基于电导率快速测定豆类细胞破壁率方法的研究

党通州，罗剑飞，林炜铁

（华南理工大学生物科学与生物工程学院，广东广州 510006）

摘要：为了建立一种通过电导率，能够快速准确检测豆类细胞破壁率的方法。通过测定不同处理程度的四种豆子的蛋白含量、电导率，考察了四种豆子水溶性蛋白释放量与电导率之间的关系。研究了豆浆用量、外渗时间、测定温度对破壁率的影响。利用建立的评价方法，分别测定了四种常见豆子在破壁料理机豆浆程序下的破壁率。结果表明：四种豆子破壁过程中水溶性蛋白的释放量与电导率相关性较高（R^2≥0.8995），豆浆用量和外渗时间对于破壁率的测定结果影响不显著（p>0.05），测定温度对于破壁率的影响非常显著（p<0.01），测定温度在 25 ℃左右时破壁率的测定结果较为稳定。四种豆子在新型破壁料理机豆浆程序下的破壁率达到 90%左右。结论，利用电导率快速评价豆类细胞破壁率的方法，具有一定的可行性。

关键字：电导率；水溶性蛋白；破壁率；豆浆

文章篇号：1673-9078(2018)02-129-133 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.2.021

Rapid Determination of Wall-broken Rate of Beans Cells Based on Conductivity

DANG Tong-zhou, LUO Jian-fei, LIN Wei-tie

(School of Bioscience and Bioenginineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: A method for rapid and accurate determination of wall-broken rate of beans cells by conductivity was established in this study. The relationship between water-soluble proteins of four kinds of beans and conductivity was investigated by measuring the protein content and conductivity of four kinds of beans with different degrees of treatment, and the effects of soymilk dosage, extravasation time and measure temperature on the wall-broken rate were also studied. The wall-broken rate of four common beans under the soymilk program of high speed blender was determined by using the established evaluation method. Results suggested that the correlation between the concentration of water-soluble proteins in the four common beans and the conductivity was significant (R^2≥0.8995), and the soymilk dosage and extravasation time had no significant influence on the determination of wall-broken rate (p>0.05). The effect of measure temperature on wall-broken rate was very significant (p<0.01), and the wall-broken rate was relatively stable at 25℃. The wall-broken rate of four common beans reached about 90% by using the new high speed blender. Consequently, it was feasible to quickly evaluate the wall-broken rate of beans cells by conductivity.

Key words: conductivity; water-soluble protein; wall-broken rate; soymilk

植物细胞壁结构与成分具有高度的复杂性和多样性[1]，具有一定的硬度和弹性，细胞壁的存在抑制了细胞内营养物质的释放。研究表明，经破壁后的灵芝孢子粉，其多糖、有机酸和三萜类等成分含量极为丰富，药用价值较实体灵芝高 75 倍[2]。植物细胞的破壁率是指植物细胞的破碎程度，与有效成分的释放直接相关。有关破壁率的研究报道并不多，主要集中于中医药的研究，检测方法是借助显微镜观察特征细胞数来衡量破壁率。浙江中医药大学的石森林利用显微观察的方法测定了六味地黄丸的破壁率，并研究了破壁率与粒径、有效成分溶出度的相关性关系[3]。陕西中医药大学的宋忠兴、赵鹏等人，利用该方法分别测定了丹参、黄芩、苦参和秦艽 4 种常用中药微细粉体的细胞破壁率[4]。该方法需要在显微镜下人工目测记录不同视野的特征细胞数目，工作量大且容易受到操作熟练程度及计数时段的影响，重复性较差。另外由于豆类的特征细胞不明显，目前对于豆类的破壁率研究较少。

生活中，豆浆是一种很受欢迎的早餐饮品。豆浆的蛋白质含量较高，且含有多种矿物质元素及多种人体必需的微量元素，营养丰富[5]，人体的吸收率较高[6]。传统豆浆的制作工艺比较复杂，为缩短时间，豆浆机，破壁料理机的出现，但是使用料理机制作的豆浆，其

收稿日期：2017-08-30

基金项目：智能健康家电工程技术开发研究（x2cl-D8163060）

作者简介：党通州（1991-），男，在读硕士，主要从事食品检测方面的研究

通讯作者：林炜铁（1964-），男，教授，博士生导师，主要从事微生物生态学、发酵工程等的研究

营养品质未知。豆浆的营养品质与破壁率成正相关，检测破壁率可以间接衡量豆浆的品质。破壁率一般检测方法采用显微观察特征细胞的方法，工作量大，重复性差，另一方面，由于豆类细胞的特征细胞不明显，不易寻找。蛋白作为豆类的主要营养成分，但以蛋白衡量破壁率存在试剂的消耗且耗时。

电导率是指溶液的导电能力，电导率越大则导电性能越强。相关研究表明，电导率与植物有效成分提取之间存在一定的相关性，采用电导率可以快速、准确的指示植物有效成分的提取规律和提取终点[7,8]。豆类细胞破壁后，细胞内部的物质释放出来，在水溶液中具有一定的导电性，破壁率越高电导率就越高。本文通过研究豆子在破碎过程中，其水溶性蛋白释放量与其电导率之间的关系，从而建立一种以电导率为指标快速评价破壁率的方法，并利用该方法测定了四种豆子在破壁料理机豆浆程序下制备豆浆的破壁率。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

四种豆子（大豆、黑豆、绿豆和红豆），购自沃尔玛超市，参照 GB/T 5497-1985 测定四种豆子的水分含量[9]，分别为 7.00±1.00%、7.33±0.58%、5.67±0.57%和 10.33±1.15%；参照 GB 50095-2010 测定四种豆子的粗蛋白含量[10]，分别为 31.12±0.43%、32.91±0.34%、20.60±0.40%和 18.29±0.27%。

考马斯亮蓝 G-250、乙醇、磷酸等均为分析纯；蒸馏水（电导率≤3 μs/cm），购自屈臣氏；牛血清白蛋白（BSA）标准品购自上海生工。

AUX-PB956 破壁料理机：佛山市海迅有限公司提供；UV-2802SH 型紫外可见分光光度计：尤尼柯（上海）仪器有限公司；Orion Star A215 台式电导率/pH 测量仪：美国奥利龙公司。

1.2 实验方法

1.2.1 豆浆的制备

（1）豆浆的制备：精密称取四种干豆子 50 g，以 1:12 的比例加入 600 g 水，利用破壁料理机 9 档分别处理 10 s、20 s、30 s、40 s、50 s、60 s、70 s、80 s、90 s、100 s、110 s 和 120 s 制备豆浆；精密称取四种干豆子 50 g，以 1:12 的比例加入 600 g 水，利用破壁料理机的豆浆程序制备四种豆浆。

（2）完全破壁豆浆的制备：破壁料理机豆浆程序制备好的豆浆，利用料理机 9 档处理 2 min 后；在-80 ℃冷冻 20 min，然后 40 ℃水浴 15 min，如此操作重复 3 次；超声（功率为 150 W，频率为 25 kHz，间歇 2 s）破壁处理 20 min；使用研钵进行研磨 10 min。此方法制作的豆浆作为一种完全破壁的豆浆溶液。

1.2.2 电导率的测定

精密移取一定体积的豆浆，用恒温的蒸馏水定容至 80 mL，搅拌均匀，然后使用电导率/pH 测量仪测定溶液电导率。

1.2.3 水溶性蛋白的测定

取 2 g 豆浆，用蒸馏水稀释至一定倍数后，3000 r/min 离心 5 min 后取上清，采用考马斯亮蓝法[11]测定豆浆中的水溶性蛋白含量，以牛血清白蛋白（BSA）为标准品，蒸馏水为空白对照，于 595 nm 波长处测定吸光度。以牛血清白蛋白质量浓度（μg/mL）为横坐标，吸光度值 $OD_{595\ nm}$ 为纵坐标，绘制标准曲线，得线性回归方程：y=0.003x-0.006（R^2=0.9950）。

1.2.4 破壁率测定的影响因素

利用电导率测定待测豆浆和完全破壁豆浆水溶液的电导率，计算破壁率。即破壁率为待测豆浆水溶液的电导率与相同体积的完全破壁豆浆水溶液的电导率之比。

$$破壁率(\%)=\frac{待测豆浆电导率}{完全破壁豆浆电导率}\times 100\%$$

1.2.4.1 豆浆用量对破壁率测定的影响

分别移取 2 mL、4 mL、6 mL、8 mL、10 mL、12 mL、14 mL 和 16 mL 的豆浆样品和完全破壁的豆浆样品，均用蒸馏水定容 80 mL 后，搅拌均匀常温下测定电导率，计算破壁率。

1.2.4.2 外渗时间对破壁率测定的影响

豆浆样品和完全破壁豆浆样品利用蒸馏水定容至 80 mL 后，搅拌均匀后，分别静置 0 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min 和 30 min 后，常温下测定电导率，计算破壁率。

1.2.4.3 测定温度对破壁率测定的影响

豆浆和完全破壁豆浆利用蒸馏水定容至 80 mL 后，分别在不同温度（20 ℃、25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃和 45 ℃）水浴锅中水浴 10 min，然后测定电导率，计算破壁率。

1.3 数据处理

数据初步整理使用 Excel 2017（Microsoft Corporation），以 SPASS 22.0（IBMCo.Ltd）软件进行相关性分析，并利用 OriginPro 8.5 对数据进行整理作图。

2 结果与分析

2.1 电导率与水溶性蛋白的相关性

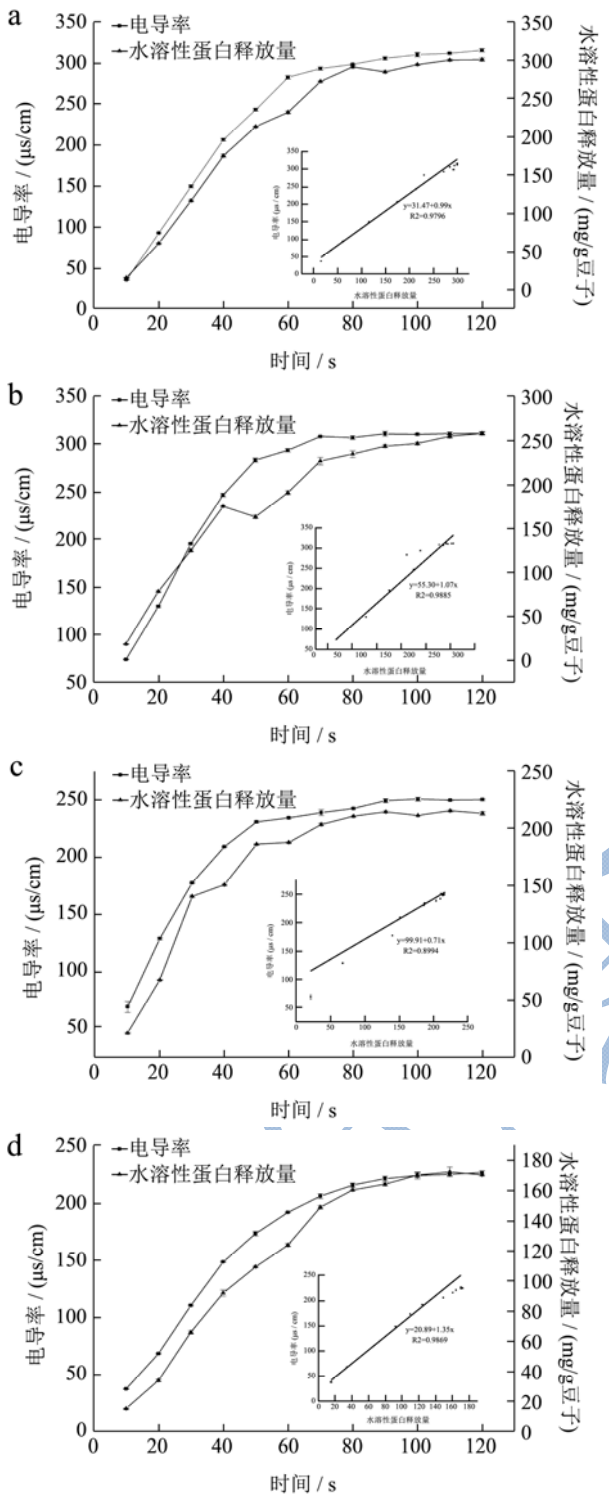


图 1 大豆（a）、黑豆（b）、绿豆（c）和红豆（d）的水溶性蛋白、电导率-时间曲线图

Fig.1 Water-soluble proteins and conductivity-time curves of soybeans (a), black beans (b), mung beans (c) and red beans (d)

普通细胞在破碎的过程中，细胞内部物质释放出来，包括营养成分蛋白质、脂质和核酸等，也有一些小分子的离子物质，如钠、钾离子，胞内物质的释放使得在水溶液中具有一定的导电性。对于常见豆子，其有效成分为植物蛋白。本实验研究了四种豆子在破壁料理机 9 档 0~120 s 的处理过程中，豆子中水溶性蛋白释放量和豆浆的电导率之间的关系。豆浆电导的测定移取 6 mL 待测豆浆进行测定。结果见图 1。

由图 1 可以看出，四种豆子在破壁料理机处理过程中，其水溶性蛋白释放量和电导率呈现出相同的变化趋势。在 0~80 s，水溶性蛋白释放量和电导率均呈上升趋势；80 s 后，基本维持不变。利用 SPASS 22.0 软件的 Pearson 相关性分析进行双尾检验，120 s 内四种不同豆子的水溶性蛋白释放量和电导率的相关性较高（p<0.01），大豆、黑豆、绿豆和红豆的相关性系数分别为 0.9796、0.9885、0.8994 和 0.9869。研究结果表明，四种豆子的水溶性蛋白释放量与电导率的相关性较高，可以利用电导率间接反映水溶性蛋白的释放量。因此可以建立一种以电导率为指标快速评价豆类细胞破壁率的方法。

2.2 破壁率测定的稳定性分析

破壁率测定的方法是分别测定待测豆浆和完全破壁豆浆的电导率，考虑植物细胞电导率测定的影响因素。对于经破壁料理机处理的植物细胞，影响植物细胞内物质释放的因素有外渗透压、测定温度、破碎程度和外渗时间[12]等。破碎程度即是破壁率，检测的对象。不同的豆浆用量，有着不同的渗透压。溶液的渗透压越低，温度越高，外渗时间越长，会促进完整细胞胞内小分子物质的释放，从而使得破壁率测定结果偏大。以大豆豆浆为例，主要从豆浆用量、外渗时间和测定温度等三方面考虑对破壁率的影响。

2.2.1 豆浆用量对破壁率测定的影响

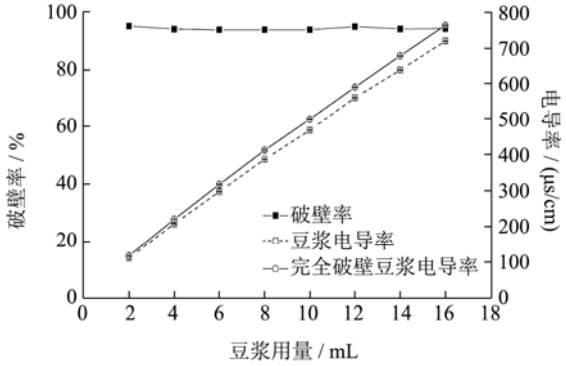


图 2 不同豆浆用量的电导率、破壁率变化

Fig.2 Changes in the conductivity and the wall-broken rate of different soymilk dosage

不同的豆浆用量的溶液，有着不同的渗透压。分别移取 2 mL、4 mL、6 mL、8 mL、10 mL、12 mL、14 mL、16 mL 的豆浆样品和完全破壁的豆浆样品，

均用蒸馏水定容 80 mL，搅拌均匀，常温下测定其电导率值，计算破壁率。结果见图 2。

由图 2 可知，豆浆和完全破壁豆浆的电导率随着豆浆用量的增加而不断升高，且完全破壁豆浆的电导率始终稍大于豆浆的电导率，而破壁率的值保持稳定。利用 SPASS 22.0 软件的 Duncan 对破壁率和豆浆用量进行显著性分析，豆浆用量对破壁率的影响不显著（p>0.05）。

结果表明，建立的利用电导率测定破壁率的方法，待测豆浆样品和完全破壁豆浆样品的移取量相同，则其破壁率的测定结果稳定，说明该方法具有一定的适用性。如制作豆浆选取的料液比不同、豆浆稀释倍数不同，均不影响破壁率的测定结果。

2.2.2 外渗时间对破壁率测定的影响

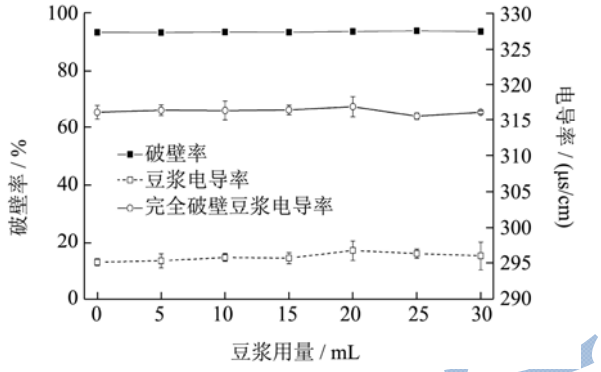


图 3 不同外渗时间的电导率、破壁率变化

Fig.3 Changes in the conductivity and the wall-broken rate of different extravasation time

在低渗透压的溶液中，外渗时间越长，促进了完整细胞内部小分子物质的释放，使得破壁率的测定值偏大。移取 6 mL 的豆浆和完全破壁豆浆，蒸馏水稀释定容至 80 mL，搅拌均匀后，静置 0 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min 和 30 min 后测定电导率，计算破壁率。其结果见图 3。

由图 3 可知，豆浆和完全破壁豆浆，以及破壁率在不同的外渗时间下（0~30 min），其变化较为稳定。利用 SPASS 22.0 软件的 Duncan 对破壁率、电导率和外渗时间进行显著性分析，外渗时间对豆浆和完全破壁豆浆的电导率的影响不显著（p>0.05），外渗时间对破壁率的影响不显著（p>0.05）。外渗时间对于两种豆浆电导率的影响不显著，很有可能是因为豆类细胞与普通植物细胞的不同。结果表明，建立的利用电导率测定破壁率的方法，在 30 min 内外渗时间对于电导率、破壁率的测定结果没有影响，说明该方法在一定程度上的可行性。

2.2.3 测定温度对破壁率测定的影响

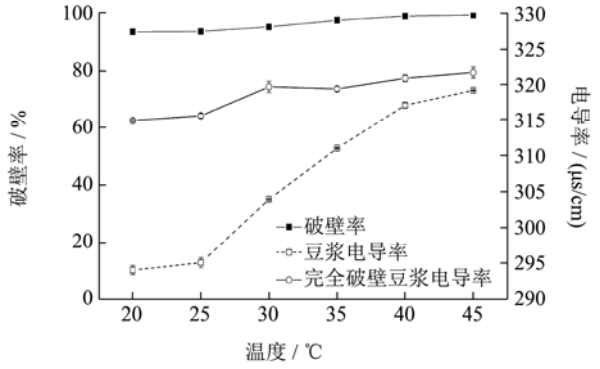


图 4 不同测定温度的电导率、破壁率变化

Fig.4 Changes in the conductivity and the wall-broken rate of different temperature

温度对于电导率的测定有影响，有研究表明，温度越高电导率越大。温度对于完整细胞内部物质的释放有促进作用，温度越高，细胞内部的小分子物质释放越多，使得电导率增大。移取 6 mL 的豆浆和完全破壁豆浆，蒸馏水稀释定容至 80 mL 后，在不同温度（25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃和 45 ℃）水浴锅中水浴 10 min 后，测定电导率并计算破壁率。其结果见图 4。

由图 4 可知，豆浆和完全破壁豆浆的电导率，以及破壁率都随温度的增大而不断增大。而完全破壁豆浆的电导率的变化更为平缓，说明完全破壁豆浆的破壁率基本为 100%。而豆浆样品的电导率随温度增大而变大的原因，很有可能使在高温下，完整细胞内部的小分子物质释放到溶液中，使得溶液的电导率增大。利用 SPASS 22.0 软件的 Duncan 对破壁率和温度进行显著性分析，温度对破壁率的影响非常显著（p<0.01）。温度在 20 ℃~25 ℃之间时，其破壁率测定更为稳定。结果表明，温度使得破壁率的测定结果偏大。建立的利用电导率测定破壁率的方法，在测定温度为 20 ℃~25 ℃时，测定结果稳定。所以利用常温蒸馏水在室温环境中进行实验测定，无需对溶液进行水浴加热处理。

建立的利用电导率快速测定豆类细胞破壁率的方法，通过研究三种不同因素对于破壁率的影响，发现豆浆用量、外渗时间对于破壁率的测定没有影响，温度对于破壁率的测定有影响，但常温 25 ℃左右，其测定结果相对稳定。所以建立的方法较为稳定，测定范围较广，具有一定的广泛适用性。

2.3 破壁料理机豆浆程序制备豆浆的破壁率

采用 2.1 建立的以电导率为指标快速测定豆类细胞破壁率的方法，测定四种豆子在破壁料理机的豆浆程序下制备的豆浆的破壁率，结果见图 5。从而可以在一定程度评估使用破壁料理机制作豆浆的品质。

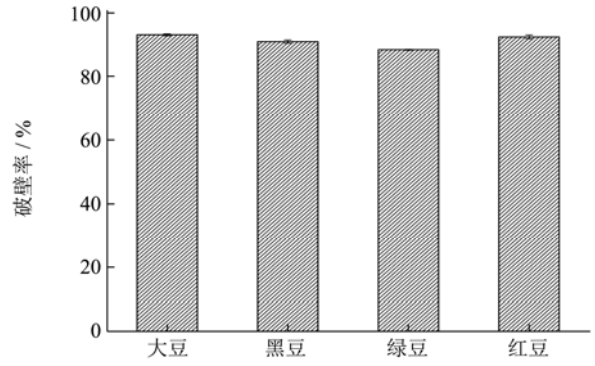


图 5 四种豆子在豆浆程序下的破壁率（n=5）

Fig.5 The wall-broken rate of four common beans by soymilk program (n=5)

由图 5 可以看出，四种豆子(大豆、黑豆、绿豆和红豆)在破壁料理机的豆浆程序下的破壁率分别为 93.24±0.34% 、 91.06±0.51% 、 88.53±0.14% 和 92.54±0.64%，其破壁率较高，说明营养的释放越充分。但四种豆子的破壁率有一定差异，可能是由于不同豆子的硬度、水分含量等不同造成的。结果表明，市场上破壁料理机采用干法制作豆浆时，其豆浆程序对于常见豆类的破壁率较高达到 90%左右，且制作过程更加简便，符合了现代人的生活要求。另外，测定结果也验证了以电导率测定豆类细胞破壁率的稳定性。

3 结论

3.1 本试验研究了四种豆子在料理机处理过程中，水溶性蛋白释放量与电导率之间的关系，发现其相关性较高（R^2≥0.8995），从而建立了一种以电导率快速评价豆类细胞破壁率的方法。豆浆用量、外渗时间、常温测定对于破壁率没有影响，电导率测定豆类细胞破壁率的方法具有较高的稳定性，误差在 1%以内。可以快速、简便、准确的测定豆类细胞在制浆过程中的破壁率，在一定程度上具有广泛的适用性。

3.2 新型破壁料理机采用干法制作豆浆时，其更加方便快捷，对于常见豆类的破壁率较高，达到 90%左右。

参考文献

[1] Paredez A R, Somerville C R, Ehrhardt D W. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules [J]. Science, 2006, 312: 1491-1495

[2] 赵洁胜,魏联,虞燕萍,等.灵芝孢子粉破壁率的检验方法研究进展[J].中国医药指南,2013,5:431-434
ZHAO Jie-sheng, WEI Lian, YU Yan-ping, et al. Research progress on the test method of Reishi mushroom powder broken rate [J]. Guide of China Medicine, 2013, 5: 431-434

[3] 叶英响,冯超,翁夏蒙,等.六味地黄丸粉体粒径与其破壁率和溶出度的相关性研究[J].中草药,2016,47(12):2108-2112
YE Ying-xiang, FENG Chao, WENG Xia-meng, et al. Correlation of power particle size, cell wall-breaking rate and in vitro dissolution rate of Liuwei Dihuang Pill [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(12): 2108-2112

[4] 宋忠兴,赵鹏,唐志书,等.4 种中药微细粉体显微特征及细胞破壁率的测定[J].中国现代中药,2017,19(2):246-249
SONG Zhong-xing, ZHAO Peng, TANG Zhi-shu, et al. Study on microscopic feature and wall-broken rate of four kinds of traditional chinese medicine micro-fine powders [J]. Modern Chinese Medicine, 2017, 19(2): 246-249

[5] 林旭东,潘巨忠,凌建刚.豆浆的保健功能及研究进展[J].现代农业科技,2007,24:146-146
LIN Xu-dong, PAN Ju-zhong, LING Jian-gang, et al. The health functions and research progress of soymilk [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2007, 24: 146-146

[6] 薛伟明,张效林,刘袖洞,等.电导率测定法在植物有效成分提取过程中的应用研究[J].现代化工,1998,8:21-24
XUE Wei-ming, ZHANG Xiao-lin, LIU Xiu-dong, et al. Application of specific conductance method in the extraction of effective components from plants [J]. Modern Chemical Industry, 1998, 8: 21-24

[7] 孙冬梅,陈卉,王洛临,等.电导率测定法在中药有效成分提取过程中的应用研究[J].中成药,2015, 37(12):2686-2690.
SUN Dong-mei, CHEN hui, WANG Luo-lin, et al. Application of specific conductance method in the extraction of effective constituents from traditional Chinese medicines [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2015, 37(12): 2686-2690

[8] GB/T 5497-1985, 粮食、油料检验 水分测定法[S]

[9] GB/T 5497-1985, Inspection of grain and oilseeds Methods for determination of moisture content[S]

[10] GB 50095-2010, 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S]
GB 50095-2010, National food safety standard Determination of protein in foods[S]

[11] 王孝平,邢树礼.考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J].天津化工,2009, 23(3):40-42
WANG Xiao-ping, XING Shu-li. Determination of protein guanitation using the method of coomassie brilliant blue [J]. Tianjin Chemical Industry, 2009, 23(3):40-42

[12] 林国辉,林丽云.浅议电导测量的影响因素[J].计量与测试技术,2014,41(7):37-38
LIN Guo-hui, LIN Li-yun. Discussion on factors influencing

the conductance measurement [J]. Metrology & Measurement Technique, 2014, 41(7): 37-38

现代食品科技