50℃、pH 5.45,用质量分数 2% 的纤维素酶、质量分数 0.2% 的木聚糖酶和质量分数 0.5% 的淀粉酶作用 5 h,最后升温到 90℃灭酶。

样品的处理:酶解前的样品直接用原料可可粉;

酶解后的产品需要进行冷冻干燥,然后用中药粉碎机粉碎。

油脂的测定^[1]:取 10 g 干燥的样品加入到甲醇-三氯甲烷(体积比 1:1)的 150 mL 的溶液中,4℃搅拌 2 h,在 6 000×g 离心 15 min,倾出清液,重复 1 次,合并清液,将清液干燥得到油脂。

可溶性物质的测定^[1]:将实验中得到的残渣用 150 mL 的水在室温下搅拌,提取 2 次,合并提取液,浓缩并冷冻干燥,然后测定水分含量,计算出干物质。

蛋白质的测定^[1]:将实验中得到的不溶物加入到 150 mL W(苯酚):V(乙酸):V(水)=2:1:1 (PAW)的溶液中,在室温下搅拌过夜,离心,再用 150 mL 提取 3 h(室温下),将 PAW 溶解的部分进行透析,将透析产物冷冻干燥,然后测定水分含量,计算出干物质。

淀粉的测定^[1]:将 PAW 不溶的部分加入到 150 mL DWSO (100%)中室温下搅拌 5h,将清液倾出,再用 150 mL 95%的 DWSO 搅拌过夜,透析,然后冷冻干燥,再测定水分含量,计算出干物质。

细胞壁材(CWM)的分析^[1]:将 DWSO 不溶解的部分在 4℃的水中透析,再冷冻干燥。称取 1g 的 CWM 溶解在 100 mL 0.05mol/L CDTA/0.05 mol/L Na₂CO₃(含有 20mmol/L NaBH₄),在室温下搅拌 3 h,7 000×g 离心得到清液,残渣用 50 mL 水洗,将所有的清液混合,调节 pH 到 5.0,再进行透析,然后冷冻干燥,再测定干物质含量;残渣再次加入到 100 mL 4 mol/L KOH(含有 20 mmol/L NaBH₄),室温下搅拌 2 h,离心将上层清液用乙酸调节到中性再进行透析,冷冻干燥,再测定干物质含量;将残渣也进行透析,冷冻干燥,再测定干物质含量。

水溶性物质中寡糖和单糖的分析^[1]:称取 2 g 可

第一作者:硕士研究生(王璋教授为通讯作者)。

收稿日期:2005-07-28,改回日期:2005-10-20

溶性物质加入到 20 mL 的水中,在 1 000 mL 的水中透析,重复 2 次,分离出低分子质量的单糖和寡糖,将水溶液合并,浓缩,冷冻干燥,用 HPLC 分析。

Zeta 电位的测定:采用 DPM-1-Zeta 电位测定仪对样品中悬浮颗粒的 Zeta 电位进行测定。将样品适当稀释,然后分别测定其中 10 个微粒在正反方向移动一格(80 μm)的时间,共计 20 次。

微观结构的测定:用 SEM 进行观察,拍照。

2 结果和讨论

2.1 酶解前后主要成分的分析

表 1 酶解前后主要成分的变化

成分	酶解前的含量/%	酶解后的含量/%
油脂	10.29	12.1
水溶物	17.3	39.12
PAW-溶	20.06	5.01
DMSO-溶	7.19	2.91
CWM	45.16	42.84

通过表 1 可以发现,由于试验中采用了甲醇和 CHCl_3 混合液提取油脂,甲醇会提取部分的酚类物质^[2],而造成酶解前的油脂含量比实际值 9.56% 要高;酶解后的含量的升高主要来自于酶解过程中部分酚类物质的释放。可溶性物质在酶解前后变化很大,这是由于酶解过程中大分子的淀粉和纤维素等被降解,且其他可溶性物质在酶解过程中也被释放出来。PAW-溶部分酶解后大量减少,但试验中并未加入蛋白酶,可见有其他物质和蛋白质结合在了一起,酶解作用使得这些物质部分或全部分离出来,进入水相。这类物质可能是酚类,因为可可粉中酚类物质含量丰富,在可可粉的生产过程中,发酵处理使得酚类和蛋白质从破碎的细胞中溢出^[3],以后的干燥处理和烘烤工艺有利于两者结合在一起,形成不溶解的成分^[4]。但是可可粉的总的酚类物质的含量在 14% 左右,比 PAW-溶含量减少量 15.05%,所以可能还有其他物质与蛋白质与酚类共同结合在一起。酶解后的 PAW-溶含量为 5.01%,也比实际测定的粗蛋白要少,除了粗蛋白法中测得的值中含有部分非蛋白成分,主要是本文实验方法中部分蛋白溶解到水中,部分结合在 CWM 中了^[1]。从 DMSO- 溶的变化发现,酶解没有使得所有的淀粉降解掉,一方面是由于酶解没有进行到最后,另一个原因是部分淀粉与其他的物质结合在一起不利于淀粉的酶的彻底作用;此外测定的酶解前的淀粉含量明显要比以前测定的淀粉的含量要少,这是因为有一小部分可溶解的淀粉进入到水

相,另一部分与其他物质结合在一起,可能结合在 CWM 中^[1],也可能与蛋白质^[1]或多酚^[4]等结合在一起。酶解前后成分中含量最高的是 CWM,这是造成可可粉以不溶状态存在的主要原因,而酶解对该成分的影响不大。

2.2 酶解前后 CWM 成分分析

表 2 酶解前后 CWM 成分的变化

成分	酶解前		酶解后	
	含量 ¹⁾ /%	含量 ²⁾ /%	含量 ¹⁾ /%	含量 ²⁾ /%
果胶	8.85	4.00	11.37	4.87
半纤维素	57.83	26.11	48.75	20.88
渣	28.85	13.03	26.59	11.39

注:1)在 CWM 中的含量;2)在总的可可粉中的含量。

进一步对 CWM 成分进行分析,由表 2 发现,酶解后果胶的含量增加,主要是酶解后果胶暴露,有利于提取^[5]。半纤维素类是 CWM 的主要成分,酶解后含量减少,这是纤维素酶和木聚糖酶的降解造成的。渣中包含了纤维素和类木质素,该类木质素是蛋白质、淀粉、纤维素以及多酚类的复合体^[1]。总体可见酶解对 CWM 的改变不明显。

2.3 酶解前后可溶性成分的分析

表 3 酶解前后可溶性成分的分子量的大体分布

分子质量/u	酶解前		酶解后	
	含量 ¹⁾ /%	含量 ²⁾ /%	含量 ¹⁾ /%	含量 ¹⁾ /%
<30 000	77.11	20.66	77.18	20.36
>30 000	13.34	3.57	30.19	7.96

注:1)在 CWM 中的含量;2)在总的可可粉中的含量。

表 4 酶解前后可溶性物质中含氮物质的分析

名称	酶解前/%	酶解后/%
粗蛋白	7.21	7.34
游离氨基酸	3.22	3.14

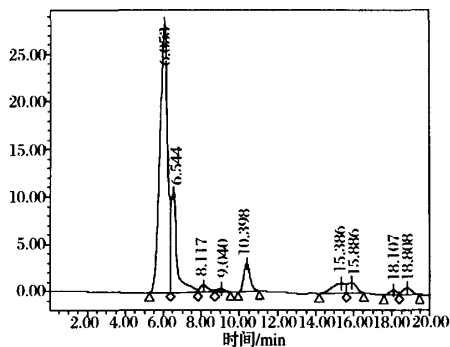


图 1 酶解前分子质量<30 000 u 可溶性物质的 HPLC 图

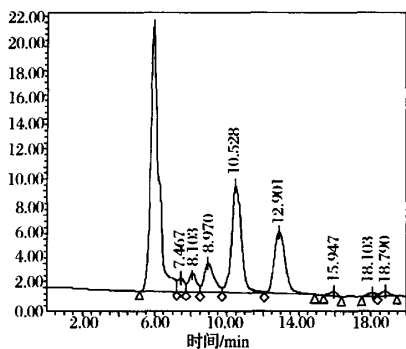


图2 酶解后分子质量<30 000 u可溶性物质的 HPLC 图

表5 酶解前后分子质量<30 000 u可溶性物质中的成分的变化

名称	酶解前含量		酶解后含量	
	含量 ¹⁾ /%	含量 ²⁾ /%	含量 ¹⁾ /%	含量 ²⁾ /%
葡萄糖	0	0	15.26	4.61
二糖	5.40	0.72	23.40	7.06
蜜三糖	0.71	0.09	6.46	1.95
水苏糖	1.88	0.25	3.32	1.00
五糖	0	0	2.05	0.62
大分子物质	82.25	10.97	47.32	14.29

注:1)在 CWM 中的含量;2)在总的可可粉中的含量。

可可粉中另一个主要的部分是可溶性物质。首先通过透析分析分子质量的分布,发现酶解前后 30 000 u 上下的物质的分布变化不明显,可溶性部分主要集中在 30 000 u 以下。

通过 HPLC 分析 30 000 u 以下物质的组成。

通过表 5 发现,葡萄糖、二糖(主要是麦芽糖)、蜜三糖、水苏糖、五糖在可可粉中的总含量共增加了 14.18%,而淀粉和 CWM 的含量仅共减少了 6.6%(表 1),所以以其他存在形式的多糖被降解,它们可能与其他的物质结合在一起或者存在于水溶液中,蛋白质除了和多酚类结合,仍可能共同结合了其他的物质,这类物质可能包括淀粉、淀粉、蛋白质以及多酚的作用方式是:多酚通过疏水键和氢键与蛋白质结合^[4],然后多酚再与淀粉作用,多酚与多糖的复合一般是可逆^[4],所以该淀粉仍是淀粉酶的底物;同时有油脂存在,蛋白质可能会与淀粉发生作用,生成脂肪-淀粉-蛋白质复合物^[6]。通过图 1 和图 2 发现,有部分大分子多糖被降解,这些多糖是糊精(在发酵过程中部分淀粉被酶解或发酵,产生了糊精以及单糖,还原性糖参与了形成风味的反应,而糊精没有很大的变化)以及部分可溶性淀粉。通过表 4 发现可溶性物质中的粗蛋白的总含量是 7% 左右,其中有 3% 左右的游离氨基酸,酶解前后两者的变化都不明显。

2.4 酶解前后可可粉结构的变化

用 SEM 观察反应前后可可粉的变化情况

图3 未经处理的可可粉

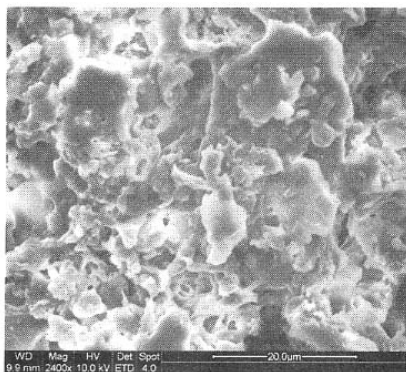


图4 糊化后的可可粉

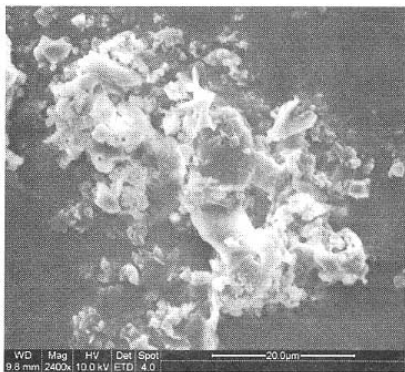


图5 酶解后的可可粉

通过图 3 发现,没有经过糊化处理的可可粉大部分以不规则的球型存在,同时也有小部分的更小的颗粒,这是磨碎程度不一样形成的,较大的颗粒有不规则的展开,展开的表面有小球状,以及不规则形状的突起,小球状突起是没有经过糊化的淀粉颗粒,不规则的突起可能是在烘烤过程中有部分的淀粉糊化后

形成的。图4是经过糊化后的可可粉体系,此时看不到明显的可可粉粒子,也看不到水相的存在,颗粒被糊化后的淀粉覆盖。通过图5发现,经过酶解后,淀粉大部分被酶解,大粒子上出现了酶解的空洞,出现支离破碎的小片段,这些颗粒出现部分的聚集,可以看到水相的存在。比较3张图发现,酶解在产生更小的粒子的同时,还使得部分粒子发生了聚集。这种聚集是比较弱的,产生聚集的可能原因是,糊化使得淀粉膨胀,相邻的颗粒交接,其他大分子物质也可能因为热处理伸展,发生空间上的缠绕和穿透。同时酶解的作用也会改变粒子的电位,如果电位不是很高的话,就很容易发生聚集。下面的实验将进一步的分析酶解前后,体系中Zeta电位的变化。

2.5 酶解前后可可粉粒子带电性的变化

表6 酶解前后可可粉粒子Zeta电位的变化

	酶解前	酶解后
Zeta 电位/mV	-20.7	-28.08

通过表6发现,可可粉经过糊化后粒子的Zeta电位是-20.7mV,造成粒子带负电的原因是可可粉中含有蛋白质以及果胶等带电物质,体系的pH是5.45,在蛋白质的等电点左右,基本上不带电荷,而果胶带有负电荷,这是可可粒子带负电的主要原因,而酶解后电位降低了,这可能是果胶的进一步暴露在表面造成的,表6中比较了酶解前后前后果胶含量,发现酶解后果胶含量增加了,实际上是部分酶解掉淀粉、纤维素、半纤维素,让果胶暴露造成的。粒子的电位下降有利于粒子的稳定,但是Zeta电位在-15~-30mv之间,粒子属于半稳定状态仍然会发生聚集,这就是在图5中出现粒子聚集的一个原因^[7]。通过均质作用可以破坏聚集,加入带有负电的亲水胶体

可以改变粒子带电性,胶体的增稠性也可以阻止粒子的聚集。这在以后的稳定性实验中将进一步讨论。

3 结 论

可可粉经过淀粉酶、纤维素酶和木聚糖酶的作用后,可溶性物质大量增加,一部分来自于多糖水解的产物:葡萄糖、麦芽糖、蜜三糖、水苏糖、五糖以及糊精,另一部分来自于多酚类物质。PAW-溶部分酶解前后变化很明显,是酶解过程中与蛋白质结合在一起的多酚类以及淀粉转移到了水相中造成的。酶解后CWM含量减少,其中的果胶类物质暴露,使得粒子的Zeta电位降低。酶解也使得可可粒子粒径减小,但是部分可可粒子发生疏松的聚集。

参 考 文 献

- 1 Redgwell R J, Trovato V, Curti D. Cocoa bean carbohydrates: roasting-induced changes and polymer interactions [J]. Food Chemistry, 2003, 80:511~516
- 2 Serra Bonvehí J, Ventura Coll F. Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder [J]. Food Chemistry, 1997, 60:365~370
- 3 Kim H, Keeney P G. (-)Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans[J]. Food Science, 1984, 49: 1 090~1 092
- 4 石 碧,狄 莹 编著. 植物多酚[M]. 北京:科学出版社, 2000. 67~91, 95~97
- 5 Emilio Recio, Antonio Encina, Jesus M Alvarez, Jose l. Acebes. Autolysis-like releases of homogalacturonan from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cell walls[J]. Plant Science, 2003, 164:579~588
- 6 Genyi Zhang, Bruce R Hamaker. Starch-free fatty acid complexation in the presence of whey protein[J]. Carbohydrate Polymers, 2004(8): 256~234
- 7 焦学瞬主编. 天然食品乳化剂和乳液—组成、性质、制备、加工与应用[M]. 北京:科学出版社出版, 1999. 213

The Changes in the Cocoa Powders Before and After the Enzymatic Process

Yin Luqin Wang Zhang

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

ABSTRACT Precipitation is the major problem in the cocoa beverage. Enzymes were used to reduce the particle size and improve the solubility of the cocoa powder. After the treatment of the amylase, cellulase and pentosanase, the composition, microstructure and the charges in the cocoa particles occurred. The soluble composition content increased; and the starch, protein and the cell wall material (CWM) content decreased. At the same time, the particle size decreased, but part of them aggregated. Moreover the pectin was exposed after the enzymatic process, which made the Zeta potential of the particles decrease from -20.7mv to -28.08mv.

Key words cocoa powder, enzyme, soluble composition, cell wall material(CWM), microstructure, Zeta potential