

甘蔗原汁后混浊及其蛋白质组成特征

王琦¹, 蒙丽丹¹, 田润¹, 王淑培², 谢彩锋^{1,3}, 杭方学^{1,3}, 李凯^{1,3*}

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)(2. 南宁师范大学环境与生命科学学院, 广西南宁 530001)
(3. 糖业及综合利用教育部工程研究中心, 广西制糖协会, 广西南宁 530004)

摘要: 甘蔗原汁后混浊是指澄清甘蔗汁在贮存或商品流通期间发生成分变化, 浊度增加或产生沉淀的现象。该研究通过聚丙烯酰胺凝胶电泳、组合式质谱鉴定、氨基酸组分分析和傅立叶红外分析等方法, 研究甘蔗原汁后混浊物的基本成分、蛋白质的分子质量大小、种类、氨基酸组成及二级结构。实验发现, 甘蔗原汁后混浊物中主要成分是总糖, 其含量达 60.94%, 其次是灰分和蛋白质, 含量分别为 19.52% 和 18.43%, 酚类仅为 0.62%。后混浊蛋白质分子质量分布在 42 ku 左右和小于 20 ku, 分别鉴定出 12 种和 44 种蛋白, 其中丰度较高的几种蛋白分别为 protein Z, PREDICTED: calmodulin-7 isoform X1, PREDICTED: calcium-dependent protein kinase 34 isoformX1 和 hypothetical protein SORBIDRAFT_01g014740。后混浊蛋白质和上清液蛋白质的氨基酸组成差异不大, 但在二级结构上差异明显。后混浊蛋白质中除了无规卷曲结构远高于上清蛋白质外, α -螺旋和 β -转角分别比上清蛋白质低 33.43% 和 22.42%, 而 β -折叠差异不大。总的来说, 分子质量大小低于 42 ku、疏水值高、 α -螺旋含量低和无规卷曲含量高的蛋白质更容易参与甘蔗原汁后混浊。

关键词: 甘蔗原汁; 后混浊; 氨基酸; 疏水性; 二级结构

文章编号: 1673-9078(2022)07-143-151

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.7.1025

Post-haze and Protein Composition of Raw Sugarcane Juice

WANG Qi¹, MENG Lidan¹, TIAN Run¹, WANG Shupe², XIE Caifeng^{1,3}, HANG Fangxue^{1,3}, LI Kai^{1,3*}

(1.College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

(2.College of Environmental and Life Sciences, Nanning Normal University, Nanning 530001, China)

(3.Sugar Industry and Comprehensive Utilization Research Center of Ministry of Education, Guangxi Sugar Association, Nanning 530004, China)

Abstract: Post-haze of raw sugarcane juice refers to the phenomenon that the clarified raw sugarcane juice undergoes changes in composition, increase of turbidity or precipitation during storage or commodity circulation. In this study, the basic composition as well as the molecular weight, type, amino acid composition and secondary structures of proteins of the sediment in sugarcane juice were studied by polyacrylamide gel electrophoresis, combined mass spectrometry, amino acid analysis and Fourier transform infrared spectroscopy. The experimental results showed that the main component in the sediment of the raw sugarcane juice was sugar (total sugar content 60.94%), followed by ash and protein (19.52% and 18.43%, respectively), and the content of total phenolics was only 0.62%. The molecular weight distribution of post-haze proteins was about 42 ku and lower than 20 ku, and 12 and 44 proteins were identified, respectively. Among them, the proteins with higher abundance are protein Z, PREDICTED: calmodulin-7 isoform X1, PREDICTED: calcium-dependent protein kinase 34 isoformX1, and hypothetical protein SORBIDRAFT_01g014740. The amino acid compositions of the post-haze proteins and the supernatant proteins were only marginally different, but their secondary structures differed significantly. Except that the content of random coil structure in the post-haze proteins was much higher than that of the supernatant protein, the α -helix and β -turn of post-haze proteins were lower than those of

引文格式:

王琦,蒙丽丹,田润,等.甘蔗原汁后混浊及其蛋白质组成特征[J].现代食品科技,2022,38(7):143-151

WANG Qi, MENG Lidan, TIAN Run, et al. Post-haze and protein composition of raw sugarcane juice [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(7): 143-151

收稿日期: 2021-09-14

基金项目: 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-170502); 蔗糖产业省部共建协同创新中心; 广西绿色制糖工程技术研究中心 (2017GZGX)

作者简介: 王琦 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 糖类物质资源化利用, E-mail: wq13223054276@163.com

通讯作者: 李凯 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 绿色制糖技术, E-mail: gxlikai@gxu.edu.cn

the supernatant protein by 33.43% and 22.42%, respectively, although the difference in the β -sheet was insignificant. In general, proteins with molecular weight slower than 42 ku, high hydrophobicity, low α -helix content and high random coil content more likely contributed to the post-haze of raw sugarcane juice.

Key words: sugarcane juice; post-haze; amino acids; hydrophobicity; secondary structure

甘蔗是许多国家重要的农业作物之一，目前主要用于蔗糖、燃料酒精生产^[1,2]。事实上，甘蔗除了含有蔗糖与还原糖，还含有丰富的多糖、蛋白质、氨基酸、必需微量元素、维生素等营养物质以及有机酸、多酚等活性物质，且口感清甜爽口，深受消费者喜爱，应用于饮料行业具有巨大的市场潜力。目前市场上甘蔗基饮料种类繁多，主要为甘蔗原汁、甘蔗原汁复配饮料及甘蔗浓缩汁加工的饮料等^[3]。

然而，甘蔗基饮料在贮藏和商品流通过程易产生后混浊现象，影响了其饮料开发的感官价值。目前普遍认为饮料产生后混浊主要原因是蛋白质和多酚发生相互作用，形成肉眼可见的聚集物^[4-7]，虽然不影响饮料的食用安全，但会影响消费者的接受度，进而不利于其市场的开拓。因此研究甘蔗原汁后混浊主要成分及后混浊作用机制对有效控制其后混浊问题是至关重要的^[8-10]。近些年，大量研究发现蛋白质是导致饮料发生后混浊的重要原因，当蛋白质浓度达到 3~4 mg/L 时，饮料就容易产生混浊或沉淀^[11,12]。Zeng 等^[13]研究储藏过程荔枝汁成分变化，发现蛋白质和酚类含量在上清液中下降最为明显，在后混浊物则呈上升趋势；Millet 等^[9]发现苹果基饮料混浊物的蛋白质含量占混浊物的 18%~24%。目前关于饮料后混浊的研究主要集中在葡萄酒、苹果汁、啤酒、荔枝汁和茶等饮料^[14-18]，而这些饮料在成分、含量及性质上，与甘蔗原汁存在明显差异，特别是在蛋白质、多酚、多糖等易导致后混浊物质的含量、结构与性质上，因此其在贮存或流通过程发生的后混浊作用与其他饮料体系的可能不完全一样。目前对于甘蔗原汁后混浊问题的研究，除了本研究团队前期分析了甘蔗浓缩汁中的后混浊物主要成分外^[2]，尚未见有任何报道。因此本试验在分析甘蔗原汁后混浊主要成分基础上，重点分析其蛋白质的组分及二级结构，以鉴别出易发生后混浊的蛋白质种类及结构特性，为解决甘蔗原汁后混浊问题提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甘蔗，广西扶绥市甘蔗双高基地提供，经小型压榨机榨汁后用有 50 nm 孔径的陶瓷膜过滤处理，获得

甘蔗清汁，置于 -18 °C 冷库中保存备用。

硫酸铵、盐酸、硫酸、氢氧化钠、硫酸钾、硫酸铜、甲醇和冰醋酸，成都市科龙化学品有限公司；SDS-PAGE 变性丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒、透析袋（3500 ku）和甘氨酸，索莱宝生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

YY-T1-10L 超纯水仪，成都优越科技有限公司；TLE-204E 分析天平，梅特勒-托利多中国有限公司；A-5082 Grodig 连续波长多功能微孔检测器，奥地利 Untersbergstr.1A 公司；Mini-Protein3Cell 蛋白质电泳系统，美国 Bio-Rad 公司；Orbitrap Elite 组合式质谱，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；KjelMaster K-375 凯氏定氮仪，德国 Bruker 公司；IRTracer-100 傅立叶红外光谱，日本岛津公司；Gel Doc2000 凝胶成像系统，美国 Bio-Rad 公司；CenLee18R 台式高速冷冻离心机，湖南湘立科学仪器有限公司；L-8900 氨基酸分析仪，日本日立公司。

1.3 试验方法

1.3.1 甘蔗原汁后混浊物的收集

甘蔗汁置于 -18 °C 储藏 6 个月，常温解冻后经 8000 r/min 离心 15 min，分离上清液和沉淀，超纯水水洗沉淀，去除可溶性物质，冷冻干燥 48 h，获得冻干粉^[9]，-18 °C 储存备用。

1.3.2 后混浊物主要成分的测定

1.3.2.1 总糖的测定

称量 20 mg 沉淀物，用 2 mol/L 的三氟乙酸水解沉淀中的糖，采用蒽酮硫酸法测总糖^[19]。

1.3.2.2 总酚的测定

沉淀中总酚的提取参考 Mane 等^[20]方法并作出一些修改。将 2 mL 0.05% (V/V) 三氟乙酸酸化的丙酮/水/甲醇混合溶液 (51:34:15, V/V/V) 加入到 10 mg 混浊物中，超声提取 (350 W, 90 min) 后，离心，取上清液。采用 Folin-Ciocalteu 法测定混浊物的总酚含量。

1.3.2.3 蛋白质含量的测定

蛋白质含量采用凯氏定氮法测定^[21]。

1.3.2.4 灰分的测定

灰分测定采用灼烧法^[22]。

1.3.3 甘蔗原汁上清液蛋白质的收集

采用盐析法收集甘蔗汁上清液中的蛋白质^[23]。具体操作为：在上清液中加入硫酸铵至 80%饱和度，磁力搅拌至硫酸铵完全溶解，于 4 °C 静置 3 h，离心分离（8000 r/min，4 °C，15 min），收集沉淀，并将其置于超纯水中透析 48 h 去除盐类及小分子杂质，期间每 12 h 更换一次水。将透析袋中样品冻干，并置于-20 °C 储存备用。

1.3.4 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

SDS-PAGE 参考 Lin 等^[24]的方法并作出一些修改。将 10 mg 上清液蛋白质和后混浊蛋白质复溶在 8 mol/L 尿素中，在涡旋振荡器上混匀，取上清 20 μL 与等量的上样缓冲液混合均匀，煮沸 5 min 后，离心，取上清液上样。

电泳条件如下：浓缩胶和分离胶的浓度分别为 5% 和 15%，上样量 30 μL，浓缩胶电压 80 V，持续 30 min；分离胶电压 120 V 至当样品条带迁移至凝胶底部时电泳结束。使用 0.125% 的考马斯亮蓝 R250 溶液（甲醇：冰醋酸：水=3:1:6）对胶进行染色，随后用脱色液将胶的背景脱至无色，并使用凝胶成像系统拍照。

1.3.5 酶解及质谱鉴定

将电泳条带均匀切成小份，胶内酶解参照 Shevchenko^[25]的方法。将胶条颗粒漂洗、褪色、脱水及还原烷基化处理，按 1:50 比例用胰蛋白酶酶解过夜，最后用 LTQ Orbitrap Elite 组合式质谱对酶解的肽段进行分析。得到的质谱图用 Proteome Discoverer 1.3 软件通过 SEQUEST 算法比对 Uniprot 数据库进行蛋白质搜索。

1.3.6 甘蔗原汁后混浊物蛋白质氨基酸组成分析

采用氨基酸分析仪分析蛋白质的氨基酸组成^[26,27]。具体操作为：取 30 mg 蛋白样品于具塞水解管内，添加 10 mL 6 mol/L HCl 置于 110 °C 烘箱水解 22 h，期间间断性摇匀水解液，使样品充分水解。水解完毕后冷却过滤，取 1 mL 滤液于 60 °C 水浴蒸干，复蒸一次后，用 0.02 mol/L HCl 冲洗蒸干物并定容至 10 mL，过膜，氨基酸分析仪分析。

1.3.7 蛋白质平均疏水性分析

甘蔗原汁上清液蛋白质和后混浊蛋白质的平均疏水性经验计算公式如下^[28]：

$$H_{\phi} = \sum_{i=q}^n X_i \times H_{\phi i}$$

式中：

X_i —氨基酸占样品中所有氨基酸的摩尔比例；

$H_{\phi i}$ —氨基酸的疏水值。

1.3.8 傅里叶变换红外光谱（FT-IR）的测定

按照参考文献^[29,30]的方法对冷冻干燥后的蛋白质进行 FT-IR 测定。

1.4 数据处理

运用 SPSS 23.0 软件对数据进行单因素方差分析（ $p < 0.05$ ），利用 Origin 2017 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 后混浊物主要成分的分析

甘蔗原汁后混浊物的主要成分如图 1 所示，包括蛋白质、总糖、总酚和灰分等，表明蛋白质、总糖、总酚和灰分都参与了甘蔗原汁后混浊过程。后混浊物中，总糖含量最高，达 60.94%；其次是灰分和蛋白质，分别为 19.52% 和 18.43%；总酚含量最少，仅为 0.62%。甘蔗原汁后混浊物中总糖含量最高，这可能是由于甘蔗原汁中可溶性糖含量高，在后混浊过程会有少量被包裹或夹带在后混浊物中^[6]。Belleau 等^[31]在研究啤酒混浊物中也发现高含量的碳水化合物，认为它们通过某种方式凝结或粘附在蛋白质-多酚主链上而被包裹在后混浊物中的，并不是导致后混浊形成的主要因子，蛋白质才是导致饮料混浊的重要因素^[32-34]。在饮料中，蛋白质能与多酚、多糖、咖啡碱及 Ca^{2+} 等多种成分发生相互作用，逐渐聚集形成混浊^[35]。

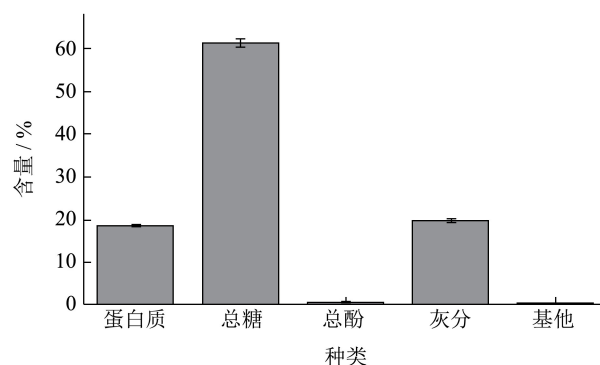


图 1 混浊物主要成分分析

Fig.1 Analysis of main components of sediment

2.2 后混浊蛋白质的分子质量分布

甘蔗原汁后混浊蛋白质和上清液蛋白质的 SDS-PAGE 分析见图 2。甘蔗原汁上清液蛋白质主要分子质量在 20 ku，而相应后混浊蛋白质分子质量广泛分布在 42 ku 左右和 20 ku 以下。这可能是由于该分子质量范围的蛋白质容易参与后混浊，也可能是由小分子质量的蛋白质聚集形成复杂的蛋白质聚集体。许多针对果汁和葡萄酒的研究发现，后混浊物中蛋白质的

分子质量集中在一定的范围内，它们具有一定的相似性。大麦麦芽汁中混浊蛋白质分子质量主要集中在25~45 ku及18.4 ku两部分^[36]；葡萄酒后混浊蛋白质则主要分布在18~26 ku及41、53和69 ku处^[11]。无论上清蛋白质还是后混浊蛋白质分子质量均小于100 ku，这可能与甘蔗汁经50 nm陶瓷膜处理有关，大分子蛋白质被截留。

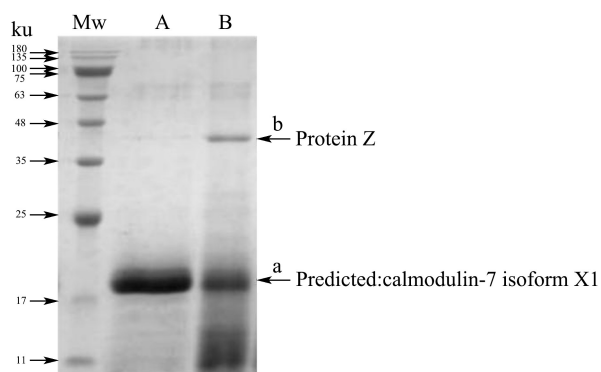


图2 甘蔗原汁蛋白质的SDS-PAGE图

Fig.2 SDS-PAGE diagram of protein in sugarcane juice

注：图中Mw为标准分子量（11~180 ku）；A为上清液蛋白质；B后混浊蛋白质。

2.3 质谱鉴定

为了鉴定后混浊蛋白质的种类，对图2的条带a和b进行质谱鉴定，结果如表1所示。条带a和b分别鉴定出44种和12种蛋白质，表明甘蔗原汁后混浊蛋白质种类繁多。这些蛋白质的理论等电点大都位于4~6之间，与甘蔗原汁的初始pH 5.5左右接近，因此等电点蛋白质析出可能导致蛋白质参与后混浊。其中条带a丰度较高的几种蛋白质为PREDICTED: calmodulin-7 isoform X1、protein Z、PREDICTED: calcium-dependent protein kinase 34 isoform X1，其理论分子量大部分位于15~25 ku处，与电泳结果一致，而条带b丰度较高的蛋白质为protein Z和hypothetical protein SORBIDRAFT_01g014740，其理论分子量大都位于9~25 ku，明显小于电泳结果，这进一步证实了上述条带b处的蛋白质一部分是由小分子蛋白质聚集，最终蛋白质呈多聚体形式存在导致其分子量变大。甘蔗原汁后混浊蛋白质中鉴定出大量的protein Z。这与Li等^[37]研究啤酒酿造过程后混浊物的主要成分是protein Z的结论是一致的。

表1 后混浊物蛋白质质谱鉴定

Table 1 Identified haze proteins by LTQ-Orbitrap

	蛋白质名称	分子量	理论等电点	丰度
条带 a	PREDICTED: calmodulin-7 isoform X1	21.337	4.45	25
	PREDICTED: calcium-dependent protein kinase 34 isoform X1	31.426	5.16	7
	protein Z	21.132	6.19	10
	unknown	15.314	5.06	6
	hypothetical protein SORBIDRAFT_03g027710	11.701	4.58	4
	PREDICTED: cysteine proteinase 2	21.455	4.63	2
	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g032690	18.315	4.59	2
	calcium-dependent protein kinase	15.445	4.7	1
	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g002720	16.198	7.43	1
	hypothetical protein ZEAMMB73_680472	20.8	6.15	4
	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g041180	31.748	8.15	2
	hypothetical protein SORBIDRAFT_03g006930	37.544	6.77	2
	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g014740	16.93	8.59	1
	uncharacterized LOC100381559	21.039	4.42	2
	PREDICTED: cysteine proteinase 2	3.487	7.12	1
	PREDICTED: heat shock cognate 70 ku protein 2	8.24	7.24	1
	hypothetical protein SORBIDRAFT_08g018750	71.533	5.2	1
	hypothetical protein SORBIDRAFT_10g002940	19.274	6.52	2
	predicted protein	51.39	9.1	2
	hypothetical protein SORBIDRAFT_04g033510	68.425	6.92	1
	ubiquitin-like protein SMT3	12.072	5.12	1
	peroxidase 12 precursor	30.31	5.26	1

续表 1

蛋白质名称	分子量	理论等电点	丰度
putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7.8	5.34	1
hypothetical protein SORBIDRAFT_06g004290	84.834	6.86	1
PREDICTED: retrotransposon protein isoform X1	21.5	4.7	1
hypothetical protein SORBIDRAFT_03g039360	29.219	4.72	1
PREDICTED: stromal 70 ku heat shock-related protein	61.848	4.89	1
hypothetical protein SORBIDRAFT_01g031740	23.834	7.42	1
peroxiredoxin	19.666	5.38	1
hypothetical protein EUGRSUZ_J00025	71.63	5.72	1
LOC100281745 precursor	8.036	5.81	1
unknown	12.081	9.01	1
pathogenesis-related protein 5	10.466	9.11	1
hypothetical protein SORBIDRAFT_10g004060	14.2	11.71	1
hypothetical protein SORBIDRAFT_08g005210	18.85	4.78	1
hypothetical protein SORBIDRAFT_01g004860	22.442	9.47	1
hypothetical protein SORBIDRAFT_09g004650	18.137	7.34	1
hypothetical protein	47.504	8.73	1
hypothetical protein SORBIDRAFT_01g001880	81.739	6.33	1
PREDICTED: uncharacterized protein LOC100192808 isoform X1	19.118	4.42	1
unknown	14.151	5.49	1
uncharacterized LOC103645754	12.83	5.05	1
nucleosome/chromatin assembly factor group A	46.968	4.51	1
hypothetical protein SORBIDRAFT_01g048010	34.722	7.03	1
protein Z	21.132	6.19	27
protein Z	9.715	6.28	10
hypothetical protein SORBIDRAFT_08g004500	42.684	6.81	3
hypothetical protein SORBIDRAFT_01g014730	45.585	6.34	4
hypothetical protein SORBIDRAFT_01g014740	16.93	8.59	14
hypothetical protein SORBIDRAFT_02g004260	18.962	6.18	1
hypothetical protein SORBIDRAFT_02g004260	31.269	7.81	2
ATP synthase CF1 beta subunit	58.558	5.3	1
hypothetical protein SORBIDRAFT_10g001640	15.069	6.76	1
Chrome b559 subunit alpha	10.229	4.83	1
putative C4 phosphoenolpyruvate carboxylase	94.898	6.81	1
chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	6.031	5.11	1

条带 b

2.4 氨基酸分析结果

由表 2 可知, 上清液蛋白质和后混浊蛋白质的氨基酸含量分别占样品干重的 19.82% 和 11.82%, 这与凯氏定氮法测定的相应蛋白质含量为 29.49% 和 18.43% 有一定的差距, 说明其中存在一定量的无机氮。

按照氨基酸比例计算, 上清液蛋白质和后混浊蛋白质的氨基酸组成结果显示, 无论上清液蛋白质还是

后混浊蛋白质, 谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸和异亮氨酸含量均较高, 说明它们是甘蔗原汁蛋白质的主要氨基酸。不同饮料体系中, 后混浊蛋白质的氨基酸组成各有不同, 谷氨酸是苹果汁后混浊蛋白质中的第一或第二组成氨基酸^[9], 而在啤酒混浊物中则发现了高含量的脯氨酸^[36]。在蛋白质水解过程中, 谷氨酰胺和天冬酰胺分别转化为谷氨酸和天冬氨酸, 因此他们的含量往往被高估^[9]。脯氨酸和半胱氨酸均是疏水性较强的氨基酸, 其在前混浊蛋白质中的含量分别为上清

液蛋白 1.44 和 1.95 倍。研究表明肽键与脯氨酸具有空间位阻，这些蛋白质不能自由旋转形成有序螺旋，从而使蛋白质高级结构变得松散无序，疏水位点暴露，易与多酚相互作用形成沉淀^[38]。而半胱氨酸含有二硫键，贮藏会导致蛋白质去折叠，使隐藏于分子内部的巯基、二硫键和疏水基团暴露，蛋白质间的相互作用增强^[39]。上清液蛋白质和后混浊蛋白质中疏水性氨基酸的比例分别为 55.46%和 57.13%。根据

Lozano 等^[28]经验公式计算后混浊蛋白质的平均疏水值分别为 0.87, 比上清液蛋白质的平均疏水值高 3%。这与黄酒后混浊蛋白质的疏水值比上清液蛋白质高 16.46%有所不同^[40]，可能是由于原料不同，后混浊蛋白质的性质有所不同。上述结果表明甘蔗原汁后混浊蛋白质和上清液蛋白质氨基酸的种类和含量差异不明显，蛋白质的低疏水值不是导致甘蔗原汁后混浊的主要因素。

表 2 上清液蛋白质和混浊物蛋白质的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of supernatant protein and haze protein

名称	疏水值	上清液蛋白质		后混浊蛋白质	
		绝对含量/(m/m)	相对含量/%	绝对含量/(m/m)	相对含量/%
Asp	0	2.41±0.23	12.18±0.53	1.62±0.13	13.67±0.89
Thr	0.4	1.37±0.11	6.91±0.19	0.71±0.15	6.03±0.32
Ser	-0.3	1.07±0.09	5.41±0.23	0.62±0.11	5.25±0.23
Glu	0	3.70±0.25	18.68±0.89	1.99±0.21	16.77±0.16
Gly	0	1.64±0.13	8.26±0.12	0.85±0.18	7.18±0.23
Ala	0.5	1.10±0.18	5.56±0.11	0.78±0.09	6.59±0.19
Cys	1	0.11±0.03	0.55±0.09	0.13±0.01	1.07±0.05
Val	1.59	1.28±0.06	6.45±0.37	0.76±0.03	6.40±0.39
Ile	2.95	0.92±0.13	4.66±0.36	0.48±0.08	4.04±0.05
Leu	1.8	1.61±0.15	8.14±0.32	0.80±0.11	6.77±0.17
Tyr	2.3	0.77±0.03	3.88±0.16	0.42±0.03	3.57±0.23
Phe	2.5	0.99±0.09	5±0.37	0.65±0.09	5.49±0.17
Lys	1.5	1.02±0.11	5.15±0.09	0.75±0.11	6.35±0.33
His	0.5	0.39±0.05	1.95±0.26	0.23±0.02	1.92±0.03
Arg	0.75	0.79±0.03	3.98±0.18	0.5±0.03	4.25±0.18
Pro	2.6	0.64±0.01	3.23±0.09	0.55±0.01	4.65±0.19
Total		19.82±0.35	100.00	11.86±0.18	100.00
H _{Qav} (氨基酸平均疏水值)			0.84		0.87

2.5 甘蔗原汁后混浊蛋白质二级结构分析

FT-IR 能够有效分析食品成分的化学组成和构象结构，是监测蛋白质二级结构变化的有效工具。常见的二级结构有 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲等。

由图 3 可以看出，在波段 500~1000 cm^{-1} ，上清液蛋白质的吸光度明显大于后混浊蛋白质，而在酰胺 I 带（1600~1700 cm^{-1} ）处，却表现出相反的结果，相对于上清液蛋白质，后混浊蛋白质的吸光度偏向于高波段，说明后混浊蛋白质和上清液蛋白质的结构存在差异。

图 3b 为上清液蛋白质和后混浊蛋白质在酰胺 I 带的二阶导数图谱，二阶导数图谱显示上清液蛋白质具有 5 个明显的峰，而后混浊蛋白质则具有 7 个峰。对酰胺 I 带原始谱图（图 3a）分峰拟合，各峰所对应

的结构如表 3 所示。

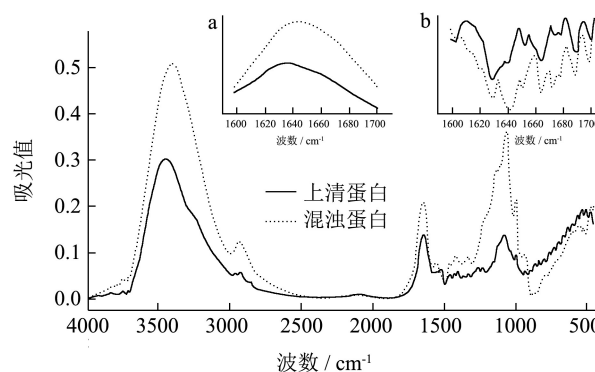


图 3 甘蔗原汁蛋白质的傅立叶变换红外光谱图

Fig.3 Fourier transform infrared spectrogram of sugarcane juice protein

注：图 3a 为 1600~1700 cm^{-1} 的原始谱图；图 3b 为 1600~1700 cm^{-1} 的二阶导数图谱。

表3 傅立叶红外光谱拟合图谱分析

Table 3 Fitting analysis of FT-IR spectra

峰	上清液蛋白质后混浊蛋白质					
	位置	峰面积/%	对应结构	位置	峰面积/%	对应结构
1	1620.2	9.06	β -折叠	1618.5	9.29	β -折叠
2	1635.0	25.01	β -折叠	1633.1	21.36	β -折叠
3	1651.5	31.32	α -螺旋	1647.2	21.66	无规卷曲
4	1663.8	17.28	β -转角	1658.0	20.85	α -螺旋
5	1679.7	17.34	β -转角	1673.5	21.74	β -转角
6				1686.0	4.4	β -转角
7				1698.9	0.71	β -转角

表4 甘蔗原汁后混浊蛋白质和上清液蛋白质二级结构含量

Table 4 Secondary structure of protein composition in the haze protein and the supernatant protein

结构	上清液蛋白质/%	后混浊蛋白质/%
β -折叠	34.07±2.21	30.65±1.12
无规卷曲		21.66±0.86
α -螺旋	31.32±0.56	20.85±0.98
β -转角	34.61±1.10	26.85±0.46

由表4可知,后混浊蛋白质和上清液蛋白质的二级结构组成存在显著的差异,其中后混浊蛋白质中无规卷曲的含量为21.66%,而上清液蛋白质则不含无规卷曲结构,后混浊蛋白质的 α -螺旋和 β -转角含量分别比上清液蛋白质低33.43%和22.42%, β -折叠含量差异不大。研究表明蛋白质二级结构和疏水性存在相关性,其疏水性与 α -螺旋的含量成负相关,与 β -折叠和无规卷曲含量呈正相关^[41]。甘蔗汁后混浊蛋白质具有高含量的无规卷曲和低含量的 α -螺旋结构,其疏水性更强,蛋白质之间以及蛋白质与酚类等其他组分相互作用,溶解度降低,从而促进甘蔗汁后混浊。此外,陶瓷膜过滤甘蔗汁时,为了加快过滤速度,往往加热至90℃以增加通量,高温条件可能破坏了甘蔗汁蛋白质的空间结构,疏水性残基暴露,从而导致蛋白质疏水性增强,加速混浊和沉淀形成。

3 结论

以甘蔗原汁上清液蛋白质为对照,对比分析甘蔗原汁后混浊物及其后混浊蛋白质的特性,结果表明:

(1) 甘蔗原汁形成沉淀的过程是复杂的,其后混浊物中主要由蛋白质、总糖、总酚和灰分组成。

(2) 甘蔗原汁后混浊蛋白质分子量主要分布在42 ku左右和20 ku以下,分别鉴定出12种和44种蛋白质,其中丰度较高的几种蛋白质为 protein Z, PREDICTED: calmodulin-7 isoform X1, PREDICTED: calcium-dependent protein kinase 34 isoform X1 和

hypothetical protein SORBIDRAFT_01g014740。

(3) 后混浊蛋白质氨基酸的平均疏水值略高于上清液蛋白质,表明氨基酸组成的差异不是导致甘蔗汁后混浊的主要原因。两者的二级结构差异明显,后混浊蛋白质中具有高含量的无规卷曲和低含量的 α -螺旋、 β -转角结构。

综上,分子质量大小低于42 ku、疏水值高、 α -螺旋含量低和无规卷曲含量高的蛋白质更容易参与甘蔗原汁后混浊。

参考文献

- [1] Nikpay A. First report of occurrence of Psocoptera (Trogium) apterum on sugarcane from Iran [J]. Sugar Tech, 2016, 19(2): 225-227
- [2] Qu R J, Li K, Hang F X, et al. Analysis of sedimentary components in post-haze concentrated sugarcane juice [J]. Sugar Tech, 2018, 20(5): 617-620
- [3] Zhu Z, Xie C F, Li W, et al. Nutritional and antioxidant properties of non-centrifugal cane sugar derived from membrane clarified juice [J]. LWT - Food Science and Technology, 2020, 131: 109717
- [4] Batista L, Monteiro S, Loureiro V B, et al. Protein haze formation in wines revisited. The stabilising effect of organic acids [J]. Food Chemistry, 2010, 122(4): 1067-1075
- [5] Cagnazzo K A, Heeger A, Udrișard I, et al. Phenolic compounds of grape stems and their capacity to precipitate proteins from model wine [J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(2): 435-443
- [6] Siebert K J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1999, 47(2): 353-362
- [7] Sluyter S V, Mcrae J M, Falconer R J, et al. Wine protein haze: mechanisms of formation and advances in prevention [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(16):

- 4020-4030
- [8] Millet M, Poupard P, Guilois-Dubois S, et al. Heat-unstable apple pathogenesis-related proteins alone or interacting with polyphenols contribute to haze formation in clear apple juice [J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125636
- [9] Millet M, Poupard P, LeQuere J M, et al. Haze in apple-based beverages: detailed polyphenol, polysaccharide, protein, and mineral compositions [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2017, 65(31): 6404-6414
- [10] Esteruelas M, Kontoudakis N, Gil M, et al. Phenolic compounds present in natural haze protein of Sauvignon white wine [J]. Food Research International, 2011, 44(1): 77-83
- [11] Esteruelas M, Poinssaut P, Siczkowski N, et al. Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine [J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 28-35
- [12] Buren V. Avoiding haze in clarified apple juice [R]. Geneva (USA), New York State Agricultural Experiment Station, 1992
- [13] 曾丹.荔枝浊汁沉淀多酚和蛋白组成分析及其稳定化技术研究[D].武汉:华中农业大学,2018
ZENG Dan. Analysis of polyphenols and protein composition of litchi cloudy juice precipitation and study on its stabilization technology [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018
- [14] Marangon M, Sluyter S V, Neilson K A, et al. Roles of grape thaumatin-like protein and chitinase in white wine haze formation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(2): 733-740
- [15] 袁星星.乳酸菌发酵荔枝饮料的二次沉淀及褐变控制关键技术研究[D].南昌:江西农业大学,2018
YUAN Xingxing. Study on the key technology about controlling secondary precipitation and browning of litchi beverage fermented by lactic acid bacteria [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2018
- [16] Iimure T, Nankak Da N, Watanabe-Sugimoto M, et al. Identification of novel haze-active beer proteins by proteome analysis [J]. Journal of Cereal Science, 2009, 49(1): 141-147
- [17] Yu X, Cai X H, Luo L Y, et al. Influence of tea polyphenol and bovine serum albumin on tea cream formation by multiple spectroscopy methods and molecular docking [J]. Food Chemistry, 2020, 333: 127432
- [18] 马梦君.绿茶饮料沉淀模型建立及机理探讨[D].重庆:西南大学,2015
MA Mengjun. Model building and bonding mechanism of precipitation in green tea beverage [D]. Chongqing: Southwest University, 2015
- [19] Meng L, Li K, Li J, et al. Understanding the pathways for irreversible aggregate clusters formation in concentrated sugarcane juice derived from the membrane clarification process [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 151: 112204
- [20] Mané C, Souquet J M, Ollé D, et al. Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid, and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design: application to the characterization of champagne grape varieties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(18): 7224-7233
- [21] GB 5009.5-2016,食品中蛋白质的测定[S]
GB 5009.5-2016, Determination of Protein in Foods [S]
- [22] GB 5009.4-2016,食品中灰分的测定[S]
GB 5009.4-2016, Determination of Ash in Food [S]
- [23] Zhou L, Zhang Y, Leng X, et al. Acceleration of precipitation formation in peach juice induced by high pressure carbon dioxide [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(17): 9605-9610
- [24] Lin L, Gu Y L, Li C Z, et al. Antibacterial mechanism of epsilon-poly-lysine against *Listeria monocytogenes* and its application on cheese [J]. Food Control, 2018, 91: 76-84
- [25] Shevchenko A, Tomas H, Havli J, et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes [J]. Nature Protocols, 2006, 1(6): 2856-2860
- [26] You-Shin S, Won-Jin Y, Jaeho H, et al. Method validation of 16 types of structural amino acids using an automated amino acid analyzer [J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 22(6): 1567-1571
- [27] 孙鹏飞,高献礼,闫爽,等.酱油二次沉淀蛋白质的分离,鉴定及氨基酸分析[J].食品工业科技,2014,35(5):87-90
SUN Pengfei, GAO Xianli, YAN Shuang, et al. Distribution, identification and amino acid composition analysis of proteins in the secondary precipitate of soy sauce [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(5): 87-90
- [28] Lozano P, Combes D, Iborra J L. Food protein nutrient improvement by protease at reduced water activity [J]. Journal of Food Science, 1994, 59(4): 876-880
- [29] 郭丽萍,熊双丽,黄业传.超高压结合热处理对猪肉蛋白质相互作用力及结构的影响[J].现代食品科技,2016,32(2): 204-212
GUO Liping, XIONG Shuangli, HUANG Yechuan. Effects of ultra-high pressure combined with thermal treatment on molecular interaction and structure of pork proteins [J].

- Modern Food Science and Technology, 2016, 32(2): 204-212
- [30] 张振山,李晨阳,刘玉兰.霉变和辐照对大豆蛋白质理化性质和结构的影响[J].现代食品科技,2015,31(7):191-196
ZHENG Zhenshan, LI Chenyang, LIU Yulan. Effect of mildew and γ -irradiation on the physicochemical property and structure of soybean proteins [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(7): 191-196
- [31] Belleau G, Dadic M. Beer hazes. II. Further analyses of basic components by high performance liquid chromatography [J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 1981, 39(4): 142-146
- [32] Siebert K J. Haze in beverages [J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2009, 57(57): 53-86
- [33] Dadic M, Belleau G, Beerhazes I. Isolation and preliminary analysis of phenolic and carbohydrate components [J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 1980, 38(4): 154-158
- [34] Siebert K J, Stenroos L E, Reid D S. Characterization of amorphous-particle haze [J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 1981, 39(1): 1-11
- [35] 许勇泉.绿茶茶汤及其浓缩汁沉淀形成与调控基础研究[D].杭州:浙江工商大学,2015
XU Yongquan. Sedimentformation and control basis of green tea infusion and its concentrate [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2015
- [36] 张辰东,蔡国林,张明,等.江苏单二啤酒大麦麦芽麦汁中混浊物质的研究[J].食品工业科技,2014,11:138-142
ZHANG Chendong, CAI Guolin, ZHANG Ming, et al. Identification of wort turbid substances in Jiangsudaner barley wort [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 11: 138-142
- [37] 金蓓,李琳,李冰,等.啤酒混浊蛋白组分的分离鉴定[J].食品科学,2011,3:86-90
JIN Bei, LI Lin, LI Bing, et al. Isolation and identification of haze proteins in beer [J]. Food Science, 2011, 3: 86-90
- [38] Charlton A J, Baxter N J, Khan M L, et al. Polyphenol/peptide binding and precipitation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(6): 1593-1601
- [39] Chagas R, Ferreira L M, Laia C A, et al. The challenging SO₂-mediated chemical build-up of protein aggregates in wines [J]. Food Chemistry, 2016, 192: 460-469
- [40] 孙军勇,樊世英,谢广发,等.绍兴黄酒混浊蛋白的分离鉴定及其氨基酸组成、二级结构分析[J].食品与发酵工业,2016, 42(2):1-6
SUN Junyong, FAN Shiyong, XIE Guangfa, et al. Isolation, identification of haze proteins from Chinese rice wine and analysis of its amino acid composition and secondary structure [J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(2): 1-6
- [41] Wang C, Jiang L, Wei D, et al. Effect of secondary structure determined by FTIR spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate [J]. Procedia Engineering, 2011, 15: 4819-4827

(上接第 159 页)

- [14] 周琼琼,孙威江.代谢组学技术及其在茶叶研究中的应用[J].天然产物研究与开发,2015,27(10):1821-1826
ZHOU Qiongqiong, SUN Weijiang. Metabonomics technology and its application in tea research [J]. Natural Products Research and Development, 2015, 27(10): 1821-1826
- [15] 刘海燕,曹藩荣.茶叶中黄酮类化合物对肠道的保护作用的研究概况[J].广东茶业,2021,3:2-7
LIU Haiyan, CAO Fanrong. The protective effect of tea flavonoid on intestinal tract [J]. Guangdong Tea Industry, 2021, 3: 2-7
- [16] 龚雨顺,戴申,黄建安,等.茶叶的抗衰老作用[J].中国茶叶, 2019,41(8):6-11
GONG Yushun, DAI Shen, HUANG Jia'nan, et al. Anti aging effect of tea [J]. Chinese Journal of Tea, 2019, 41(8): 6-11
- [17] 赵燕妮,陈丹,陈雪峰,等.基于脂质组学的不同原料茯茶"发花"前后脂类变化研究[J].陕西科技大学学报,2021,39(3): 40-47
ZHAO Yanni, CHEN Dan, CHEN Xuefeng, et al. Research on lipid changes of different raw materials before and after blooming of Fu tea based on lipidomics [J]. Journal of Shaanxi University of Science and Technology, 2021, 39(3): 40-47
- [18] 黄秀琼.不同引种地区保靖黄金茶 1 号品质周年变化规律研究[D].长沙:湖南农业大学,2014
HUANG Xiuqiong. Researchon the annual variation of quality of Baojing Huangjincha No.1 in different introduced areas [J]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2014
- [19] 王春波,吕辉,韦玲冬,等.不同产地都匀毛尖茶代谢组学研究[J].河南农业大学学报,2021,55(3):422-428
WANG Chunbo, LYU Hui, WEI Lingdong, et al. Metabonomics research of Duyun Maojian tea from different origins [J]. Journal of Henan Agricultural University, 2021, 55(3): 422-428