

提取条件对大豆 11S 球蛋白得率及纯度的影响

邓克权^{1,2}, 黄友如³, 华欲飞^{1,*}

(1.江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122;

2.中粮东海粮油工业有限公司, 江苏 张家港 215634; 3.常熟理工学院生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500)

摘 要: 以低脂质含量豆粕为原料, 探讨大豆 11S 球蛋白分级分离过程中提取条件(pH 值、还原剂和冷沉时间)对蛋白得率及纯度的影响。结果表明: 将浸提液 pH 值由 6.2 调至 6.6 时, 大豆 11S 球蛋白的得率降低了 16.71%, 而纯度提高了 4.60%。随着浸提 pH 值的提高, 蛋白质的巯基与二硫键含量增加。与二硫苏糖醇(DTT)或 β -巯基乙醇(ME)相比, 在 pH6.4 的浸提液中添加亚硫酸氢钠(SBS), 大豆 11S 球蛋白的得率最高。而 DTT、ME 和 SBS 还原剂中, 使用 DTT 时的 11S 球蛋白组分得率与纯度最低。在蛋白沉淀阶段, 当冷沉时间为 10h 时, 蛋白的得率与纯度最佳, 随着冷沉时间的延长(12~16h)巯基与二硫键总量并无显著差异($P \geq 0.05$), 而部分巯基发生氧化形成二硫键, 大豆 11S 球蛋白游离巯基含量降低。

关键词: 大豆 11S 球蛋白; 工艺条件; 得率; 纯度

Effect of Operating Conditions on Extraction Rate and Purity of Glycinin (11S) from Soybean

DENG Ke-quan^{1,2}, HUANG You-ru³, HUA Yu-fei^{1,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. COFCO Eastocean Oils and Grains Industries Co. Ltd., Zhangjiagang 215634, China;

3. School of Biological Science and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract: Low-fat soybean flakes were used to evaluate the effects of some operating conditions for glycinin (11S) extraction such as pH, reducing agent type and cold precipitation duration on the extraction rate and purity of glycinin. The pH adjustment of protein extract from 6.2 to 6.6 could decrease the extraction rate of glycinin by 16.71%, while the purity of the protein exhibited an increase by 4.60%. The contents of sulfhydryl and disulfide in proteins increased as the pH increased. Addition of sodium bisulfite (SBS) instead of dithiothreitol (DTT) or β -mercaptoethanol (ME) to the protein extract at pH 6.4 could increase the extraction rate of glycinin. The effect of DTT on the extraction rate of glycinin was the lowest among the reducing agents. The highest extraction rate and purity of glycinin were obtained after 10 h of cold precipitation. No significant difference was observed in the total content of sulfhydryl and disulfide as the precipitation duration was prolonged from 12 to 16 h ($P \geq 0.05$), while the content of free sulfhydryl decreased as a result of partial oxidation to disulfide bonds.

Key words: glycinin(11S); operating conditions; extraction rate; purity

中图分类号: TQ936.212

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0059-05

大豆蛋白主要由大豆球蛋白和 β -伴球蛋白两个主要组分构成, 分别占分离蛋白总量的 40% 和 30% 左右^[1]。大豆球蛋白是大豆种子的一种贮藏球蛋白, 其沉降系数为 11S, 由 6 个亚基组成, 每个亚基分别由一个酸性多肽链 A 与一个碱性多肽链 B 通过一个二硫键连接形成^[2]。大豆球蛋白(11S)的每一多肽链亚基的功能性质不同, 因而可在食品加工中加以利用。如源于 11S 蛋白的酸性亚基具有很好的凝胶形成能力, 且凝胶强度随着酸性亚基

的含量增加而增强^[3]。源于 11S 蛋白的碱性亚基在酸性饮料的 pH 值范围溶解性很好, 因而可作为一种酸溶蛋白原料应用于饮料、蛋黄酱和色拉味调料中^[4]。从大豆蛋白中分离 11S 组分, 改进其功能性质, 应用于食品工业, 对提高产品的附加值具有重要意义。此外, 对酸性和碱性亚基的研究也有助于我们了解更多有关 11S 组分在食品添加剂中所起的作用。

有关 11S 分离纯化方面的工作已有很多的文献报道。

收稿日期: 2011-05-03

基金项目: 江苏省高校自然科学研究项目(10KJB550001); 苏州市科技计划项目(SYND201003)

作者简介: 邓克权(1976—), 男, 工程师, 博士研究生, 研究方向为油脂及植物蛋白。E-mail: dkq161671@sina.com

* 通信作者: 华欲飞(1962—), 男, 教授, 博士, 研究方向为植物蛋白。E-mail: huayufei1966@yahoo.com.cn

大多直接以脱脂豆粕为原料,通过冷沉(pH6.3~7.0)从碱性大豆蛋白浸提液中初步分离得到纯度不是很高的11S球蛋白^[5-9]。本实验在前期研究基础上,以低脂质含量豆粕为原料,利用SDS-PAGE等分析蛋白亚基组成,并藉此评价加工条件,如pH值、还原剂及冷沉时间对11S球蛋白纯度与得率的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

低温脱脂豆粕 山东万德福实业集团。

其他试剂均为均为常规分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

Gel Doc XR 凝胶成像系统 美国Bio-Rad公司;
LGJ-1G 冷冻干燥机 上海医用分析仪器厂; CR22GII 高速冷冻离心机 日本Hitachi公司。

1.3 方法

1.3.1 低温脱脂豆粕的预处理

低温脱脂豆粕→粉碎→过80目标筛→乙醇和正己烷混合浸出(脱脂豆粕、体积分数95%乙醇、正己烷质量比1:4:2, 20℃浸提2h)→3000×g离心分离30min→沉淀→95%乙醇浸出(质量比1:5, 20℃浸提1h)→3000×g离心分离30min→沉淀→真空干燥→低脂质含量豆粕

1.3.2 11S球蛋白的分离

11S球蛋白的分离参考Deak等^[9]的方法稍加修改(图1)。将低脂质含量豆粕按1:15(m/V)的料液比与水混合,用2mol/L NaOH溶液将其pH值调至8.5。搅拌1h后,将悬浮液离心(14000×g, 30min, 15℃)倾出上清液加入NaHSO₃溶液使之浓度达10mmol/L,用2mol/L HCl溶液将其pH值调至6.4并在冷藏(4℃)条件下静置12h后离心(7500×g, 20min, 4℃),得富含11S球蛋白的沉淀,将沉淀分散于去离子水中并用2mol/L NaOH溶液将其pH值调至7.0,透析去盐后冷冻干燥。

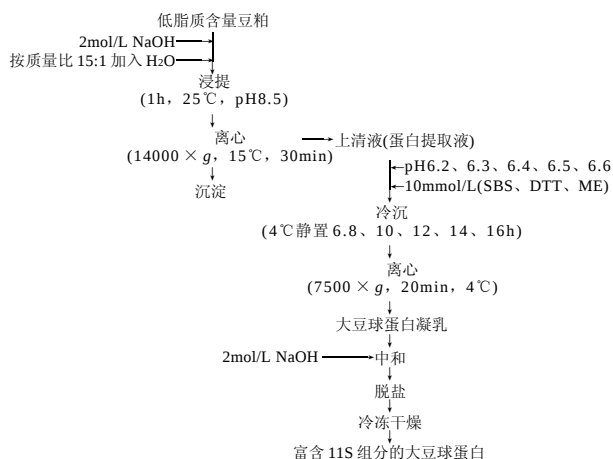


图1 大豆球蛋白(11S)组分的分级分离

Fig.1 Flow diagram for the fractionation procedure of soybean glycinin (11S)

1.3.3 pH值对11S球蛋白分离的影响

在分离沉淀的初始阶段,浸提液NaHSO₃浓度达10mmol/L时,分别将其pH值调至6.2、6.3、6.4、6.5和6.6,其他步骤同1.3.2节。每个实验至少重复2次。

1.3.4 还原剂对11S组分分离的影响

在分离沉淀的初始阶段,添加不同还原剂如亚硫酸氢钠(SBS)、二硫苏糖醇(DTT)或β-巯基乙醇(ME),使其在浸提液中浓度达10mmol/L时,将其pH值调至6.4,冷藏(4℃)静置12h,其他步骤同1.3.2节。每个实验至少重复2次。

1.3.5 冷沉时间对11S球蛋白分离的影响

在分离沉淀的初始阶段,浸提液NaHSO₃浓度达10mmol/L时,将其pH值调至6.4,冷藏(4℃)静置6~16h后离心(7500×g, 20min, 4℃),得富含11S球蛋白的沉淀,其他步骤同1.3.2节。每个实验至少重复2次。

1.3.6 蛋白组分的SDS-PAGE分析

采用SDS不连续电泳方法^[10]进行SDS-PAGE分析。分离胶12%;浓缩胶4%;样品溶解液质量浓度:2mg/mL;上样量:10μL;考马斯亮蓝染色。依据O'Keefe等^[11]的方法制备11S球蛋白和β-伴球蛋白(7S)的纯品,利用凝胶成像系统做纯度分析。每个实验至少重复2次。

1.3.7 蛋白质巯基与二硫键含量的测定

按照参考文献[12]的方法测定蛋白质的巯基(包括游离的和埋藏在疏水基团内部的巯基)和总巯基基团(包括巯基和还原的二硫键)含量。

1.4 数理统计方法

采用Microsoft Excel 2007和Origin 7.5进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 低温脱脂豆粕主要理化指标

低温脱脂豆粕的蛋白质、水分及脂质含量分别是56.37%(以干基计,下同)、10.32%和5.21%。11S和7S球蛋白含量分别为总蛋白含量的53.12%和31.37%。

2.2 pH值对11S球蛋白得率与纯度的影响

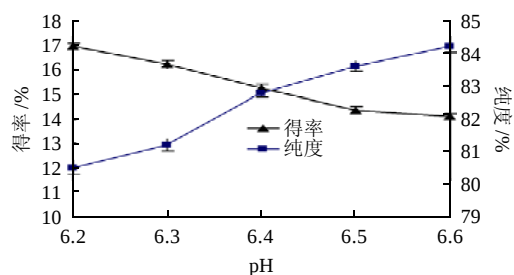


图2 pH值对11S球蛋白得率与纯度的影响

Fig.2 Effect of pH on the extraction rate and purity of glycinin (11S)

由图2可知,在蛋白质浸提过程中,随溶液pH值的升高,11S球蛋白组分的得率显著降低。同pH6.2时的浸提效果比较,pH6.6时的11S球蛋白组分得率减少了16.71%。这是由于浸提液pH值增加,蛋白质溶解度迅速降低造成的^[13]。但当浸提液pH值由6.2调至6.6时,11S球蛋白组分的纯度增加了4.60%。该结果同以前学者的研究^[13-15]发现7S和11S两种球蛋白在不同pH值条件下有不同的溶出行为的结论相一致。

2.3 不同种类还原剂对11S球蛋白得率与纯度的影响

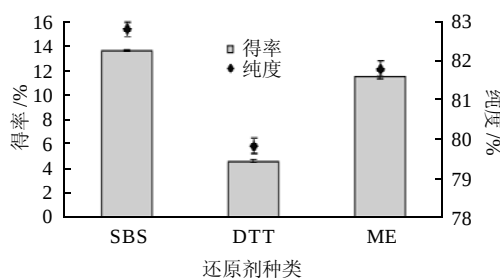


图3 还原剂对11S球蛋白得率与纯度的影响

Fig.3 Effect of different reducing agents on the extraction rate and purity of glycinin (11S)

SBS、DTT和ME可作用于蛋白质的二硫键,使其聚集体发生部分解聚,从而增加蛋白质的溶解度^[16]。Thanh等^[15]研究了ME对大豆种子蛋白分级分离的影响,Petrucelli等^[17]和Wu Shaowen等^[18-19]则研究了SBS在大豆蛋白分级分离中的作用。可以肯定的是SBS可替代ME,因为SBS可使11S球蛋白的蛋白含量达41%,高于使用ME提取11S球蛋白的蛋白含量(19%)^[7]。图3为不同种类还原剂对11S球蛋白得率与纯度的影响。相比较于DTT或ME,在pH6.4时的浸提液中添加SBS可以使11S球蛋白的得率最高。3种还原剂中,使用DTT时的11S球蛋白得率最低,分别是使用SBS时的33.43%和使用ME时的39.69%。3种还原剂对11S球蛋白纯度的影响与之类似,但三者之间的差异较小。使用DTT时所得的11S球蛋白纯度最低,为使用SBS时的96.40%,使用ME时的97.59%。因此,多数研究者^[8-9,16-21]在11S球蛋白的制备中,在蛋白浸提阶段使用SBS作为还原剂以提高其纯度与得率。

2.4 冷沉时间对11S球蛋白得率与纯度的影响

Wolf等^[22]报道大豆蛋白中11S球蛋白的冷沉经1~2h可接近完全。不过其他研究者如Deak^[8,20-21]、Wu Shaowen^[18-19]、Hou^[23]等则认为在4~7℃条件下,11S球蛋白沉淀的最佳时间为12~16h甚至过夜。鉴于此,图4选择了冷沉时间为6~16h作为研究的变量。随着冷沉时间的延长,11S组分的得率在起始阶段增加,在10h时达到最高,随后即下降。11S球蛋白的纯度也相应的在起

始阶段快速增加,在10h时达到最高,但在10~16h之间变化幅度较小。这表明在4℃条件下,只有当冷沉时间达到某一限定时间时,11S球蛋白的纯度才能达到某一水平。因此本实验中,选择10h作为冷沉时间。随着冷沉时间的延长,11S球蛋白得率的降低,其主要原因可能是由于在蛋白浸提阶段添加还原剂造成11S球蛋白的解聚引起的。

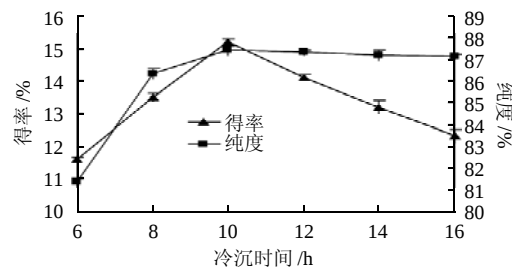


图4 冷沉时间对大豆11S球蛋白得率与纯度的影响

Fig.4 Effect of cold precipitation time on the extraction rate and purity of glycinin (11S)

2.5 SDS-PAGE

采用SDS-PAGE主要用于分析蛋白亚基组成,并藉此评价加工条件,如pH值、还原剂及冷沉时间对11S球蛋白纯度与得率的影响。调节浸提液pH6.2~6.6(泳道2~6)或在pH6.4时添加SBS、DTT或ME(泳道7、8和9)时所得11S球蛋白的污染主要来自7S的各个亚基,即 α' 、 α 和 β 。

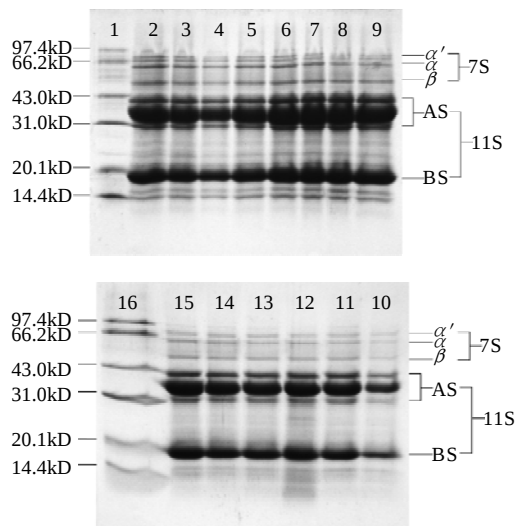


图5 不同方法所得11S组分的SDS-PAGE图谱

Fig.5 SDS-PAGE patterns of 11S-rich fractions obtained by different methods

将图5中泳道7~9同泳道11~15比较可发现,在pH6.4时,还原剂的使用降低了11S球蛋白的纯度。因此相对于泳道2~9,泳道11~15中11S球蛋白的相对含量较高。而要提高11S球蛋白纯度,可通过延长冷沉时间以减少7S球蛋白的相对含量来实现。

2.6 蛋白质巯基及二硫键含量

表1 不同提取条件各蛋白质样品的巯基与二硫键含量
Table 1 Effect of various conditions of pH, reducing agent type and cold precipitation duration on the content of free sulfhydryl and the total content of sulfhydryl and disulfide

条件	游离巯基/($\mu\text{mol/g}$)	总的巯基与二硫键含量/($\mu\text{mol/g}$)
pH	6.2	5.85 ± 0.08^a
	6.3	6.01 ± 0.04^a
	6.4	6.35 ± 0.07^b
	6.5	6.63 ± 0.03^c
	6.6	6.87 ± 0.03^c
还原剂	SBS	6.39 ± 0.04^b
	DTT	4.38 ± 0.02^f
	ME	5.73 ± 0.04^a
冷沉时间/h	6	5.77 ± 0.06^a
	8	6.23 ± 0.04^b
	10	6.72 ± 0.02^c
	12	6.76 ± 0.05^c
	14	6.50 ± 0.05^{bd}
	16	6.30 ± 0.05^b

注:同种提取条件下,同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

蛋白质的巯基与二硫键在蛋白质结构及功能性方面发挥着非常重要的作用。不同大豆品种可能导致蛋白巯基差异,但蛋白质制备方法是造成巯基差异的主要原因^[21,24],尤其是在蛋白浸提阶段添加不同种类的还原剂如SBS、DTT或ME等。表1为在不同提取条件下的各蛋白质样品的巯基与二硫键含量。当浸提液pH值由6.2上升至6.6时,蛋白质巯基与二硫键含量也随之增加。且样品之间的巯基与二硫键含量差异显著($P \leq 0.05$)。与其他两种还原剂相比,在浸提液中添加SBS,蛋白质巯基与二硫键含量差异显著($P \leq 0.05$)。与浸提液pH6.4时样品相比,在浸提液中添加SBS,蛋白质巯基与二硫键含量没有明显差异($P \geq 0.05$)。当浸提液的冷沉时间由8h延长至16h时,总的巯基与二硫键含量在水平上也没有显著差异($P \geq 0.05$)。但浸提液pH值为6.4和使用还原剂SBS以及冷沉12h后的游离巯基含量有显著差异($P \leq 0.05$)。这种差异产生的原因目前尚不清楚。随着冷沉时间的延长(12~16h),总的巯基与二硫键含量并无显著差异

($P \geq 0.05$),但游离巯基含量逐渐减少,意味着游离巯基的氧化和二硫键的形成。

3 结 论

本实验室进行的前期研究发现,脱脂豆粕中残留不饱和脂质及加工工艺条件对终产品大豆球蛋白的品质有着直接的影响。本实验在前期研究基础上,以低脂质含量豆粕为原料,应用SDS-PAGE等分析蛋白亚基组成,并藉此评价加工条件,如pH值、还原剂及冷沉时间对大豆球蛋白纯度与得率的影响。结果表明,提高浸提pH值可使大豆球蛋白的巯基与二硫键含量增加、纯度提高,但得率降低;在pH6.4的浸提液中添加SBS,大豆球蛋白的得率最高;在蛋白沉淀阶段,当冷沉时间为10h时,蛋白的得率与纯度最佳。

参考文献:

- [1] UTSUMI S, MATSUMURA Y, MORI T. Structure-function relationships of soy proteins[M]//DAMODARAN S, PARAF A. Food proteins and their application. New York: Marcel Dekker, 1997: 257-291.
- [2] DELWICHE S R, PORDESIMO L O, PANTHEE D R, et al. Assessing glycinin (11S) and β -conglycinin (7S) fractions of soybean storage protein by near-infrared spectroscopy[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2007, 84(12): 1107-1115.
- [3] FUKUSHIMA D. Recent progress in research and technology on soybeans [J]. Food Science and Technology Research, 2001, 7(1): 8-16.
- [4] KINSELLA J E. Functional properties of soy proteins[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1979, 56(3): 242-258.
- [5] THANH V H, SHIBASAKI K. Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1976, 24(6): 1117-1121.
- [6] BROOKS J R, MORR C V. Current aspects of soy protein fractionation and nomenclature[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1985, 62(9): 1347-1354.
- [7] NAGANO T, HIROTSUKA M, MORI H, et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans[J]. Journal of Agricultural and Food chemistry, 1992, 40(6): 941-944.
- [8] DEAK N A, MURPHY P A, JOHNSON L A. Effects of NaCl concentration on salting-in and dilution during salting-out on soy protein fractionation[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(4): C247-C254.
- [9] TENG Zi, LIU Chong, YANG Xiaoquan, et al. Fractionation of soybean globulins using Ca^{2+} and Mg^{2+} : a comparative analysis[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2009, 86(5): 409-417.
- [10] 郭尧军. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 123-160.
- [11] O'KEEFE S F, WILSON L A, RESURRECCION A P, et al. Determination of the binding of hexanal to soy glycinin and betaconglycinin in an aqueous model system using a headspace technique[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(6): 1022-1028.
- [12] HUANG Youru, HUA Yufei, QIU Aiyong. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation[J]. Food Research International, 2006, 39(2): 240-249.
- [13] LUI D Y M, WHITE E T, LITSTER J D. Dissolution behavior of soy

- proteins and effect of initial concentration[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(6): 2467-2473.
- [14] LAKEMOND C M M, de JONGH H H J, HESSING M, et al. Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(6): 1985-1990.
- [15] YUAN Y J, VELEV O D, CHEN Ken, et al. Effect of pH and Ca^{2+} induced associations of soybean proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(17): 4953-4958.
- [16] LIU Chun, WANG Hongling, CUI Zhumei, et al. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein[J]. Food Chemistry, 2007, 102(4): 1310-1316.
- [17] PETRUCCELLI S, ANON M C. Soy protein isolate components and their interactions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(7): 1762-1767.
- [18] WU Shaowen, MURPHY P A, JOHNSON L A, et al. Pilot-plant fractionation of soybean glycinin and β -conglycinin[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1999, 76(3): 285-293.
- [19] WU Shaowen, MURPHY P A, JOHNSON L A, et al. Simplified process for soybean glycinin and β -conglycinin fractionation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(7): 2702-2708.
- [20] DEAK N A, MURPHY P A, JOHNSON L A. Characterization of fractionated soy proteins produced by a new simplified procedure[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2007, 84(2): 137-149.
- [21] DEAK N A, MURPHY P A, JOHNSON L A. Effects of reducing agent concentration on soy protein fractionation and functionality[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(3): C200-C208.
- [22] WOLF W J, SLY D A. Cryoprecipitation of soybean 11S protein[J]. Cereal Chemistry, 1967, 44(9): 653-668.
- [23] HOU D H, CHANG S K. Structural characteristics of purified glycinin from soybeans stored under various conditions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(12): 3792-3800.
- [24] WOLF W J. Sulfhydryl content of glycinin: effect of reducing agents[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41(2): 168-176.