

两种大豆分离蛋白的比较研究

黄友如, 华欲飞, 裘爱泳

(江南大学食品学院 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡

214036)

摘 要: 本文以醇洗豆粕为原料制备大豆分离蛋白(SPI-A), 并将之与传统的碱溶酸沉工艺制备的大豆分离蛋白(SPI-C)作比较, 发现脱脂豆粕经醇洗之后所制备的大豆分离蛋白, 其功能性质明显优于传统的大豆分离蛋白。凝胶性能研究表明样品SPI-A的凝胶强度是385.4g, 明显高于样品CSPI(85.4g); 样品SPI-A的乳化和起泡性能也有明显的改善; HPLC研究表明SPI-A和SPI-C两种样品几乎在同一时间出峰, 但激光光散射分析表明样品SPI-A的流体动力学半径远比样品SPI-C的大, 说明样品SPI-A形成的聚集体体积较大, 结构较为疏松, 而样品SPI-C所形成的聚集体积较小且结构较为致密。

关键词: 大豆分离蛋白; 乙醇; 功能性质; 凝胶; HPLC; 光散射

Characteristics Comparative Study on Two Extraction Types of Soy Protein Isolates

HUANG You-ru, HUA Yu-fei, QIU Ai-yong

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, School of Food Science and Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Defatted soy flakes were washed with aqueous alcohol and the resultant material was extracted with water to prepare soy protein isolate (SPI-A) with improved functional properties in comparing with the conventional soy protein isolate (SPI-C)

收稿日期: 2005-05-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(20476040); 教育部留学回国人员基金资助项目(教外司留[2003]406号)

作者简介: 黄友如(1966-), 男, 讲师, 博士研究生, 主要从事植物蛋白的研究与开发。

Carbohydrates were unimportant to the taste of hydrolysates except the appearance even at low content. Change of pH demonstrated that the buffer capacity of hydrolysates was increasing, and its texture became better full-bodied. To further understand the changes of hydrolysate taste, more work should be focused on the effects of peptide composition changes during hydrolysis so as to affect the hydrolysate taste.

References:

- [1] Ping Fang. Problems and countermeasures of poultry meat export in China[J]. Food Information Guidance(in Chinese), 2004, (1): 25-27.
- [2] Yi Fang. Present situation, problems and countermeasures of chicken industry in China[J]. Food Information Guidance(in Chinese), 2004, (1): 23-25.
- [3] Yang Lan, Liu Tong-xun. Study on enzymatic hydrolysis of chicken protein and debittering of its hydrolysate[J]. Science and Technology of Food Industry(in Chinese), 1999, 20(2): 4-6.
- [4] Xiong Shan-bo, Wang Qi-ming, Zhao Shan. Study on stepwise enzymic hydrolysis of black-bone chicken and clearing of its hydrolysate[J]. Science and Technology of Food Industry(in Chinese), 2000, 21(4): 17-19.
- [5] AOAC. Official methods of analysis[M]. Arlington, VA: Kenneth Hilrich, 1996.
- [6] Carroll N V, Longley R W, Roe J H. The determination of glycogen and muscle by use of anthrone reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1956, (220): 583-593.
- [7] Spackmann, D H, Stein W H, Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids[J]. Analytical Chemistry, 1958, 30: 1190-1206.
- [8] Mogensen L, Adler-Nissen J. Evaluating bitterness masking principles by taste panel studies[J]. In: Frontiers of Flavor Proceeding of the 5th International Flavor Conference Porto Karras, Chalkidiki, Greece, 1987, (7): 1-3.
- [9] Huang Wei-kun. Food test and analysis[J]. Beijing: Chinese Light Industry Press, 1995. 33-34.
- [10] Hu Wen-sheng. Handbook of common food data[M]. Beijing: Chinese Food Press, 1989. 450-451.
- [11] Adler-Nissen, Jens. Enzymatic hydrolysis of food proteins[J]. Novo Industri S/A, London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- [12] Cao Yan-ping. Technology of food seasoning[M]. Beijing: Chemistry Industry Press, 2002. 63.

extracted directly from the alkaline low-denatured soy flakes. Gelling property was determined by rheometer at the protein concentration of 12% (W/W) while the gel fracture force of SPI-A was 385. 4g, substantially higher than that of SPI-C (85. 4g). Emulsifying and foaming stability were also found to be improved through alcohol washing. High performance size exclusion chromatography showed that when SPI-A and SPI-C were both eluted around the same time, the laser light scattering analysis indicated that SPI-A solution contains particles with larger hydrodynamic radius than SPI-C, suggesting that SPI-A forms larger protein aggregates with more flexible structure whereas SPI-C forms smaller and more compacted aggregates.

Key words: soy protein isolate; ethanol; functionality; gelation; HPLC; light scattering

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)05-0072-05

大豆分离蛋白是高度纯化的大豆蛋白产品^[1], 因其良好的功能性质而广泛应用于肉制品和乳制品中。目前市售的大豆分离蛋白是以脱脂豆粕为原料制备的, 但脱脂豆粕中的残留脂质很容易在脂肪氧合酶(亚油酸: 氧氧化还原酶, EC 1. 13. 11. 12, 大豆蛋白的一种成分)的催化下发生氧化^[2~4], 从而引起蛋白质的营养和功能性质发生不期望的变化^[4, 5]。

在过去的几十年中, 许多研究者致力于提高分离蛋白的风味、色泽和功能性质的研究。其中在提高大豆蛋白产品质量方面最具潜力的, 当属于醇浸出工艺^[6~9]。已经证实脱脂豆粕经醇洗之后可除去异味和诱导色泽形成之成分^[7]。Moser 等人^[10]发现以乙醇浸出的豆粕为原料制备的大豆分离蛋白, 其色泽与风味俱佳, 且由于醇浸出去除了磷脂类以及其它醇溶性物质, 大豆分离蛋白的起泡性能也有了明显的改善^{[8][11]}。Ishino 和 Kudo^[12]也注意到醇洗可改善大豆分离蛋白的凝胶性能, 但对此他们并未做出解释。

作为功能性食品添加剂, 大豆分离蛋白已广泛应用于我国的食品加工业。但目前国内生产的大豆分离蛋白产品无论功能性抑或是风味均不能满足使用者或消费者的需求, 为此许多学者正致力于该领域的研究。

本文以醇洗豆粕为原料制备大豆分离蛋白(SPI-A), 将其凝胶、乳化和起泡性能与传统的碱溶酸沉工艺制备的大豆分离蛋白(SPI-C)作比较, 并通过凝胶色谱和激光光散射分析来获得蛋白质的结构和聚集体性能方面的信息, 以期对其功能性质发挥之机理有更深刻的理解。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

低温脱脂豆粕 山东禹王实业有限公司植物油厂; 其它试剂均为分析纯。

1.2 脱脂豆粕的醇洗涤工艺流程

脱脂豆粕→粉碎→100% 过 80 目标准筛→乙醇浸出→固液分离→滤饼→真空干燥→醇洗涤豆粕

乙醇浸出的工艺条件为乙醇浓度为 85%(V/V), 浸提温度均为 30℃, 浸提时间为 30min, 固液比为脱脂豆粕:

乙醇=1:5, 低速搅拌。

1.3 大豆分离蛋白的制备

将醇洗涤豆粕或脱脂豆粕按 1:10 的料液比与水混合, 用 2mol/L NaOH 调 pH7.0。低速搅拌(30~35r/min) 1h 后, 在 1300 × g 下离心 15min, 取上清液用 2mol/L HCl 调 pH4.5。静置后在 1300 × g 下离心 15min, 取蛋白沉淀分散于去离子水中并用 2mol/L NaOH 调 pH7.0。以上所有步骤均在室温下进行。最后将蛋白溶液冷冻干燥(-15℃, 24h)后粉碎即得粉末状大豆分离蛋白。

1.4 蛋白质分散指数(PDI)的测定

参照 AACC(1975)^[13]方法, 将大豆分离蛋白分散于水溶液中以 10000r/min 速度均质 1min, 根据下式计算 PDI 值。

$$PDI(\%) = 100(\text{水溶性蛋白质}) / \text{总蛋白质}$$

1.5 凝胶性能的测定

将大豆分离蛋白溶于去离子水中, 浓度为 12%(W/W), 搅拌均匀, 将此蛋白质溶液置于 90℃的水浴中加热保温 30min 后, 冰浴冷却至室温, 在 4℃的冰箱中保存 24h 后, 取出陈化 30min, 用物性测试仪(Texture Analyser TA-XT2i)测定凝胶强度, 选用直径为 12mm 的圆柱状平头冲头。冲压速度: 4mm/s; 冲压深度: 20mm; 试样做成 $\phi 30 \times 30\text{mm}$ 圆柱体, 压至 20mm, 则形变为 33.3%。记录凝胶破裂时所需的力定义为凝胶强度。

1.6 乳化和起泡性能的测定

参照 Pearce 和 Kinsella^[14]的浊度法, 利用乳化界面的面积与混浊度存在简单的相关关系原理, 通过测定蛋白质的乳化活性参数来评价蛋白质的乳化强弱, 方法如下: 配置浓度为 0.1% 的蛋白质溶液, 取 30ml 该溶液, 加 10ml 大豆色拉油, 在 10000r/min 下均质 1min, 用微量进样器分别于 0min 和 10min 后从底部取乳化液 50 μ l 稀释于 5ml 的 0.1% SDS 溶液中, 以 0.1% SDS 溶液为参照, 立即用分光光度计在 500nm 处测定吸光度。乳化活性(EA)以 0min 测定的吸光度表示; 乳化稳定性(ES)以 10min 和 0min 测定的吸光度之比值表示。

起泡性能的测定参考 Coffmann 和 Garcia^[15]方法稍加改动。在室温下(25℃), 取 3g 大豆分离蛋白溶于 100ml 去离子水中, 使用 Fluko FA25 型均质机, 以 10000r/min

转速均质 1min, 将其混合物倒入 250ml 具刻度的量筒中, 分别记录经过 0.0、0.25、0.50、1.0、1.5、2.0、3.0、14.0、25.0 和 36.0h 静置后的泡沫总体积(ml)。

1.7 凝胶色谱法测定蛋白质的相对分子质量分布

将大豆分离蛋白分散于去离子水中配制成 8% (W/W) 的溶液, 以 10000r/min 速度均质 1min 后在 $1500 \times g$ 下离心 10min, 取上清液于 90℃ 的水浴中加热保温 10min 后冷却至 25℃, 再通过孔径 0.45 μm 的醋酸纤维素膜, 收集滤液进样分析。采用 Water 2690 型液相色谱系统, 色谱柱: Shodex protein KW-803 型 (300mm $\times$ 8mm id), 检测器: Waters 996 光电二极管阵列检测器, 流动相: 含 0.3mol/L NaCl 的 50mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.0), 紫外检测波长: 280nm, 流速: 1ml/min, 柱温: 25℃。用于曲线校正的十种化学物质及相对分子质量分别是: 甲状腺球蛋白 669000; 醛缩酶 158000; 牛血清蛋白 67000; 卵清蛋白 43000; 过氧化物酶 40200; 腺苷酸激酶 32000; 肌红蛋白 17000; 核糖核酸酶 13700; Aprotinin 6500; 维生素 B₁₂ 1350 (图 4, a)。

1.8 应用激光光散射仪分析溶液中的大豆蛋白聚集体的颗粒分布

将样品溶于去离子水中配制成 8% (W/W) 的分散液, 以 10000r/min 速度均质 1min 后在 $1500 \times g$ 下离心 10min, 取上清液于 90℃ 的水浴中加热保温 10min 后冷却至 25℃, 再通过孔径 0.45 μm 的醋酸纤维素膜, 收集滤液, 加去离子水稀释滤液使之浓度至 0.03% 后取样分析, 溶液粘度 $\eta = 0.8933\text{cp}$ 。ALV-5000/E 型激光光散射仪 (德国 ALV 公司); 功率为 10mW 的 He-Ne 光源, 波长 633nm, 散射角度 $\phi = 90^\circ$, 折射率 $\gamma = 1.332$, 测定温度为 25℃。横坐标代表流体动力学半径 R_h , 单位是纳米 (nm), 纵坐标代表流体动力学半径的分布函数 $f(R_h)$ 。

2 结果与分析

2.1 化学组成和溶解度

脱脂豆粕、醇洗涤豆粕、SPI-A 和 SPI-C 的蛋白质、水分和脂类的含量见表 1。从结果可以看出豆粕经醇洗后脂类物质明显减少, 蛋白质含量明显增加。值得注意的是脱脂豆粕的 PDI 值和蛋白质得率并没有因为醇洗而受影响。因此醇洗涤豆粕可作为制备大豆分离蛋白的一种较好原料, 以期提高产品的理化性能。

从表 1 还可以看出 SPI-A 的蛋白质含量 (95.74%) 高于 SPI-C (91.47%)。尽管在总脂质含量方面两者没有较大的差异, 但与未经醇洗的豆粕相比, 醇洗涤豆粕在大豆分离蛋白制备过程中的等电点沉淀物较为致密。因此这类蛋白质沉淀所含的杂质较少。

2.2 大豆蛋白的功能性质

图 1 是样品 SPI-A 和 SPI-C 凝胶强度测定。样品 SPI-

表 1 豆粕和大豆分离蛋白的主要理化指标

Table 1 Some material contents in the different types of soy flakes and soy protein isolates

样品	蛋白质 (%)	水分 (%)	脂质 (%)	PDI (%)	蛋白质得率 (%)	产品得率 (%)
脱脂豆粕	57.36	10.49	5.51	66.13		
醇洗涤豆粕	70.85	11.12	0.12	76.60	98.24	80.10
SPI-A	95.74	2.37	0.07	90.53	60.55	33.26
SPI-C	91.47	2.50	0.08	86.04	59.76	34.40

注: 蛋白质含量由凯氏定氮法 (AOAC, 1970) [16] 测定;

残留脂质的测定是由氯仿: 甲醇 (2:1, V/V) 混合萃取;

蛋白质得率为各蛋白与脱脂豆粕中蛋白含量之比值。

A 和 SPI-C 的凝胶强度分别是 385.4g 和 85.4g。很明显, 豆粕经醇洗后制备的大豆分离蛋白, 其凝胶强度明显提高。图 2 是样品 SPI-A 和 SPI-C 乳化活性 (EA) 和乳化稳定性 (ES) 之比较。两者的乳化活性没有多大的差别, 但豆粕经醇洗后乳化稳定性明显提高。

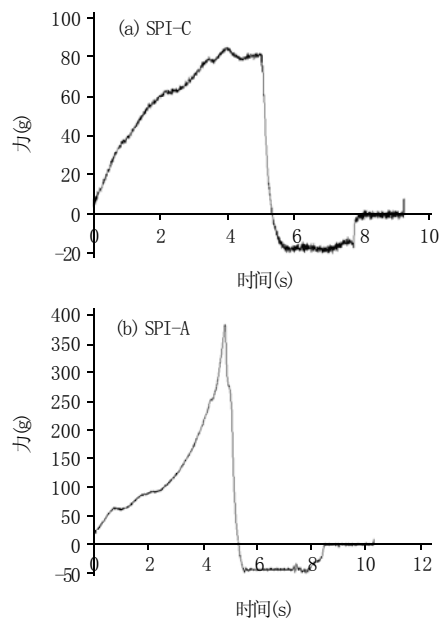


图 1 大豆分离蛋白的凝胶性能测定曲线

Fig.1 Force-deformation test curves of soy protein isolates gelation performance

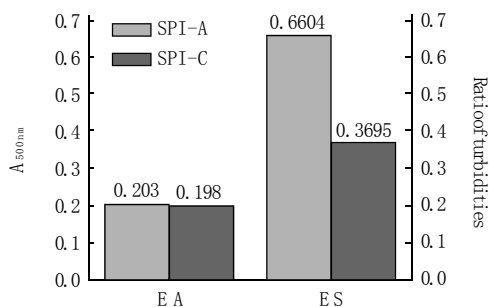


图 2 两种大豆分离蛋白的乳化活性 (EA) 和乳化稳定性 (ES)

Fig.2 Emulsifying activity (EA) and emulsion stability (ES) of SPI-C and SPI-A respectively

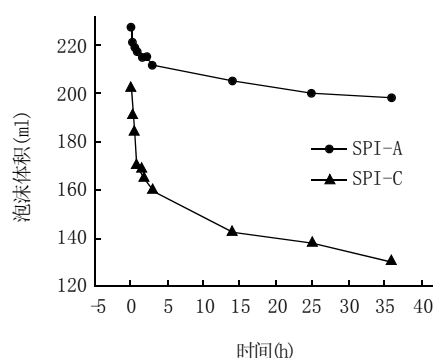


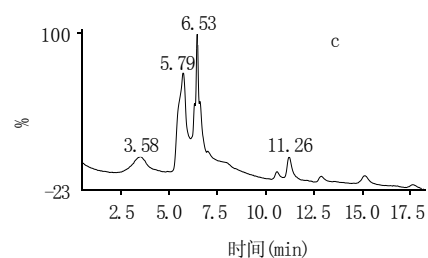
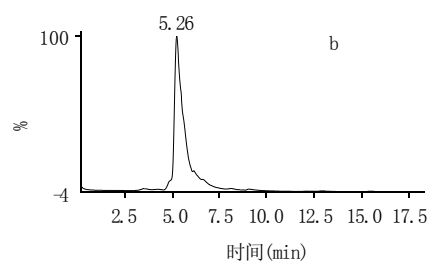
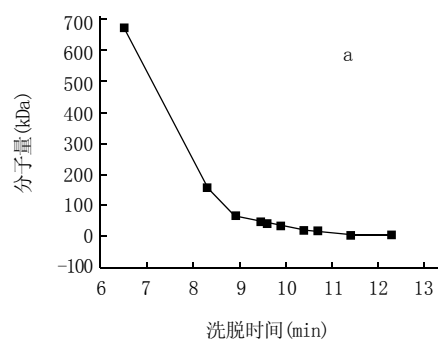
图3 两种大豆分离蛋白的泡沫稳定性

Fig.3 Variation of foam volume of SPI-A and SPI-C dispersions 3% (W/V) with time

图3是样品SPI-A和CSPI-C的起泡度和泡沫稳定性之比较。在室温下静置36h后,样品SPI-A的泡沫体积尚有198ml之多,表明其具有良好的泡沫稳定。此外由于脱脂豆粕的醇浸出,样品SPI-A的起泡能力增加了25%。大豆蛋白之所以可作为一种搅打剂在于它能较长时间地维持泡沫的能力^[17]。其起泡性能受许多因素的影响,包括搅打过程中参与的各种气体、固体颗粒、液滴以及水、多聚物与表面活性剂的复合成分等^[18]。样品SPI-A较高的泡沫稳定性可能是磷脂含量的减少造成的^{[8][11]}。

2.3 样品的相对分子质量分布

为进一步明确大豆蛋白凝胶性能改善的分子基础,我们将样品SPI-A和SPI-C的溶液加热诱导蛋白质的聚集和交联,然后通过HPLC和激光光散射分析其相对分子质量和颗粒分布。图4是样品SPI-A和SPI-C的凝胶色谱,与标准蛋白相比较样品SPI-C的凝胶色谱仅出现一个峰,对应的相对分子质量约670kDa。与样品SPI-C相比,除了一个相对分子质量约1.350kDa的小峰外,样品SPI-A的凝胶色谱峰多在相同保留时间范围出现,由于大豆蛋白的7S和11S成分的相对分子质量分别为180和350kDa左右,较高相对分子质量峰的出现很大程度上可归属于蛋白质聚集体的形成。



a. 十种标准蛋白的校正曲线; b. SPI-C; c. SPI-A。

图4 两种大豆分离蛋白的凝胶色谱

Fig.4 HPLC on Shodex protein KW-803 column of soy protein isolates

图5是通过激光光散射分析得到的样品SPI-A和SPI-C的颗粒粒度分布情况。与凝胶色谱类似,样品SPI-C的粒度分布也只有一个峰, R_h 均值在45nm左右。样品SPI-A的粒度分布则具多态性,其颗粒分布在4~2000nm之间较广的范围内,但 R_h 均值在222nm左右。比较两

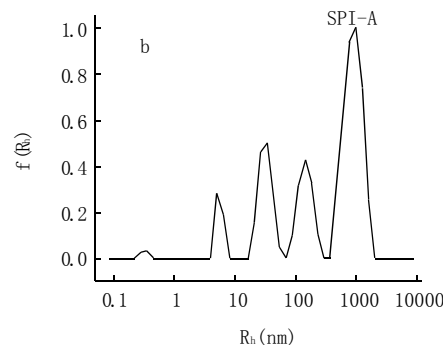
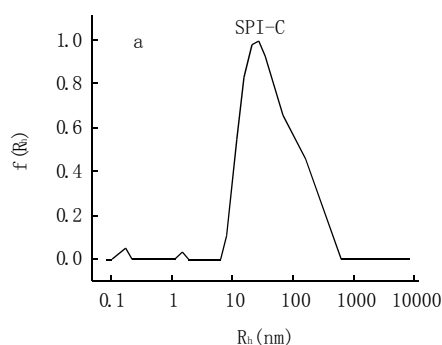


图5 两种大豆分离蛋白粒度分布

Fig.5 Particle size distributions of soy proteins suspensions determined by laser light scattering (ALV-5000/E)

种样品的凝胶色谱和激光光散射结果,可得到除聚集体大小之外的有关聚集体结构方面的信息。值得注意的是,在动态光散射分析条件下,经热处理后的样品SPI-A出现较大的聚集体,但在凝胶色谱中却没有对应的(相对分子质量较高)峰出现。一种可能的解释是,样品SPI-A聚集体的外形结构在凝胶色谱分析中,由于洗脱液的压力作用而发生了明显地的改变,但样品SPI-C聚集体的外形结构却很少受到这种液体动力的影响。我们知道,球蛋白溶液在加热条件下会形成两种类型的聚集体,即“念珠串型”和“颗粒型”^[19]。从结构上看,“念珠串型”聚集体柔韧性较大,而“颗粒型”聚集体结构较为紧密、刚性较大。因而在流经凝胶色谱柱的时候,由于层析过程中的高剪切力,使得前者发生了变形。换句话说,具有较大体积的样品SPI-A聚集体可能具有开放或柔韧性的结构;样品SPI-C的粒度分布和凝胶色谱只有一个主要的峰,表明样品SPI-C的聚集体在经过HPLC柱后,并没有发生很大的变化,说明该聚集体体积较小,结构更为紧密。当然,导致不同聚集体结构形成的分子机理有待进一步研究。Saeed等人^[20]曾报道了脂质氧化产生的自由基对蛋白质变性和聚集的影响。这种影响可能与结构有关。与醇洗脱脂豆粕相比较,脱脂豆粕在蛋白质的水萃取阶段,由于大豆脂肪氧合酶催化的脂质氧化反应,样品SPI-C的聚集行为可能更加明显。根据球蛋白胶凝理论,凝胶的形成是由于变性的蛋白质分子进一步聚集并交联的结果。具有较大体积和开放性结构的SPI-A聚集体可为交联提供更多的相互作用位点,因而样品SPI-A的凝胶强度较大。而体积较小且结构较为致密的SPI-C聚集体却不易彼此交联形成网络,结果其凝胶强度较低。

3 结 论

与传统的碱溶酸沉工艺制备的大豆分离蛋白(SPI-C)相比,以醇洗豆粕为原料制备大豆分离蛋白(SPI-A),其凝胶、乳化和起泡性能已有明显的改善。醇洗去除了脱脂豆粕中的大部分残留脂质,使得制备过程中的大豆蛋白聚集行为发生了改变。这种改变对大豆蛋白的热聚集行为也有影响,它表现在粒度分布分析中,样品SPI-A的流体动力学半径远远大于样品SPI-C。有关脂质氧化与蛋白质聚集和胶凝之间的关系尚待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Kolar CW, Richert SH, Decker CD, et al. Isolated soy protein[A]. In A. M. Altschul, & H. L. Wilcke (eds.), *New Protein Foods*, Vol. 5[M]. New York: Academic Press, Inc, 1985. 259-299.
- [2] Hua Y F, Huang Y R, Qiu A Y, et al. Properties of soy protein isolate prepared from aqueous alcohol washed soy flakes[J]. *Food Research International*, 2005, 38(3): 273-279.
- [3] Hua Y F, Cui S W, Wang Q, et al. Gelling properties of proteins from different defatted soybean flours[J]. *Food Research International*, 2005, 38(4): 377-385.
- [4] 黄友如, 裴爱泳, 华欲飞, 等. 大豆分离蛋白风味物质的气相色谱-质谱分析[J]. *分析化学*, 2005, 33(3): 389-391.
- [5] Nakhost Z, Karel M. Changes in bovine myoglobin due to interaction with methyl linoleate in a model system[J]. *Journal of Food Science*, 1983, 48: 1335-1339.
- [6] Beckel A C, Smith A K. Alcohol extraction improves soya flour flavor and color[J]. *Food Industry*, 1944, 16: 616, 664.
- [7] Baker E C, Mustakas G C, Warner K A. Extraction of defatted soybean flours and flakes with aqueous alcohols: evaluation of flavor and selected properties[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1979, 27(5): 969-973.
- [8] Eldridge A C, Wolf W J, Nash A M, et al. Alcohol washing of soybean protein[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1963, 11(4): 323-328.
- [9] Grant G, McKenzie N H, Watt W B, et al. Nutritional evaluation of soy beans (glycinemax): nitrogen balance and fractionation studies[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1986, 37: 1001-1010.
- [10] Moser H A, et al. Sensory evaluation of soy flour[J]. *Cereal Science Today*, 1967, 12: 296, 298-299, 314.
- [11] Eldridge A C, Hall P K, Wolf W J. Stable foams from unhydrolyzed soybean protein[J]. *Food Technology*, 1963, 17: 1592-1595.
- [12] Ishino K, Kudo S. Conformational transition of alkali-denatured soybean 7S and 11S globulins by ethanol[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1980, 44(3): 537-543.
- [13] AACC. "AACC Approved Methods," rev. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. 1975.
- [14] Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1978, 26(3): 716-723.
- [15] Coffmann C W, Garcia V V. Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour[J]. *Journal of Food Technology (UK)*, 1977, 12: 473.
- [16] AOAC. "Official Methods of Analysis," 11th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C. 1970.
- [17] Lin M J Y, Humbert E S, Sosulski F W. Certain functional properties of sunflower meal products[J]. *Journal of Food Science*, 1974, 39: 368-370.
- [18] Richert S H. Physical-chemical properties of whey protein foams[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1979, 27: 665.
- [19] Gosal W S, Ross-Murphy S B. Globular protein gelation[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2000, (5): 188-194.
- [20] Saeed S, Fawthrop S A, Howell N K. Electron spin resonance (ESR) study on free radical transfer in fish lipid-protein interaction[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79(13): 1809-1816.