

双极膜电酸沉提取大豆分离蛋白效率的研究

陈颖岚, 郭顺堂

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:双极膜电酸沉技术在分离提取大豆分离蛋白方面具有广阔的应用前景,同时该技术也存在易受蛋白污垢影响的缺点。比较了在没有外加物质的影响下,双极膜电酸沉技术与化学酸沉法提取大豆蛋白的效果;分析了双极膜间残留蛋白质及其对双极膜提取速率的影响。结果表明:双极膜电酸沉技术比化学酸沉法更具优势;双极膜提取速率随酸沉程度的增加而降低,在连续电酸沉 4 次后,膜间残留的蛋白质对双极膜提取速率造成显著性影响。

关键词:双极膜电酸沉;化学酸沉;残留蛋白;提取速率

中图分类号:TS214 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2008)06-1024-04

Studies on Bipolar Membrane Electrochemical Acidification for Precipitation of Soybean Proteins

CHEN Ying-lan, GUO Shun-tang

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

Abstract: Bipolar membrane electro-acidification (BMEA) has a wide-ranging application potential in production of soybean protein isolate, although with the disadvantage of the susceptibility to blocking. In this study, chemical acidification and BMEA for precipitation of soybean proteins were compared without additive in the soybean protein concentrate (SPC), the effect of the spacer fouling on the efficiency of BMEA was evaluated by one-factor analysis of variance. The result showed that BMEA precipitated more soybean proteins than chemical acidification, the ash content of the electro-acidified samples was lower than that of the chemical acidified samples, the efficiency of BMEA decreased as the concentration of the isolated protein increased, and the spacer fouling ($P < 0.05$) had a significant effect on the efficiency of BMEA after electro-acidifying 4 times successively.

Key words: Bipolar membrane electro-acidification; Chemical acidification; Protein deposit; BMEA efficiency

大豆分离蛋白是食品行业广泛应用的生产配料和营养剂,其生产多采用碱提酸沉的生产工艺,原理和方法简单,为我国大豆蛋白企业普遍采用。但是,从节约资源和减少对环境的污染来看,该方法仍存在水和酸碱消耗量大、产品灰分含量高等问题^[1-2]。

针对上述问题,由电渗析技术发展而来的双极膜电酸沉技术的应用引起了广泛的关注^[3]。双极膜由阳离子交换层、阴离子交换层和亲水界面组成。在外加电流作用下,水分子在双极膜解离为 H^+ 和 OH^- 并透过各自的离子交换层进入溶液^[4]。1996 年,Laurent Bazinet 等开始对双极膜电酸沉技术分离大豆蛋白进行了研究。研究表明,双极膜电酸沉法

可沉淀约 95% 的大豆蛋白,能耗低,避免了酸的加入,产生的碱也能重复利用,大大减少了水的用量,并且所得分离蛋白与商业标准相比,具有蛋白质含量高、灰分含量低、溶解性好、乳化性和起泡性与碱溶酸沉法相近等特点^[5]。但是双极膜也存在易受蛋白污垢影响的缺点^[2]。在前期研究中笔者发现沉淀出的蛋白质会残留在双极膜间,并对提取速率造成一定影响。为此,研究分析了没有外加任何离子的大豆蛋白提取液的双极膜电酸沉情况,以及膜间残留蛋白对双极膜提取速率的影响,为双极膜电酸沉技术用于大豆分离蛋白的工业化生产提供依据。

收稿日期:2008-04-23

作者简介:陈颖岚(1983-),女,硕士研究生,研究方向为蛋白质加工利用。E-mail:marrisea@163.com。

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

1 材料与方法

1.1 材料

蛋白提取液的制备:称取一定量的低温脱脂豆粕,与10倍的50℃水混合打浆,加少量消泡剂消除泡沫,中性或碱性(调pH值到8.0)、50℃条件下搅拌1h。然后离心除去豆渣,得到大豆蛋白溶液,蛋白质含量约为 $25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2 方法

1.2.1 电酸沉装置 EX3B型电酸沉装置,由日本ASTOM株事会社生产(膜的有效面积为 0.055 m^2)。装置组成如图1,共有20片阳膜和21片BP-1E双极膜,有蛋白溶液(循环1)、水(循环2)、5% Na_2SO_4 溶液(循环3)三个循环。两极的电压变化范围为 $0\sim35\text{ V}$,流速为 $1.5\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.2.2 试验设计 在双极膜电酸沉大豆蛋白的过程中,蛋白浓度是主要影响因素^[6-7];升高温度能增加能效,但不改变最终蛋白沉淀率^[8]。因此确定参数如下:每次室温条件下处理浓度约 $25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白样液300 mL,双极膜电酸沉的电压控制在35 V,当蛋白溶液的pH值达到4.3时停止循环。化学酸沉用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ HCl}$ 。中性蛋白提取液的初始pH值为6.5左右,碱性蛋白提取液的初始pH值为7.6左右。

将同一中性蛋白提取液分别进行双极膜电酸沉和化学酸沉,pH值每下降0.2取5 mL溶液,离心($4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,5 min),测定上清中的可溶性蛋白含量,沉淀进行电泳。比较双极膜电酸沉和化学酸沉蛋白的效果差异。

将碱性蛋白提取液进行双极膜电酸沉,pH值每下降0.3取5 mL溶液,离心($4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,5 min),测定上清中的可溶性蛋白含量,沉淀进行电泳。确定碱性蛋白液提取过程中pH值。

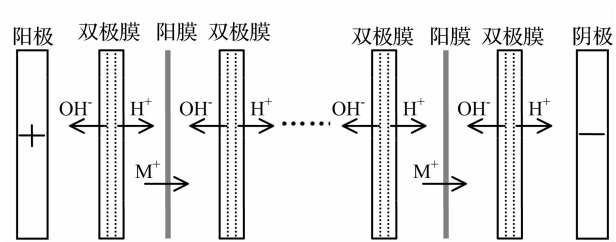


图1 双极膜电酸沉装置

Fig. 1 Bipolar membrane electro-acidification cell

根据上述试验确定的pH值,将同一碱性蛋白

提取液分成两批,第一批分别电酸沉到不同pH值时停止,对双极膜造成不同程度的污染,然后再进行第二批电酸沉到pH4.3。与彻底清洗的双极膜酸沉到pH4.3的时间变化曲线相比较,分析单次上样残留蛋白对双极膜酸沉速率的影响。

将同一碱性蛋白提取液分为5批上样,每批酸沉到pH4.3时停止,两批上样间不清洗膜。分别做pH-时间变化曲线,分析多次连续上样对双极膜分离蛋白速率的影响。

1.2.3 可溶性蛋白含量的测定 以牛血清蛋白(BSA)为标样,采用Bradford的方法测定可溶性蛋白质含量^[9]。

1.2.4 灰分含量的测定 根据GB/T6438-1992测定。

1.2.5 蛋白沉淀成分分析 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[10]。

2 结果与分析

2.1 双极膜和化学酸沉法提取大豆蛋白效果比较

用中性蛋白提取液分别进行双极膜和化学酸沉,由图2~4可以看出,与化学酸沉相比,双极膜电酸沉大豆分离蛋白表现出相同的沉淀规律。随pH值的下降,11S首先开始大量沉淀,在一定pH范围内11S的沉淀量减少,但还没达到7S等电点,可溶性蛋白含量变化缓慢,当达到7S等电点时7S开始大量沉淀,pH下降到5.0以下时,蛋白沉淀速度减慢并趋于恒定。但是对于化学酸沉法和双极膜法,7S的等电点有所偏差。从图3、4可以看出,化学酸沉法在溶液pH5.5时7S开始沉淀,而双极膜法在

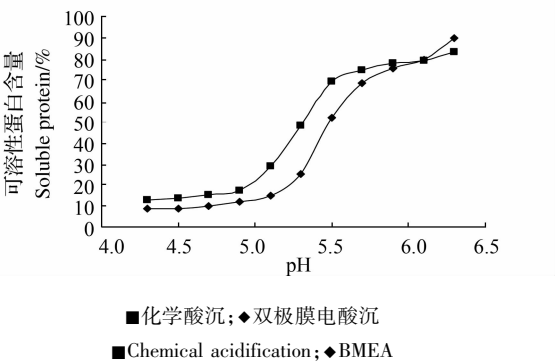


图2 双极膜电酸沉和化学酸沉的可溶性蛋白含量随pH值变化

Fig. 2 Percentage of soluble proteins in the protein solution during bipolar membrane electro-acidification and chemical titration

溶液 pH 5.7 时 7S 就开始沉淀了。这可能与两者溶液中不同的离子强度有关。当溶液 pH 下降到 4.3 时,双极膜电酸沉的蛋白沉淀率达到 92%,灰分含量 2.51%;化学酸沉法的蛋白沉淀率为 88%;灰分含量 2.96%。说明在双极膜电酸沉过程中,有部分阳离子在电场作用下转移到了碱室,使得灰分含量下降^[2,7]。

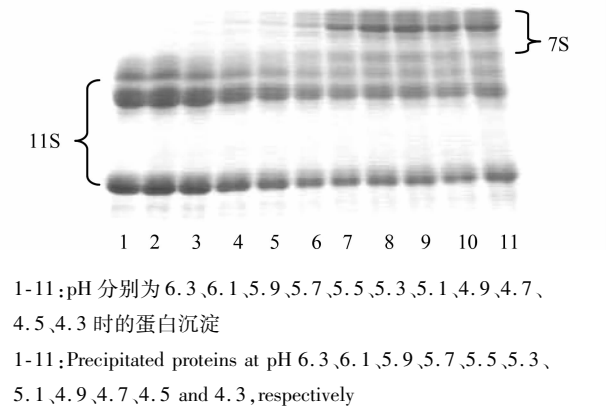


图3 化学酸沉大豆蛋白的 SDS- PAGE 图谱
Fig.3 SDS- PAGE pattern of precipitated proteins by chemical acidification

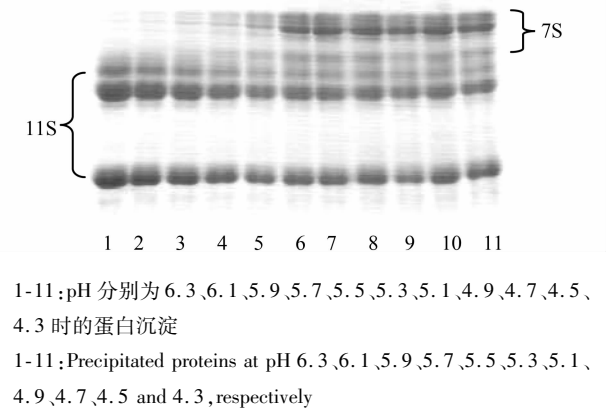


图4 双极膜电酸沉大豆蛋白的蛋白沉淀 SDS- PAGE 图谱
Fig.4 SDS- PAGE pattern of precipitated proteins by bipolar-membrane electro-acidificatio

2.2 单次酸沉的残留蛋白对双极膜提取速率的影响

用碱性蛋白提取液进行双极膜蛋白分离,并对蛋白沉淀进行了 SDS- PAGE 图谱分析,由图 5、6 可以看出,pH 6.1 时蛋白沉淀速率显著增加,pH 5.5 时 7S 开始大量沉淀,pH 5.2 时蛋白沉淀速率变缓。由于 pH 6.1 时还有 70% 以上的蛋白未沉淀,因此分析了双极膜样液在 pH 5.8、5.2、4.3 时的膜污染情况。

分别将碱性蛋白提取液在双极膜装置中运转到 pH 5.8、5.2、4.3 时停止,不清洗双极膜,再通入

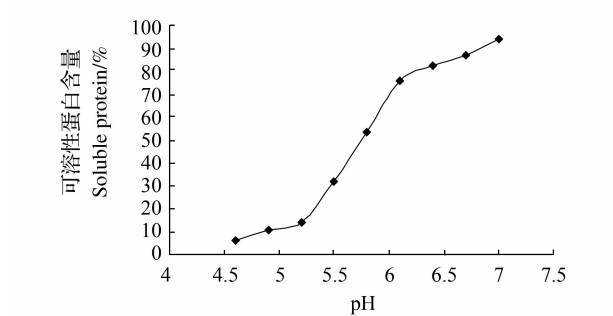


图5 双极膜电酸沉的可溶性蛋白含量随 pH 值变化
Fig.5 Percentage of soluble proteins in the protein solution during bipolar membrane electro-acidification

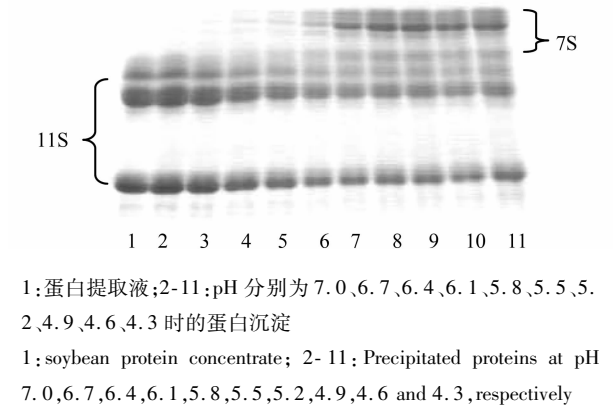
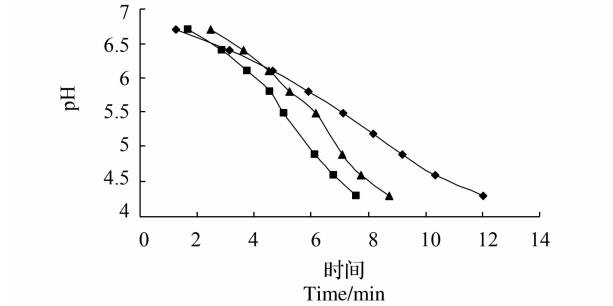


图6 双极膜电酸沉沉淀的蛋白 SDS- PAGE 图谱
Fig.6 SDS- PAGE pattern of precipitated proteins by bipolar-membrane electro-acidification



◆第一批酸沉到 pH 4.3 时,第二批酸沉的 pH- 时间;■第一批酸沉到 pH 5.2 时,第二批酸沉的 pH- 时间;▲第一批酸沉到 pH 5.8 时,第二批酸沉的 pH- 时间
◆Stop at pH 4.3 at the 1st time; ■Stop at pH 5.2 at the 1st time; ▲Stop at pH 5.8 at the 1st time

图7 单次酸沉残留蛋白对双极膜提取速率的影响
Fig.7 Effect of fouling produced by single BMEA on the efficiency of bipolar membrane

第二批蛋白液,在相同条件下运转到 pH 4.3 时停止。由图 7 可以看出,随着酸沉程度的增加,双极膜电酸沉速率降低。分别将三次电酸沉的 pH 下降速

率与彻底清洗双极膜后的 pH 下降速率进行比较,单因素方差分析得出第一批蛋白液酸沉到 pH5.8、5.2、4.3 时,残留的蛋白均对双极膜的酸沉速率没有造成显著性影响($P < 0.05$)。

2.3 多次连续酸沉的残留蛋白对双极膜提取速率的影响

将碱性蛋白液分 5 次分别进行电酸沉到 pH 4.3,每次之间不清洗双极膜。由图 8 可以看出,随着酸沉次数的增加,双极膜的酸沉速率逐渐降低。对每次电酸沉的 pH 下降速率进行单因素方差分析得出,在连续酸沉到第 5 次时,之前残留的蛋白对双极膜的提取效率造成了显著性影响($P < 0.05$)。

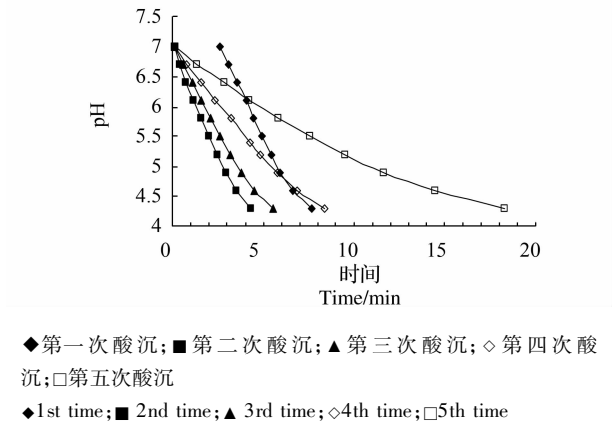


图 8 多次连续酸沉残留蛋白对双极膜提取速率的影响

Fig. 8 Effect of fouling produced by multiple BMEA on the efficiency of bipolar membrane

3 结论

双极膜能用于大豆分离蛋白的分离提取。在相同条件下,双极膜分离大豆分离蛋白的沉淀率、灰分含量均优于化学酸沉法。

随着酸沉程度和酸沉次数的增加,残留在双极膜间的蛋白质对双极膜分离蛋白的影响加大,电酸沉速率降低。单次酸沉对双极膜的分离速率没有产

生显著性影响,但是在连续酸沉 4 次后,残留的蛋白对双极膜的提取速率产生了显著性影响。因此,在连续电酸沉 4 次后,必须彻底清洗双极膜。

参考文献

[1] 韦艳姿. 大豆蛋白的电化学分离提取技术及提取物的功能特性[D]. 北京:中国农业大学,2006. (Wei Y Z. Study on the electro-chemistry separation and extraction technology of soybean protein and the functional properties of production[D]. Beijing: China Agricultural University,2006.)

[2] Bazinet L, Lamarche F, Ippersiel D. Bipolar-membrane electro-dialysis: applications of electrodialysis in the food industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 1998, 9:107-113.

[3] Bazinet L, Lamarche F, Labrecque R, et al. Effect of number of bipolar membranes and temperature on the performance of bipolar membrane electroacidification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45:3788-3794.

[4] Mani K N. Electrodialysis water splitting technology[J]. Journal of Membrane Science, 1991, 58, 117-138.

[5] Bazinet L, Lamarche F, Labrecque R, et al. Electroacidification of soybean proteins for production of isolate[J]. Food Technology, 1997, 5(9):52-60.

[6] Bazinet L, Lamarche F, Labrecque R, et al. Effect of KCl and soy protein concentrations on the performance of bipolar membrane electroacidification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45:2419-2425.

[7] Bazinet L, Lamarche F, Ippersiel D. Ionic balance: a closer look at the K^+ migrated H^+ generated during bipolar membrane electro-acidification of soybean proteins[J]. Journal of Membrane Science, 1999, 154:61-71.

[8] Bazinet L, Lamarche F, Labrecque R, et al. Effect of number of bipolar membranes and temperature on the performance of bipolar membrane electroacidification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45:3788-3794.

[9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72, 248-254.

[10] 韩雅君. 大豆分离蛋白的组分分离提取技术研究[D]. 北京:中国农业大学,2004. (Han Y J. The study of industrial technology of preparing 7S-rich and 11S-rich soybean protein isolate[D]. Beijing: China Agricultural University, 2004.)

参考文献著录格式

4. 专著中的析出文献
著录格式:

[序号]析出文献主要责任者. 析出文献题名[文献类型标志](电子文献必备,其他文献任选)// 原文献主要责任者. 原文献题名. 出版地:出版者,出版年:析出文献起止页码.

例:

[1] 钟文发. 非线性规划在可燃毒物配置中的应用[C]//赵玮. 运筹学的理论与应用 - 中国运筹学会第五届大会论文集. 西安:西安电子科技大学出版社,1996:468 - 471.

[2] 王家益. 1995 年湖南省交通肇事逃逸案件[G]//公安部交管局. 49 ~ 99 五十年交通事故统计资料汇编. 北京:群众出版社,2000.