

不同大豆加工制品中主要抗营养因子免疫及抑制活性的比较

赵元, 秦贵信, 王涛, 张兵, 朱丹

(吉林农业大学动物科技学院, 长春 130118)

摘要 大豆经适当加工可减少或去除其中的抗营养因子, 因而大豆制品所含的抗营养因子成分不同。通过竞争 ELISA 法和胰蛋白酶抑制法检测豆粕、膨化大豆、脱壳豆粕、大豆分离蛋白、大豆浓缩蛋白、全脂豆粉、脱脂豆粉和热处理大豆粉大豆加工制品中胰蛋白酶抑制因子、大豆凝集素、大豆球蛋白及 β -伴大豆球蛋白的活性, 并进行 SDS-PAGE 分析, 进而比较其主要抗营养因子灭活的程度。结果表明, 在现取样的 10 种大豆加工制品中, 膨化处理除去了绝大多数的主要抗营养因子, 是一种较理想的加工工艺; 去皮豆粕中胰蛋白酶抑制因子和大豆凝集素几乎被灭活, 但仍存在一定量的大豆球蛋白及 β -伴大豆球蛋白。此项工作为评价大豆加工工艺提供理论基础。

关键词 大豆; 加工制品; 抗营养因子; 活性

中图分类号 TS201.2 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2007)06-0930-05

COMPARISONS OF IMMUNOCOMPETENCE AND INHIBIT COMPETENCE OF MAIN ANTINUTRITIONAL FACTORS IN DIFFERENT PROCESSED SOYBEAN PRODUCTS

ZHAO Yuan, QIN Gui-xin, WANG Tao, ZHANG Bing, ZHU Dan

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)

Abstract The antinutritional factors are decreased or inactivated by appropriate processing, and there are different immunocompetence and inhibit competence in soybean products. The immunocompetence and inhibit competence of trypsin inhibitor, lectin, glycinin and β -conglycinin in different processed soybean products including soybean meal, extruded full-fat soybean, dehulled soybean meal, soy protein isolate, soy protein concentrate, full-fat soybean powder, defatted soybean powder and heated soybean powder, were determined by the inhibition ELISA and trypsin inhibit method, meanwhile SDS-PAGE was utilized to analyze protein, in order to compare the processed degree of soybean. Results showed that in the selective 10 kind of processed soybean products, extruded process was the most ideal treating method, for no immunocompetence and inhibit competence of the antinutritional factors were detected. The trypsin inhibitor and lectin were decreased evidently in the dehulled soybean meal, while glycinin and β -conglycinin still occurred. This work provided the theory basis for estimating the processing methods of soybean.

Key words Soybean; Processed products; Antinutritional factors; Activity

收稿日期: 2007-04-28

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30430520)

作者简介: 赵元 (1981), 女, 博士研究生, 研究方向饲料抗营养因子。E-mail: zhaoyuan4CL52@126.com

通讯作者: 秦贵信, 教授, 博士生导师。

大豆抗营养因子(antinutritional factors, ANFs)在一定程度上影响了大豆的营养价值,在过去近 80 年的相关研究中,共发现了 10 余种大豆抗营养因子。自 1917 年 Osborne 和 Mendel^[1]报道蒸煮大豆可以改善小鼠的生长性能以来,人们对大豆抗营养因子的热稳定性进行了大量研究。目前,按照大豆抗营养因子对热敏感性的程度,又可将其分为两类,一类是热不稳定的抗营养因子,包括胰蛋白酶抑制因子(trypsin inhibitor, TI)、糜蛋白酶抑制因子、大豆凝集素(soybean agglutinin, SBA)、致甲状腺肿因子及抗维生素因子;另一类是热稳定的抗营养因子,包括皂甙、单宁、异黄酮、寡糖(棉子糖和水苏糖等)、大豆抗原蛋白(主要是大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白)及植酸等。其中,日粮中胰蛋白酶抑制因子、大豆凝集素和大豆抗原对动物的不良影响较大,所以在饲料行业中,低活性抗营养因子成为评价大豆饲料原料好坏的重要指标。以往研究表明,经热处理后可以灭活大豆胰蛋白酶抑制因子和大豆凝集素,但后者对温度和时间的要求较苛刻^[2]。有关热处理对大豆抗原活性的影响,目前尚无准确检测结果,仅从是否导致动物致敏作用的角度来定论的。膨化大豆,大豆浓缩蛋白和大豆分离蛋白在加工过程中,也能去除大部分的抗营养因子。通过检测豆粕、膨化大豆、脱壳豆粕、大豆分离蛋白、大豆浓缩蛋白、全脂豆粉、脱脂豆粉和热处理大豆粉中胰蛋白酶抑制因子、大豆凝集素、大豆球蛋白及 β -伴大豆球蛋白的活性及 SDS-PAGE 分析,进而比较其主要抗营养因子灭活的程度,为评价大豆加工工艺提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 不同大豆加工制品

豆粕(CP > 43%),膨化大豆,脱壳豆粕(CP > 46%)采样于吉林省五禾牧业。大豆分离蛋白(CP > 90%),大豆浓缩蛋白(CP > 70%),全脂豆粉 I 和脱脂豆粉(CP > 55.4%)采样于通榆县益发合大豆制品有限责任公司。另外,丰交 7607 的大豆粉(全脂豆粉 II)进行了 100℃, 25 min 及 121℃, 7.5 min 蒸汽处理,依次命名为热处理大豆粉 I 和 II。将上述大豆制品均过至少 60 目的筛网,准备检测。

1.2 竞争 ELISA 法检测 SBA 的活性

1.2.1 大豆凝集素的分离提纯及其特异性抗体的制备 大豆凝集素的分离提纯参照荆剑等^[3]方法进行,并将提纯产物进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。大豆凝集素特异性抗体的制备参照何昭阳等^[4]方法进行。

1.2.2 蛋白质粗提液的提取方法 参照 Perez 等^[5]方法进行。

1.2.3 竞争 ELISA 法检测大豆凝集素活性的方法 参考李振田^[6]的方法进行测定。

1.3 竞争 ELISA 法检测大豆球蛋白及 β -伴大豆球蛋白的活性

1.3.1 大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白的分离提纯及其特异性抗体的制备

大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白的分离提纯参照 Setsuko 和 Fumio^[7]方法进行,并将提纯产物进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白特异性抗体的制备方法同 2.2.1。

1.3.2 蛋白质粗提液的提取方法 提纯方法同 2.2.2。

1.3.3 竞争 ELISA 法检测大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白活性的方法

标准曲线的绘制:按 Perez 等^[5]方法进行。

检测方法:参照 Perez 等^[5]的竞争 ELISA 法进行。

1.4 胰蛋白酶抑制法检测 TI 的活性

1.4.1 待检样品准备 取 0.5 g 样品溶于 50 mL 蒸馏水中,在 200 r min⁻¹的条件下,机械震荡 30 min。取 10 mL 的上清液,加入等体积的样品缓冲液,机械震荡 2 ~ 3 min 后,过滤。然后用蒸馏水稀释滤液,使胰蛋白酶的抑制率达到 30% ~ 70%,从而保证 TIA 的相对标准差为 $\pm 3.5\%$ 。生大豆样品的最终适应浓度应为 0.1 mg mL⁻¹,热处理样品为 0.5 ~ 1.5 mg mL⁻¹。

1.4.2 测定方法 参考 Liu 和 Markakis^[8]方法,进行 TI 活性检测。当加入胰蛋白酶 10 min 后,用 30% 的醋酸终止反应(0.5 mL),同时测定在 410 nm 处的吸光度(A_{410}^s)。通过测定胰蛋白酶的活性来推算样品中胰蛋白酶抑制因子的含量。以蒸馏水替代样品,相应得到的吸光度(A_{410}^r)作为对照值。活性计算: TUI/mg 样品 = $[(A_{410}^r - A_{410}^s) \times 100] / \text{mg 样品}$ 。

1.5 十二烷基酸钠凝胶电泳(SDS-PAGE)

根据汪家政和范明^[9]的方法,稍加改动。在不连续缓冲系统上进行 SDS-PAGE 电泳分析,分离胶和浓缩胶质量分数分别为 12% 和 5%。不同大豆加工制品(浓度调整到 2 mg mL⁻¹左右,准备上样)与 SDS-PAGE 样品缓冲液(含质量分数为 5% 的巯基乙醇和 2% 的 SDS)等体积混合,电泳前沸水中加热处理 5 min。上样量为 20 μL,凝胶电泳于恒压下进行,在浓缩胶中的电流为 100 V,进入分离胶后增至 200 V。凝胶染色液采用含有质量分数为 0.25% 的考马斯亮蓝 R-250,脱色液采用甲醇的醋酸溶液(甲醇、醋酸、水的体积比为 2: 3: 35)。

1.6 数据统计

采用单因子方差分析,分别统计分析来自不同加工大豆制品中大豆球蛋白、β-伴大豆球蛋白、大豆凝集素及大豆胰蛋白酶抑制因子含量的数据,以 5% 水平最小显著差异方法来处理平均值的偏差。

2 结果与分析

2.1 竞争 ELISA 法检测活性大豆凝集素和大豆抗原变化的标准曲线

在竞争 ELISA 检测法中,由绘制的标准曲线(如图 1)可知,大豆凝集素、大豆球蛋白和 β-伴大豆球蛋白含量与光密度值(OD 值)成反比。

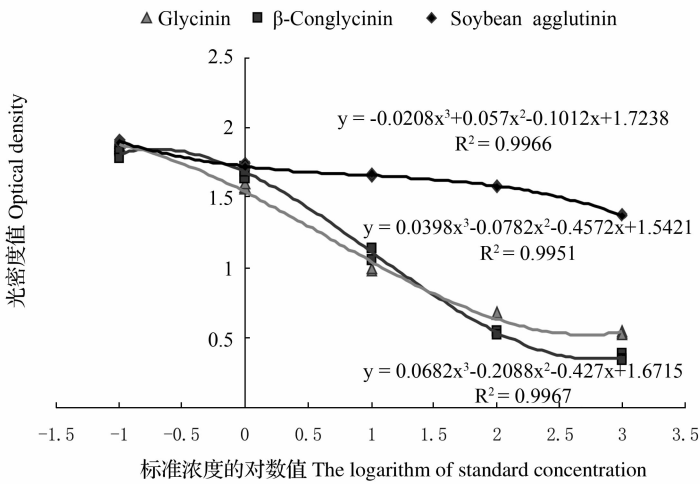


图 1 SBA、大豆球蛋白和 β-伴大豆球蛋白免疫活性变化检测标准曲线图

Fig.1 Inhibition ELISA calibrations curves for SBA, glycinin and β-conglycinin

2.2 不同大豆加工制品中主要抗营养因子的活性

从表 1 的结果,可以看出,大豆制品中的主要抗营养因子都不同程度被灭活。热处理对胰蛋白酶抑制因子和凝集素的影响远远大于大豆球蛋白及 β-

表 1 不同大豆加工制品中主要抗营养因子的免疫活性及抑制活性

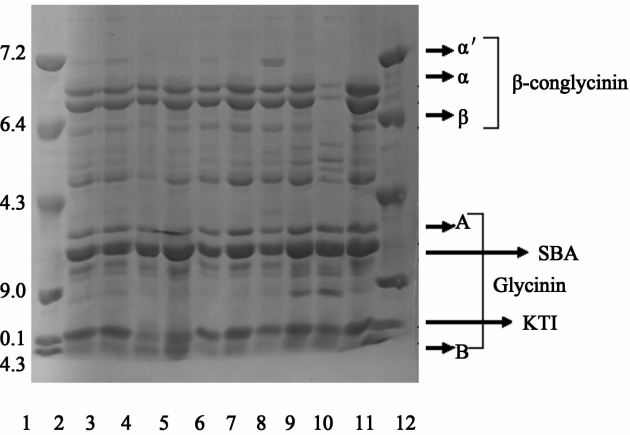
大豆制品 Soybean products	胰蛋白酶抑制因子 Trypsin inhibitor/TUI mg ⁻¹	大豆凝集素 Soybean aglutinin/mg g ⁻¹	大豆球蛋白 Glycinin/mg g ⁻¹	β-伴大豆球蛋白 β-glycinin/mg g ⁻¹
全脂豆粉 I FSP I	42.5000 ± 2.5000b	16.7480 ± 0.8137b	44.3628 ± 0.7034e	10.4195 ± 0.4337d
全脂豆粉 II FSP II	51.0000 ± 3.0000a	19.8588 ± 1.4904a	167.6749 ± 1.9461a	11.3032 ± 0.0735d
脱脂豆粉 DSP	32.0000 ± 2.0000c	12.1119 ± 1.1448c	161.0118 ± 1.4328c	20.3038 ± 0.8986a
热处理大豆粉 I HSP I	3.0000 ± 0.2000f	1.3595 ± 0.0340g	31.9074 ± 1.4035f	6.2117 ± 0.3667f
热处理大豆粉 II HSP II	3.4000 ± 0.2000f	2.9682 ± 0.2889e	44.6501 ± 0.3618e	6.1964 ± 0.2157f
膨化大豆 EFS	0.9000 ± 0fe	1.5526 ± 0.0659fg	21.7358 ± 0.9524g	1.7739 ± 0.1533g
豆粕 SM	0.8200 ± 0.0346fe	5.6573 ± 0.4122d	164.7071 ± 1.5031b	18.4644 ± 0.8181b
去皮豆粕 DSM	0.3000 ± 0e	1.1424 ± 0.0265g	48.3427 ± 0.4829d	12.4529 ± 1.4564c
大豆浓缩蛋白 SPC	10.8000 ± 0.6000d	2.8721 ± 0.1145ef	1.994 ± 0.1716h	6.7357 ± 0.0353f
大豆分离蛋白 SPI	9.0000 ± 0.8660d	16.8795 ± 1.0323b	0.3198 ± 0.0090h	8.6328 ± 0.3738e

表中不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。Different lowercase letters indicate significant at 0.05 probability level. FSP:full-fat soybean powder;DSP:defatted soybean powder;HSP:heated soybean powder;EFS:extruded full-fat soybean;SM:soybean meal;DSM:dehulled soybean meal;SPC:soy protein concentrate;SPI:soy protein isolate

伴大豆球蛋白,β-伴大豆球蛋白仅降低40%。与其它加工方法相比,膨化可很好去除大豆中的主要抗营养因子。尽管豆粕去皮后,胰蛋白酶抑制因子和凝集素的活性最低,而大豆抗原蛋白仍表现出很高的活性,分别为48 mg g⁻¹和12 mg g⁻¹。膨化大豆,豆粕和去皮豆粕中几乎不含有胰蛋白酶抑制因子。大豆浓缩蛋白和分离蛋白不能很好的去除β-伴大豆球蛋白,但可灭活多数的胰蛋白酶抑制因子和绝大部分的大豆球蛋白。凝集素在大豆分离蛋白中灭活程度很小,在大豆浓缩蛋白中仅剩11%。

2.3 不同大豆加工制品的 SDS-PAGE 分析

从图2结果中,可以清晰看到膨化大豆中的β-伴大豆球蛋白明显消失,大豆浓缩蛋白、热处理豆粉及膨化大豆的中SBA的含量比全脂豆粉少,大豆浓缩蛋白中KTI的电泳带颜色最浅。每种大豆制品中主要抗营养因子中,大豆球蛋白的含量最多,其次是β-伴大豆球蛋白和KTI,SBA含量最少。与全脂大豆相比,膨化大豆和去皮豆粕在30KD处各有一条清晰的条带。此外,大豆制品中除了这几种主要抗营养因子外,还存在其它分子量的蛋白。



1和12道电泳带为标准蛋白质分子量;2-11道电泳带分别代表脱脂豆粉,全脂豆粉I,大豆浓缩蛋白,大豆分离蛋白,热处理大豆粉II,全脂豆粉II,热处理大豆粉I,去皮豆粕,膨化大豆,豆粕等大豆制品。

Lane 1 and 12, marker; lane 2-11, samples of defatted soybean powder, full-fat soybean powder I, soy protein concentrate, soy protein isolate, heated soybean powder II, full-fat soybean powder II, heated soybean powder I, dehulled soybean meal, extruded full-fat soybean, soybean meal.

图2 不同大豆加工制品的 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig.2 SDS-PAGE gel electrophoresis of different processed soybean products

3 讨论

3.1 不同大豆加工制品中主要抗营养因子的活性

3.1.1 胰蛋白酶抑制因子 胰蛋白酶抑制因子对热敏感,与热有关的加工工艺都很容易使之灭活,如蒸汽处理、膨化、烘烤等。研究表明,随膨化温度的提高,大豆胰蛋白酶抑制因子呈对数降低,膨化温度90℃时失活25.42%,90~120℃失活速度最快,膨化温度超过120℃后失活减慢^[10]。去皮豆粕的胰蛋白酶抑制因子的活性继续降低,由于脲酶含量与胰蛋白酶抑制因子含量有很大的正相关性,康玉凡等^[11]测得,来自不同国家和地区11个品种的去皮豆粕中脲酶活性含量为0~0.22ΔpH,而57个带皮豆粕样品的脲酶活性为0~0.75ΔpH,这与本试验测定的结果一致。制备大豆浓缩蛋白时需要浸提和烘烤,在这些过程中,胰蛋白酶抑制因子和凝集素可有效灭活。大豆经分离后除去2S球蛋白和15S复合蛋白,得到的大豆分离蛋白含有少量的胰蛋白酶抑制因子,剩余部分以7S和11S球蛋白为主。由于大豆浓缩蛋白和分离蛋白中蛋白含量显著高于其他加工产品,其胰蛋白酶抑制因子绝对含量明显高于它们,但从相对含量来看,差距不大。

3.1.2 大豆凝集素 尽管大豆凝集素属于热不稳定性的抗营养因子,但大豆凝集素对温度和时间的要求较苛刻。有报道,大豆经蒸汽处理90℃,35min和120℃,15min后,大豆凝集素才明显失活^[12]。而膨化能明显降低凝集素的含量,且随膨化温度的升高呈线性下降,当膨化温度达120℃时下降为零^[10]。目前测定大豆种皮中凝集素含量的研究不多见,但脱皮工艺对大豆中热不稳定的抗营养因子都会有不同程度的影响。李振田^[4]用ELISA方法检测去皮豆粕几乎不含有大豆凝集素,这一结论在本试验中再次得到证实。从大豆分离蛋白的加工原理上,可知7S组分没有被分离出去,其中的凝集素和β-伴大豆球蛋白几乎不受影响。

3.1.3 大豆球蛋白和β-伴大豆球蛋白 一直以来,有关大豆致敏蛋白活性的检测,没有简单易行的方法,因而比较不同大豆制品中抗原蛋白活性的研究并不多见。以往研究认为,单纯的加热处理对这类蛋白影响不大,尤其对β-伴大豆球蛋白,普通的加工方法(蒸汽处理和烘烤等工艺)不能很好的将它们去除,本试验也得到类似的结论。这在动物试验中得到进一步的证实,孙鹏等^[13]发现蒸汽处理后的大豆球蛋白提纯产物不能造成小鼠过敏,而β-伴

大豆球蛋白的免疫原性却依然存在。然而, Sisson等^[14]和 Li 等^[15]等研究表明, 膨化处理和乙醇溶液提取过程的组合工艺能有效降低大豆抗原蛋白, 本试验的结果与之相符。

3.2 不同大豆加工制品的 SDS-PAGE 分析

用 SDS-PAGE 分析的结果基本与理论分子量相符, 其中大豆分离蛋白的结果与周志红等^[16]的报道结果接近。电泳条带的颜色与蛋白的含量有关, 一般的检测方法从活性的角度证实了适当的加工处理可以有效灭活大豆中抗营养因子, 而电泳分析表明的是蛋白结构的变化, 这与蛋白的特殊活性并不相同, 但二者有很大的关联。膨化大豆和去皮豆粕在 30KD 处各有一条清晰的条带, 可能是由于加工促使蛋白质结构发生改变所导致的。

4 结论

大豆中的抗营养因子在加工过程中, 会不同程度的遭到破坏。在取样的 10 种大豆加工制品中, 膨化处理除去了绝大多数的胰蛋白酶抑制因子、大豆凝集素、大豆球蛋白及 β -伴大豆球蛋白等主要抗营养因子, 是一种较理想的加工工艺; 去皮豆粕中胰蛋白酶抑制因子和大豆凝集素几乎被灭活, 但仍存在一定量的大豆球蛋白及 β -伴大豆球蛋白。

参 考 文 献

[1] Osborne T B, Mendel L B. The use of soybean as food. [J]. Journal of Biological Chemistry, 1917, 32:369.

[2] 杨丽杰, 李素芬, 张永成. 黑龙江几个大豆品种中营养因子含量的分析[J]. 大豆科学, 1999, 1: 32 – 36.

[3] 荆剑, 赵翔, 张页. 大豆凝集素的纯化及其凝集不同肿瘤细胞

的探讨[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 3: 401 – 405.

[4] 何昭阳, 胡桂学, 王春风. 动物免疫学实验技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2005: 71 – 76.

[5] 李振田. 大豆凝集素的检测/纯化和对大鼠抗营养机理的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.

[6] Iwabuchi Setsuko, Yamauchi Fumio. Determination of glycinin and β -conglycinin in soybean protein by immunological methods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35: 200 – 205.

[7] Perez M D, Mills E N C, Lambert N, et al. The use of anti-soya globulin antisera in investigating soya digestion in vivo [J]. Science of Food and Agriculture, 2000, 80: 513 – 521.

[8] Liu K, Markakis P. An improved colorimetric method for determining antitryptic activity in soybean products [J]. Cereal chemistry, 1989, 66(5): 415 – 422.

[9] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [K]. 北京: 科技出版社, 2005: 77 – 92.

[10] 李素芬, 杨丽杰, 霍贵成. 膨化处理对全脂大豆抗营养因子及营养价值的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(3): 193 – 201.

[11] 康玉凡, 李德发, 邢建军. 去皮豆粕的技术工艺和品质控制 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005, 3: 48 – 50.

[12] 于平, 励建荣, 顾振宇, 等. 去除大豆抗营养因子的研究[J]. 营养学报, 2001, 23(4): 383 – 385.

[13] 孙鹏, 秦贵信. 蒸汽处理对纯化大豆抗原含量及免疫原性的影响[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(5): 551 – 554.

[14] Sissons J W, Smith R H, Hewitt D, et al. Prediction of the suitability of soybean products for feeding to preruminant calves by an in-vitro immunochemical method [J]. British Journal of Nutrition, 1982, 47: 311.

[15] Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, et al. Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early-weaned pigs [J]. Journal of Animal Science, 1991, 69: 4062 – 4069.

[16] 周志红, 唐传核, 杨晓泉. 大豆蛋白的体外模拟消化过程及热处理的影响[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 37 – 40.