

微小毛霉凝乳酶对大豆蛋白进行组分分离的研究

刘 钊, 郭顺堂, 吕 莹

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要:大豆球蛋白(7S)和 β -伴大豆球蛋白(11S)是大豆中两种主要的贮藏蛋白,在结构和功能特性上具有很大的差异,广泛应用于食品及非食品领域。传统分离大豆蛋白组分的方法都需要添加还原剂,其残留成为影响人体健康的安全隐患。利用微量凯氏定氮方法比较了微小毛霉凝乳酶作用于大豆蛋白和牛奶蛋白后产生的凝聚效果,发现其对大豆蛋白和牛奶蛋白有着不同的蛋白沉淀率。进一步试验表明:微小毛霉凝乳酶具有特异性的凝聚大豆蛋白11S组分的特性,且这种分离作用与酶反应降低了蛋白溶液的pH值无关。因此,微小毛霉凝乳酶可以用于大豆蛋白7S和11S组分的分离。

关键词:大豆蛋白;大豆球蛋白; β 伴大豆球蛋白;微小毛霉凝乳酶;分离

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2008)04-0654-05

Study on Fractionation of Soybean Protein with Rennase from *Mucor Pusillus*

LIU Zhao, GUO Shun-tang, LÜ Ying

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

Abstract: The major storage proteins in soybeans are glycinin and β -conglycinin, which play important roles in food and nonfood soy protein products due to their different functional properties. In conventional methods, reductants which were bad for consumer health were commonly used to separate soybean glycinin and β -conglycinin. In this study, Rennase made from *Mucor pusillus* was found to have different characteristics in clotting milk proteins and soy proteins by micro-Kjeldahl method. Rennase was found to clot 11S fraction particularly by further researches. The separation was proved not due to the pH value decreasing caused by the rennase simply and may be relevant to the special clotting effect of rennase, and this characteristic could be used to separating 7S and 11S fractions.

Key words: Soybean protein; Glycinin; β -conglycinin; Rennase; *Mucor pusillus*; Fractionation

大豆蛋白质是大豆种子中诸多蛋白质的总称,其中大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白两种组分占贮藏蛋白总量的70%左右^[1]。大豆球蛋白(11S)是一种异质性的蛋白,分子量在340 000~375 000^[2-3],由酸性亚基An和碱性亚基Bn通过二硫键结合而成(An-S-S-Bn)^[4]。 β -伴大豆球蛋白分子(7S)是由 α 、 α' 、 β 三种亚基相组合而成的糖蛋白,分子量为180 000^[5]。由于11S和7S两种组分具有不同的结构和功能特性,如溶解性^[6]、热变性^[7]、凝胶性^[8-9]、起泡性^[10]和乳化性^[11-12]等,所以在食品和非食品大豆蛋白产品中发挥各自不同的作用。

在大豆蛋白组分分离的研究中,Wolf等^[13]首先利用冷沉和硫酸铵分级沉淀的手段得到纯度为91%~93%的11S组分。Thanh等根据在pH6.1~

6.6之间7S和11S组分溶解度不同的特点,提出了直接分离两组分的方法^[14-15],该方法是目前实验室制备7S和11S的主要方法,但7S组分纯度较低。Nagano等^[16]改进了Thanh的方法,提取时用水替代了Tris缓冲溶液,分离时亚硫酸盐替代了巯基乙醇,提高了7S组分的纯度,但因产生了中间产物,7S、11S组分的得率下降。Wu等^[17]利用超滤技术对Nagano的方法进行了改进,去除中间产物,提高了组分得率,但这一方法技术较复杂,不易实现工业化。以上所有的方法都涉及还原剂的添加并且需要一个冷凝过程以达到较好的分离效果。还原剂在最终产品中的残留将对人体健康产生不利影响,而冷凝过程的引入则限制了产品的工业化生产。

微小毛霉凝乳酶是目前微生物凝乳酶中应用最

收稿日期:2008-04-13

作者简介:刘钊(1983-),男,硕士,研究方向大豆蛋白加工利用。E-mail:liuzhao30336@gmail.com。

通讯作者:郭顺堂,教授。E-mail:shuntang@cau.edu.cn。

为广泛的一种,具有蛋白分解力较弱,对牛乳凝固力强的特点^[18]。1964年,Arima发现毛霉属微小毛霉可以产生高活力凝乳酶后,国内外的研究者从微小毛霉凝乳酶的发酵条件、纯化方法、酶学性质及在奶酪和干酪素的生产等方面进行了大量研究。但在利用微小毛霉凝乳酶对大豆蛋白组分进行分离的研究方面还未见报道。

试验发现,微小毛霉凝乳酶对牛奶蛋白和大豆蛋白有着不同的凝聚效果。在进一步研究产生这种差异的原因过程中,发现微小毛霉凝乳酶能特异性的凝聚大豆蛋白11S组分而对7S组分作用不大,在适宜的pH条件下,实现大豆蛋白的组分分离。从而为酶法进行大豆蛋白组分分离技术的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料试剂

脱脂豆粕,秦皇岛益海粮油集团提供。微小毛霉,购自中科院微生物所。凝乳酶($4\,500\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$),自制。

2-巯基乙醇(2-ME),亚硫酸氢钠(SBS),十二烷基硫酸钠(SDS),丙烯酰胺 N,N'-甲叉双丙烯酰胺,过硫酸氨(AP),四甲基乙二氨(TEMED),考马斯亮蓝 R-250,牛血清蛋白(BSA),所用试剂均为进口分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 微小毛霉凝乳酶沉淀脱脂牛奶 把脱脂奶粉加水配成蛋白浓度4%的溶液。向其中加入微小毛霉凝乳酶使浓度分别达到0、1.5、3.0、4.5、6.0、7.5、9.0、10.5、12.0、13.5、15 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$,60℃下反应30 min,3 600 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,测定沉淀部分蛋白量,3次重复。

1.2.2 微小毛霉凝乳酶沉淀大豆蛋白溶液 将脱脂豆粕按1:10的比例加蒸馏水,用2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH调溶液pH到8.5,搅拌1.5 h后,3 600 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心除渣,所得上清液为大豆蛋白溶液,调大豆蛋白溶液蛋白浓度到4%,再调pH6.0,分别加入微小毛霉凝乳酶使其浓度分别达到0、1.5、3.0、4.5、6.0、7.5、9.0、10.5、12.0、13.5、15.0 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$,60℃下反应30 min,3 600 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,测定沉淀部分蛋白量,重复3次。

1.2.3 微小毛霉凝乳酶进行大豆蛋白组分分离 按1.2.2配制大豆蛋白溶液,调pH 5.6,加入微小

毛霉凝乳酶使其浓度分别达到12 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$,60℃下反应30 min,3 600 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,沉淀部分即为11S组分。用2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl调上清部分pH值到4.5,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,沉淀部分即为7S组分。

1.2.4 酶反应过程中pH变化与组分分离效果之间的关系 A1:按1.2.2配制大豆蛋白溶液,调pH 5.6,60℃保温30 min,3 600 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,沉淀部分即为11S组分。用2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl调上清部分pH值到4.5,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,沉淀部分即为7S组分。对两组分分别进行电泳分析。

A2:按1.2.2配制大豆蛋白溶液,调pH5.55,60℃保温30 min,3 600 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,沉淀部分即为11S组分。用2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl调上清部分pH值到4.5,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,沉淀部分即为7S组分。对两组分分别进行电泳分析。

A3:按1.2.2配制大豆蛋白溶液,调pH5.6,60℃保温30 min,3 600 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清部分再调pH5.6,加热到60℃,添加12 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的微小毛霉凝乳酶,60℃保温30 min,3 600 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,对上清、沉淀部分分别进行电泳分析。

1.2.5 蛋白质含量的测定 微量凯氏定氮法(N×6.25)。

1.2.6 SDS-PAGE 鉴定分离效果和蛋白组分纯度 SDS-PAGE 采用Laemmli的方法^[19],采用不连续垂直板状凝胶电泳。凝胶厚度1 mm,浓缩胶浓度为4%,分离胶浓度为12.5%。

1.2.7 电泳凝胶分析 用Scion Image软件分析对图像进行处理和分析,根据各谱带峰面积的大小,分析每个电泳样品的蛋白组成。

2 结果与讨论

2.1 微小毛霉凝乳酶对脱脂牛奶与大豆蛋白溶液中蛋白凝聚作用的比较

微小毛霉凝乳酶对牛奶蛋白和大豆蛋白都具有不同程度的凝聚作用。微小毛霉凝乳酶的添加量与其凝聚牛奶蛋白与大豆蛋白溶液中蛋白量的关系如图1所示。在用微小毛霉凝乳酶凝聚脱脂牛奶时,随着酶添加量的增加,蛋白沉淀量变化不大;当酶的浓度达到4.5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后,随着酶添加量的增加,蛋白沉淀量急速增加,并在9 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时达到最高值;然后,酶添加量的增加对蛋白沉淀量的影响不大。采用微小毛霉凝乳酶凝聚大豆蛋白溶液时,随着酶

添加量的增加,大豆蛋白溶液中蛋白沉淀量缓慢增加。

微小毛霉凝乳酶能使 85.38% 的牛奶蛋白质发生凝聚并沉淀下来,而其沉淀大豆蛋白的最大量为 47.32%,考虑到 pH6.0 时,大豆蛋白在不加酶条件下也能产生 36.47% 的沉淀,那么微小毛霉凝乳酶只能促进 11% 的大豆蛋白发生沉淀。由此可见,微小毛霉凝乳酶对脱脂牛奶和大豆蛋白溶液中蛋白的凝聚作用差异很大。

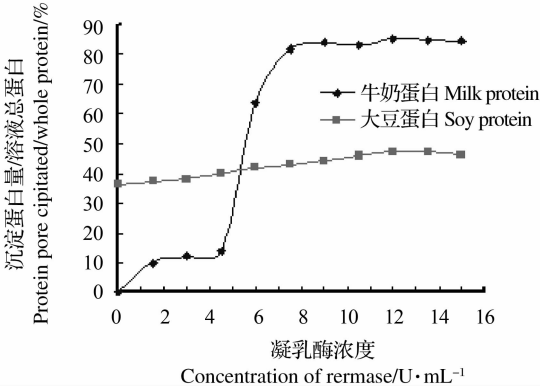


图1 微小毛霉凝乳酶凝聚脱脂牛奶与大豆蛋白溶液的比较

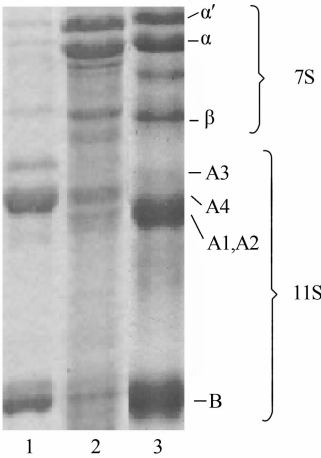
Fig.1 Comparison of clotting effects of mucor pusillus chymosin on defatted milk and soybean protein solution

2.2 微小毛霉凝乳酶沉淀大豆蛋白溶液的组分分析

在 pH6.0 的条件下,微小毛霉凝乳酶能使 47.32% 的大豆蛋白沉淀下来,大量的蛋白仍溶解于上清中。为了明确其原因,用 SDS - PAGE 凝胶电泳分析了沉淀部分与上清部分在蛋白组成上的差异,结果如图 2 所示。与大豆全蛋白溶液相比,沉淀部分的大豆蛋白以 11S 组分为主,而上清部分的大豆蛋白以 7S 组分为主。由此可见,针对不同的大豆蛋白组分,微小毛霉凝乳酶对大豆蛋白的凝聚作用是不同的。蛋白质的沉淀主要是由于蛋白之间发生凝聚,形成了大的粒子,因此微小毛霉凝乳酶可能主要对 11S 组分产生较强的凝聚作用,从而离心后能使其沉淀;而对 7S 组分可能不产生或很少产生凝聚作用,离心后 7S 组分仍然以可溶的形式存在于上清中。

2.3 微小毛霉凝乳酶进行大豆蛋白组分分离

由于 7S,11S 组分的等电点不同(7S 的等电点为 4.8 ~ 4.9,11S 的等电点为 6.4) [20],在调节大豆蛋白溶液 pH 值的过程中,随着 pH 值的降低,可溶



1:pH6.0 时微小毛霉凝乳酶作用后的沉淀部分;2:pH6.0 时微小毛霉凝乳酶作用后的上清部分;3:全大豆蛋白液
1: insoluble fraction of soybean protein treated with rennase at pH6.0;2: soluble fraction of soybean protein treated with rennase at pH6.0;3: soybean protein solution

图2 酶作用于大豆蛋白溶液后溶解和沉淀部分的电泳分析

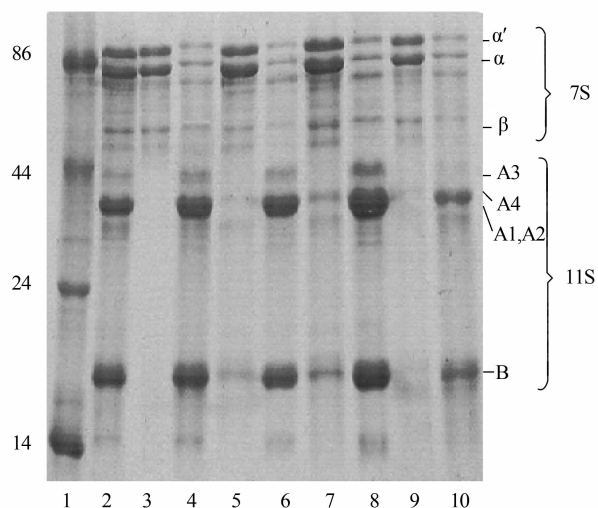
Fig.2 Urea-SDS-PAGE of soluble and insoluble fractions of soybean protein after rennase reaction

部分和粒子部分中蛋白组分变化很大。pH5.5 左右时,可溶性部分中 7S 约占 60%,凝聚的粒子部分 11S 约占 90% [21]。微小毛霉凝乳酶在 pH4 - 8 范围稳定且随着 pH 值的降低酶活力逐渐升高 [22]。综合以上两方面,为了更好的研究微小毛霉凝乳酶进行大豆蛋白组分分离的可行性,提高分离效果,在进一步研究微小毛霉凝乳酶对大豆蛋白组分分离时,调节溶液 pH 值到 5.6,使酸沉 11S 作用与酶沉 11S 作用相结合,达到更好的分离效果。此方法制得的 7S 组分、11S 组分的电泳如图 3 泳道 3、4 所示。与图 2 泳道 2、3 相比较,pH5.60 条件下 11S 组分纯度与 pH6.0 条件下的相当,而 7S 组分纯度显著提高。这提示可以通过进一步调整反应初始 pH 值来对分离工艺进行优化。经过光密度扫描分析,得到的 7S 组分纯度达到 85%,11S 组分纯度达到 80%,实现了组分分离的目的。

2.4 pH 变化对分离效果的影响

在 1.2.4 试验中,发现酶反应后溶液的 pH 值由初始的 5.6 变为 5.55。为了验证微小毛霉凝乳酶对大豆蛋白组分的分离作用是否由 pH 值的变化引起,进行了不加酶,只调节大豆蛋白溶液 pH 值至 5.6(A1);不加酶,调节大豆蛋白溶液 pH 值到 5.55(A2)。为了证明微小毛霉凝乳酶对大豆蛋白中

11S 蛋白的凝聚作用,先调节反应初始 pH 值 5.6,离心,然后对上清再添加酶(A3)。用 SDS - PAGE 凝胶电泳对各种处理的沉淀和上清部分进行的组分分析比较,结果如图 3 所示。



1 - 10 依次为低分子量标准蛋白,低温脱脂豆粕蛋白,酶法分离得到的 7S 组分,酶法分离得到的 11S 组分,A2 得到的 7S 组分,A2 得到的 11S 组分,A3 得到的 7S 组分,A3 得到的 11S 组分,A4 的上清部分,A4 的沉淀部分。

1. molecular weight standard, numbers on the left of the picture denote molecular weights in kDa; 2. soybean white flakes; 3. β - conglycinin fraction of the rennase method; 4. glycinin fraction of the rennase method; 5. β - conglycinin fraction of A1 procedure (pH5.6); 6. glycinin fraction of A1 procedure (pH5.60); 7. β - conglycinin fraction of A2 procedure (pH5.55); 8. glycinin fraction of A2 procedure (pH5.55); 9. soluble fraction of A3 procedure; 10. insoluble fraction of A3 procedure

图 3 各试验的不同组分电泳分析

Fig. 3 Urea - SDS - PAGE of selected fractions

利用微小毛霉凝乳酶对大豆蛋白进行组分分离得到的 7S, 11S 组分纯度显著高于 A1、A2 两个对照中相应组分的纯度。说明微小毛霉凝乳酶对大豆蛋白的组分分离不是由微小毛霉凝乳酶与大豆蛋白的反应降低了溶液的 pH 值而引起的。A3 中,对离心后的上清液再加入酶后产生了新的沉淀,说明了微小毛霉凝乳酶确实使一部分在未加酶条件下不能沉淀的组分沉淀出来。同时,SDS - PAGE 凝胶电泳结果也表明,利用凝乳酶从上清中再次沉淀出的大豆蛋白主要以 11S 组分为主(图 3 泳道 10)。这一结果进一步说明了微小毛霉凝乳酶对大豆蛋白不同组分具有特异的凝聚作用。

3 结论

微小毛霉凝乳酶对大豆蛋白 7S 和 11S 组分的凝聚作用差异很大。在一定的条件下,11S 组分能被微小毛霉的蛋白酶凝聚,而 7S 组分很难被其凝聚下来。这一性质与凝乳酶的酶反应改变了溶液的 pH 值没有明显关系。这一特性,为今后进行微小毛霉凝乳酶对大豆蛋白进行组分分离技术的深入研究提供了理论依据。

参考文献

- [1] Derbyshire E, Wright D B, Bloulter L. Storage protein of legume seeds [J]. *Phytochemistry*, 1976, 15: 3 - 24.
- [2] Kitamura K, Takagi T, Shibasaki K. Subunit structure of soybean 11S globulin [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1976, 40 (9): 1837 - 1844.
- [3] Utsumi S, Inaba H, Mori T. Heterogeneity of soybean glycinin [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20: 585 - 589.
- [4] Badley R A, Atkinson D, Hauser H, et al. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin [J]. *Biochemistry Biophysics Acta*, 1975, 41: 224 - 228.
- [5] Thanh V H, Shibasaki K. Major proteins of soybean seed. Subunit structure of β - conglycinin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1978, 26: 692 - 295.
- [6] Yao J J, Tanteeratarom K, Wei L S. Effects of maturation and storage on solubility, emulsion stability and gelation properties of isolated soy proteins [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1990, 67 (12): 974 - 979.
- [7] Tezuka M, Yagasaki K, Ono T. Changes in characters of soybean glycinin groups I, II a, and II b caused by heating [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 1693 - 1699.
- [8] Utsumi S, Kinsella J E. Force involve in soy protein gelation effect of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat - induced made from 7S, 11S and soy isolate [J]. *Journal of Food Science*, 1985, 50: 1278 - 1282.
- [9] Hashizume K, Nakamura N, Watanate T. Influence of ionic strength on conformation changes of soybean proteins caused by heating, and relationship of its conformation changes to gel formation [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1975, 39: 1339 - 1347.
- [10] Fukushima D. Structures of plant storage proteins and their functions [J]. *Food Reviews International*, 1991, 7 (3): 353 - 379.
- [11] Aoki H, Taneyama O, Inami M. Emulsifying properties of soy protein; Characteristics of 7S and 11S proteins [J]. *Jouranal of Food Science*, 1980, 445 (3): 534 - 538.
- [12] Nir I, Feldman Y, Aserin A, et al. Surface properties and emulsification behavior of denatured soy proteins [J]. *Journal of Food Science*, 1994, 59: 606 - 609.
- [13] Wolf W J, Babcock G E, Smith A K. Purification and stability studies of the 11S component of soybean proteins [J]. *Archives of Bio-*

- chemistry and Biophysics, 1962, 99: 265 – 274.
- [14] Thanh V H, Okubo K, Shibasaki K. Isolation and characterization of the multiple 7S globulins of soybean [J]. Plant Physiology, 1975, 56: 19 – 22.
- [15] Thanh V H, Okubo K, Shibasaki K. Major proteins of soybean seeds a straight forward fraction and their characterization heterogeneity of beta – conglycinin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1976, 24: 1117 – 1121.
- [16] Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40: 941 – 944.
- [17] Wu S, Murphy P A, Johnson L A, et al. Simplified process for soybean glycinin and β – conglycinin fractionation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 2702 – 2708.
- [18] 周俊清, 林亲录. 微生物源凝乳酶的研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2004, 2: 6 – 9. (Zhou J Q, Lin Q L. Studies on the production of chymosin by microorganisms [J]. China Food Additives, 2004, 2: 6 – 9.)
- [19] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ [J]. Nature, 1970, 227: 680 – 685.
- [20] Wolf W J. Physical and chemical properties of soybean proteins [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1997, 54 (2): 112 – 117.
- [21] 韩雅君. 大豆分离蛋白的组分分离技术研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2006. (Han Y J. The study of industrial technology of preparing 7S – rich and 11S – rich soybean protein isolate [D]. Beijing: China Agricultural University, 2006.)
- [22] 碱性蛋白酶 Alcalase 凝固豆浆机理的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005. (Luan G Z. Studies on the mechanism of soymilk coagulation by an alkaline proteinase – alcalase [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005.)



第八届世界大豆研究大会将在北京召开

由中国农业科学院和中国作物学会联合主办、中国农业科学院作物科学研究所承办的第八届世界大豆研究大会将于 2009 年 8 月 10 ~ 15 日在北京召开。本次大会的主题是“描绘全球大豆产业蓝图, 保障安全供给与可持续发展”, 学术议题包括大豆种质资源、遗传育种、分子生物学与生物技术、生理与生产、作物保护、储藏与加工、产品与应用、供求与贸易等。

大会将充分宣传和展示我国在大豆科研和产业发展方面的成就, 加深我国大豆科技工作者和产业界人士对世界大豆科研进展的了解, 促进中外大豆科技信息交流, 加快国外大豆种质资源和技术引进, 提高我国大豆生产能力和产品的国际竞争力; 为决策部门借鉴其他国家的成功经验, 进一步调整大豆产业的相关政策, 推动我国大豆产业的发展提供依据。大会除开展学术交流外, 还将附设大豆新技术、新产品展览。

第八届世界大豆研究大会组委会热忱欢迎国内外大豆专家和企业界人士积极参会。

大会组委会秘书处联系方式如下:

地 址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号 中国农业科学院作物科学研究所

邮 编: 100081

电 话: 010 – 62142730

传 真: 010 – 62142730

大会网站: www.wsrc2009.cn

电子邮箱: wsrc2009@caas.net.cn