

梁红云,王 英,李 清,等. 黑莓果酒中蛋白质提取方法研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):349-351.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.113

黑莓果酒中蛋白质提取方法研究

梁红云¹,王 英¹,李 清¹,董明盛²,周剑忠¹

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014; 2. 南京农业大学食品科技学院,江苏南京 210095)

摘要:以实验室自酿的黑莓果酒为原料,采用无水乙醇沉淀法、透析冻干法和 KDS 法分别提取黑莓果酒中的总蛋白质,利用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度以及 SDS-PAGE 检测蛋白质的纯度,并比较 3 种方法之间的差异。结果表明,无水乙醇沉淀法的蛋白质提取率较高,SDS-PAGE 图谱显示条带最多、最清晰;透析冻干法的蛋白质提取率最高,但 SDS-PAGE 图谱中呈现的条带较无水乙醇沉淀法少,条带不清晰,背景颜色较深;KDS 沉淀法的蛋白质提取率最低,SDS-PAGE 图谱中呈现的条带最少、最不清晰。3 种方法中无水乙醇沉淀法最适于黑莓果酒中总蛋白质的提取。

关键词:黑莓果酒;蛋白质;提取方法;SDS-PAGE

中图分类号:TS262.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0349-03

随着人们生活水平提高和保健意识增强,以葡萄酒为代表的果酒,其营养价值得到广泛认可。黑莓果实柔嫩多汁、营养丰富,富含锌、硒等多种矿物质,氨基酸种类齐全,且花色苷和总酚含量较其他浆果高,被誉为第三代“黄金水果”。其所含的多酚类化合物在体内发挥抗氧化作用,可以降低心脏病、癌症和其他慢性病的发生率^[1-2]。但是黑莓的果实皮薄多汁,易发生霉烂,耐储运能力较差,室内条件下存放 2~3 d 后果实即变软发黏,而且果实不耐搬运和翻动,因此对黑莓鲜果必须及时加工处理,并且黑莓为高酸型水果,不宜鲜食,有较强的加工属性,将其制成黑莓果酒将具有巨大的市场潜力。

作为一种商品,果酒的澄清度是决定其品质的一个重要指标,澄清透明、颜色清亮的果酒商品容易吸引消费者的眼球。虽然浑浊或带有沉淀的果酒对人体健康没有影响,但影响消费者的购买欲,进而影响销售市场,因此,不论储存条件如何,果酒必须保持较高的澄清度和稳定性才能保持果酒的商品价值。果酒的澄清工艺及澄清剂的研制是目前的研究热点^[3-6]。

总体来说,引起果酒浑浊沉淀的因素分为生物因素和非生物因素。针对生物因素,在加工和储存的过程中须严格控制卫生管理。非生物因素是引起果酒浑浊及沉淀的主因,也是在酿造工艺上必须重点探讨解决的技术难点。从已有的研

究结果来看,果酒中的蛋白质是引起果酒浑浊的一个主要非生物因素,果酒中的蛋白质含量较低,不是果酒中的主要营养成分,但对果酒的澄清度和稳定性有重要影响,因为果酒装瓶储存过程中蛋白质的缓慢降解导致蛋白质絮凝和聚集成颗粒,最终导致果酒的浑浊和沉淀^[7-9]。大部分研究者认为果酒中蛋白质是引起果酒浑浊的一个必要因素,且蛋白质的含量越高,果酒越容易不稳定,越易发生浑浊沉淀现象,因此,果酒中的蛋白质对果酒的浑浊和沉淀都具有贡献作用^[10-11]。

目前对葡萄果酒中蛋白质的提取主要采用的方法有无水乙醇沉淀法、丙酮沉淀法、TCA 沉淀法、硫酸铵沉淀法、冻干透析法、十二烷基磺酸钠和氯化钾沉淀法(KDS)^[12-13]。本研究选择常用的无水乙醇沉淀法、透析冻干法、十二烷基磺酸钠和氯化钾沉淀法(KDS)对黑莓果酒中的蛋白质进行提取,通过比较 3 种方法中蛋白质提取率和提取纯度,旨在找出一种简便快捷高效的黑莓果酒蛋白质提取方法,为研究黑莓果酒中蛋白质组分如何引起黑莓果酒沉淀提供可靠的方法,同时对充分开发利用我国的黑莓资源、提高农产品经济价值有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

黑莓初酒为江苏省农业科学院农产品加工研究所酿造。果酒酿造采取 2 种方式:一种为在黑莓打浆后添加 0.1% 果胶酶 45 ℃ 酶解 2 h;另一种位黑莓打浆后不添加果胶酶。其他的酿造条件一致。果酒未经澄清剂处理。

1.2 试剂与仪器

试剂:无水乙醇、丙酮、SDS 均购自南京化学试剂有限公

收稿日期:2014-10-08

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)5026]。

作者简介:梁红云(1989—),女,硕士研究生,主要从事食品生物技术研究。E-mail:lianghongyun0606@163.com

通信作者:周剑忠(1965—),男,博士,研究员,研究方向为食品生物技术。E-mail:zjzluck@126.com

[5]郭 丽,谭俊峰,王 力,等. 花香型绿茶加工工艺的研究[J]. 浙江农业科学,2009(5):946-948.

[6]袁林颖,周正科,高飞虎,等. 花香绿茶的加工工艺[J]. 西南园艺,2001,29(3):47-48.

[7]李家贤,黄华林,何玉娟. 广东特色茶品种花香绿茶的加工工艺研究[J]. 广东农业科学,2007(8):81-83.

[8]杨 娟,齐桂年,陈盛相,等. 花香型绿茶品种适制性及加工工艺研究进展[J]. 福建茶叶,2010(7):5-6.

[9]敖 存,唐德松,龚淑英,等. 不同鲜叶摊放处理对夏秋茶香气品质的影响[J]. 茶叶科学,2010,30(5):384-392.

[10]周春明,袁海波,秦志荣,等. 花香绿茶的香气成分分析[J]. 广州食品工业科技,2004,20(2):101-104.

司;KCl,西陇化工股份有限公司;考马斯亮蓝,上海蓝季科技发展有限公司;以上试剂均为分析纯。3.5 ku 的透析袋,USA。

仪器:FDU-1200 真空冷冻干燥机(东京理化/EYELA);UV-1600PC 分光光度计(上海美普达仪器有限公司);SDS-PAGE电泳仪(BIO-RAD 公司);Tanon3500 全自动数码凝胶成像分析系统(上海天能公司)。

1.3 方法

1.3.1 黑莓果酒的前处理 分别取适量未加果胶酶和加果胶酶的黑莓酒样品 4 ℃条件下 3 000 g 离心 10 min,去除不溶性的大颗粒物。弃沉淀,上清备用。

1.3.2 无水乙醇沉淀法 参照 Lambri 等的方法^[14],稍作修改,具体操作步骤如下:分别量取经离心处理的 50 mL 未加果胶酶和加果胶酶的黑莓酒样品,加入 200 mL 无水乙醇,于 4 ℃条件下沉淀 72 h 后,10 000 g 离心 20 min,收集沉淀,重悬于超纯水中,于 3.5 ku 的透析袋中透析 48 h,每隔 4 h 换 1 次双蒸水。然后于真空冷冻干燥机中冻干,用 5 mL 蒸馏水分别溶解未加果胶酶和加果胶酶黑莓酒的蛋白质冻干样品,所得蛋白质样品放置在-20 ℃冰箱中备用。

1.3.3 透析冻干法 参照 Marangon 等的方法^[15],稍作修改,具体操作步骤如下:分别量取经离心处理的 50 mL 未加果胶酶和加果胶酶的黑莓酒于 3.5 ku 的透析袋中,透析 48 h 后,于真空冷冻干燥机中冻干,用 5 mL 蒸馏水分别溶解未加果胶酶和加果胶酶黑莓酒的蛋白质冻干样品,所得蛋白质样品放置在-20 ℃冰箱中备用。

1.3.4 十二烷基磺酸钠和氯化钾沉淀法(KDS) 参照 Fusi 等的方法^[16],稍作修改,具体操作步骤如下:分别量取经离心处理的 50 mL 未加果胶酶和加果胶酶的黑莓酒,10% (质量浓度)十二烷基磺酸钠(SDS)加入到黑莓酒样品中,使其终浓度为 0.2% (质量浓度),沸水浴 5 min,然后将 2 mol/L 的 KCl 溶液加入到样品中,使其终浓度为 400 mmol/L,轻轻混匀样品后将混合液在 4 ℃条件下放置 45 min,4 ℃条件下 14 000 g 离心 15 min,收集沉淀,即为提取的蛋白质样品。将所得样品自然干燥后,分别用 5 mL 蒸馏水溶解未加果胶酶和加果胶酶黑莓酒的蛋白质冻干样品,所得蛋白质样品放置在-20 ℃冰箱中备用。

1.3.5 蛋白质含量测定 参照 Lambri 等的方法^[14]对提取的总蛋白质含量进行测定,以牛血清蛋白质(BSA)作为标准蛋

白质,考马斯亮蓝 G-250 染色,然后于 595 nm 波长处比色,标准曲线方程为 $y = 0.0083x - 0.0009$, $r^2 = 0.9964$,结果用 mg/L 表示。提取蛋白质样品冷冻干燥后加入一定体积的蒸馏水溶解,再用考马斯亮蓝 G-250 染色,在 595 nm 波长处比色。每个样品蛋白质含量均取 3 次测定结果的平均值。

1.3.6 蛋白质提取率 蛋白质提取率 = (提取液的蛋白质含量 × 蛋白质提取液体积) / (黑莓酒蛋白质含量 × 黑莓酒样品体积) × 100%。

1.3.7 SDS-PAGE 分析提取的果酒蛋白质 SDS-PAGE 电泳采用 12.5% (体积分数)的聚丙烯酰胺凝胶作为分离胶,5% (体积分数)的聚丙烯酰胺凝胶作为浓缩胶。冻干的蛋白质提取样品加入一定量的蒸馏水溶解,5 × 样品缓冲液 [0.5 mol/L Tris-HCl, pH 值 6.8, 20% (体积分数)甘油, 4% (质量浓度)SDS, 0.005% (质量浓度)溴酚蓝, 10% (体积分数)β-巯基乙醇]稀释 5 倍后,与蛋白质提取液按 1:1 的体积比混合,沸水浴 5 min,使蛋白质变性,上样量为 20 μL,浓缩胶内电泳时设置电压为 80 V,当溴酚蓝线到达分离胶时把电压提高到 120 V,当溴酚蓝线到达分离胶底部时停止电泳。蛋白质检测用硝酸银溶液染色,再用 Tanon3500 全自动数码凝胶成像分析系统拍照分析。

2 结果与分析

2.1 总蛋白质提取效果的比较

从表 1 可以看出,在 3 种方法中,透析冻干法提取的蛋白质含量和提取率最高,未加酶黑莓酒蛋白质含量为 (484.34 ± 23.51) mg/L,提取率达到 66.01% (质量分数),加酶黑莓酒蛋白质含量为 (630.60 ± 29.74) mg/L,提取率达到 67.01% (质量分数);无水乙醇沉淀法提取的蛋白质含量较高,未加酶黑莓酒蛋白质含量为 (438.37 ± 23.68) mg/L,提取率达到 60.65% (质量分数),加酶黑莓酒蛋白质含量为 (596.39 ± 32.73) mg/L,提取率达到 62.43% (质量分数);KDS 沉淀法的提取量和提取率最低,未加酶黑莓酒蛋白质含量为 (278.57 ± 17.02) mg/L,提取率为 30.19% (质量分数),加酶黑莓酒蛋白质含量为 (314.02 ± 11.54) mg/L,提取率仅为 32.87% (质量分数)。因此,从蛋白质含量和提取率的比较结果可以看出,无水乙醇沉淀法和透析冻干法的效果较好,KDS 法的提取效果最差。

表 1 不同方法提取蓝莓酒总蛋白质含量的测定

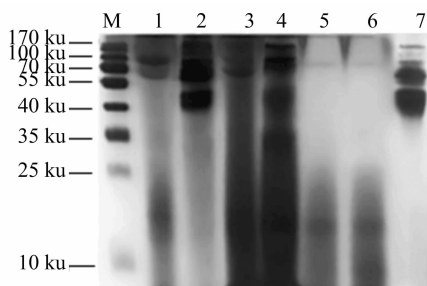
提取方法	提取液含量(mg/L)		蛋白质含量(mg/L)		提取率(%)	
	未加酶	加酶	未加酶	加酶	未加酶	加酶
无水乙醇沉淀法	438.37 ± 23.68	596.39 ± 32.73	72.27 ± 1.77	95.54 ± 2.02	60.65	62.43
透析冻干法	484.34 ± 23.51	630.60 ± 29.74	72.27 ± 1.77	95.54 ± 2.02	66.01	67.01
KDS 法	278.57 ± 17.02	314.02 ± 11.54	72.27 ± 1.77	95.54 ± 2.02	30.19	32.87

2.2 SDS-PAGE 分析提取的蓝莓酒蛋白质

3 种方法提取的蛋白质质量检测 and 图谱分析分别见图 1 和表 2。从图 1、表 2 可以看出,提取蛋白质的相对分子质量分布在 40 ~ 170 ku,但 3 种方法所获得的蛋白质在凝胶电泳中显示的条带数目、背景颜色以及清晰度均存在差异。无水乙醇沉淀的蛋白质条带最多、最清晰,背景颜色也较浅,未加

酶的黑莓酒蛋白质的相对分子质量多集中在 100、70、20 ku 左右,显示 3 条带,加酶黑莓酒的条带较多,蛋白质的分子质量多集中在 40 ~ 170 ku,显示 5 条带;透析冻干法提取的蛋白质不纯,背景颜色很深,未加酶的黑莓酒蛋白质的相对分子质量多集中在 100 ku 和 70 ku 左右,显示 2 条带,加酶黑莓酒的条带较多,蛋白质的相对分子质量多集中在 40 ~ 170 ku,显示

4 条带;KDS 法提取的蛋白质 SDS - PAGE 图谱中呈现的条带最少、最不清晰,加酶和未加酶的黑莓酒蛋白质的相对分子质量在 70 ku 和 20 ku 左右,只显示 2 条带。果胶酶的条带多且集中,相对分子质量多集中在 40 ~ 170 ku,与加酶黑莓酒中的条带较一致,说明在酿酒工艺的酶解过程中所添加的果胶酶是黑莓酒中的蛋白质的一个重要组成部分。从蛋白质的 SDS - PAGE 电泳结果来看,无水乙醇沉淀法提取的蛋白质的纯度最高,杂质最少;透析冻干法提取的蛋白质里的杂质较多;KDS 法提取的蛋白质质量最差。



M—蛋白质marker; 1—无水乙醇沉淀法(未加酶); 2—无水乙醇沉淀法(加酶); 3—透析冻干法(未加酶); 4—透析冻干法(加酶); 5—KDS法(未加酶); 6—KDS法(加酶); 7—果胶酶

图1 3种方法提取黑莓酒总蛋白质的 SDS-PAGE 图谱

表2 3种方法提取黑莓酒总蛋白质的 SDS - PAGE 图谱比较

提取方法	条带数		背景色	条带清晰度
	未加酶	加酶		
无水乙醇沉淀法	3	5	浅	清晰,颜色深
透析冻干法	2	4	最深	较清晰
KDS 法	2	2	较浅	不清晰,颜色很浅

3 结论

本研究通过无水乙醇沉淀法、透析冻干法和 KDS 法提取黑莓酒中的蛋白质,对得到的总蛋白质样品进行定量和 SDS - PAGE 电泳检测,结果显示如下:

(1)蛋白质含量和提取率的分析结果显示,透析冻干法提取效果最高,无水乙醇法次之,两者的提取率都在 60% 以上;KDS 法的提取效果最差,提取率为 30% 左右。

(2)SDS - PAGE 电泳显示黑莓果酒的蛋白质相对分子质量分布在 40 ~ 170 ku,未加酶的黑莓酒蛋白质的相对分子质量多集中在 70 ~ 100 ku。在果酒的酿造过程中酶解处理会增加果酒中的蛋白质含量和蛋白质种类。

(3)无水乙醇沉淀法获得的蛋白质纯度最高,条带最清晰;冻干透析法获得的蛋白质,冻干后有很大一部分黏稠物不能复溶,杂质太多,虽然含量最高,但其背景颜色太深,条带不清晰;KDS 法获得的蛋白质含量最低,条带最少,染色最弱,最不清晰。

样品制备是关键环节,直接影响后续的 SDS - PAGE 电泳效果,尤其针对黑莓果酒这样低蛋白质含量的原料,确定理想的蛋白质提取方法对蛋白质电泳非常重要。综合以上结

果,确定无水乙醇沉淀法为黑莓果酒中总蛋白质提取的最适方法。

参考文献:

- [1]Bowen - Forbes C S,Zhang Y J,Nair M G. Anthocyanin content, antioxidant, anti - inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2010,23(6):554 - 560.
- [2]Elisia I, Hu C, Popovich D G, et al. Antioxidant assessment of an anthocyanin - enriched blackberry extract[J]. Food Chemistry, 2007, 101(3):1052 - 1058.
- [3]王 英,周剑忠,黄开红,等. 皂土在黑莓果酒澄清中的应用研究[J]. 中国酿造,2012,31(8):47 - 51.
- [4]徐 春. 壳聚糖在白葡萄酒澄清中的应用研究[J]. 中国酿造, 2006,37(1):21 - 23.
- [5]周文化,周 晔,周其中,等. 壳聚糖在荔枝果酒澄清中的应用研究[J]. 中南林业科技大学学报,2007,27(3):106 - 108.
- [6]邓学良,周文化,付 希. 壳聚糖在草莓果酒澄清中的应用研究[J]. 中国酿造,2009,34(12):83 - 85.
- [7]Achaerandio I, Pachova V, Guell C, et al. Protein adsorption by bentonites in a white wine model solution: effect of protein molecular weight and ethanol concentration [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2001, 52:122 - 126.
- [8]Esteruelas M, Poinaut P, Sieczkowski N, et al. Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine [J]. Food Chemistry, 2009, 113(1):28 - 35.
- [9]Pocock K F, Waters E J. Protein haze in bottled white wines: How well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2006, 12(3):212 - 220.
- [10]Batista L, Monteiro S, Loureiro V B, et al. The complexity of protein haze formation in wines[J]. Food Chemistry, 2009, 112(1):169 - 177.
- [11]Waters E J, Wallace W, Williams P J. Identification of heat - unstable proteins and their resistance to peptidases[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40:1514 - 1519.
- [12]Moreno - Arribas M V, Pueyo E, Polo M C. Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 458(1):63 - 75.
- [13]Vincenzi S, Mosconi S, Zoccatelli G, et al. Development of a new procedure for protein recovery and quantification in wine[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2005, 56:182 - 187.
- [14]Lambri M, Dordoni R, Giribaldi M, et al. Heat - unstable protein removal by different bentonite labels in white wines[J]. LWT - Food Science and Technology, 2012, 46(2):460 - 467.
- [15]Marangon M, Vincenzi S, Lucchetta M, et al. Heating and reduction affect the reaction with tannins of wine protein fractions differing in hydrophobicity [J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 660(1/2):110 - 118.
- [16]Fusi M, Mainente F, Rizzi C, et al. Wine hazing: a predictive assay based on protein and glycoprotein Independent recovery and quantification[J]. Food Control, 2010, 21(6):830 - 834.