

冷冻处理对大豆油体微观结构及理化特性的影响

王丽丽, 李再贵

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 本研究冷冻处理对大豆油体微观结构及基本物理化学性质的影响, 为大豆油体作为功能性食品原料在食品工业中的应用提供一定的参考。通过透射电镜观察冷冻前后大豆子叶细胞中油体形态的变化, 发现冷冻处理导致了较大粒径的油体聚集体出现。采用超高速离心的方法提取豆浆中的油体, 将油体的分散液进行光学显微镜观察、粒径分布试验和电泳分析。结果显示, 未处理组油体的粒径最小 (0.54 μm), 而冷冻后大多数油体的粒径范围为2~4 μm , 且超过4 μm 的油体数量随冷冻时间的延长而增加。电泳图像显示冷冻后分子量为24 kDa的oleosin含量减少。油体在不同pH值 (pH值2~8)、NaCl浓度 (0~250 mM) 条件下的Zeta电位和疏水性进行测定。结果表明, 冷冻处理能够轻微地降低油体的等电点, 增加油体表面的疏水性。

关键词: 冷冻; 大豆; 油体; 结构; 特性

文章编号: 1673-9078(2014)9-173-178

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.029

Effect of Freeze-processing on the Microstructure and Physicochemical Properties of Soybean Oil

WANG Li-li, LI Zai-gui

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In this study, the effect of freeze-processing on the microscopic structure and physicochemical properties of soybean oil was evaluated. This study provided a reference for the application of soybean oil as raw material for functional food. Morphological changes in soybean oil particles within cotyledons of soybeans before and after freeze-processing were examined using a transmission electron microscope. Large-diameter oil body was found to be aggregated during freezing. Oil was extracted from soymilk by performing ultra-high-speed centrifugation. Oil body dispersion was visualized by light microscopy and measured by particle size distribution and SDS-PAGE. The results suggested that the smallest diameter of oil body was that of unprocessed oil (0.54 μm), most diameters of freeze-processed oil ranged from 2 to 4 μm , while the number of oil body with a diameter >4 μm increased with increasing freeze duration. Electrophoretic results showed that the amount of oleosin, with a molecular weight of 24 kDa, decreased after freeze-processing. The Zeta-potential and hydrophobicity of oil body at different pH values (pH 2~8) and NaCl concentrations (0~250 mM) were measured. The results indicated that freeze-processing could slightly decrease the isoelectric point (pI) and increase the hydrophobicity at the surface of the oil body.

Key words: freezing; soybean; oil body; structure; properties

大豆是世界上最重要的油料作物之一, 不仅能为人们提供优质的植物蛋白和植物油, 而且是加工豆浆、豆腐等传统豆类食品的原料^[1]。大豆种子中的主要贮藏物质包括蛋白质、脂肪和碳水化合物。脂类是种子中重要的能量储存形式。几乎所有植物中的脂类物质都以三酰甘油酯 (triacylglycerols, TAG) 的形式贮藏在被称为油体 (oil body) 的亚细胞器中。一般油体呈球

形或椭球形, 直径约0.5~2 μm , 离散地分布在植物的子叶、胚乳等组织中, 为种子的萌发和植株的早期生长提供能量。根据Tzen等人提出的油体模型可知, 油体的内部是TAG的液态基质, 外部被磷脂单分子层及镶嵌的构造蛋白所组成的半单位膜包围。这些构造蛋白包括油体膜蛋白 (oleosin) 及微量的油体钙蛋白 (caleosin) 和油体固醇蛋白 (steroleosin) ^[2~3]。研究表明这些植物特有的构造蛋白对维持油体的稳定和控制油体大小有着极为重要的作用, 使油体无论在细胞中还是在游离状态下均很稳定, 不会由于干燥或者挤压而发生融合或聚合^[4~6]。基于这种天然的稳定性, 油体可用来提高食品原料的稳定性而比乳化剂更加经济、健康。此外, 油体还可以作为疏水性的保健产品、

收稿日期: 2014-04-17

基金项目: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-08-D-3)

作者简介: 王丽丽 (1983-), 女, 博士研究生, 研究方向: 粮食、油脂及植物蛋白工程

通讯作者: 李再贵 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 现代谷物加工理论与技术

香料物质及医药成分的载体被广泛应用。

冷冻是食品工业中最常用的保藏手段,很多食品在储存和应用过程中都要经历某种程度的冷冻处理。此外,冷冻也是改变物料质构的一种方法,我们之前的研究表明,用冷冻处理的大豆加工豆浆,其固形物提取效率及营养成分都显著提高^[7]。但是,关于冷冻处理对油体结构和理化性质的影响还未见报道。因此,本试验提取冷冻处理后的大豆油体,并对大豆油体的微观结构和在一定的外部环境下(不同pH值、NaCl浓度)的理化性质进行研究,为大豆油体作为功能性的食品原料在食品工业中的应用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

大豆:中黄30(蛋白质39%,脂肪17%,水分14%)收获于2012年,购于中国农业科学院,4℃下贮存直至使用;考马斯亮蓝G-250、甘氨酸、1-anilinothalene-8-sulfonic acid(ANS),Sigma公司;低分子量蛋白质marker,上海生化所;丙烯酰胺、双丙烯酰胺、过硫酸铵、甘油、SDS等,北京化学试剂公司;TEMED,Fluka;Tris Base, Promega corporation。

1.2 主要仪器设备

DHG-H9070A 电热恒温鼓风干燥箱,上海一恒科技有限公司;JEOL 1200 EX 透射电镜,日本电子株式会社;JYZ-C515 料理机,九阳股份有限公司;HITACHI_CP100WX 超高速离心机,日本日立公司;LS230 粒度分布仪,美国贝克曼-库尔特公司;DYY-III8B 稳压稳流定时电泳仪,北京六一仪器厂;NANO ZS90 电位分析仪,英国马尔文公司;RF-5300PC 荧光分光光计,日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 冷冻大豆的处理

选择粒径均匀、饱满、无破皮、无机械损伤的大豆,准确称取大豆样品100 g,置于恒温箱中,4℃浸泡10 h。浸泡后的样品用纱布擦干表面的水分后放入冰箱冷冻室分别冷冻1 d、2 d和4 d。将不同冷冻处理的大豆平铺在纱布上置于烘箱中,在45℃下进行热风干燥,每隔约1 h取出,称其质量,直至干燥到100 g±0.1 g。将干燥后的大豆置于干燥器中冷却至室温。

1.3.2 豆浆的制作

分别称取20 g大豆或冷冻大豆,倒入料理机内,加水至豆与水共200 g,打浆2 min,过100目滤网,得到

生豆浆。

1.3.3 油体的提取

根据Chen和Ono报道的方法^[8],取10 mL生豆浆倒入离心管中,156,000×g离心30 min。取上层的悬浮部分,用去离子水小心地清洗三次,最后加入10 mL去离子水并用磁力搅拌器均匀分散。

1.3.4 显微结构分析

1.3.4.1 透射电镜

取干豆及冷冻后的大豆子叶切成2×2 mm左右的组织块放入2.5%戊二醛固定液中固定6 h。用0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.2)漂洗4~6次,用1%锇酸在4℃固定1 h,磷酸缓冲液漂洗多次,乙醇逐级脱水。将组织块包埋入石蜡,切片,柠檬酸铅染色,JEOL 1200 EX透射电镜下观察。

1.3.4.2 光学显微镜

在光学显微镜的载玻片上滴入一滴油体分散液,小心盖上盖玻片,避免气泡,将载玻片放到载物台上,用压片夹压住,用400×的油镜观察并拍照。

1.3.5 油体粒径分布的测定

利用粒子分布仪分析样品粒径分布,测量范围0.04~2000 μm。把样品加入样品台后,当模糊度稳定在40~50%时开始测定。以水为溶剂,折射率为1.333。采用Beckman Coulter LS Version 3.29分析软件计算不同粒径油体的体积百分比。

1.3.6 SDS-PAGE电泳

根据 Laemmli^[9]报道的方法,分离胶浓度为12.5%,浓缩胶浓度为5%。大豆油体样品溶于SDS-PAGE样品缓冲液(0.25 mol/L Tris-HCl缓冲液,含1%(m/V)SDS、2%(V/V)巯基乙醇、1%(V/V)甘油和0.025%(m/V)溴酚蓝),电泳前煮沸5 min。上样量为15 μL,凝胶电泳在恒流模式下进行,在浓缩胶中电流15 mA,进入分离胶后增至40 mA。凝胶染色采用0.25%考马斯亮蓝(R250)溶液,蒸馏水脱色,富士S2600相机拍摄电泳凝胶图像。

1.3.7 不同 pH 和氯化钠浓度对油体分散液的影响

用已知pH值(pH 2~8)和NaCl浓度(0~250 Mm)的Tris-HCl缓冲液将油体分散液稀释到浓度约为0.05%(m/V)。常温放置24 h后测定其 Zeta 电位,测定时的温度为25℃,每个样品平行测定三次。

1.3.8 油体表面疏水性的测定

疏水性试验采用1-anilinothalene-8-sulfonic acid(ANS)荧光探针法^[8]。将1 mL待测油体分散液用0.1 M磷酸缓冲液(pH 6.8)稀释40倍。向6支10 mL离心管分别加入取2 mL油体稀释液,调整ANS浓度分别

为0、2、4、6、8和10 μM ，用0.1 M 磷酸缓冲液定容到10 mL，振荡均匀。激发和发射波长为分别375 nm和475 nm。样品的荧光强度值扣除试剂空白值即为相对荧光强度值。以相对荧光强度对浓度作图，分析油体的表面疏水性。

1.4 数据分析

使用SPSS 17.0 对数据进行分析；试验数据用算术平均值和标准差（平均值 \pm SD）表示，每个样品做3个平行试验。

2 结果与讨论

2.1 冷冻前后油体微观结构的变化

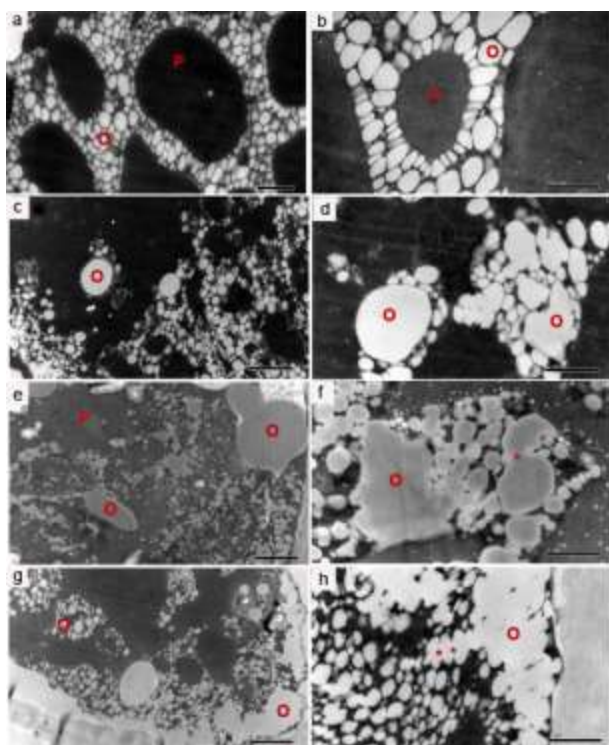


图1 冷冻前后大豆油体的投射电镜扫描图

Fig.1 The transmission electron microscope (TEM) pictures of soybean oil bodies before and after freezing

注：a、b未处理组，c、d冷冻1 d，e、f冷冻2 d，g、h冷冻4 d。O油体；P蛋白体，星号，油体融合的位置。

一般来说，大豆油体比较稳定，不容易在加工过程中被破坏。冷冻过程中增长的冰晶像长矛一样伸入浆料中，破坏了大豆的细胞等组织结构，蛋白质、脂类等物质将会被挤出原有空间。同时，冰晶会从这些物质中夺取水分子结合到表面，这使得大豆的成分在冰晶的缝隙中被浓缩。

大豆油体的超微结构图像显示，成熟的大豆子叶中充满了白色的油体和灰色的蛋白体，油体紧密地排

列在蛋白体之间，呈球形或者椭球形，彼此之间有清晰可见的边界膜包裹，直径分布在0.2~2.5 μm 之间，大部分油体大小均一，直径小于1 μm （图1a~b）。而经过冷冻处理，蛋白体被破坏，部分油体进入蛋白体中，许多大油体出现，其直径超过5 μm ，形状不规则（图1c~h）。在冷冻2 d和4 d的样品中，一些油体的磷脂膜被破坏，油体彼此融合形成超大油体。图中的星号代表了油体彼此融合的位置。

2.2 冷冻处理对油体分散液粒径的影响

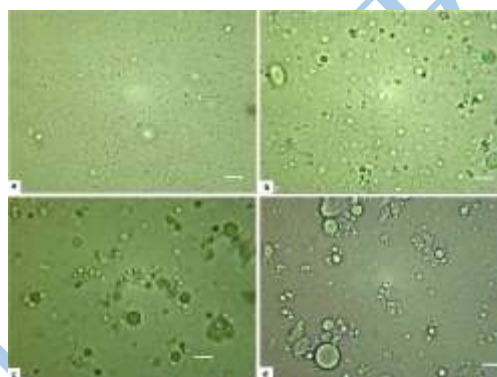


图2 冷冻前后大豆油体分散液的显微图

Fig.2 Optical microscope pictures of soybean oil bodies before and after freezing. a, control, b, freezing 1 day, c, freezing 2 days, d, freezing 4 days. Bar=25 μm

注：a未处理组，b冷冻1 d，c冷冻2 d，d冷冻4 d。标尺=25 μm 。

光学显微镜及粒度仪分别测定了分散液中油体的形态和大小。图2a所示，未处理的油体均匀地分布在溶液中。但是经过冷冻处理后，油体的形态发生了明显的变化，一些形状不规则的油体聚集体出现在分散液中，直径甚至达到了20 μm （图2b~d）。图3显示了油体的粒度分布趋势，未处理组的粒径最小，平均粒径为0.54 μm ，而经过冷冻处理的样品，绝大多数油体的粒径处于2~4 μm 的范围内，冷冻1 d、2 d和4 d的平均粒径分别为2.69 μm 、2.91 μm 和3.04 μm 。此外，粒径超过4 μm 的油体数量随着冷冻时间的延长而增加。粒径分布的结果与显微镜的观察结果相一致，说明冷冻能够导致油体的聚集和融合，形成了更大的油体聚集体。

一些研究发现，油体表面的膜蛋白（oleosin）之间存在着空间位阻和静电斥力，这使得油体有很好的稳定性，即使被相互挤压也不会融合或聚集^[2-3, 10]。然而我们的研究表明，冷冻处理显著地影响了油体的融合和聚集，产生了较大粒径的油体。这可能是由于冰晶的形成与增长增加了细胞物质间的机械压力。这种机械压力一方面破坏了油体和蛋白体表面的膜，使油体之间或油体与蛋白体等细胞物质间更易发生相互

作用，另一方面，机械压力导致空间位阻和静电斥力变得无序，从而加速了油体聚集体的形成。

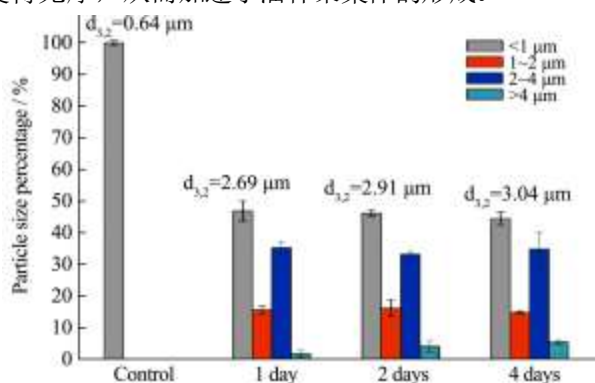


图3 冷冻前后油体的粒径分布及平均粒径

Fig.3 Particle size distribution and $d_{3,2}$ data of soybean oil bodies before and after freezing

2.3 冷冻对油体结合蛋白的影响

根据油体的模型可知^[2-3],油体是由半单位膜(half unit-membrane)包裹液态三脂酰甘油而形成的球体。基本单位为 13 个磷脂分子和一个油体结合蛋白所组成;磷脂占油体表面成分的 80%,其余 20%为油体蛋白。油体结合蛋白是油体所特有的碱性蛋白;相对分子量在 15~26 kDa 之间,主要包括油体膜蛋白(oleosin)、油体钙蛋白(caleosin)和油体固醇蛋白(steroleosin)。研究认为油体膜蛋白(oleosin)是油体表面的主要蛋白,其疏水区域为长约 11 nm 的柄状结构,占油素蛋白分子的 2/5,伸入磷脂的疏水酰基部分和油体内部的三脂酰甘油基质中,其余 3/5 则覆盖在油体表面。迄今为止,油体膜蛋白是被研究最多的油体结合蛋白。它在稳定油体和控制油体大小方面起着重要的作用。油体膜蛋白包括三种亚基(oleosin: 24 kDa、18 kDa、17 kDa),除了 oleosin 外,生豆浆中油体还结合了储藏蛋白(如酸性和碱性亚基, α' , α 和 β 亚基)及许多其他蛋白(例如酶蛋白)^[11]。图 4 显示,从四种生豆浆中提取的油体蛋白包括: β -伴球蛋白(α' 、 α 、 β subunits),球蛋白(acidic),oleosins (24、18、17 kDa)和一些未知的蛋白(X_1 、 X_2 、 X_3)。与未处理大豆样品相比,经过冷冻处理的样品中, α' 和 α 的含量略有降低。冷冻过程中,冰晶增长产生的机械挤压、低温变性和脱水作用导致了油体表面电荷性质发生变化,使得油体和蛋白的结合方式也相应的发生改变。因此油体表面结合蛋白的位置可能会发生重排,导致电泳结果中亚基分布的变化。图 4 也显示,与未处理样品相比,冷冻后分子量为 24 kDa 的 oleosin 含量明显减少。之前的研究表明,油体的大小和 oleosin 含量呈负相关^[6]。因此,我们推测冷冻处理后,形状

不规则和较大的油体含有较低含量的油体膜蛋白(oleosin)。

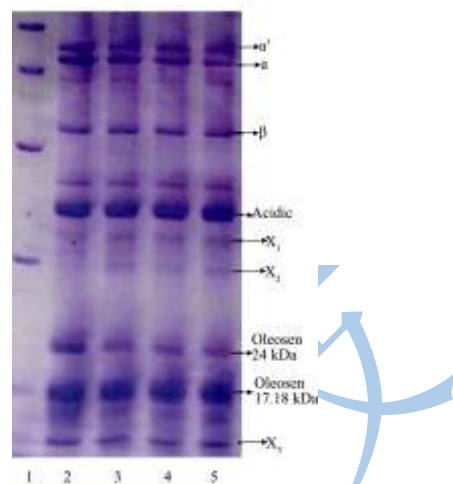


图 4 冷冻前后生豆浆提取的油体蛋白电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE of OBs extracted from raw soymilk before and after freezing

注:条带1: marker; 条带2: 未处理样品; 条带3~5: 分别为冷冻 1d、2d和4d。

2.4 pH 对油体 Zeta 电位的影响

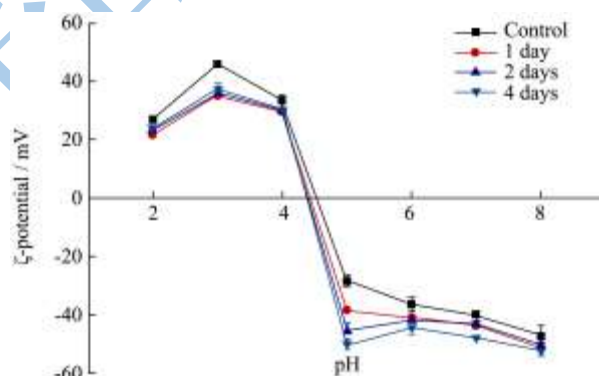


图5 冷冻前后pH对油体Zeta电位的影响

Fig.5 pH effect on the oilbodies before and after freezing

Zeta 电位是表征胶体分散体系稳定性的重要指标。从图 4 可知,当分散液的 pH 值从 2~8 时,未处理样品的 Zeta 电位值分别是 27.01、46.09、33.37、-28.24、-36.42、-40.02、-47.22 mV。当油体的静电荷为零时, pH 值约为 4.6。这与蛋白稳定的水包油乳液的性质是一致的^[12-13]。说明油体经过提取过程后,油体的结合蛋白仍然包裹在油滴表面,在水溶液中形成稳定油滴。对于冷冻处理的样品,不同 pH 值下的电位值均略小于未处理样品。冷冻后,油体的等电点也相应的减小了。根据 Tzen 和 Huang 提出的油体模型可知^[2-3],油体表面镶嵌的膜蛋白(oleosin)带正电的区域与带负电的磷脂及游离脂肪酸通过盐桥相连,而带负电的部分暴露在外面,因此油体的等电点在一个

酸性范围内^[3]。在冷冻条件下,形成许多较大体积的油体,具有较小的表面积/体积,这使得油体单位表面积上的膜蛋白(oleosin)数量减少,从而导致暴露的带负电区域也相应减少,因此冷冻处理后,油体的等电点会有所降低。

2.5 NaCl 浓度对油体 Zeta 电位的影响

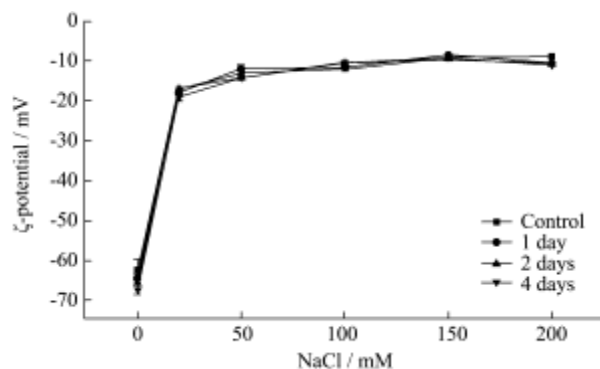


图6 冷冻前后盐浓度对油体Zeta电位的影响

Fig.6 Salt concentration effect on the ζ -potential of oil bodies before and after freezing

我们的研究表明,冷冻前后电位值的变化趋势相近(图6)。随着NaCl浓度由0 mM增大到50 mM,油体的Zeta电位绝对值急剧下降,而后随着浓度增加变化平缓。这可能是油体表面的静电荷被屏蔽的结果。由前述研究结果分析可知,在中性条件下油体表面的蛋白带负电,当NaCl溶液加入后,带正电的 Na^+ 离子与油体表面带负电的膜蛋白结合,导致膜蛋白所带的负电荷数量减少。随着NaCl浓度的增加,油滴表面蛋白被中和的电荷越多,所带的电荷越少,从而造成了大豆油体分散液Zeta电位绝对值的下降。与未处理的油体相比,在不加入NaCl溶液时,冷冻处理的样品Zeta电位绝对值较大。一般来讲,胶体溶液Zeta电位在0到 $\pm 5\text{mV}$ 之间粒子趋于凝结或凝聚, $\pm 10\text{mV}$ 到 $\pm 30\text{mV}$ 之间溶液开始趋向不稳定, $\pm 30\text{mV}$ 到 $\pm 40\text{mV}$ 之间稳定性一般, $\pm 40\text{mV}$ 到 $\pm 60\text{mV}$ 之间稳定性较好。通过测定冷冻前后的Zeta电位值,得知冷冻处理可以增加油体的稳定性。

2.6 冷冻处理对油体表明疏水性的影响

如图7所示,冷冻导致油体的疏水性轻微升高。此外,随着ANS浓度的变化,未处理和冷冻处理样品的疏水性呈现类似的趋势:当ANS浓度从0 μM 增加到40 μM 时,荧光强度快速上升,而后随着ANS浓度增大荧光强度上升缓慢。根据之前的研究可知,油体膜蛋白(oleosin)是油体结合蛋白中的主要蛋白,它含有三个结构域:N-末端两亲性区域(3 kDa)、中心疏水性油

体锚定区域(8 kDa)和C-末端两性螺旋区域(4~6 kDa)^[2]。中心疏水性的油体锚定区域约占oleosin蛋白结构的一半,起到了蛋白与油体间的锚定作用。N-和C-末端区域中带正电的残基和带负电的油质(磷脂酰丝氨酸,磷脂酰肌醇,和游离脂肪酸)结合,带负电的残基则暴露在油体表面,提供空间位阻和负电斥力维持油体结构的稳定性。因此在种子成熟过程中油体虽然被相互挤压却不会聚合。在冷冻条件下,细胞内的物质将受到冰晶增长带来的机械挤压、低温和失水等变化,这使得N-和C-末端与磷脂层的相互作用减弱,一些疏水基团暴露出来,增加了油体表面的疏水性。

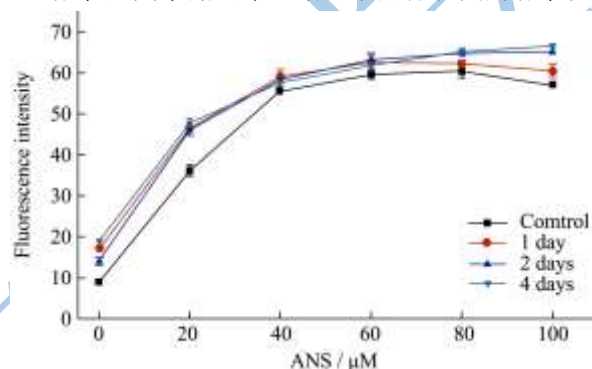


图7 冷冻对油体表面疏水性的影响

Fig.7 Freezing effect on the surface hydrophobicities of OBs

3 结论

3.1 透射电镜结果显示,冷冻处理导致油体形态结构的破坏,在冰晶的机械压力下,油体相互融合或聚集,形成体积较大、形状不规则的大油体。

3.2 油体在分散液中的微结构和稳定性分析表明,冷冻前,油体的粒径小于1 μm ,均匀地分布在分散液中,冷冻处理后,分散液中出现了体积庞大的油体聚集体,绝大多数油体的粒径处于2~4 μm 的范围内,粒径超过4 μm 的油体数量随着冷冻时间的延长而增加。

3.3 电泳图像显示冷冻后分子量为24 kDa的oleosin含量明显减少,这与前面观察到粒径变大的结果相一致。

3.4 对不同NaCl浓度下(0~250 mM),不同pH条件下(pH2~8)大豆油体的电位测定结果表明,大豆油体等电点为4.6,冷冻处理后等电点略有降低。随着NaCl浓度的增加,油体Zeta电位的绝对值下降,未加入NaCl时,冷冻样品组的Zeta电位绝对值增大,说明冷冻处理增加了油体的稳定性。

3.5 冷冻前后油体疏水性的变化趋势类似,但冷冻处理样品荧光吸收强度比未处理样品大,说明冷冻增加了油体表面的疏水性。

参考文献

- [1] Lui K. Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization [M]. New York: Aspen publishers, 1997
- [2] Tzen J, Lie G C, Huang A H. Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies [J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267: 15626-15634
- [3] Tzen J T, Huang A H. Surface structure and properties of plant seed oil bodies [J]. Journal of Cell Biology. 1992, 117: 327-335
- [4] Siloto R M. The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 2006, 18: 1961-1974
- [5] Ross J H E, et al. Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissues in olive (*Olea europaea*) and avocado (*Persea americana*) [J]. Plant Science, 1993, 93: 203-210
- [6] Ting J T L, et al. Oleosin genes in maize kernels having diverse oil contents are constitutively expressed independent of oil contents - Size and shape of intracellular oil bodies are determined by the oleosins oils ratio [J]. Planta, 1996, 199: 158-165
- [7] Wang L, Chen Y, Li Z. The effects of freezing on soybean microstructure and qualities of soymilk [J]. Journal of Food Engineering, 2013, 116: 1-6
- [8] Chen Y, Ono T. Simple extraction method of non-allergenic intact soybean oil bodies that are thermally stable in an aqueous medium [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2010, 58(12):7402-7407
- [9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685
- [10] Leprince O, et al. Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low-temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and -sensitive oilseeds [J]. Planta, 1998, 204:109-119
- [11] Guo ST, Ono T, Mikami M. Interaction between protein and lipid in soybean milk at elevated temperature [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1997, 45 (12): 4601-4605
- [12] Demetriades K, Coupland J N, McClements D J. Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl [J]. Journal of Food Science, 1997, 62: 342-347
- [13] Guzey D, Kim H J, McClements D J. Factors influencing the production of O/W emulsions stabilized by beta-lactoglobulin/pectin membranes [J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18:967-975