

苹果汁中活性蛋白的性质及其稳定化处理研究进展

李全宏 李娜 付才力 邸 诤

(中国农业大学食品科学与营养工程学院,北京,100083)

摘 要 苹果汁中活性蛋白质(HAP)是澄清苹果汁产生混浊沉淀的重要原因之一,疏水性氨基酸易于和多酚聚集,形成混浊。苹果汁中不同浓度的活性蛋白质与低分子的多酚以及简单酚所引起混浊的反应机理不同;活性蛋白质的种类、分子结构、反应的时间、温度、反应体系的 pH、无机离子及其离子强度对混浊的产生有重要影响。单宁酸、膨润土、硅溶胶和聚乙烯聚吡咯烷酮(PVPP)是有效的稳定化处理措施。

关键词 苹果汁,混浊,稳定化

苹果中活性蛋白质和多酚是果汁中浑浊沉淀产生的主要原因,它对果汁的感官和货架期造成了不利的影晌^[1]。Beveridge 等(1993)在研究苹果汁混浊的成分时,发现其中蛋白质占很大比例,约为 11.4%~29.0%,同时蛋白质与酚类物质形成的复合体也是产生混浊的原因之一。目前对苹果汁浑浊沉淀形成因素的研究主要集中在多酚上,而对蛋白质的研究很少,主要是因为苹果汁中的蛋白质含量很少^[2]。Van Buren 等^[3]报道,传统苹果汁中的蛋白质含量为 11~180 mg/L。对能引起浑浊的活性蛋白质(HAP)的研究,主要是集中在用吸附剂或澄清剂如膨润土、硅胶、明胶或氧化处理果汁后,比较处理前后果汁的稳定性,蛋白质含量和蛋白质电泳图谱^[2]。苹果汁蛋白经电泳分析,分子量在 21~31 ku 的蛋白质和混浊有关。对果汁或葡萄酒中 HAP 的研究表明,其活性与分子量和 pI 值有关^[4]。

1 苹果汁中蛋白质产生浑浊的机理

苹果汁中蛋白质主要是和多酚结合形成复合物而产生沉淀^[1~5],关于蛋白质和多酚的相互反应已做了大量的研究工作。研究表明,果汁在低温条件下产生的沉淀当升温时会部分或全部溶解,因此判断该反应是非共价连结^[4]。此反应也不是离子连结,因为加入盐会使沉淀

溶解^[6]。非极性溶剂二氧杂环乙烷和二甲基甲酰胺能抑制沉淀形成并能将形成的沉淀溶解^[7]。最近研究表明,多酚和含脯氨酸的蛋白质反应,可能是由于 2 者的苯环重叠形成了 π 键,最终导致果汁中浑浊物的产生^[8]。蛋白质和多酚主要是借助疏水键连结,疏水性氨基酸的含量一方面也反映了蛋白质疏水性的强弱,有后混浊现象的果汁中疏水性蛋白质易于和多酚聚集,形成混浊。

当 HAP 和多酚以不同的比例反应时,其结果是不同的。当蛋白质浓度保持恒定,多酚浓度增加时,沉淀会增加,但当多酚增加到一定浓度时,沉淀又会减少。同样,多酚保持恒定,蛋白质增加时,沉淀会增加到某一最大值然后下降^[5,8]。其机理可能如下(如图 1):当溶液中蛋白质的浓度较低时,大量的多酚分子聚集在蛋白质的表面形成了单分子的疏水层,当多酚的分子数目足够多时,蛋白质表面的疏水性就会大到使蛋白质从溶液中沉淀析出(图 1a);如果继续增加蛋白质的含量,当溶液中的蛋白质的比例上升到某一程度时,此时蛋白质的结合点总数与多酚的大体相等,就会形成多酚-蛋白质的交联网状结构,从而更容易使蛋白质从溶液中沉淀出来(图 1b);当蛋白质的量继续增加时,多酚的相对含量就会降低,这时由于蛋白质提供的结合点多于多酚的羟基数,于是多酚一

第一作者:博士,副教授。

收稿时间:2004-05-10,改回时间:2004-06-21

蛋白质的交联网状结构就会受到破坏,网络结构解体,混浊沉淀物反而会减少(图 1c);图 1d 表明,即使是低分子的多酚以及简单酚,只要它们的浓度足够大,也能在蛋白质的表面形成疏水层而使蛋白质沉淀出来^[8,9]。

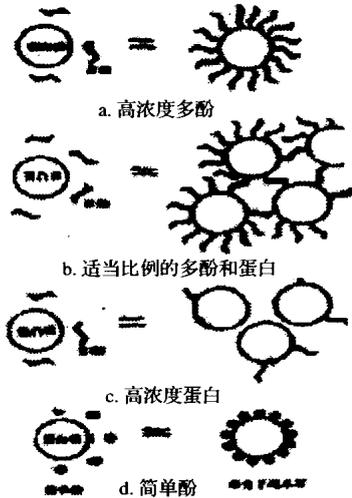


图 1 多酚-蛋白质反应模式

2 影响苹果汁中蛋白质浑浊沉淀的因素

2.1 蛋白质的种类与分子结构的影响

Butler^[10] 研究结果显示,蛋白质中脯氨酸含量的高低对浑浊的影响是很明显的。富含脯氨酸的蛋白质被认为是 HAP 的主要成分^[4]。脯氨酸残基不仅可作为多酚的结合位点,而且可使多肽保持伸展,从而使结合表面积达到最大^[11]。富含羟脯氨酸的蛋白质虽然不与儿茶素或单宁酸形成复合物,但它也有可能参与浑浊的形成^[12]。从苹果汁分离的沉淀中研究发现,脯氨酸占 HAP 的 5%~16%。不含脯氨酸的氨基酸几乎没有起混活性^[4]。

在蛋白质与多酚相互反应形成混浊沉淀的过程中,蛋白质的分子结构是一个很重要的决定因素^[1]。一般来说,氨基酸残基中脯氨酸残基或其他疏水性氨基酸含量高的蛋白质对多酚的亲合力比较强,容易产生混浊沉淀;蛋白质的分子量越大,结合点就越多,就越容易和多酚反应;结构比较松散的蛋白质与多酚容易反应,这可能是因为在存在较多的结合点,或者是空间位

阻较小的缘故^[9]。同时,多酚和蛋白质的结合常常具有一定的相互选择性^[1]。

2.2 反应时间和温度的影响

蛋白质和多酚的反应是一个可逆反应,反应的温度和时间对反应的平衡也有很大的影响。一般来说,温度越高,反应所需的时间也就越短。温度的升高,会使蛋白质的结构更为松散,分子内的疏水性基团就会充分的暴露出来,更利于多酚的羟基与之反应。果汁加工中利用热处理,改变蛋白质和多酚的聚合状态,使蛋白质充分伸展,溶解蛋白质和多酚的聚合物。一般榨汁后的巴氏杀菌温度的选择以及最后过滤和装瓶前的热处理对混浊有很大的影响,有助于蛋白质热聚合,易于沉淀,被超滤膜截留而去除^[13]。

2.3 反应体系的 pH 的影响

反应体系的 pH 对多酚和蛋白质的反应程度有很大的影响,每一种蛋白质都有其最适合的多酚沉淀点,而常常在等电点附近的 pH 的范围内沉淀出的多酚的量最大^[9]。在这个范围内,蛋白质的静电斥力最小,此时多酚-蛋白质之间交联的拉力大于蛋白质分子间存在的斥力,从而生成的混浊沉淀量最大^[1]。研究表明,pH4.0~4.2 比 pH3.0 产生的沉淀多 6 倍(相同的蛋白质和多酚反应),当 pH>4.2 时,沉淀减少,Siebert 推测可能与蛋白质的等电点有关^[6]。

2.4 无机离子及其离子强度的影响

当多酚和蛋白质反应时,会明显受到盐离子的影响。在通常的情况下,无机盐都会促进反应向混浊沉淀的方向发展^[6]。无机盐主要是通过增加多酚对蛋白质的疏水作用而促进混浊反应的进行。同时,当反应体系中有金属离子存在时,它们可与蛋白质、多酚中大量的酚羟基和羧基形成配位键,进一步加强相互间的交联作用而促进混浊沉淀的产生^[1,9]。

3 澄清果汁的稳定化处理

3.1 单宁酸

单宁酸是一种公认的和浑浊有关的多

酚^[6],易于和蛋白质形成浑浊,常用于啤酒的澄清,也常用于作为模拟体系的酚类底物^[9]。由于单宁酸的分子结构和其他多酚类物质相同,因此可以作为 HAP 的沉淀剂。

Mussche 指出,使用一定浓度的单宁酸对饮料泡沫的稳定性是没有影响的,然而当它的用量达到 200 mg/mL 时,能除去饮料中的泡沫活性多肽,这可能会使一些饮料如啤酒的品质受到不利的影响^[1]。对于单宁酸所引起的泡沫多肽的损失,可以采用抗体法进行测量^[14]。

3.2 膨润土

膨润土是一种粘土矿物质,由微小的晶片组成,这些微小晶片携带负电荷,且束缚蛋白质的能力很大。在膨润土的晶片间蛋白质做桥梁,形成一种比膨润土单一更易于沉淀的凝聚体。这种凝聚体也能捕获混浊粒子和悬浮粒子。膨润土广泛地应用于果汁和果酒中无选择性吸附除去混浊物质和泡沫多肽,防止蛋白凝聚体的产生^[15]。

膨润土使用中的缺点就是在澄清液中形成一定量的松散微粒而不易除去,因此在工业生产中用的较少。

3.3 硅溶胶

与膨润土不同,硅溶胶能选择性地去除 HAP,这是由于硅溶胶能够辨别活性多肽,并与之相应的位置结合反应^[1,15]。硅溶胶对泡沫活性蛋白没有影响,因此在啤酒中,硅溶胶的应用要比膨润土广泛的多。在富含多酚的饮料(如苹果汁)中,硅溶胶的作用则不明显,因为蛋白质中脯氨酸的位置已经被多酚占据。

3.4 聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)

PVPP 一直是作为多酚的吸附剂, Siebert 等发现 PVPP 也能除去苹果汁中的一部分 HAP。他们认为可能是除去了蛋白质—多酚复合物,研究表明蛋白质—多酚复合物是沉淀的主要原因。Siebert 用 PVPP 吸附果汁,通过比较吸附前后 HPLC(278 nm 检测)图谱的变化,发现峰的变化很小,表明苹果汁中的 HAP 只占总蛋白的很少一部分,或此类蛋白在 278 nm 处检测不到。LI-CHEN WU 等^[2]用 5 g/L

的 PVPP 加入到果汁中,发现总蛋白减少了 18%。将果汁进行 SDS-PAGE,表明果汁中的蛋白质分子量为 15,28 和 32 ku,用 PVPP 处理后,15 和 28 ku 处的带谱减少,说明这 2 种蛋白可能是 HAP。

4 讨论

苹果汁的浑浊现象一直未得到彻底的解决,主要是由于对浑浊产生的机理缺乏认识。目前的研究结果主要是分析总酚含量和如何尽可能降低酚类物质含量,国外的研究围绕苹果汁中活性蛋白质和多酚结合产生沉淀机理和影响因素进行分析,但对于苹果汁中有害的活性蛋白质从结构、分子量以及在整个加工中蛋白质的变化情况都缺乏全面系统的研究,只有解决了这些技术难题,才有利于我们获得稳定澄清的苹果汁产品。

参 考 文 献

- 1 王 志,黄惠华,陈建新. 饮料中的多酚—蛋白质反应及其稳定化处理[J]. 食品工业科技,2002,23(12):81~84
- 2 Li ChenWu, Siebert K J, Characterization of haze-active proteins in apple juice[J]. J Agric Food Chem. 2002,50:3 828~3 834
- 3 Van Buren J P. Avoiding haze in clarified apple juice. In Processed Apple[M]. New York: New York State Agricultural Experiment Station,1992
- 4 Siebert K J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis[J]. J Agric Food Chem, 1999,47:353~360
- 5 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):46~49
- 6 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
- 7 Siebert K J, troukhanova N V, Lynn P Y. Nature of polyphenol-protein interactions [J]. J Agric Food Chem, 1996,44:80~85
- 8 Bianco A, Chiacchio U, Rescifina A. Biomimetic supramolecular biophenol-carbohydrate and biophenol-

- protein models by NMR experiments [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45:4 281~4 285
- 9 石 碧,狄莹著. 植物多酚[M]. 北京:科学出版社,2000
- 10 Butler L G. New perspectives on the antinutritional effects of tannins. In *Food Proteins*, 1989:402~409
- 11 Baxter N J, Lilley T H, Haslam E. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation[J]. *Biochemistry*, 1997, 36:5 566~5 577
- 12 Luck G, Hua L, Murray N J et al. Polyphenols, as-tringency and proline-rich proteins[J]. *Phytochemistry*, 1994, 37:357~371
- 13 Boye J I, Ma C Y, Harwalkal V R. Thermal denaturation and coagulation of Proteins[C]. New York: Marcel Dekker Inc, 1997:25~56
- 14 Siebert K J, Lynn P Y. Effect of protein-polyphenol ratio on the size of haze particles[J]. *Am Soc Brew Chem*, 2000:117~123
- 15 Siebert K J, Lynn P Y. Mechanisms of beer colloidal stabilization[J]. *J Am Soc Brew Chem*, 1997, 55:73~78

Characterization of Haze-Active Proteins and Its Stabilization Treatments in Apple Juice

Li Quanhong Li Na Fu Caili Di Zheng

(College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agriculture University, Beijing, 100083)

ABSTRACT The haze-active protein(HAP) in clear apple juice is one of the important reasons of haze formation. Hydrophobic amino acids have been shown to readily interact with polyphenols to induce haze. The mechanism is different according to the concentrations of HAPs combined with low molecule polyphenols and simple phenols. The species and structures of HAP, reaction time temperature, pH and metal ions exert stronger influences on haze formation. Tannic acid, bentonite, silica gels and polyvinylpolypyrrolidone(PVPP) are effective stabilization reagents.

Key words apple juice, haze, stabilization

FDA 拟对健康食品制订更严格的标准

政策、法规、标准

美国食品和药物管理局(FDA) 2004年年中公布了一份健康食品管理新条例草案,首次提出要为健康食品的生产 and 标签制订严格标准。这一草案预计 2005 年生效,它有可能对海外健康食品进入美国市场造成一定影响。

美国食品和药物管理局声称,制订新管理条例的目的是为了确保食品增补剂和营养食品中不含污染或不应有的掺杂物,确保此类产品的标签能准确反映其所含营养成分,从而让消费者买得放心。在健康食品的生产方面,新条例对工厂的设计和建造、生产设备、质量控制、产品检测、如何处理消费者投诉、生产档案保存等都将有一系列规定。

另外,根据新条例,健康食品中包含的成分超出或少于标签上所注明的剂量;含有标签上没有的成分或者细菌、杀虫剂、重金属等有害污染物,都将被视为“掺假”。美国食品和药物管理局将有权把这类产品清除出市场,甚至对厂商采取惩罚措施。但美国食品和药物管理局也强调说,健康食品的安全性,其对健康效果究竟如何,并不在新条例管理范围之内。

中草药,含钙、维生素和氨基酸等成分的产品,在美国都被归为食品增补剂或称健康食品。美国曾在 1994 年制订了相对宽松灵活的健康食品管理法规。近 10 年来,保健食品市场在美国迅速扩大,目前其规模约为 190 亿美元,美国国内的生产商已达到上千家。

与此同时,健康食品所引发的争议也不断在美国发生。美国食品和药物管理局目前正在就新条例征求社会各界的意见。如果新条例在 2005 年生效,它将对美国国内生产商和国外进口商一视同仁。据悉,美国国内的一些健康食品生产商已开始准备应对新条例的生效。