

# 完全热变性、可溶性大豆蛋白聚集物的溶解性质研究

郑恒光<sup>1</sup>, 杨晓泉<sup>1</sup>, 林福珍<sup>2</sup>

(1. 华南理工大学食品蛋白研究工程中心, 广东 广州 510640)

(2. 福建省粮油科学技术研究所, 福建 福州 350002)

**摘要:** 大豆分离蛋白在完全或部分热变性下仍可以保持较高的溶解性, 这种类型的大豆蛋白在世界大豆蛋白工业中占据了重要地位。本研究发现: 该类型的大豆分离蛋白的亚基之间是以共价键和非共价键相结合。其溶解性质与传统的低变性大豆分离相比: 在饱和湿度加热条件下更容易丧失水溶性, 在湿度为 18%和 50%下二者的变化趋势基本相同, 盐溶性相对较差, 含水乙醇对其溶解度的降低作用相对较弱, 在 65%乙醇溶液中加热溶解性非但不降低而且还大幅度升高。该研究成果对于大豆分离蛋白产品的开发以及大豆蛋白的基础研究都具有重要的借鉴意义。

**关键词:** 热变性; 完全热变性可溶性大豆蛋白聚集物; 溶解性质

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)05-0428-05

## Solubility of Fully Heat-denatured Soluble Soybean Protein Aggregates

ZHENG Heng-guang<sup>1</sup>, YANG Xiao-quan<sup>1</sup>, LIN Fu-zhen<sup>2</sup>

(1. Research and Development Center of Food Proteins, Department of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)(2. Fujian Grain and Oil Science and Technology Research Institute, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** Fully or partially heat-denatured soybean protein isolate (DSPI) had high solubility, which took an important role in the soybean protein industry. Our research showed that the subunits of DSPI were combined with each other via covalent bands and non-covalent bands. The solubility of DSPI were reduced more easily than that of the traditional low denatured SPI by heating at 100% humidity. But changes of their solubility were similar when they were heated at 18% or 50% humidity. The salt-solubility of DSPI was lower than that of the traditional low denatured SPI. Besides, aqueous ethanol could not obviously lower the solubility of DSPI. Heating DSPI in 65% ethanol may greatly improve its solubility. The results of this research had significant meaning for further basic researches and industrial application of soybean protein.

**Key words:** heat-denature; fully denatured soluble soybean protein aggregates; solubility

在人口急剧增长, 能源和资源供给相对紧张的今天, 开发食物蛋白资源已经成为众多食品科研工作者的研究热点。在植物蛋白资源中, 大豆蛋白不仅具有良好的营养价值和加工品质, 而且对人类的健康也具有积极的作用, 在食品加工中具有巨大的潜力。分离蛋白具有蛋白含量高, 产品功能性强等优点, 在我国目前主要应用于肉制品行业。我国年产大豆分离蛋白 12 万吨<sup>[1]</sup>, 虽然拥有非转基因的优势, 但是总产量只占世界总产量的六分之一, 还存在着产品内在指标低, 市场竞争力弱的缺点。国外的大豆分离蛋白产品品种高达上百种, 可以满足不同类型的需求, 与之相比,

收稿日期: 2008-01-21

作者简介: 郑恒光 (1970-), 男, 博士研究生, 主要从事大豆蛋白加工技术方面的研究

通讯作者: 杨晓泉, 教授, 博导

我国的大豆科研水平和力度上还较为欠缺。国外的研究表明: 在国际市场上销售的大豆分离蛋白中, 同时具有严重热变性以及较高水溶性特征的蛋白并不在少数<sup>[2]</sup>; 然而对这种类型大豆蛋白性质的研究无论是在国内还是国际上还比较少, 所以很有必要对这种大豆蛋白进行深入的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验材料

低温脱溶脱脂豆粕 (白豆片): 山东禹王蛋白厂, 蛋白含量 55% (干基), 水分含量 7.39%。

盐酸、氢氧化钠、碘化钠、氯化钙: 分析纯。

电泳装置: 北京六一分析仪器厂。

凝胶过滤装置: 美国 Waters 蛋白纯化仪,  $\Phi 2.3 \times 1000$  层析柱。

凝胶过滤软胶: Sepharose CL-6B(美国 GE 公司)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 低变性大豆分离蛋白的提取

将白豆片和水以 1:15 ( $m/V$ ) 的比例混合, 用 2 mol/L 的氢氧化钠溶液调 pH=8.0, 室温下搅拌 2 h, 然后用纱布滤去豆渣, 所得提取液以 10000×g 在室温下离心 30 min 至澄清, 而后用 2 mol/L HCL 调 pH 至 4.5。所得沉淀以 5000×g 在室温下离心 15 min。用 2 mol/L 氢氧化钠将酸沉物调 pH 7.0 并以最少的水重新溶解, 所得蛋白溶液透析, 尔后冻干备用。

### 1.2.2 完全变性、可溶性大豆蛋白聚合物的制备

将上述的冻干低变性大豆蛋白以 1:50 ( $m/V$ ) 的比例溶于去离子水, 在灭菌锅内以 121 °C 处理 0.5 h, 而后将所得溶液冻干备用。

### 1.2.3 凝胶过滤测相对分子量分布

将蛋白溶液以 1% 的体积百分比溶于 pH 7.6 磷酸缓冲溶液 (32.5 mmol/L 磷酸氢二钾+2.5 mmol/L 磷酸二氢钾) 中, 以 5% 的柱体积上样, 以 4 mL/管收集洗脱液, 用紫外分光光度计 280 nm 检测每管的吸光度。

### 1.2.4 SDS-PAGE 电泳检测大豆蛋白亚基组成及亚基间作用力类型

采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 浓缩胶含量 5%, 电流 40 mA, 分离胶含量 10%, 电流 80 mA; 用考马斯亮蓝染色 20 min, 采用甲醇、冰醋酸溶液脱色 ( $V_{水}:V_{甲醇}:V_{乙酸}=8:1:1$ ), 脱色时间 12 h 以上。

### 1.2.5 溶解度和溶液 pH 关系的测定

将大豆蛋白以 1 g/L 的质量浓度溶于 0.01 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液中, 用 0.1 mol/L HCl 或 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 至 2~10。室温下搅拌 1 h, 然后 8000×g 离心 10 min, 取一定量的上清液用 Lowry 法测蛋白浓度。

溶解度 = (可溶性蛋白/总蛋白) × 100%。

总蛋白用凯氏定氮法检测。

### 1.2.6 耐盐性的测定

以去离子为离子强度 0 作为标准。在离子强度为 0.1 的 pH 7.6 磷酸缓冲溶液 (32.5 mmol/L 磷酸氢二钾 + 2.5 mmol/L 磷酸二氢钾) 中加入 0.1~0.4 mol/L 的 NaCl 形成具 0.1~0.5 盐离子强度的磷酸缓冲液, 将大豆蛋白以 1 g/L 的质量浓度分散于上述不同盐离子强度的磷酸缓冲液, 比较蛋白在不同盐离子强度下的溶解度, 可以比较不同蛋白的耐盐性。

### 1.2.7 耐乙醇变性能力的测定

#### 1.2.7.1 含水乙醇浓度对蛋白的变性作用

将无水乙醇和去离子按比例混合, 分别配成 20%、40%、60%、80% 的含水乙醇溶液。用上述不同

浓度的含水乙醇浸泡大豆分离蛋白 2 h, 而后冷冻干燥, 测定冻干蛋白的溶解度, 比较不同浓度乙醇降低大豆蛋白溶解性的程度。

#### 1.2.7.2 含水乙醇浸泡温度对蛋白的变性作用

称取一定量的蛋白粉, 以 10 g/L 质量浓度分散于 65% 的含水乙醇中, 将盛有该溶液的具塞三角瓶放入水浴锅以 20 °C、40 °C、60 °C、80 °C 保温 1 h, 取出冻干后测定蛋白的溶解度。

### 1.2.8 耐干、湿热变性的能力测定<sup>[3]</sup>

#### 1.2.8.1 耐饱和湿热能力检测

将两种大豆蛋白粉置于饱和湿度环境下以 60 °C、80 °C、100 °C、121 °C 加热 0.5 h, 而后检测溶解度。将干燥器底部放入少量的水置于烘箱中加热以模拟 60 °C、80 °C 下饱和湿度加热环境, 将大豆蛋白粉放入灭菌锅中加热以模拟 100 °C、121 °C 下饱和湿度加热环境。

#### 1.2.8.2 耐干热能力检测

将两种大豆蛋白置于底部盛有氯化钙 (RH=18%) 和碘化钠 (RH=50%) 饱和溶液的干燥器内, 放入烘箱内以 90 °C 分别加热 1 h、2 h、3 h 后, 取出样品检测溶解度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大豆蛋白可溶性聚合物相对分子量分布情况

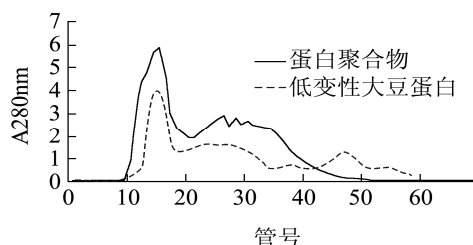


图1 以磷酸缓冲盐为溶解液, 凝胶过滤低变性大豆蛋白以及完全变性、可溶性大豆蛋白聚合物

Fig.1 Molecular weight profile of low-denatured soybean protein and fully denatured soluble soy protein aggregates in phosphate buffer

从图1可以看出, 完全热变性、可溶性大豆蛋白聚合物 (以下简称为: 蛋白聚合物) 和天然低变性大豆蛋白的相对分子量分布十分相似, 即: 相对分子量大于 400 万的聚集物占有很高的比例, 同时大多数组成蛋白以聚集方式存在, 而不是以 7S 三聚体 (即: 相对分子量 18 万, 图 1 中 36 管处) 或 11S 六聚体 (即: 相对分子量 28 万, 图 1 中 29 管处) 形式存在。这种现象说明冷冻干燥能导致低热变性蛋白的聚集, 而热处理也能导致大豆蛋白的聚集。由于 0.5% 的 SDS 能

使疏水结合的蛋白解聚，所以从图 2 可以看出：SDS 能够使冻干所导致的低变性大豆蛋白以疏水键结合的聚集体几乎完全解聚，而对于热变性所导致的以二硫键结合为主的大豆蛋白聚集体仅有少量解聚。这表现为：热变性大豆蛋白聚合物的排阻峰（即：相对分子量大于 400 万）所占比例降低，而分布在 400 万~28 万之间的蛋白聚合物比例增加，几乎不以 7S、11S 或更小亚基形式存在。

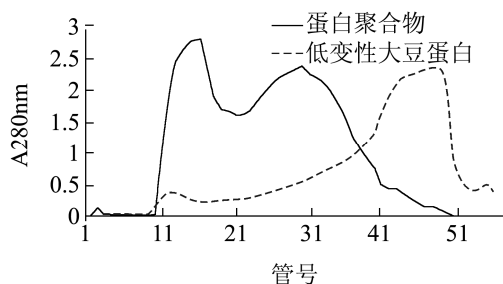


图 2 以 0.5% SDS 为溶解液，凝胶过滤低变性大豆蛋白以及完全变性、可溶性大豆蛋白聚合物。

Fig.2 Molecular weight profile of low-denatured soybean protein and fully denatured soluble soy protein aggregates in 0.5% SDS solution.

### 2.2 电泳

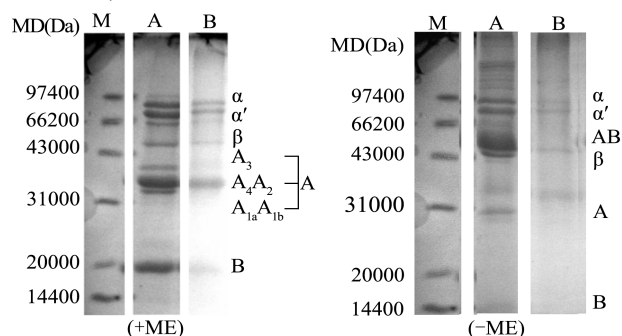


图 3 大豆蛋白的还原（左）和非还原电泳图（右）

Fig.3 SDS-PAGE for soybean protein samples under both reducing (left) and non-reducing conditions (right)

注：M：标准相对分子量蛋白，A：低变性分离蛋白，B：完全变性、可溶性大豆蛋白聚合物

Remarks: M: molecular-weight marker, A: low-denatured soybean protein, B: fully denatured soluble soy protein aggregates

从图 3 可看出：蛋白聚合物的 7S-β 亚基和 11S-B 亚基含量明显低于其它亚基。对于低变性大豆分离蛋白而言，冻干所引起的疏水性聚集可以在 SDS 作用下而进入分离胶。然而，无论是在还原还是非还原条件下，蛋白聚合物都难以被解离成低相对分子量物质而进入分离胶。该电泳实验结果和上述的凝胶过滤结论相一致。

### 2.3 两种大豆蛋白的溶解度和溶液 pH 关系

从图 4 可以看出蛋白聚合物的溶解度曲线和低变性分离蛋白一样，也具有 U 型特征。完全热变性的蛋白聚合物的溶解性高于低变性的大豆分离蛋白，可能是由于溶解性不好的大部分 7S-β 亚基和 11S-B 亚基在热处理过程中结合成不溶性高聚物从而使可溶性蛋白聚合物的溶解性提高。

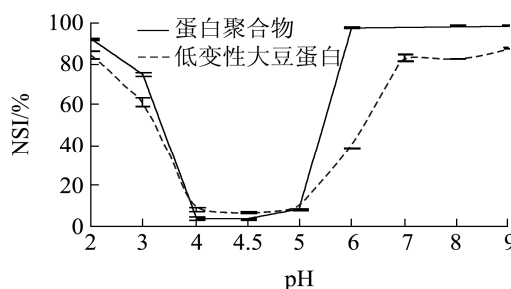


图 4 两种大豆蛋白的溶解度和溶液 pH 关系

Fig.4 pH-dependent solubility for two proteins

### 2.4 两种大豆蛋白的耐盐性

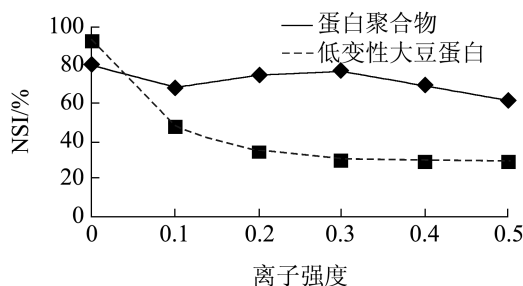


图 5 两种大豆蛋白的耐盐性

Fig.5 Salt-endurance for two protein solutions

从图 5 可以看出：蛋白聚合物的耐盐性很差，在离子强度为 0 到 0.1 时，溶解度迅速下降，而低变性分离蛋白的溶解度却随着盐离子浓度的变化而波动较小。这可能是由于蛋白聚合物在热变性后，内部疏水基团外露，分子间更容易克服静电斥力并通过疏水作用聚集成相对分子量更大的聚合物，进而产生相分离而从溶液中沉淀出来。

### 2.5 耐乙醇变性能力

#### 2.5.1 含水乙醇浓度对蛋白的变性作用

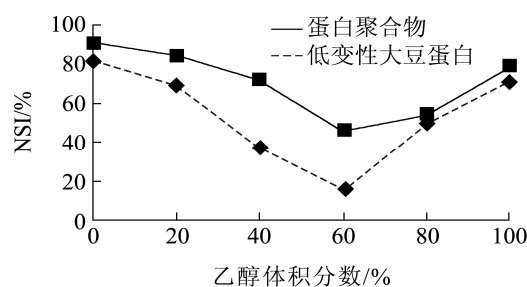


图 6 乙醇浓度对蛋白溶解度的影响

Fig.6 Effect of alcohol concentration on the solubility of soy

protein

从图 6 可以看出：60%的含水乙醇对低变性蛋白的溶解性破坏最大，大致可以使 85%的蛋白不溶解，而对于蛋白聚合物，60%的含水乙醇对其溶解性的破坏也是最大，但只是使大约一半的蛋白不溶解。乙醇对于完全变性的可溶性蛋白溶解性破坏程度较之非变性蛋白小的现象在中外文献上未见报道。

学术界对含水乙醇降低蛋白的溶解性现象一般有两种解释；BULL 等人<sup>[4]</sup>认为：乙醇能够和蛋白相结合从而改变蛋白的结构和蛋白之间的相互作用，而这种结合伴随着蛋白质的脱水作用，通常我们可以将这种观点理解为：乙醇分子深入蛋白分子内部并与其内部肽链结合，从而破坏了蛋白的结构，使蛋白内部疏水基团外露，导致溶液内蛋白分子之间更容易通过疏水作用而结合成大分子聚合物沉淀；而持另一种观点的 Horne 等人<sup>[5]</sup>认为：乙醇的加入只是改变了溶液的介电常数，乙醇的这种非特异性作用导致了蛋白之间的相互作用，通常我们也可以将这种观点理解为：乙醇的加入破坏了蛋白表面的双电层结构和蛋白的外部环境，使蛋白分子之间的斥力不足以抵消蛋白分子之间的疏水作用。

对于完全热变性的蛋白而言，其分子结构已经呈现无规则卷曲状态，这与天然蛋白的疏水基团朝内亲水基团朝外的结构截然不同，这显然与 BULL 等人<sup>[4]</sup>所说的前提条件不相符，所以应该用 Horne 等人<sup>[5]</sup>的改变溶剂介电常数的观点来解释。比较乙醇对完全热变性蛋白和低变性蛋白的作用后我们可以推断：对于天然蛋白或是非变性蛋白而言，乙醇同时改变了蛋白结构和溶液的介电常数，所以溶解度降低较大；而对于完全热变性的蛋白聚合物而言，乙醇只是改变了溶液的介电常数，所以溶解度降低较小。

2.5.2 含水乙醇浸泡温度对蛋白溶解性的影响

从图 7 可以看出：65%的乙醇对低变性大豆蛋白的变性作用非常大，并且随着温度的升高这种变性作用略微加剧；然而乙醇作用于蛋白聚合物的结果则完全不同，65%的乙醇在室温下可以使 45%左右的蛋白失去溶解性，但是乙醇对溶解性的破坏作用却随着温度的升高而降低，这种现象在中外文献上未见报道。这可能是由于乙醇在加热后使蛋白聚合物的溶解性增加，布朗运动加剧，从而使原先部分沉淀聚集的蛋白重新溶解分散。在热乙醇溶液冷却后，分散的蛋白聚合物通过侧链交连而形成自持凝胶，从而阻止了蛋白聚合物分子主体的聚集沉淀，在溶液冻干后，蛋白聚合物仍就保持分散状态从而保持了高温加热所获得的

分散性。

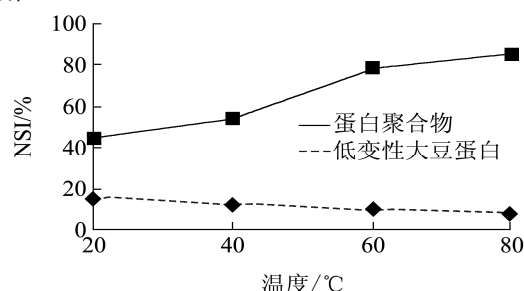


图 7 温度对蛋白溶解性的影响 (65%乙醇浸泡)

Fig.7 Effect of temperature on the solubility of soy proteins in 65% aqueous alcohol solution

2.6 耐干、湿热变性的能力

2.6.1 干热条件下热变性

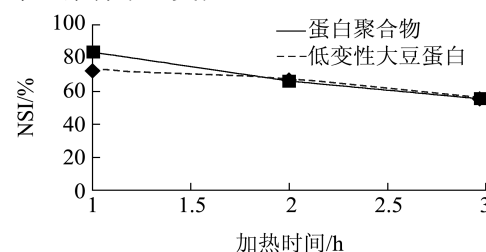


图 8 两种蛋白在湿度为 18%下的热变性程度

Fig.8 Degree of losing solubility for two proteins by heating under the humidity of 18%

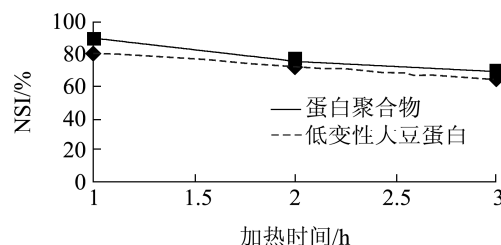


图 9 两种蛋白在湿度为 50%下的热变性程度

Fig.9 Degree of losing solubility for two proteins by heating under the humidity of 50%

比较图 8 和 9 可以看出，两种蛋白的热变性趋势基本一致，在湿度小于 50%下，蛋白质缓慢失去其溶解性。

2.6.2 饱和湿度下热变性

从图 10 可以看出：在饱和湿度下蛋白聚合物在 100 °C 和 120 °C 的热变性程度要明显低于低变性蛋白，这可能是由于低变性蛋白要经历一个热变性过程，蛋白质分子内部疏水基团外露的过程更容易导致蛋白聚合而使溶解度下降。然而对于蛋白聚合物而言，只有通过热运动而聚合，在饱和湿度条件下，水蒸汽中的水分子促进了聚合过程，在 121 °C 下加热更加剧了蛋白质溶解度的下降趋势。

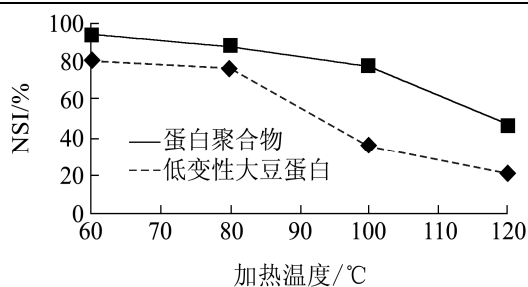


图 10 两种蛋白在饱和湿度 (RH=100%) 下的热变性程度  
Fig.10 Degree of losing solubility for two proteins by heating under the humidity of 100%

### 3 结论与展望

完全热变性可溶性大豆蛋白聚集物的溶解性质和传统的低变性大豆蛋白存在着显著差异, 在完全变性条件下, 大豆蛋白中的胰蛋白抑止剂等抗营养物质完全失活, 微生物数量大大降低, 同时又具有高的溶解性和抗乙醇变性、抗湿热变性的优点, 因此, 可以预见: 该类型的大豆分离蛋白具有良好的应用前景, 对

(上接第 440 页)

量细胞沉淀, 允许有少量乳清出现。

气味、味道: 具有乳酸菌发酵制成的酸奶特有的气味和味道; 有发菜特有香味, 无异味。

#### 2.2.2 理化指标

脂肪 $\geq 1.5\%$ , 全乳固体 $\geq 12\%$ , 蛋白质 $\geq 2.3\%$ ; 酸度为 55~70°T。

#### 2.2.3 卫生指标

乳酸菌总数 $>10^6$  cfu/mL, 大肠菌群 $\leq 90$  MPN/mL, 致病菌不得检出。

### 3 结论

利用鲜乳和发菜细胞为原料生产发菜功能性酸奶的最佳配方是, 在鲜牛乳中添加 10%的发菜细胞, 加入 10%砂糖, 0.15%单干酯和 0.2% CMC, 接入 4%的保加利亚乳杆菌和乳酸链球菌的混合发酵剂 ( $m/m=1:1$ ) 在 44 °C 发酵至凝乳, 就可以得到酸度在 55~70°T, 口感细腻, 色泽淡绿, 具有发菜特有的清香的功能性酸奶。不仅为功能性酸奶的开发提供了一条新的途径, 而且为发菜细胞的综合利用提供了新的思路。

丰富我国的大豆蛋白品种, 增加国际竞争力具有十分重要的意义。

### 参考文献

- [1] 南喜平,等.我国大豆分离蛋白生产发展对策的研究.农产品加工,2005,(12):54-56
- [2] Arrese, E., L.. Electrophoretic, solubility, and functional properties of commercial soy protein isolates[J]. J. Agric. Food Chem., 1991, 39:1029-1032
- [3] Beckel, A., C.. Heat denaturation of protein in soybean meal[J]. J. Agric. Food Chem., 1942, 34:973-976
- [4] Bull, H., B., & Breese, K.. Interactions with alcohol with proteins. [J]. Biopolymers, 1978, 17:2121-2131
- [5] Horne, D., S., & Parker, T., G. Factors affecting the ethanol stability of bovine casein micelles: contributions of ethanol by other organic solvents[J]. International of biological Macro- molecules, 1981a,(3):399-402

### 参考文献

- [1] Gao K.S. Chinese studies on the edible bluegreen alga, Nostoc flagelliforme: a review[J]. Journal of Applied Phycology. 1998, (10): 37-49
- [2] 戴治稼,曹有龙,王天宁.宁夏发菜营养及化学成分测定[J].宁夏农林科技,1991,(3):42-43
- [3] Kanekiyo K., Lee J.B., Hayashi K., Takenaka H., Hayakawa Y., Endo S. and Hayashi T. Isolation of an antiviral polysaccharide, Nostoflan, from a terrestrial cyanobacterium, Nostoc flagelliforme [J]. J. Nat. Prod. 2005, 68: 1037-1041
- [4] 大连轻工业学院等编.食品分析[M].北京:轻工业出版社, 1952
- [5] 张玉浩译.酸奶特征微生物的菌落计数[J].中国乳品工业, 1990,(4):178-182
- [6] 岑沛霖,蔡谨.工业微生物学[M].北京:化学工业出版社, 2000
- [7] 余疾风.现代食品感官分析技术[M].成都:四川科学技术出版社,1991