

大豆乳清蛋白的热稳定性分析 及其与球蛋白的相互作用研究

帖向宇, 郭顺堂*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:研究了大豆乳清蛋白在豆奶体系中的热稳定性,并进一步研究生豆奶在加热过程中大豆乳清蛋白与大豆球蛋白之间的相互作用。大豆乳清蛋白溶于生豆奶超滤液中,将加热前后的该溶液分别经 Sephacryl S-300 凝胶过滤,发现大豆乳清蛋白加热后会发生热凝聚现象,形成较大的蛋白凝聚物。通过比较大豆乳清蛋白溶液和无乳清蛋白豆奶溶液对 pH 变化的敏感性,发现大豆乳清蛋白和球蛋白在加热过程中会发生相互作用。

关键词:大豆乳清蛋白,豆奶,热稳定性

Abstract:The study analyzes the thermal stability of soybean whey protein in soymilk system and the interactions of soybean whey protein and soybean globulin during heating. Soybean whey protein was dissolved in raw soymilk ultrafiltrates, then the unheated and heated solution was analyzed through gel chromatography (Sephacryl S-300), respectively. We observed that agglomeration phenomenon happened when soybean whey protein was heated. By comparing the sensitivity of soybean whey protein solution and soymilk without whey protein on pH change, we discovered that there were some interactions between soybean whey protein and soybean globulins during heating.

Key words:soybean whey protein; soymilk; thermal stability

中图分类号:TS201.2*1 文献标识码:A
文章编号:1002-0306(2006)09-0077-04

大豆被浸泡、磨碎或脱脂豆粕用水进行抽提,大豆蛋白质绝大部分被提取出来。在被抽提出的蛋白质中,80%以上是由 glycinin 和 β -conglycinin 构成的大豆球蛋白,当提取液 pH 为 4.5 时这部分蛋白会沉淀析出,亦即酸沉蛋白^[1]。而有少部分蛋白在此酸性条件下稳定,称为大豆乳清蛋白,主要是脂肪氧化

收稿日期:2006-01-19 * 通讯联系人

作者简介:帖向宇(1979-),男,硕士研究生,研究方向:大豆蛋白的加工利用。

酶(102000 Da)、 β -淀粉酶(61700 Da)以及在 pH2.2~10.8 的范围内均稳定的凝集素(33000 Da)和在 pH3.0~10.0 内稳定的胰蛋白酶抑制剂(20000 Da)^[2,3]。豆乳中蛋白质的组成及存在状态对豆奶产品的稳定性和加工工艺如对凝固剂的敏感性等有重要影响。Guo et al(1997,1999)等报道了豆奶中蛋白质在加热、凝固等过程中各球蛋白组分之间、蛋白与脂肪球之间的相互作用和蛋白粒子形成过程,并指出了豆奶体系中蛋白、脂肪产生凝固的机制(Guo and Ono 2005)^[4-6]。然而,大豆乳清蛋白作为豆奶中的重要成分,其热稳定性及其在豆奶加工过程中是否参与蛋白粒子的形成,以及进一步对豆奶制品性质的影响等尚未见报道。本文研究了大豆乳清蛋白在豆奶体系中的热稳定性,并进一步研究了豆奶加工过程中大豆乳清蛋白与大豆球蛋白的相互作用。

1 材料与方法

1.1 大豆乳清蛋白的制备

市售普通大豆用去离子水(豆水质量比为 1:3)在 4℃下浸泡 15h 后加 6 倍水磨浆,用脱脂棉过滤除渣后得到生豆奶。调生豆奶的 pH 到 4.5 后离心(2000×g,10min)得到上清液,调上清液的 pH 到 8.0,然后将其在 4℃下透析 24h 后冷冻干燥,得到大豆乳清蛋白粉。

1.2 生豆奶超滤液的制备

生豆奶用实验用膜分离装置(上海亚东核级树脂有限公司)进行超滤,使用截流量为 10000Da 的超滤膜,得到的滤过液即为生豆奶超滤液。

1.3 豆奶中蛋白含量的测定

Bradford 法^[7]。

1.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

参照 Laemmli(1970)法^[8]进行 SDS-PAGE 分析,

凝胶浓度为 12%~14% ,交联度为 2.6%。

1.5 凝胶过滤

将大豆乳清蛋白粉溶于 5mL 生豆奶超滤液中 ,使得该溶液的蛋白浓度为 5mg/mL。将该溶液在沸水中保持 5min ,冷却后离心(3000×g ,10min)得到的上清液用 Sephacryl S-300 (26/100) 进行凝胶过滤层析 ,流速为 3.5mL/6min。洗脱液中含有 0.4mol/L 的氯化钠 ,pH7.25 的 0.1mol/L 磷酸盐标准缓冲液。洗脱液中的蛋白用 HD-3 紫外检测仪在 280nm 检测。

1.6 大豆球蛋白和 大豆乳清蛋白对 pH 变化的敏感性分析

将大豆乳清蛋白溶于 7mL 生豆奶超滤液中 ,使得溶液的浓度为 3mg/mL ,将该溶液在沸水中保持 5min ,冷却后分别调溶液的 pH 到 6.5 6.0 5.5 5.0 ,4.5 4.0 ,离心(1800×g ,10min)后采用考马斯亮蓝 G-250 法测定上清液中的蛋白含量。

生豆奶调 pH 到 4.5 后离心(2000×g ,20min)得到沉淀 ,将沉淀用去离子水水洗两次 ,添加少量去离子水后用 1mol/L NaOH 调 pH 到 8.0 ,该溶液在 4℃下透析 24h 后用生豆奶超滤液调配蛋白浓度为 3mg/mL ,得到无乳清蛋白生豆奶。取 7mL 该溶液加热 5min 后调 pH ,测定溶液中蛋白对 pH 变化的敏感性。

将大豆乳清蛋白溶于 7mL、3mg/mL 的无乳清蛋白豆奶溶液中 ,使得乳清蛋白的浓度也为 3mg/mL ,然后用同上的方法调 pH ,测定溶液中蛋白对 pH 变化的敏感性。

敏感性为上清液中的蛋白含量占总蛋白含量的百分比 ,即 :

$$\text{蛋白百分比}(\%) = \frac{\text{上清液中的蛋白含量}}{\text{原溶液中总的蛋白含量}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 大豆乳清蛋白的组成成分

大豆乳清蛋白在大豆子实蛋白中占 5%~10% ,是大豆蛋白的重要组成部分。按照 Jorge R. Wagner

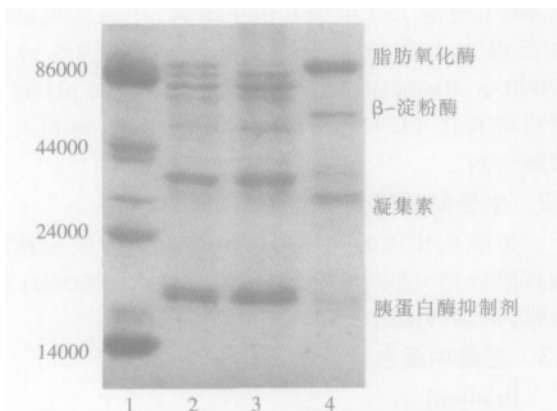


图1 豆粉和乳清蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱
泳道 1 marker 泳道 2 豆粉 泳道 3 无乳清蛋白豆粉 泳道 4 乳清蛋白

等(2002)的方法将大豆乳清蛋白从大豆子实中分离出来^[9]。结果用 SDS-PAGE 分析 ,如图 1 所示。

从图中可以看出 ,大豆乳清蛋白主要由脂肪氧化酶 (102000 Da)、β-淀粉酶 (61700 Da)、凝集素 (33000 Da)和胰蛋白酶抑制剂(20000 Da)组成。其中 ,脂肪氧化酶所占的比例最高。

2.2 大豆乳清蛋白的热稳定性分析

大豆乳清蛋白的溶解性很好 ,而它的热稳定性较差 ,如图 2 所示。乳清蛋白在豆奶超滤液和水中都能充分快速溶解(管 2 和管 5) ,形成透明溶液。乳清蛋白溶于豆奶超滤液后加热可形成混浊溶液 ,但不会沉淀 ,当调其 pH 到 4.5 后便会出现沉淀现象 ,说明加热变性后的乳清蛋白对 pH 变化是非常敏感的 (管 3)。乳清蛋白在水中加热后会出现沉淀现象 (管 6)。

生豆奶超滤液是一种豆奶体系 ,它含有与生豆奶相同的离子强度、pH 等 ,这样的体系使得乳清蛋白加热后并不沉淀。而在水中的结果就完全不同了。

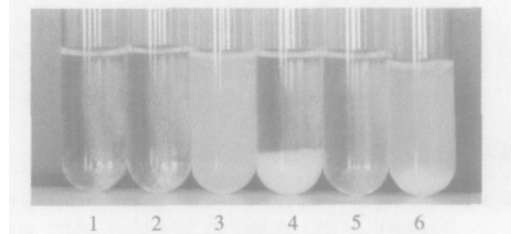


图2 加热对乳清蛋白稳定性的影响

管 1 豆奶超滤液 ;管 2 乳清蛋白溶于超滤液后的溶液 ;管 3 2 号管在沸水中保持 5min ;管 4 3 号管冷却后调 pH4.5 ;管 5 乳清蛋白溶于水后的溶液 ;管 6 5 号管在沸水中保持 5min

2.3 大豆乳清蛋白热凝聚分析

图 2 中已经发现 ,乳清蛋白在生豆奶超滤液中加热后会形成混浊溶液 ,但不会沉淀。为了进一步明确乳清蛋白加热后的变化情况 ,将生乳清蛋白溶液和熟乳清蛋白溶液分别进行 Sephacryl S-300 凝胶过滤 ,洗脱液为 pH7.25、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液 ,结果如图 3 所示。

a 图和 b 图是生乳清蛋白和熟乳清蛋白分别进行 Sephacryl S-300 凝胶过滤的图谱。结果发现 ,生乳清的图谱中在 8h 后才出现第一个峰 ,且峰很小 ,加热后的乳清在第 4h 后就会出现一个较大的峰。说明乳清蛋白中的组分在生豆奶超滤液中加热后会形成较大的凝聚物。

将图 3b 的第一个峰收集起来后经过透析脱盐、冻干 ,然后进行电泳分析 ,结果如图 4 所示 ,发现该凝聚物中为乳清蛋白的各组成成分。

在大豆乳清蛋白中 ,脂肪氧化酶的含量很高 ,它是一种非血红素铁蛋白 ,铁离子处于酶分子的内部 ,而其他组分的分子结构中均含有二硫键或巯基。热

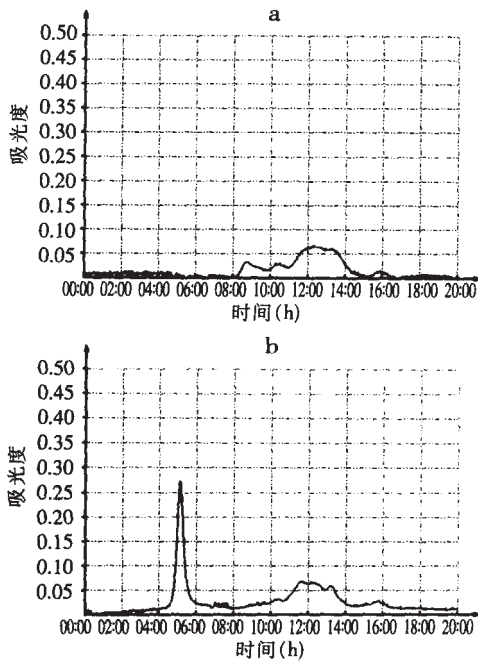


图3 生乳清蛋白溶液和熟乳清蛋白溶液的
Sephacryl S-300 凝胶过滤层析图
a, 生乳清蛋白 b, 熟乳清蛋白

处理使酶类的四级结构发生变化,使酶失活,同时,蛋白的疏水性增加。这些因素可能诱使大豆乳清蛋白的各组分在加热过程中相互交联,形成较大的蛋白凝聚物。

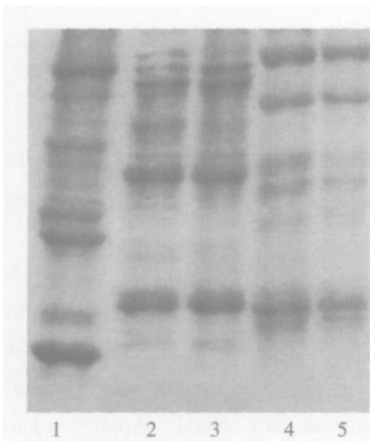


图4 豆粉和乳清蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱
泳道 1 marker 泳道 2 豆粉 泳道 3 无乳清蛋白豆粉 泳道 4 乳清蛋白 泳道 5 图 3b 的峰 1

2.4 大豆乳清蛋白和大豆球蛋白对 pH 变化的敏感性

研究发现,在制备大豆蛋白的过程中,脂肪氧化酶能够引起大豆蛋白化学结构上发生变化^[10]。大豆乳清蛋白是豆奶蛋白中的一部分,而豆奶中主要的蛋白是大豆球蛋白。图 2 和图 3 的结果中显示,大豆乳清蛋白在生豆奶超滤液中加热后会发生热凝聚现象,而生豆奶中的球蛋白在豆奶加热过程中就有可

能参与到这种热凝聚现象中。

大豆乳清蛋白在生豆奶超滤液中加热,冷却后调溶液的 pH 到 4.5,便会发生沉淀现象,说明热变性后的乳清蛋白溶液对 pH 变化是比较敏感的。

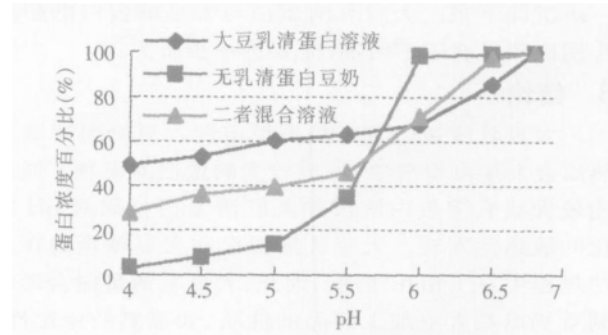


图5 热处理后的大豆乳清蛋白溶液和无乳清蛋白豆奶及其二者的混合溶液对于 pH 变化的敏感性

图 5 是热处理后的大豆乳清蛋白溶液和无乳清蛋白豆奶溶液对 pH 变化的反应。从该图可以看出,大豆乳清蛋白溶液中的蛋白含量随 pH 的下降而逐渐下降,而大豆球蛋白溶液在 pH 6.0 以前蛋白含量并不发生变化,当 pH 从 6.0 到 5.5 时,蛋白含量急剧下降。

当调 pH 到 6.0 时,热处理后的大豆球蛋白并不会沉淀,而乳清蛋白在 pH 6.0 会沉淀。将大豆乳清蛋白和无乳清蛋白生豆奶混合后加热,冷却后测定该溶液对 pH 变化的敏感性,发现在 pH 6.0 时有蛋白沉淀出来。

对离心得到的沉淀进行电泳分析,如图 6 所示。发现沉淀中出现了多种组分,有脂肪氧化酶、 β -淀粉酶、凝集素;也有 α' 、 α 和 β 亚基和酸性亚基 A,碱性亚基 B。而在上清液中也仍然存在着各蛋白组分。

无乳清蛋白豆奶加热后在 pH 6.0 时并不沉淀,

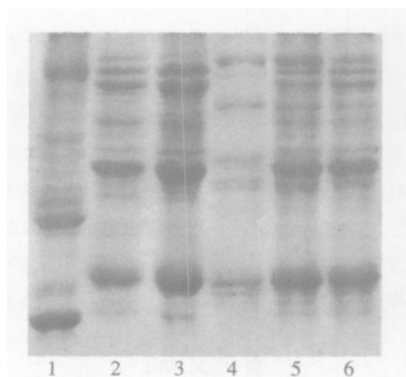


图6 大豆球蛋白和大豆乳清蛋白混合加热后调 pH 到 6.0 离心得到的沉淀和上清液电泳图谱

泳道 1 marker 泳道 2 豆粉 泳道 3 无乳清蛋白豆粉 泳道 4 乳清蛋白 泳道 5 调 pH 到 6.0 后离心得到的沉淀部分 泳道 6 调 pH 到 6.0 后离心得到的上清部分

当将大豆乳清蛋白和无乳清蛋白豆奶混合加热,冷却后调 pH 到 6.0,离心后在沉淀中发现了大豆球蛋白。说明加热使大豆乳清蛋白和大豆球蛋白之间发生了相互作用,导致了大豆球蛋白和大豆乳清蛋白一块沉淀下来。大豆乳清蛋白与大豆球蛋白的相互作用机理目前还不明确,需要进一步研究。

3 结论

大豆乳清蛋白具有热不稳定性,豆奶超滤液加热后会发生凝聚现象,形成较大的蛋白凝聚物。通过比较大豆乳清蛋白溶液和无乳清蛋白豆奶对 pH 变化的敏感性发现,大豆乳清蛋白和大豆球蛋白在加热过程中发生相互作用。因此,大豆乳清蛋白会影响豆奶以及大豆加工制品的性质,如豆奶的稳定性,豆奶粉的溶解性等,这些都还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] 石彦国,任丽 编著. 大豆制品工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,2001.68~69.
- [2] Koshiyama Y, Kikuchi M, Fukushima D. 2S Globulins of soybean seeds 2 Physicochemical and biological properties of protease inhibitors in 2S globulins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1981, 29: 340~343.
- [3] Lotan R, Siegelman H W, Lis H, Sharon N. Subunit structure of soybean agglutinin [J]. Journal of Biological

Chemistry, 1974, 249: 1219~1224.

- [4] Guo shun-tang, T Ono M Mikami. Interaction between Protein and Lipid in Soybean Milk at Elevated Temperature [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(12): 4601~4605.
- [5] Guo shun-tang, Tomotada Ono, Masayuki Mikami. Incorporation of Soy Milk Lipid into Protein Coagulum by Addition of Calcium Chloride [J]. J Agric Food and Chem, 1999, 47(3):901~905.
- [6] S-T GUO, T ONO. The Role of Composition and Content of Protein Particles in Soy milk on the Tofu Curding by Glucono- δ -lactone or Calcium sulfate [J]. Journal of Food Science, 2005, 70(4):c258~c262.
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1978, 72:248~258.
- [8] Laemmli U K. Nature[J], 1970, 227:680~685.
- [9] Sorgentini D A, Wagner J R. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins [J]. Journal of Food Biochemistry, 1999, 23(5): 489~507.
- [10] Youru Huang, Yufei Hua *, Aiyong Qiu. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation[J]. Food Research International, 2006, 39: 240~249.

(上接第 76 页)

(弹性、流动性、柔韧性等),使其对由冰晶引起的机械损伤的抵抗能力增强,即使细胞膜的通透性降低,使内容物的露出量降低,保持膜的完整性,提高细胞的存活率^[4]。

3 结论

在双歧杆菌的培养液中添加不同量的吐温-80,经过 24h 的液氮冷冻处理后,测定细胞漏出液中 LDH 的漏出量,结果表明吐温-80 可显著降低细胞培养液中的 LDH 的漏出率,说明其对双歧杆菌细胞膜有一定保护作用,且不同的吐温-80 添加量之间差异显著,尤其吐温-80 的添加量为 0.025%时,对双歧杆菌在液氮冷冻处理后有极为显著的保护作用。这将为菌种的冷冻保护及其保藏开辟一条新的途径。

参考文献:

- [1] E Selmer-Olsen. Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized Lactobacillus subjected to drying, storage and rehydration [J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 87: 429~437.
- [2] 洪庆涛. 细胞培养液乳酸脱氢酶漏出率的比色测定及其

应用[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(1): 67~71

- [3] R B SMITTLE. Death of Lactobacillus bulgaricus Resulting from Liquid Nitrogen Freezing [J]. Applied microbiology, 1972(10): 551~554.
- [4] R B SMITTLE. Relationship of cellular fatty acid composition to survival of lactobacillus bulgaricus in liquid nitrogen[J]. Applied microbiology, 1974(4): 738~743.
- [5] C WAYNE MOSS. Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acid[J]. Applied microbiology, 1974 (7): 80~85.
- [6] LOBNER D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis [J]. Journal of Neuroscience Methods, 2000, 96: 147~152.
- [7] SHUAIB A, SOCHOCKA E, ISHAQZAY R, et al. Protective effect of hypothermia during ischemia in neural cell cultures[J]. Neurochem Res, 1993, 18(6): 663~665.
- [8] E Ferhan TEZCAN. Cold shock proteins[J]. Turk J Med Sci, 2001, 31: 283~290
- [9] 韩雪. 双歧杆菌的增殖与保藏[D]. 东北农业大学硕士学位论文, 2003.