富含大豆异黄酮的大豆蛋白功能特性研究

杨娟，王成根，彭捷，杨晓泉
（华南理工大学轻工与食品学院，广州 510640）

摘要：本文研究了不同加热条件制备和表征富含异黄酮的大豆蛋白及其功能性，该蛋白极大改善了异黄酮的难溶性。选择了在pH 6.4和pH 7.0加热制备了富含纯天然大豆异黄酮（SPIG）和苷元型异黄酮（SPIA）的大豆蛋白。与大豆分离蛋白（SPI）相比，加热的SPI (HSPI)、SPIG和SPIA的发泡能力提高，pH 7.0条件下的SPIG的发泡能力为165.77±2.90%，强于其它几种条件下添加异黄酮的蛋白。同SPI相比，加入异黄酮后大豆蛋白的持水能力下降，其中SPIA6.4的持水能力最低。采用SPI、大豆蛋白与纯天然大豆异黄酮的混合物及与苷元异黄酮的混合物(MixG和MixA)、HSPI及SPIG、SPIA分别制备了乳液。SPI制备的乳液的d_{43}为1.35±0.12 μm，MixG和MixA制备的乳液的d_{43}为25.41±1.32 μm和24.57±1.73 μm，SPIG、SPIA制备乳液的d_{43}为38.99±0.89 μm和34.50±0.48 μm。离心条件下的SPIG和SPIA制备的乳液的稳定系数相对降低，但该乳液同SPI制备的乳液相比具有更加良好的塑性，激光共聚焦显微镜（CLSM）的结果与d_{43}结论相一致。

关键词：大豆分离蛋白；大豆异黄酮；功能性质
文章篇号：1673-9078(2014)7-98-102

Functional Properties of Soy Protein Enriched with Soybean Isoflavones

YANG Juan, WANG Cheng-gen, PENG Jie, YANG Xiao-quan
(School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Soy protein enriched with isoflavones was prepared under different heating conditions and its functional characteristics were studied. The insolubility of isoflavones in protein was greatly changed. Soy protein enriched with natural soybean isoflavones (SPIG) and aglycone isoflavones (SPIA) prepared under pH 6.4 and pH 7.0 were selected. Compared with soybean protein isolate (SPI), the foaming abilities of the heated SPI (HSPI), SPIG and SPIA were enhanced after isoflavone was added. When the pH value was 7.0, the foaming ability of SPIG was 165.77 ± 2.90 %, which was stronger than that of the other proteins enriched with isoflavones. However, water holding ability of the soybean proteins decreased after adding isoflavone, and SPIA 6.4 demonstrated the lowest water holding ability. Then, SPI, the mix of soy protein and natural soybean isoflavones and aglycone isoflavones (MixG and MixA), SPIG and SPIA were respectively adopted to make emulsion. The d_{43} of fresh emulsion was determined; the average droplet size of SPI was 1.35 ± 0.12 μm, while the average droplet size of MixG and MixA was 25.41 ± 1.32 and 24.57 ± 1.73 μm, respectively. After heating, the average droplet size of SPIG and SPIA increased to 38.99 ± 0.89 μm and 34.50 ± 0.48 μm, respectively. The emulsion stability coefficients of SPIG and SPIA under centrifugal condition were relatively low, but the emulsion had better plasticity than the emulsion of SPI. The conclusion derived from confocal laser scanning photomicrographs (CLSM) was corresponded with d_{43}.

Key words: soy protein isolate; soybean isoflavones; functional properties

大豆蛋白是一种大宗食品配料，广泛应用于食品工业。作为一种来源广泛的贮藏蛋白，大豆蛋白从流行病学及临床营养认为可以降血脂[1]、影响绝经期妇女的骨代谢[2]及对肝脂积累产生一定的作用[3]。研究表明，大豆蛋白的降血脂作用来自大豆蛋白与多酚类物质的协同作用[4]。

大豆异黄酮（Soybean isoflavone）是多酚的一种，是从豆科植物中分离提取的具有异黄酮类化合物典型结构的活性成分。对于其生物活性的研究表明，大豆异黄酮具有一定的抗肿瘤[5]、改善妇女更年期不适[5]、抗氧化[6]等诸多功效。大豆蛋白与大豆异黄酮天然可以结合牢固，可保护异黄酮免于热处理发生降解[7]。同时，大量研究也已经表明了激素依赖症-妇女更年期综合症、钙的流失与异黄酮关系较为密切。有的研究也表明，苷元型异黄酮与生物利用的关系更为密切[8]。大豆蛋白中异黄酮的含量依赖于不同的结合形式和品

收稿日期：2013-11-3
基金项目：国家高新技术研究发展计划（863计划）项目(2013AA102208-3)；粤港关键领域重点突破项目（2012A080107006）
作者简介：杨娟(1980-)，女，博士研究生，主要从事蛋白化学和综合利用研究
通讯作者：杨晓泉(1965-)，男，教授，主要从事蛋白化学和综合利用研究

种，用高浓度的有机溶剂难以萃取出大豆蛋白中的异黄酮，证明二者的天然存在的结合以及相互作用。

天然的大豆异黄酮大部分分布于各种豆类中，且95%左右是结合型的糖苷形式，远不能满足人类对其需求，生物可及性及生物适用性均较低。当前市场上的大豆异黄酮产品较多，且多是根据安全剂量设计的固体制剂，从溶解度的角度，大豆异黄酮游离状态下在水中较为难溶，大大限制其在饮料等制品中应用。为此，现代食品工业迫切需要研制出食品级的功能性成分输送系统，赋予异黄酮类成分在加工过程中的稳定性，克服应用中异黄酮本身溶解度较低及需同时辅助大量蛋白摄入的问题，并实现在人的胃肠环境中靶向释放[9]。本文的目的在于利用蛋白-多酚天然可以形成复合物的特性，通过比较不同 pH、不同温度、不同异黄酮类型所制备的富含大豆异黄酮的大豆蛋白的差异，找到大豆蛋白结合异黄酮制备新型功能性蛋白的适宜条件，揭示不同条件、不同类型大豆异黄酮所制备的大豆蛋白的功能性质，为功能性大豆蛋白的开发和应用提供一定理论支持。

1 材料与方法

1.1 原料

低温脱脂豆粕，山东禹王实业有限公司；纯天然大豆异黄酮（>40%），陕西禾博天然产物有限公司；β-葡萄糖苷酶（1200 U/g），日本 Amano 公司。苷元型大豆异黄酮，纯天然大豆异黄酮经 β–葡萄糖苷酶水解制备，其它试剂为分析纯或色谱纯。

1.2 主要仪器设备

Mastersize 2000 粒度分布仪，英国 Malvern 公司生产；手提式高温灭菌锅，上海三申医疗器械有限公司生产；T25 高速剪切机，德国 IKA 公司生产；Rapid N cube-杜马斯定氮仪，法国 Elementar 公司生产；2501PC-紫外-可见分光光度计，日本岛津公司生产；CR22G-型冷冻离心机，日本 HITACHI 公司生产；Leica TCS SP5 激光共聚焦显微镜，德国 Leica 公司生产。

1.3 试验方法

1.3.1 富含异黄酮大豆蛋白的制备

采用 Wang 等[10]的方法，以低温脱脂豆粕为原料，采用碱溶酸沉技术提取制备大豆分离蛋白（SPI）。纯天然大豆异黄酮配置成浓度为 40 mg/mL 的体系，再经 β-葡萄糖苷酶（1200 U/g）水解后制备成苷元型的大豆异黄酮原液。称取一定量的大豆分离蛋白，分别配制成 pH 2.0~7.0 的浓度为 2% (*m/V*)的分散液，9000 r/min 离心 30 min 后，按照每 4 mL 2% SPI 加入 0.05 mL 异黄酮的比例分别加入糖苷型大豆异黄酮及苷元型大豆异黄酮，并于常温充分混合，混合的样品于高压锅 120 ℃处理 15 min，加热后取出充分混匀后冰浴降至室温，加热的样品记为 SPIG（加入了糖苷型异黄酮）和 SPIA（加入了苷元型异黄酮），2%蛋白直接高压锅处理记为 HSPI。

1.3.2 起泡性

根据夏宁[11]等报道的方法，略有改动。量取 100 mL 1%蛋白溶液，高速分散均质机以 5000 r/min 的条件均质 2 min，快速移至 250 mL 量筒内，记录本次泡沫所占的体积并记为 V_0，依此评估该蛋白溶液起泡能力大小。将装有该蛋白溶液的量筒于 30 ℃水浴静置 30 min 后记录泡沫的残留体积 Vr。

泡沫稳定性=$(V_r/V_0)\times100\%$

1.3.3 持水性(WHC)[11]

1% (*m/V*)的蛋白溶液 5 mL 移入 10 mL 离心管（已称重），经离心（5000 g，30 min）后除去上清，称量离心管的质量，蛋白的持水能力（WHC）按照如下公式计算：

$$WHC/\%=(m_2-m_1)\times100/m$$

其中 m_1 为离心管的质量，单位 g；m_2 为去除上清液后离心管的质量，单位 g；m 为离心管中蛋白质的质量，单位 g。

1.3.4 溶解度

取不同 pH 的 1%的富含异黄酮的大豆蛋白，分散均匀后采用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 为 2.0~10.0。经过离心（9000 g，30 min）后，取上清液测定蛋白质含量。本实验中溶解度记为上清液中的总蛋白含量与样品中的总蛋白含量的比值。冻干后的 SPI、Mix、SPIG 6.4 粉末于 0~500 ℃条件下进行热重分析以比较失重及分解温度。

1.3.5 乳液的制备[11~12]

为研究中性（pH 7.0）条件下加入异黄酮前后大豆蛋白在常温及高温处理后制备的乳液的性质，取大豆分离蛋白（SPI）、热变性大豆分离蛋白（HSPI）、常温混入糖苷型和苷元型异黄酮的大豆蛋白（Mix-SPIG 和 Mix-SPIA）和热变性富含纯天然大豆异黄酮和苷元型异黄酮的蛋白（SPIG 和 SPIA），溶液相中分别加入玉米油相(最终的乳液中含有 20%（*V/V*）的玉米油和 1%的大豆蛋白。充分混合后经预均质（5000 r/min，2 min）后，进行高压微射流处理（50 MPa），向所制备的乳液中加入 0.02%（*m/V*）NaN_3 以抑制微生物的生长。

1.3.6 乳液平均粒径的测定[11]

采用 Malvern Mastersizer 2000 激光粒度仪测定乳状液滴的粒径大小。实验中采用颗粒折射率为 1.520、颗粒吸收率为 0.001 以及分散剂折射率为 1.330（水）的参数进行测定。表面平均粒径 d_{32} 与体积平均粒径 d_{43} 表征乳液粒度的大小。三次重复测定。

1.3.7 乳液的微结构[11]

取 40 μL 荧染燃料（0.02 %尼罗红和 0.1%尼罗蓝混合液）加入 1 mL 乳液样品中，充分混合后吸取样品置于带有凹槽的玻璃载玻片上，载玻片固定于载物台后再用 100×物镜粗调聚焦平面。选取 488 nm 的 Ar 离子和 633 nm 的 He/Ne 离子双通道激光模式采集图像，扫描密度设置为 1024×1024。采用 LAS AF Lite 软件对图像处理。

1.4 统计分析

数据一般为三次测定的平均值，并采用 SPSS 软件的一维方差分析的 LSD 比较样品平均值之间的差异显著性。

2 结果与讨论

2.1 蛋白的制备

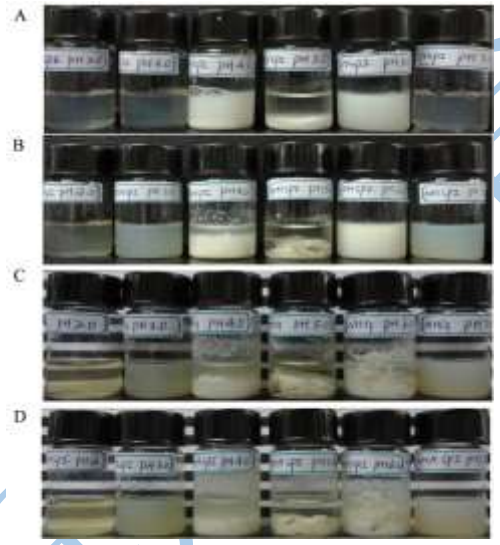


图 1 富含异黄酮的大豆蛋白的制备

Fig.1 Preparation of soy protein enriched with isoflavones

注：A 图为 2% SPI 在常温及 pH 2.0~7.0 条件下的实物图，B 图为 2% SPI 在 pH 2.0~7.0 条件下经高压锅 120 ℃加热 15 min，C 图为 2% SPI 在 pH 2.0~7.0 条件下加入纯天然大豆异黄酮经高压锅 120 ℃加热 15 min，D 图为 2% SPI 在 pH 2.0~7.0 条件下加入苷元型大豆异黄酮经高压锅 120 ℃加热 15 min。

不同 pH 条件下 SPI、HSPI 及加热制备的富含纯天然大豆异黄酮及苷元型异黄酮的大豆蛋白实物图如图 1。

2.2 溶解度

图 2 为大豆异黄酮、SPI、HSPI、富含纯天然大豆异黄酮的大豆蛋白及富含苷元型的大豆蛋白的溶解度-pH 曲线。

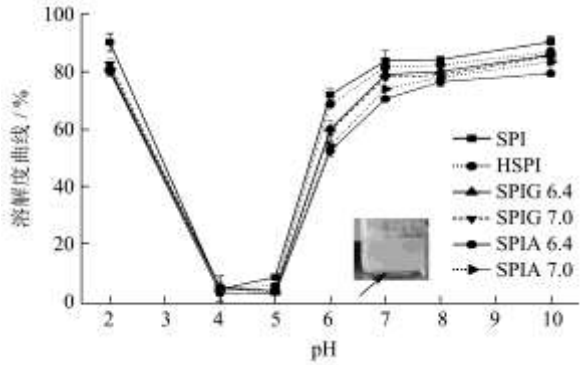


图 2 富含异黄酮大豆蛋白的溶解度-pH 曲线

Fig.2 Analysis of the solubility profiles of proteins extracted using different methods

图 2 中的实物图为大豆异黄酮在水中的溶解状态，由箭头所指可见异黄酮在水中溶解度较低。异黄酮结合蛋白后，形成的复合物具有了类似于蛋白的溶解特性。即几种蛋白在 pH 2.0~pH 10.0 的条件下，溶解度曲线都呈现马蹄形。在等电点附近即 pH 4.0~5.0 的条件下，几种蛋白的溶解度都是最低；而在高 pH 即 pH 8.0 和 pH 10.0 的条件下，溶解度呈增加趋势。几种大豆蛋白在碱性条件下溶解性良好。富含异黄酮的大豆蛋白的溶解性低于 SPI 和 HSPI，中性 pH 条件下的富含纯天然大豆异黄酮的蛋白溶解性优于富含苷元型的大豆异黄酮的溶解性。大豆蛋白加热后疏水集团暴露，在一定程度上可能增加了大豆蛋白与异黄酮的结合能力，从异黄酮的结构来看，苷元型的异黄酮为几种纯天然大豆异黄酮去糖苷基形成，即为更加疏水的异黄酮类型，从而导致加热后的蛋白聚集体中结合了更多的苷元型的异黄酮，蛋白-异黄酮复合物的形成及蛋白纯度下降可能是富含异黄酮大豆蛋白溶解度变化的原因，此机理有待进一步验证。

2.3 起泡性

SPI、HSPI 和富含异黄酮的大豆蛋白的起泡性如图 3 所示。

蛋白质的起泡能力应用食品体系中能增加产品的体积也可以起到酥松的作用[11]。大豆蛋白质分子因为具两亲性结构而在分散液中表现出较强界面活性，急速机械搅拌时大量气体混入，溶液中的蛋白质分子吸附到水-空气界面上，降低界面张力，促进界面形成。同时由于大豆蛋白部分肽链在界面上伸展开来，并通

过肽链间相互作用，形成一个二维保护网络而使界面膜得以加强，从而促进泡沫的形成与稳定[13]。从图 3a 可知，同 SPI 相比，加热后处理的几种蛋白的发泡能力都有所提高，其中 HSPI 的发泡能力为 172.01±0.66%，强于其它几种蛋白，同时，从图 3b 可知，加热后蛋白样品的泡沫稳定性相比于 SPI 有所降低，一方面异黄酮中的糖的存在可能提高粘度，可以一定程度的提高泡沫的稳定[13]，同时加热处理的过程会导致蛋白溶液粘度降低，继而排液速率加快，最终使得泡沫稳定性下降。

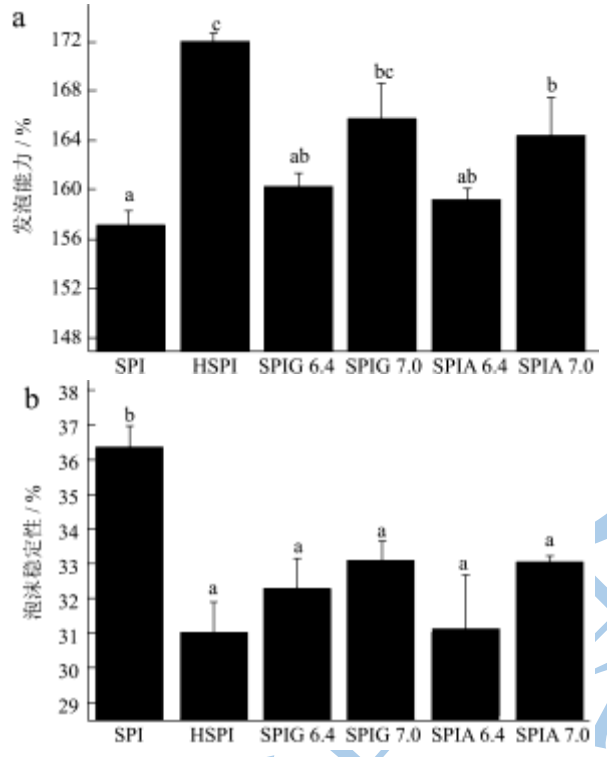


图 3 SPI、HSPI 和富含异黄酮的大豆蛋白的起泡性

Fig.3 Foaming capacity, foaming stability of SPI, HSPI and soy proteins enriched with isoflavones

2.4 持水性

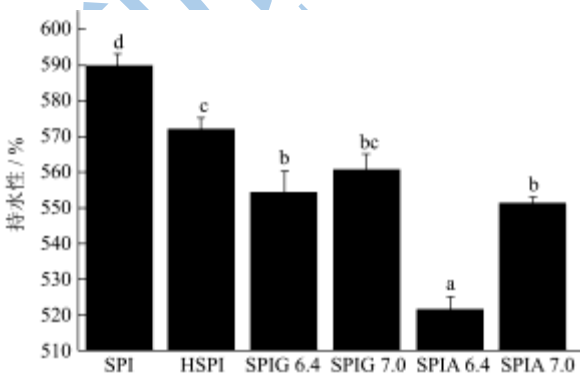


图 4 富含异黄酮大豆蛋白的持水性

Fig.4 Water holding capability of soy proteins enriched with isoflavones

富含异黄酮大豆蛋白的持水能力如图 4 所示。

蛋白质的肽链上的亲水集团与水的相互作用对于蛋白质的持水性有重要关系[11]。本研究中 SPI 的持水能力约为 590.00±3.45%，加热处理及加入异黄酮后大豆蛋白的持水能力下降，同时 pH6.4 处加热制备的富含苷元型异黄酮的大豆蛋白（SPIA6.4）的持水能力最低，即 521.56±3.67%，这可能与加热处理导致的蛋白的彻底变性和疏水集团的暴露以及苷元异黄酮的疏水能力有关。

2.5 乳化性

SPI、HSPI 及富含异黄酮大豆蛋白的乳化特性及乳液的微观结构如图 5 和图 6。

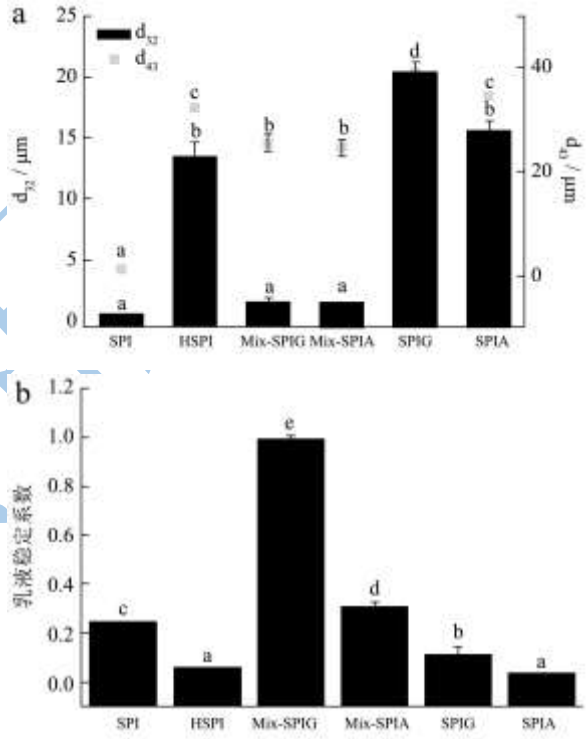


图 5 富含异黄酮大豆蛋白乳液的粒度、乳液稳定性

Fig.5 Average droplet size and stability of the emulsions

对于新鲜乳液测定的 d_{43}，SPI 的粒度为 1.35±0.12 μm，混合纯天然大豆异黄酮及苷元型异黄酮的蛋白的乳液粒度分别为 25.41±1.32 μm 和 24.57±1.73 μm。加热后的 SPI 及 SPIG、SPIA 的粒度分别为 32.14±0.21 μm、38.99±0.89 μm 和 34.50±0.48 μm。试验条件下，同天然分离蛋白和混合添加异黄酮的蛋白相比，加热法富含异黄酮的蛋白制备的乳液的粒度增大，离心处理后稳定系数有所降低，但该乳液具有更加良好的塑性，与 HSPI 呈现相似特性，可见热处理对蛋白乳液特性具有重要影响，这与文献报道的结论一致[14]。对于乳液粒度的增大，一方面可能由于高压乳化时首先促进了蛋白质聚集体在界面上的吸附，后因蛋白质聚

集体的空间位阻作用，蛋白质分子最终难以完整的覆盖油滴，油滴的再次聚结被阻止，因而加热后的聚集体都出现了较大的液滴[12]；另一方面，大豆异黄酮的加入首先形成了大豆蛋白-异黄酮复合物，加热制备后形成了粒径更大的可溶性聚集体颗粒（图 A），由于纯天然大豆异黄酮带有糖侧链，且比苷元型的异黄酮具有更大的分子量，因而形成了几种乳液的粒度差异。

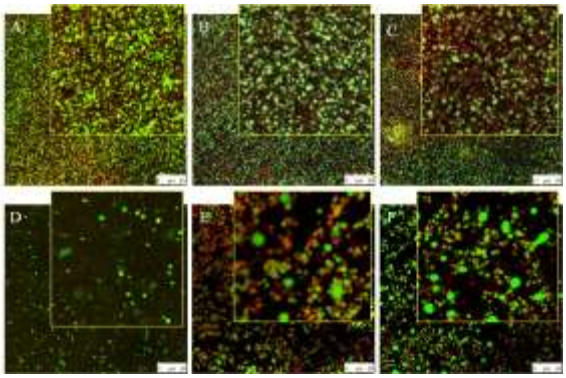


图 6 几种大豆蛋白的 CLSM 图像

Fig.6 CLSM images of the emulsions formed by soy protein samples

图中 A-F 分别为 SPI、Mix-SPIG、Mix-SPIA、HSPI、SPIG 和 SPIA 形成的乳液。由图可知，染色后的乳液的微结构可通过激光共聚焦显微镜观察。经过加热处理后的蛋白（包括加入异黄酮的）都出现了相对较大粒度的油滴，直接混合未加入异黄酮的大豆蛋白乳液比加入异黄酮加热处理的蛋白的油滴较小（图 6），该结论与粒度测定的结果相一致。

3 结论

本文以 SPI 与大豆异黄酮为原料，制备了不同 pH、不同温度、不同大豆异黄酮类型等条件下的富含异黄酮的大豆蛋白，并考察了各种蛋白的功能性。研究表明，优化的 pH 条件制备的蛋白可以实现对难溶性的大豆异黄酮的增溶，加热处理对于所制备的蛋白的功能性具有重要的作用。富含异黄酮的大豆蛋白具有相对良好的起泡性、泡沫稳定性、持水性及溶解性，富含纯天然大豆异黄酮的大豆蛋白的持水性、发泡能力、溶解性略优于同原料制备的富含苷元型异黄酮的大豆蛋白。同 SPI 及混合了异黄酮的大豆蛋白相比，加热后蛋白所制备的乳液粒度增大、离心后乳液稳定系数降低，但相对于天然大豆蛋白，加热后的蛋白制备的乳液具有更加良好的塑性。该蛋白的制备对大豆异黄酮的增溶及富含异黄酮的功能性饮料的研究提供一定基础。

参考文献

[1] Jenkins D J A, Mirrahimi A, Srichaikul K, et al. Soy protein reduces serum cholesterol by both intrinsic and food displacement mechanisms [J]. The Journal of Nutrition, 2010, 140(12): 2302S-2311S

[2] Potter S M, Baum J A, Teng H, et al. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women [J]. The American Journal of Clinical nutrition, 1998, 68(6): 1375S-1379S

[3] Xiao C W, Wood C M, Weber D, et al. Dietary supplementation with soy isoflavones or replacement with soy proteins prevents hepatic lipid droplet accumulation and alters expression of genes involved in lipid metabolism in rats [J]. Genes & Nutrition, 2014, 9(1): 1-12

[4] Nestel P J, Yamashita T, Sasahara T, et al. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1997, 17(12): 3392-3398

[5] 袁根良,蒋丽,殷光玲,等.大豆异黄酮复合胶囊的毒理学安全评价[J].现代食品科技,2013,29(2):388-392
YUAN Gen-liang, JIANG Li, YIN Guang-ling, et al. The toxicological assessment on safety of compound capsule of soy isoflavone [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(2): 388-392

[6] 卢义伯,潘超.大豆功能因子的研究进展[J].现代食品科技,2007,23(2):105-108
LU Yi-bo, PAN Chao. Research progress of soybean functional factors [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(2): 105-108

[7] Malaypally S P, Ismail B. Effect of protein content and denaturation on the extractability and stability of isoflavones in different soy systems [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(16): 8958-8965

[8] Németh K, Plumb G W, Berrin J G, et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans [J]. European Journal of Nutrition, 2003, 42(1): 29-42

[9] 杨晓泉,尹寿伟,王金梅,等.蛋白质微胶的制备、形成机制及应用[J].中国食品学报,2012,12(4):1-7
YANG Xiao-quan, YIN Shou-wei, WANG Jin-mei, et al. Preparation, characterization and application of protein microgels [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(4): 1-7

[10] Wang J M, Xia N, Yang X Q, et al. Adsorption and dilatational rheology of heat-treated soy protein at the

oil-water interface: Relationship to structural properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(12): 3302-3310

[11] 夏宁.喷射蒸煮制备米糠、碎米蛋白及其功能性研究[D].广州:华南理工大学,2012

XIA Ning. Preparation and function of protein from rice bran and broken rice using hydrothermal cooking [D]. Guang Zhou: South China University of Technology, 2012

[12] Guilmineau F, Kulozik U. Impact of a thermal treatment on the emulsifying properties of egg yolk. Part 2: Effect of the environmental conditions [J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20: 1114-1123

[13] 黄友如,华欲飞,裘爱泳.大豆分离蛋白功能性质及其影响因素[J].粮食与油脂,2003,5(5):12-15

HUANG You-ru, HUA Yu-fei, QIN Ai-yong. Functional properties of soy protein isolate and affecting factors [J]. Cereals & Oils.2003, 5(5): 12-15

[14] Tang C H, Liu F. Cold, gel-like soy protein emulsions by microfluidization: Emulsion characteristics, rheological and microstructural properties, and gelling mechanism [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(1): 61-72

现代食品科技