

单宁酸与麦胶蛋白结合反应的研究

寇正福,刘坐镇,邬行彦

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237

摘要: 以单宁酸和麦胶蛋白分别作为引起啤酒浑浊的敏感多酚和敏感蛋白的模型物质,用分光光度法对影响单宁酸与麦胶蛋白结合反应的因素进行了研究。发现,麦胶蛋白的浓度影响单宁酸与麦胶蛋白结合的方式,也影响二者的结合比例。反应温度越低、反应时间越长,单宁酸与麦胶蛋白结合反应越完全。在很低的pH值时,单宁酸与麦胶蛋白结合能力很差,在pH4.0附近,单宁酸与麦胶蛋白结合反应较完全。低乙醇浓度下,随着乙醇浓度的上升,单宁酸与麦胶蛋白结合反应程度有所下降,而在较高乙醇浓度下却随之增大。

关键词: 单宁酸; 麦胶蛋白; 啤酒; 分光光度法

中图分类号: TS262.5; TS261.4; O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286 (2003)03-0065-03

Study on the Complexation Interaction of Tannic Acid with Gliadin

KOU Zheng-fu, LIU Zuo-zhen and WU Xing-yan

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering ECUST, Shanghai 200237, China

Abstract: The influencing factors on the interaction of tannic acid (as a model substance of the haze-active polyphenol in beer) with gliadin (as a model substance of the haze-active protein in beer) were studied with a spectrometric method. It was found that the concentration influences the mode and the ratio of complexation of tannic acid with gliadin. The lower the temperature and the longer the time, the more complete was the reaction. At low pH, the complexation was low; at about pH 4.0, the complexation reaction was relatively complete. At low alcohol concentration, the extent of complexation reaction decreased with the increase of alcohol concentration; whereas at high alcohol concentration it was the other way round.

Key words: tannic acid; gliadin; beer; spectrometric method

啤酒常常由于微生物和物理化学因素造成浑浊,多酚和蛋白质是引起浑浊的一个主要因素,这是啤酒业中一个长期研究的课题。引起啤酒混浊的敏感蛋白有大麦醇溶蛋白、富含脯氨酸的醇溶谷蛋白等。麦胶蛋白与它们具有很好的相似性,形成混浊能力强,而且容易得到,因此非常适合作为引起啤酒混浊的敏感蛋白的模型物质^[1]。

测定多酚和蛋白质结合能力的方法有平衡渗析法、微热计量法、连续动态渗析法、酶抑制法、核磁共振法、蛋白质沉淀法和相对涩性法^[2]。利用多酚-蛋白质结合产生的沉淀即可对多酚结合能力进行分析。常用的方法为浊度分析法、放射性同位素标记蛋白质定量法和血红蛋白法。一种较简便的方法是分光光度计法。此方法不仅可测定多酚对蛋白质的结合能力,而且可阐明反应的动力学、热力学乃至反应机理^[3]。与一些传统的方法相比,它比较简单、准确,而且样品用量少。其原理如下。

单宁溶液和麦胶蛋白溶液的紫外吸收光谱均有两个吸收峰。设浓度为 C_T 的单宁水溶液在 λ_1 和 λ_2 处的吸光度值为 A_{T1} 和 A_{T2} ,吸光系数为 ε_{T1} 和 ε_{T2} 。浓度为 C_P 的麦胶蛋白水溶液在相应波长处的吸光度值为 A_{P1} 和 A_{P2} ,吸光系数为 ε_{P1} 和 ε_{P2} 。则有:

$$A_{T1} = \varepsilon_{T1} C_T \quad (1)$$

$$A_{T2} = \varepsilon_{T2} C_T \quad (2)$$

$$A_{P1} = \varepsilon_{P1} C_P \quad (3)$$

$$A_{P2} = \varepsilon_{P2} C_P \quad (4)$$

设在单宁酸-麦胶蛋白反应溶液中 λ_1 和 λ_2 处的吸光度值为 A_1 和 A_2 ,则:

$$A_1 = A_{T1} + A_{P1} \quad (5)$$

$$A_2 = A_{T2} + A_{P2} \quad (6)$$

将(1)至(4)式代入(5)和(6)式,则有:

$$A_1 = \varepsilon_{T1} C_T + \varepsilon_{P1} C_P \quad (7)$$

$$A_2 = \varepsilon_{T2} C_T + \varepsilon_{P2} C_P \quad (8)$$

解方程组得:

$$C_T = \frac{\varepsilon_{P2} A_1 - \varepsilon_{P1} A_2}{\varepsilon_{P2} \varepsilon_{T1} - \varepsilon_{P1} \varepsilon_{T2}} \quad (9) \quad C_P = \frac{\varepsilon_{T2} A_1 - \varepsilon_{T1} A_2}{\varepsilon_{T2} \varepsilon_{P1} - \varepsilon_{T1} \varepsilon_{P2}} \quad (10)$$

先作空白实验,分别测试一定浓度的单宁溶液和麦胶蛋白溶液在 λ_1 和 λ_2 处的吸光度值,则可根据(1)至(4)算出 ε_{T1} , ε_{T2} , ε_{P1} 和 ε_{P2} 4个常数。因此,对于任一单宁和麦胶蛋白反应样品,反应完毕后,经高速离心除去沉淀物,再测离心液紫外光谱在 λ_1 和 λ_2 处的吸收值 A_1 和 A_2 ,则可根据(9)和(10)式计算出离心液中单宁含量和麦胶蛋白含量。由于反应的初始单宁浓度和麦胶蛋白浓度是已知的,因此可以根据以下两式分别计算相对吸光度值 R 以及沉淀中单宁与麦胶蛋白反应的分子比例 $\Delta C_T / \Delta C_P$:

$$R = T \% = \frac{C_{T0} - C_T}{C_T} \quad \frac{\Delta C_T}{\Delta C_P} = \frac{C_{T0} - C_T}{C_{P0} - C_P}$$

收稿日期 2002-11-05

作者简介:寇正福(1973-),男,陕西镇安人,工学硕士,发表论文数篇。

相对吸收值 R 越小,表明反应的单宁越少,单宁与蛋白质反应的程度越小。

多酚-蛋白质结合是一个复杂的可逆反应。两者的分子结构、结合方式和复合物的稳定性是影响结合反应的决定因素;两者的分子比例、溶剂及pH值、反应温度和时间对反应也有一定的影响。

本文以单宁酸和麦胶蛋白作为引起啤酒浑浊的敏感多酚和敏感蛋白的模型物质,用分光光度法对影响单宁酸与麦胶蛋白结合反应的因素(麦胶蛋白的浓度、反应温度、时间、pH值和乙醇)进行了研究。

1 实验仪器和材料

紫外光栅分光光度计:752型,上海第三分析仪器厂;精密酸度计:pHS-2C型,上海雷磁仪器厂;台式离心机:0412-1型,上海医疗器械有限公司手术器械厂。

麦胶蛋白(gliadin):平均分子量约为50000,fluka公司;单宁酸(tannic acid):试剂级,平均分子量为1701,上海试剂公司。

2 分析方法

紫外分光光度法。

3 实验方法

测定单宁酸磷酸盐缓冲液(pH4.2)和麦胶蛋白磷酸盐缓冲液的紫外吸收光谱。将0.01 mM单宁酸溶液与一定浓度麦胶蛋白溶液(含有一定的乙醇)按1:1(体积比例)混合,在一定的温度下,反应一定时间,台式离心机离心15 min,分别测定上清液的紫外吸收值,计算相对吸收值 R 。

4 实验结果与讨论

4.1 紫外吸收系数的计算

分别测定0.01 mM单宁酸磷酸盐缓冲液和 5×10^{-4} mM麦胶蛋白磷酸盐缓冲液的紫外吸收光谱(见图1)。单宁酸分别在214 nm和275 nm处有两个吸收峰,麦胶蛋白在214 nm也有一定的吸收值,在275 nm处吸收值为0。可以算出: $\varepsilon_{T1}=154.3 \text{ cm}^{-1}$, $\varepsilon_{T2}=70.0 \text{ cm}^{-1}$, $\varepsilon_{P1}=644 \text{ cm}^{-1}$, $\varepsilon_{P2}=0.0$ 。

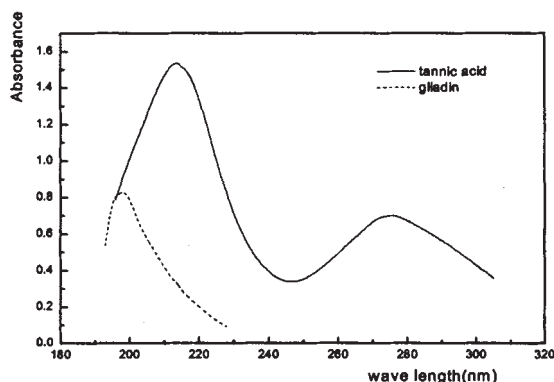


图1 单宁酸和麦胶蛋白的紫外吸收光谱

4.2 麦胶蛋白浓度对反应的影响

分别以 R 和 $\Delta C_T/\Delta C_P$ 对麦胶蛋白初始浓度作图(见图2、图3)。 R 越小,表明 C_T 大,即溶液中剩余的单宁酸的含量高,沉淀的单宁酸就少,单宁酸与麦胶蛋白的反应程度小。反之, R 越大,单宁酸与麦胶蛋白的反应程度大。图2、图3表明,当麦胶蛋白浓度较低时,单宁酸分子可能在麦胶蛋白表面形成单分子层,单位麦胶蛋白结合的单宁酸分子数量多,单宁酸的沉淀率高,沉淀中的单宁酸分子

比例高。当麦胶蛋白的浓度较高时,单宁酸在麦胶蛋白分子间产生交联,单位麦胶蛋白结合的单宁酸分子数量相对减小,单宁酸的沉淀率降低,沉淀中的单宁酸-麦胶蛋白分子比例降低。单宁酸与麦胶蛋白结合的位点数是一定的,因此,当单位麦胶蛋白分子结合到一定数量的单宁酸分子后,也难以再找到稳定的结合点^[3]。这是一种动态平衡,表现在图2、图3中曲线的趋势趋向水平。

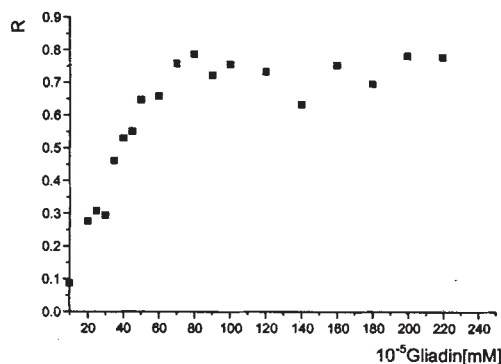


图2 麦胶蛋白初始浓度对相对吸收值 R 的影响

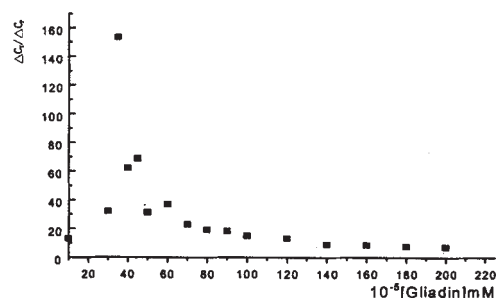


图3 麦胶蛋白浓度对 $\Delta C_T/\Delta C_P$ 的影响

4.3 温度对反应的影响

由图4可以看出,在相同的麦胶蛋白浓度下,温度越高, R (结合反应程度)越小。这说明,单宁酸与麦胶蛋白结合反应是放热反应,高温不利于结合反应。在实际生产中,啤酒受激冷时容易产生冷凝物(单宁与麦胶蛋白类物质的结合物),也说明了低温有利于单宁与蛋白的结合。

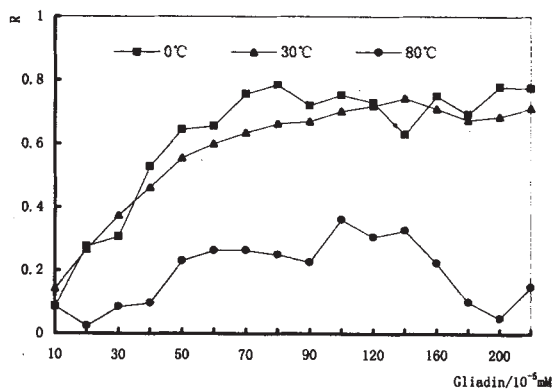


图4 温度对反应的影响

4.4 时间对反应的影响

多酚-蛋白质结合反应是一个可逆反应,反应时间对反应平衡有很大影响。图5显示出这样一个规律:反应时间太短(0.5 h),即使麦胶蛋白的浓度足够高,相对吸收值 R 还是很小,反应也难以达到平衡;经过12 h以后,单宁酸和麦胶蛋白反应基本完全。

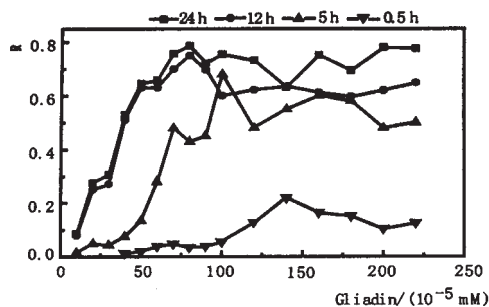


图5 反应时间对反应的影响

4.5 pH对反应的影响

方法同实验4.1,由不同pH下的单宁酸与麦胶蛋白的紫外吸收光谱,得出 $\lambda_1, \lambda_2, A_{T1}, A_{T2}, A_{P1}, A_{P2}$, 根据公式 $\varepsilon_{T1} = A_{T1}/C_T, \varepsilon_{T2} = A_{T2}/C_T, \varepsilon_{P1} = A_{P1}/C_P, \varepsilon_{P2} = A_{P2}/C_P$ 计算出 $\varepsilon_{T1}, \varepsilon_{T2}, \varepsilon_{P1}, \varepsilon_{P2}$ 再计算 C_T, C_P, R_0 取R最大值对pH作图,如图6。

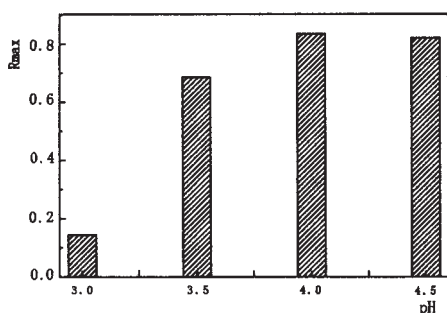


图6 pH对反应的影响

溶液的酸碱性对多酚-蛋白质反应有很大的影响。每一种蛋白都有其最适宜的多酚沉淀点 P_{max} , 往往在 $P_{max} \pm 1$ 的范围内沉淀出的多酚的量最大^[4]。多酚,尤其是单宁沉淀蛋白质的结合反应可以分为两步。首先是单宁分子在蛋白质表面结合,然后单宁在蛋白质分子内和分子间形成交联,使结合产物聚集成更大的结构,最终导致沉淀。第二步发生的程度取决于多酚-蛋白质之间交联的引力是否大于蛋白质之间可能存在的静电斥力。蛋白在 $P_{max} \pm 1$ 的范围内,所带的净电荷最少,所以蛋白之间的静电斥力最少。这就很容易解释图6中的现象:在pH4.0附近,最大相对吸收值 R_{max} 较大,而在很低的pH值时,最大相对吸收值 R_{max} 很低。因为,麦胶蛋白的等电点在pH4.2, pH高于4.2会带负电荷, pH低于4.2会带正电荷; pH越偏离4.2,所带电荷就越多,静电斥力就越大,单宁酸与麦胶蛋白就越难反应。这个结果与Siebert等用浊度法研究的结论一致^[1]。

4.6 乙醇浓度对反应的影响

取R最大值对乙醇浓度作图,如图7。随着乙醇浓度的上升,最大相对吸收值 R_{max} 起初有所下降,而在较高乙醇浓度下却随之增大。这是可能的:多酚-蛋白质的结合反应一般都是在水溶液中进行

行的,一般低浓度的有机溶剂是结合反应有效的抑制剂。而高浓度的乙醇可能会引起蛋白质沉淀^[5]。

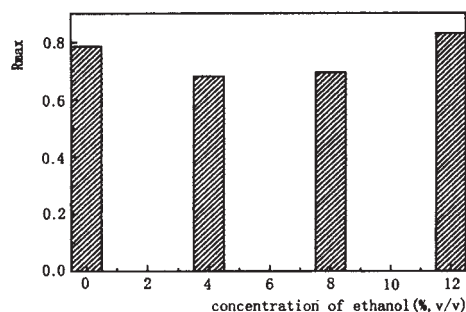


图7 乙醇浓度对反应的影响

5 结论

本文以单宁酸和麦胶蛋白作为引起啤酒浑浊的敏感多酚和敏感蛋白的模型物质,用分光光度法对影响单宁酸与麦胶蛋白结合反应的因素(麦胶蛋白浓度、反应温度、时间、pH值和乙醇)进行了研究。结果发现:()当麦胶蛋白浓度较低时,单宁酸分子在麦胶蛋白表面形成单分子层,单位麦胶蛋白结合的单宁酸分子数量多,单宁酸的沉淀率高,沉淀中的单宁酸分子比例高。当麦胶蛋白的浓度较高时,单宁酸在麦胶蛋白分子间产生交联,单位麦胶蛋白结合的单宁酸分子数量相对减小,单宁酸的沉淀率降低,沉淀中的单宁酸-麦胶蛋白分子比例降低。单宁酸与麦胶蛋白结合的位点是一定的,因此,当单位麦胶蛋白分子结合到一定数量的单宁酸分子后,也难以再找到稳定的结合点。()反应温度越低、反应时间越长,单宁酸与麦胶蛋白结合反应越完全。()在很低的pH值时,单宁酸与麦胶蛋白结合能力很差,在pH4.0附近,单宁酸与麦胶蛋白结合反应较完全。()低乙醇浓度下,随着乙醇浓度的上升,单宁酸与麦胶蛋白结合反应程度有所下降,而在较高乙醇浓度下却随之增大。

参考文献:

- [1] Karl J.Siebert, Aurea Carrasco, and Penelope Y.Lynn. Formation of protein-polyphenol haze in beverages[J]. J.Agric.Food Chem., 1996, 44: 1997-2005.
- [2] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [3] 石碧, 何先祺, 爱德华. 哈斯兰姆. 水解类植物鞣质性质及其与蛋白质反应的研究 V 水解类植物鞣质与明胶的反应机理[J]. 皮革科学与工程, 1994, (1): 4-10.
- [4] H.Oh, J. Hoff. pH dependence of complex formation between condensed tannins and proteins[J]. J.Agric.Food Sci., 1990, 38: 337-340.
- [5] Karl J.Siebert. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization and analysis[J]. J.Agric.Food Chem., 1999, 47 (1): 353-362.

声 明

读者张瑞杰来电指出:本刊2003年第1期第71页刊发的郝新峰的“预测葡萄酒石酸氢钾稳定性的新方法”一文,与其和王素真发表在《中外葡萄与葡萄酒》2001年第6期第47页的“预测葡萄酒石酸氢钾稳定性的新方法”一文完全相同,系抄袭之作,侵犯了原作者的知识产权。经本刊核实,情况属实。根据本刊《约稿》“文责自负”原则,侵权责任完全在作者郝新峰本人。经与郝新峰联系,其承认是抄袭之作,并愿意向原作者张瑞杰和王素真真诚道歉,希望得到她们谅解。同时,也希望郝新峰同志吸取教训,引以为戒!

特此声明

酿酒科技编辑部
2003年3月26日