不同处理方法对分离7S、11S中抗原含量的影响

胡晓苹[1]，薛文通[1,*]，刘晓毅[1]，燕平梅[1]
(中国农业大学食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘 要：7S和11S是大豆的主要球蛋白，两者占全蛋白的70%。Gly m Bd 30K、Gly m Bd28K和β-伴大豆球蛋白(7S球蛋白)的α-亚基(MW 68k)是大豆中的主要致敏蛋白。本文主要用三种缓冲液的不同处理方法分离7S、11S，使大豆的主要致敏蛋白尽量少的存在于分离后的11S组分中，而主要集中在分离后的7S组分中。豆腐的硬度主要依赖于11S球蛋白，因此这为大豆蛋白脱敏的同时仍能保有良好的凝胶形成能力提供新思路。

关键词：大豆；抗原；分离；凝胶形成

Contents of Soybean Allergens in Separated 7S and 11S by Different Processing Methods

HU Xiao-ping[1], XUE Wen-tong[1,*], LIU Xiao-yi[1], YAN Ping-mei[1]
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: 7S and 11S are the main globins in soybean, amounting to 70 percent of the total soybean protein. Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K and α-Subunit of β-Conglycinin (MW 68k) are the main allergens of soybean. In this paper, different processing methods of 3 different buffer solutions were used to separate 7S and 11S. The results showed that the main allergens existed as little as possible in the separated 11S, with the main allergens mainly existed in the separated 7S. Since the hardness of tofu gel mainly depends on the nature of 11S, it is a new finding to remove the soybean allergens, while at the same time, the gel-forming ability of soybean protein is maintained.

Key words: soybean; allergen; separate; gel-forming
中图分类号: TS201.21 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2006)04-0096-04

大豆蛋白是最重要的植物蛋白之一，且在加工过程中具有优良的功能特性，因此大豆的应用不断扩大。然而，大豆蛋白是八大过敏源之一，为了保证大豆蛋白制品的安全性，可以通过蛋白酶酶解的方法降低抗原的致敏性[1]。大豆中的主要抗原(β-伴球蛋白的α亚基，Gly m Bd 30K和28K)都集中在7S球蛋白中[2]，而在我们以前的大豆的主要致敏原的识别实验中发现我们实验中得到的32.5kDa就是Gly m Bd 30K，28kDa就是Gly m Bd 28K。然而，用δ-葡糖酸内酯(GDL，凝结剂)制的豆腐的硬度依赖于大豆球蛋白即11S[3,4]。因此，为了有效水解大豆中的抗原且最大限度的保留大豆蛋白的加工特性，有必要先将大豆中的7S、11S进行分离。

目前，分离7S和11S的方法有很多，但考虑加工快捷且使11S中主要抗原含量较低的要求，实验选用了0.03mol/L浓度的三种缓冲液在不同条件下，将7S、11S进行分离。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆(科丰六号) 中日食品中心；0.03mol/L pH8.0的磷酸盐缓冲液 自配；0.03mol/L的氢氧化钠溶液 自配；0.03mol/L pH8.0的Tris-HCl缓冲液 自配；$CaCl_2$ 北京化学试剂公司；β-巯基乙醇 Sigma公司；电泳试剂 Sigma公司。

1.2 仪器与设备

酸度计 日本JIRCAS；GL-20B高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂；SHH.W21型电热恒温水浴箱 北京市长风仪器仪表公司；SK-M 10R型粉碎机(带冷却水循环) 日本协立理工株式会社；AE-6450垂直电泳槽、AE-8450 1000V电源 日本ATTO公司；真空冷冻干燥

收稿日期: 2005-06-20 *通讯作者
作者简介：胡晓苹(1978-)，女，硕士研究生，主要从事农产品加工储藏方向的研究。

机 日本JIRCAS; ScanJet 5P扫描仪 惠普公司; 惠普电脑(自安装Bandscan分析软件) 惠普公司。

1.3 方法

1.3.1 大豆水溶性蛋白的提取[5]

选择无损伤颗粒饱满的大豆用粉碎机磨成粉，再用5倍体积的丙酮提取过夜，过滤挥发制得脱脂豆粉，分别用0.03mol/L pH8.0的磷酸盐缓冲液，0.03mol/L的氢氧化钠溶液和0.03mol/L pH8.0的Tris-HCl缓冲液(料液比1:20)从脱脂豆粉中提取蛋白1h，于14000×g下离心30min，取上清液为大豆蛋白水溶液备用。

1.3.2 7S和11S的分离[6]

在大豆蛋白水溶液中分别添加0.01mol/L $CaCl_2$，0.01mol/L β-巯基乙醇以及将大豆蛋白水溶液4℃冷沉过夜三种不同处理，再用2mol/L HCl调节使其pH值为6.3～6.4，于6400×g，4℃下离心30min，在将沉淀(11S球蛋白)和上清液(7S球蛋白)真空冷冻干燥备用。

1.3.3 SDS-PAGE电泳条件

将各种处理方法得到的7S和11S分别溶解到0.01mol/L pH7.2的磷酸盐缓冲液中，浓度均为5%。凝胶浓度12.5%，交联度3.6%，定流10mA/gel，直到溴酚蓝跑到胶底。

1.3.4 Bandscan软件分析

将电泳图谱扫描后，使用Bandscan软件分析11S中的主要组成。

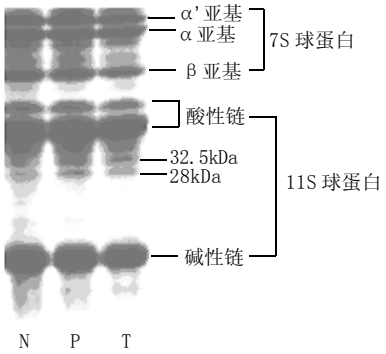
2 结果与讨论

2.1 不同缓冲液提取大豆蛋白

图1是三种缓冲液提取的蛋白为样品进行相同点样量(均为10μl)电泳得到的SDS-PAGE图谱，图中三条泳道中各条带迁移率和相对含量没有明显不同，说明这三种缓冲液提取的蛋白组分没有明显不同。

2.2 0.03mol/L的磷酸盐缓冲溶液提取下7S、11S的分离

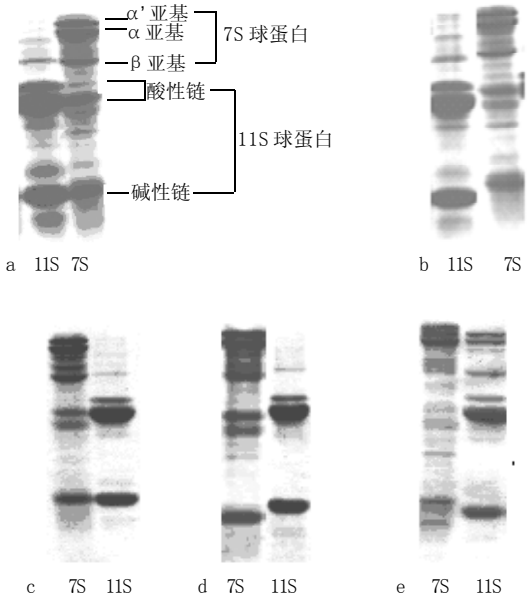
图2是0.03mol/L磷酸缓冲溶液在不同条件下分离的7S、11S为样品进行相同点样量(均为10μl)电泳得到的



N NaOH, P磷酸缓冲液，T Tris-HCl。

图1 不同缓冲液提取的大豆蛋白SDS-PAGE图谱

Fig.1 SDS-PAGE pattern of soy protein extration by different buffer



a和b分别是都加β-巯基乙醇，直接分离、4℃冷沉一夜后分离；c-e分别是都不加β-巯基乙醇直接分离、4℃冷沉一夜分离和冷沉加钙。

图2 PBS提取下的7S、11S分离效果

Fig.2 7S, 11S seperation patterns by PBS extration

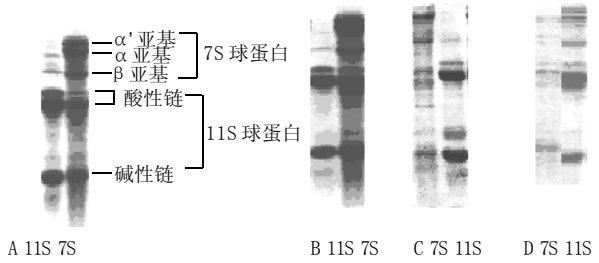
表1 0.03mol/L pH8.0 PBS提取分离时11S的组成

Table 1 Constitutes of 11S by 0.03mol/L pH8.0 PBS

11S中的主要组分	不同处理下11S各组分的比例(%)				
	a	b	c	d	e
7S的α'亚基	0.2±0.04	0.8±0.06	—	—	8.4±0.26
7S的α亚基	2.4±0.11	3.2±0.26	1.4±0.35	2.1±0.18	7.5±0.53
7S的β亚基	6.8±0.64	6.4±0.47	2.8±0.24	3.8±0.34	8.9±0.57
11S酸性链	36.2±0.84	35.3±0.75	51.1±1.13	50.9±0.88	43.8±1.24
32.5kDa	2.3±0.18	3.1±0.32	0.2±0.03	0.7±0.03	0.4±0.02
28kDa	1.3±0.28	—	—	—	—
22kDa	11.4±0.76	7.3±0.44	2.9±0.87	1.2±0.57	3.7±0.49
11S碱性链	30.4±1.63	31.3±1.34	37.3±0.86	36.4±0.96	25.3±0.76
14kDa	9.0±0.64	9.6±0.75	4.3±0.44	4.9±0.75	2.0±0.35

SDS-PAGE 图谱。比较图2，a～e 不同处理发现，c 和 d 处理分离得到的11S 相对于a、b、e 处理的11S 纯度高，杂蛋白少，而e 处理(加钙加冷沉)在此条件下7S 也被沉淀下来，这是直接冷沉所达不到的。分析表1 发现，a、b 处理(都加入β-巯基乙醇)的11S 球蛋白中Gly m Bd 30K 的量偏高，分别为2.3%和3.1%。一般还原剂能打断7S、11S 间的二硫键，使其得到更加彻底的分离，但这里加入β-巯基乙醇使Gly m Bd 30K 与7S 先得到分离所以在11S 球蛋白中Gly m Bd 30K 的量偏高。分析表1 中各条件下11S 组分中抗原的含量，发现c 处理(不加还原剂β-巯基乙醇时直接分离)效果最好，各主要抗原含量均为最低，即7S 的α亚基为1.4%, Gly m Bd 30K 为0.2%，Gly m Bd 28K 没有检出。

2.3 0.03mol/L NaOH 溶液提取下7S、11S 的分离



A～D 分别是不加β-巯基乙醇的直接分离、4℃冷沉分离、加钙直接分离和加钙冷沉分离。

图3 NaOH 提取下的7S、11S 分离效果

Fig.3 7S, 11S seperation patterns by NaOH extration

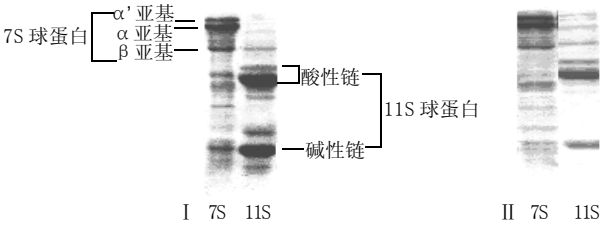
表2 0.03mol/L pH8.0 NaOH 提取分离时11S 的组成

Table 2 Constitutes of 11S by 0.03mol/L pH8.0 NaOH

11S 中的主要组分	不同处理下11S各组分的比例(%)			
	A	B	C	D
7S 的α'亚基	1.0±0.12	0.9±0.21	2.3±0.28	7.7±0.32
7S 的α亚基	3.1±0.34	3.4±0.41	2.2±0.12	6.3±0.58
7S 的β亚基	3.2±0.34	5.8±0.44	3.8±0.52	7.5±0.76
11S 酸性链	53.6±1.69	42.4±1.15	39.7±0.58	48.7±1.42
32.5kDa	0.6±0.08	1.2±0.08	1.5±0.36	1.3±0.09
22kDa	—	2.7±0.21	9.7±0.77	4.5±0.35
11S 碱性链	34.0±1.17	40.1±1.64	35.8±1.20	23.3±1.04
14kDa	4.5±0.59	3.5±0.78	5.0±0.45	0.7±0.08

图3 是0.03mol/L NaOH 溶液在不同条件下分离的7S、11S 为样品进行相同点样量(均为10μl)电泳得到的SDS-PAGE 图谱。如图3，D 处理，钙和冷沉的协同效应使7S 在pH6.4 也得到沉淀，11S 纯度低，杂蛋白多，而这并不是钙单独作用能得到的。如图3，C 处理，加钙直接分离不能大量沉淀7S。从表2 可以看出，NaOH 溶液和磷酸缓冲液在分离效果上并没有截然的不同，但是各亚基的比例由于离子种类的不同还是略有不同。分析表2 中各条件下11S 组分中抗原的含量，发现A 处理(不加还原剂β-巯基乙醇时直接分离)效果最好，各主要抗原含量均较低，即7S 的α亚基为3.1%，Gly m Bd 30K 为0.6%，Gly m Bd 28K 没有检出，但抗原含量较磷酸缓冲液c 处理的仍高。

2.4 0.03mol/L Tris-HCl 缓冲液提取下7S、11S 的分离



Ⅰ-Ⅱ,分别是不加β-巯基乙醇的直接分离、4℃冷沉分离。

图4 Tris-HCl 提取下的7S、11S 分离效果

Fig.4 7S, 11S seperation patterns by Tris-HCl extration

表3 0.03mol/L pH8.0 的Tris-HCl 提取条件下11S 的组成

Table 3 Constitutes of 11S by 0.03mol/L pH8.0 Tris-HCl

11S 中的主要组分	不同处理下11S各组分的比例(%)	
	Ⅰ	Ⅱ
7S 的α'亚基	1.3±0.25	0.9±0.05
7S 的α亚基	1.5±0.51	3.7±0.42
7S 的β亚基	1.2±0.12	5.7±0.25
11S 酸性链	44.6±1.22	53.0±1.61
32.5kDa	3.4±0.08	2.3±0.54
28kDa	—	0.3±0.06
22kDa	11.1±0.45	1.2±0.18
11S 碱性链	35.3±1.41	32.6±1.35
14kDa	3.6±0.35	0.3±0.06

图4 是Tris-HCl 分离7S、11S 为样品进行相同点样量(均为10μl)电泳得到的SDS-PAGE 图谱。比较图4 发现，Ⅰ处理较Ⅱ处理得到的11S 含量更高，杂蛋白更少。由表3 的分析可以看出，Tris-HCl 缓冲液的分离效果与磷酸缓冲液已非常接近，只是Gly m Bd 30K 在Ⅰ处理和Ⅱ处理得到的11S 组分中含量过高分别为3.4%和2.3%，这与Tris 的性质以及溶液的离子浓度有很大关系。

3 结 论

本文通过研究上述三种缓冲溶液不同处理下11S 的组成，建立了7S、11S 分离的较好方法，即0.03mol/L pH8.0 的磷酸缓冲溶液作为提取液直接调节pH 值进行分离，此时分离得到11S 组分的抗原蛋白含量最少，7S 的α亚基占1.45%，Gly m Bd 30K 占0.2%，Gly m Bd 28K 没有检出。这种7S、11S 的分离方法对大豆脱敏的同时保持大豆的加工特性具有重大意义。

参考文献：

[1] Hosoyama H, Obata A, Tsuji H, et al. Studies on the reduction of

维药孜然不同提取物抑菌作用的研究

索菲娅，苟 萍，生 光，兰 燕
(新疆大学生命科学与技术学院，新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要：本文对孜然挥发油、孜然醇提物、孜然水提物、孜然醇后水提物，用Bauer-Kirby法实验探讨了各提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等7种细菌和酵母菌的抑菌效果。结果表明，这几种提取物表现出不同的抑菌能力。采用琼脂稀释法探得出孜然挥发油和孜然醇提物的最低抑菌浓度(MIC)。孜然挥发油对细菌和酵母菌的MIC为2%～1%，孜然醇提物对细菌和酵母菌的MIC多数为100mg/ml。

关键词：孜然；挥发油；抑菌作用；M I C

Study on the Antibacterial Activities of Cumin's Extracts

SUO Fei-ya, GOU Ping, SHENG Guang, LAN Yan
(College of Life Science and Techonolgy, Xinjiang University, Urumchi 830046, China)

Abstract: To research on the *in vitro* growth inhibition effect of Cumin's extracts on bacteria. Methods: K-B paper dispersion method was used and the inhibition effects of circular filter paper pieces of Cumin's extracts on 8 tested strains were observed. It had different effects of growth inhibition on bacteria. Most of the MICs of cumin oil were among 2%～1% according to 8 tested strains. Most of the MIC of ethanol extracts were assayed as 100mg/ml according to 8 tested strains.

Key words *Cuminum cyminum* L.; cumin oil; antibacterial activities; MIC(minimum inhibition concentration)
中图分类号：TS202.3 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2006)04-0099-04

孜然(*Cuminum cyminum* L.)又名香旱芹、枯茗，维文译名安西茴香，为伞形科(*Umbelliferae*)孜然芹植物的干燥成熟果实[1]。原产于地中海和中亚地区[2]。新疆是我国的主要孜然种植基地，库克、沙雅、喀什、和田、吐鲁番等地均有种植。孜然具有特殊的香味，为新疆名特小吃烤羊肉、制咖喱粉的主要香料，其风味成分枯茗醛，即对异丙基苯甲醛，即是食用香料，也具有安神、止痛、行气、开胃、防腐等医疗保健功能。同时又是新疆重要的民族药。该药有驱风散寒、暖胃健脾、利水逐水，散结水肿等功效，可治疗胃寒呃逆，食欲不振，腹泻腹胀，胃腹胀痛，淋病，小便不利，血凝经闭，睾丸肿胀，疝气等疾病[1~3]。我们为观察孜然的体外抑菌作用，对其进行有效成分的提取和相关的抑菌实验研究，旨在为研究和进一步应用提供参考数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期：2005-02-28
作者简介：索菲娅(1964-)，女，副教授，主要从事植物资源和植物化学的研究。

soybean allergenicity(Part 1)[J]. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 68: 343.
[2] Ogawa T, Bando N, Tsuji H, et al. Investigations of the IgE-bingding proteins in soybeans by immunoblotting with sera from soybean-sensitive patients with atopic dermatitis[J]. Nutr Sci Vitaminol(Tokyo), 1991, 37: 555-565.
[3] Hashizume K, Nakamura N, Watanabe T, et al. Influence of ionic strength on conformation changes of soybean proteins caused by heating, and relationship of its conformation changes to gel formtion[J]. Agric Biol Chem, 1975, 39: 1339-1347.
[4] Kohyama K, Nishinari K, et al. Rheological studies on the gelation process of soybean 7S and 11S in the presence of glucono-δ-lactone[J]. Agric Food Chem, 1993, 41: 8-14.
[5] Zeece M G, Beardslee T A, Markwell J P, et al. Identification of an IgE-binding region in soybean acidic glycinin G1[J]. Food and Agricultural Immunology, 1999, 11: 83-90.
[6] Suchkov V V, Popello I A, Grinberg V Ya, et al. Isolation and purification of 7S and 11S globulins from broad beans and peas[J]. Agric Food Chem, 1990, 38: 92-95.