

# 大豆乳清蛋白的热促凝聚及其对分离蛋白功能性的影响

叶凌凤, 徐婧婷, 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:** 分别在 pH8.0 和 pH4.5 对“碱提酸沉”法制备大豆分离蛋白过程中所得提取液进行热处理, 研究了大豆乳清蛋白的热促凝聚效果及其对所制备分离蛋白功能性的影响。结果表明: 加热处理可降低大豆乳清中乳清蛋白的含量, 在 pH8.0 和 pH4.5 时提取液经 70℃ 加热 10 min 分别使 25.7% 和 40% 乳清蛋白转移到分离蛋白产品中。以普通分离蛋白为对照, 对 3 种分离蛋白产品进行功能性分析, 发现 3 种产品均在 pH4.5 ~ 4.8 的范围内溶解度最小, 70℃ 加热 10 min 所制备分离蛋白的持水性明显高于普通分离蛋白, 但其持油性、起泡性、泡沫稳定性和乳化性均低于普通分离蛋白, 而乳化稳定性无显著差异。

**关键词:** 大豆乳清蛋白; 碱提酸沉; 热促凝聚; 功能性质

中图分类号: TS214.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)02-0288-04

## Thermal Aggregation of Soybean Whey Protein and Its Effect on the Functional Properties of Soy Proteins

YE Ling-feng, XU Jing-ting, GUO Shun-tang

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

**Abstract:** The reclamation of soybean whey protein (WSP) can bring economic benefits and reduce environmental pollution during soybean protein production. Extracts at pH 8.0 and pH4.5 were heated to observe the thermal aggregation of WSP and its effect on the functional properties of soy proteins. Results showed that heat treatment reduced the content of WSP in soybean whey, extracts at pH 8.0 and pH4.5 were heated by 70℃ with 10 minute diverted 25.7% and 40% WSP into soybean proteins Isolated (SPI), respectively. Functional properties analysis of three kinds SPI indicated that they all had the minimum solubility during pH4.5-4.8. SPI preparing by heated by 70℃ with 10 minute had higher water holding property than common SPI, but had lower oil holding property, foaming property and foaming stability than common SPI, and had no significant difference for emulsify stability.

**Key words:** Soybean whey protein; Alkali extraction and acid precipitation; Thermal aggregation; Functional properties

“碱提酸沉”法是制备大豆分离蛋白的常规方法, 将豆粕用偏碱性的水为溶剂进行抽提, 绝大部分大豆蛋白质可被提取出来。由 11S 和 7S 构成的大豆球蛋白在 pH4.5 时会沉淀析出, 该部分沉淀所得蛋白即为大豆分离蛋白(SPI)<sup>[1]</sup>。而有少部分蛋白在此酸性条件下稳定, 称为大豆乳清蛋白(WSP), 约占大豆蛋白的 10%<sup>[2]</sup>, 主要是脂肪氧化酶(102 000Da)、β-淀粉酶(61 700Da)以及在 pH2.2 ~ 10.8 的范围内均稳定的凝集素(33 000Da)和在 pH3.0 ~ 10.0 内稳定的胰蛋白酶抑制剂(20 000Da)<sup>[3]</sup>。因乳清中的这些蛋白不能被酸沉和回收, 常常被当作废液排放掉, 造成了巨大的资源浪费和环境污染。有些企业曾尝试采用传统的蒸发浓缩方法回收乳清蛋白, 但因为蛋白质浓度太低, 回收时耗能太高, 经济效益差而无法得到应用。

膜处理方法被认为是处理乳清废水回收乳清大豆蛋白的好方法, 但由于乳清中大分子有机物质的浓度极差化效应, 使膜的通透量显著降低, 对膜造成严重污染, 膜再生时费时费水, 以至于无法正常运行<sup>[4-5]</sup>。乳清蛋白具有热促凝聚效果, 在加热条件下, WSP 可产生沉淀, 因此可通过热促凝聚 WSP, 并将其回收利用。利用这一原理, 探讨大豆分离蛋白生产过程中对不同 pH 条件下所得溶液进行适当的热处理, 研究 WSP 的热凝聚沉淀效果及其对分离蛋白功能性的影响, 以期 WSP 的回收利用提供新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

脱脂豆粕, 安阳漫天雪食品制造有限公司提

收稿日期: 2009-10-26

第一作者简介: 叶凌凤(1986-), 男, 在读硕士, 研究方向为蛋白质加工利用。E-mail: yelingfeng\_1147@163.com。

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

供。过硫酸铵、丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、溴酚蓝、三氯乙酸、脲等均为北京化学试剂公司分析纯产品;牛血清白蛋白(BSA)购自北京天来生物医学科技有限公司;考马斯亮蓝 G-250、 $\beta$ -巯基乙醇为 Sigma 公司产品;N,N'-甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺为 Fluka 公司产品。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 大豆分离蛋白的制备** 采用传统的碱提酸沉法制备大豆分离蛋白,将脱脂豆粕与蒸馏水以 1:10 的比例混合,用  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 调整混合物的 pH 为 8.0,充分搅拌 1.5h,离心分离,用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 调整上清液的 pH 值为 4.5,所得沉淀为大豆分离蛋白。分别将在 pH8.0 和 pH4.5 时提取液进行 70℃ 加热 10 min,冰浴至室温后,制备大豆分离蛋白,水洗蛋白沉淀 2 次,复溶后用  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液调 pH 至 7.0,并进行喷雾干燥制粉,同时以普通 SPI 为对照,进行相关功能性的测定。

**1.2.2 大豆乳清蛋白的加热凝聚** 量取 3 份弃去沉淀后的蛋白质提取液(pH8.0)和调酸后的提取液(pH4.5)各 30 mL,分装于 3 个试管中,分别置于 60、65、70℃ 水浴中保持 10 min,然后移入冰水浴中冷却至室温,按照 1.2.1 步骤分别制备分离蛋白,并收集乳清。

**1.2.3 可溶性蛋白含量的测定** 精确量取 1 mL 样品加蒸馏水稀释 3 倍,以牛血清白蛋白为标样,采用 Bradford 法<sup>[6]</sup>测定乳清中可溶性蛋白的含量。

**1.2.4 大豆乳清蛋白的电泳分析** 分别量取经热处理后的 pH8.0 和 pH4.5 提取液制备分离蛋白所得乳清 5 mL 于离心管中,再分别加入 5 mL 24% 三氯乙酸溶液,使混合液中的三氯乙酸浓度为 12%,混合后静置 30 min,4 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,弃去上清,并用甲醇和乙醚的混合液洗涤沉淀 2 次,风干后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[7]</sup>。

**1.2.5 溶解性的测定** 配制 1% (w/v) 大豆蛋白溶液,平衡 45 min,分别调节 pH2,3,4,5,6,7,8,9,各取 5 mL 在 1 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液稀释 10 倍后,用 Bradford 法<sup>[6]</sup>测定其蛋白含量。3 次重复。

**1.2.6 持水性和持油性的测定** 参考韦艳姿<sup>[8]</sup>的方法。

**1.2.7 起泡性和泡沫稳定性的测定** 参考 Morr 等<sup>[9]</sup>的方法。

**1.2.8 乳化性和乳化稳定性的测定** 参考 Kevin 等<sup>[10]</sup>和 Bernard 等<sup>[11]</sup>的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 加热对大豆乳清蛋白含量的影响

“碱提酸沉”过程中在对 pH8.0 和 pH4.5 时提取液进行加热,进一步制备大豆分离蛋白,所得大豆乳清中可溶性蛋白含量变化如图 1 所示,无论哪种处理所得乳清中乳清蛋白含量都随着温度的升高逐渐降低,而大豆 7S 组分蛋白的变性温度为 72℃ 左右<sup>[12]</sup>,故选择最高加热温度为 70℃。在 pH8.0 时 70℃ 加热 10 min,乳清蛋白含量由对照的  $1.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  下降至  $0.78 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,降低了 25.7%;在 pH4.5 时 70℃ 加热 10 min,乳清蛋白含量为  $0.63 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,降低了 40%。这与 Rackis 等<sup>[13]</sup>和帖向宇<sup>[14]</sup>的研究结果一致,表明大豆乳清蛋白具有热不稳定性,部分成分易发生热凝聚。

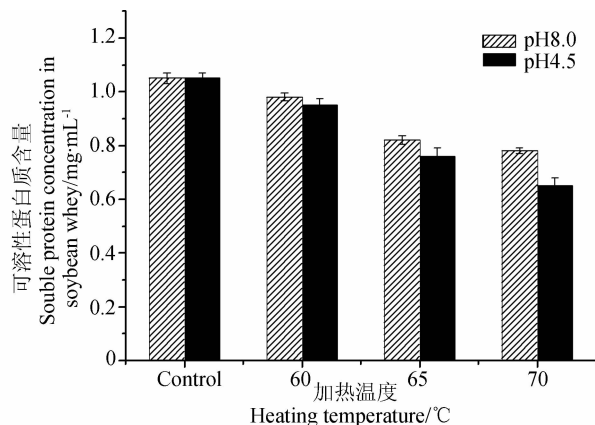


图 1 不同加热温度下所得乳清中可溶性蛋白含量

Fig.1 Concentration of soluble protein in soybean whey at different heating temperature

### 2.2 加热对大豆乳清中可溶性蛋白组分变化的影响

进一步对不同加热处理方式所得大豆乳清蛋白进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 2、3 所示。从图 2 可以看出,pH8.0 时的提取液随着加热温度的升高,所得乳清蛋白中脂肪氧化酶和  $\beta$ -淀粉酶的相对含量逐渐下降,在 70℃ 时脂肪氧化酶基本消失,而凝集素和胰蛋白酶抑制剂相对含量基本保持不变。从图 3 可以看出,提取液在 pH4.5 时随加热温度的升高,所得乳清蛋白中不但脂肪氧化酶和  $\beta$ -淀粉酶的相对含量逐渐下降,而且胰蛋白酶抑制剂在 65℃ 加热时含量已经明显减少。结果表明,脂肪氧化酶、 $\beta$ -淀粉酶和部分胰蛋白酶抑制剂由于热凝聚反应而转移到了大豆分离蛋白产品中。

### 2.3 含有乳清蛋白成分的大豆分离蛋白功能性

**2.3.1 溶解性** 在食品加工中,大豆分离蛋白通常都要求以水溶液的方式来应用,所以分离蛋白在各 pH 值下的溶解度至关重要<sup>[14]</sup>。对试验所得 3

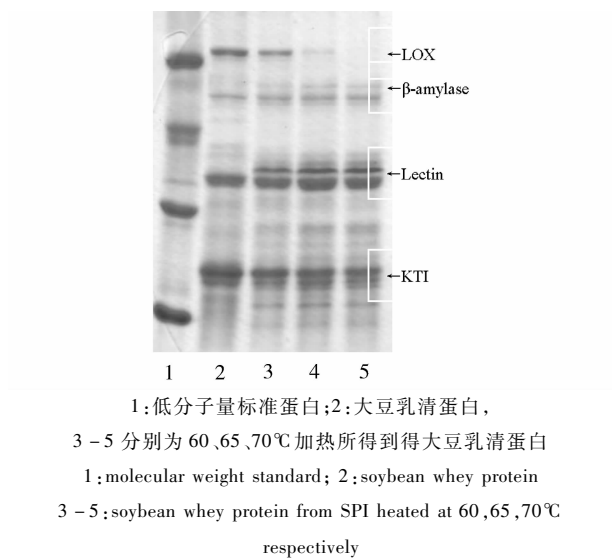


图2 pH8.0 时加热所得乳清蛋白的电泳分析  
Fig.2 SDS-PAGE of soybean whey protein  
preparing by heated at pH8.0

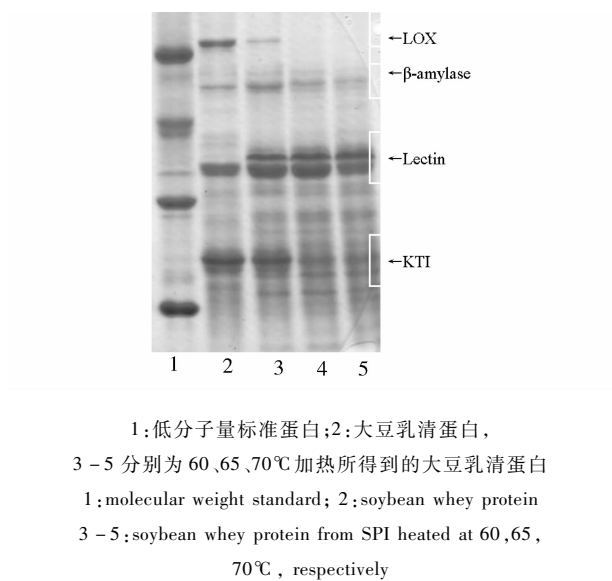


图3 pH4.5 时加热所得乳清蛋白的电泳分析  
Fig.3 SDS-PAGE of soybean whey protein  
preparing by heated at pH4.5

种分离蛋白进行了溶解度分析,结果如图 4 所示,3 种分离蛋白产品的溶解度曲线均呈“V”字型,在 pH4.5~4.8 的范围内溶解度最小,高于或低于这一范围,溶解度都增加,在 pH 低于 3 和高于 7 的范围,3 种分离蛋白均有很高的溶解度。在 pH4~5 的范围,经过加热处理所制备的分离蛋白溶解度明显高于普通分离蛋白,但在 pH6~8 范围内,普通分离蛋白溶解度较高。

2.3.2 其它功能性分析 大豆分离蛋白作为食品添加剂,其持水性、持油性、乳化性、起泡性等性质都是非常重要的,测定 3 种分离蛋白的常用功能特性指标的结果见表 1。持水、持油性的分析结果表明,在 pH4.5 时加热所制备的分离蛋白持水性

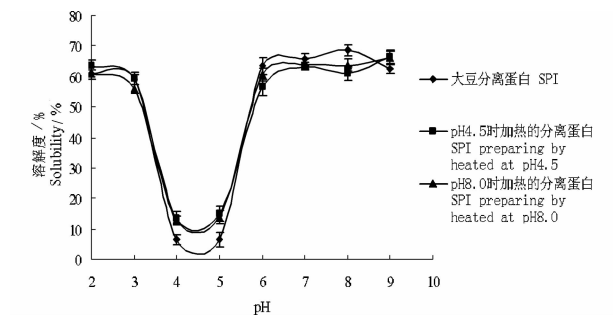


Fig.4 Solubility of three kinds of SPI at different pH

是普通分离蛋白持水性的 3.4 倍,差异显著。在 pH8.0 和 pH4.5 时加热所制备的分离蛋白在持水性上没有显著性差异。在持油性上,普通分离蛋白持油性显著高于在 pH4.5 时加热所制备的分离蛋白,在 pH8.0 时加热所制备的分离蛋白持油性介于两者之间。

表1 产品的功能性分析

Table 1 Functionality properties of SPI products			
功能性 Functional properties	大豆分离蛋白 SPI	pH4.5 时加热的 分离蛋白 SPI preparing by heated at pH4.5	pH8.0 时加热的 分离蛋白 SPI preparing by heated at pH8.0
持水性 Water holding property/%	172.7 <sup>b</sup>	594.7 <sup>a</sup>	570 <sup>a</sup>
持油性 Oil holding property/%	317.3 <sup>a</sup>	294 <sup>b</sup>	306.7 <sup>ab</sup>
起泡性 Foaming property/%	131.9 <sup>a</sup>	100.9 <sup>b</sup>	96.9 <sup>b</sup>
泡沫稳定性 Foaming stability/%	61.9 <sup>a</sup>	56.8 <sup>b</sup>	55.8 <sup>b</sup>
乳化性 Emulsify property/m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup>	0.342 <sup>a</sup>	0.253 <sup>b</sup>	0.258 <sup>b</sup>
乳化稳定性 Emulsify stability	11.6 <sup>a</sup>	12.4 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>

不同小写字母表示  $\alpha = 0.05$  水平上有显著性差异  
Values within a row followed by different lowercase letters indicate significant at 0.05 probability level.

从表 1 可以看出,热处理所制备的分离蛋白起泡性和泡沫稳定性明显低于普通分离蛋白。影响蛋白质起泡性因素有蛋白质内在属性(如内在结构及其聚集状态)、蛋白质溶液浓度、pH 值、温度和离子强度等<sup>[15]</sup>。显然,蛋白样品之间的主要差异在温度,这表明较高温度热处理对大豆分离蛋白的起泡性和泡沫稳定性有负面影响,这与胡坤等<sup>[16]</sup>研究结果一致。普通分离蛋白乳化性明显好于热处理所制备的分离蛋白,但乳化稳定性并没有显著差异。

### 3 结论

对豆粕提取液进行不同 pH 条件下的热处理, 结果发现, 提取液经热处理后都会降低大豆乳清中乳清蛋白的含量, 其中碱性 70℃ 加热 10 min 使 25.7% 乳清蛋白转移到了分离蛋白产品中, 而提取液酸调处理可使转移效率提高至 40%。转移的乳清蛋白主要是发生了热促凝聚反应的脂肪氧化酶、 $\beta$ -淀粉酶和部分胰蛋白酶抑制剂。另外, 3 种分离蛋白产品的溶解度曲线均呈“V”字型, 在 pH4.5 ~ 4.8 的范围内溶解度最小, 但经过加热处理所制备的分离蛋白在 pH4.5 ~ 4.8 的范围内的溶解度明显高于不经过热处理所制备的分离蛋白; 未经加热所制备的分离蛋白的持油性、起泡性、泡沫稳定性和乳化性均要高于加热所制备的分离蛋白, 但持水性明显低于加热所制备的分离蛋白, 乳化稳定性没有显著差异。

### 参考文献

- [1] 王秋霜, 应铁进. 大豆制品生产废水综合开发研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(9):594-598. (Wang Q S, Ying T J. Research progress on wastewater utilization in soybean processing [J]. Food Science, 2007, 28(9):594-598.)
- [2] Setsuko Iwabuchi, Fumio Yamauchi. Electrophoresis analyses of whey proteins in soybean globulin fractions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35(2):205-209.
- [3] Koshiyama Y, Kikuchi M, Fukushima D. 2S globulins of soybean seeds 2 physicochemical and biological properties of protease inhibitors in 2S globulins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1981, 29:340-343.
- [4] 刘国庆, 王占生. 从大豆乳清废水中回收生理活性物质的研究现状与发展前景[J]. 食品研究与开发, 2001, 22:3-7. (Liu G Q, Wang Z S. Research progress and development perspectives on retrieve physiological activator from soybean whey wastewater [J]. Food Research and Development, 2001, 22:3-7.)
- [5] 杜明, 刘鹤楠, 易华西, 等. 大豆乳清蛋白研究进展[J]. 食品工业科技, 2008(2):302-307. (Du M, Liu H N, Yi H X, et al. Review on soy whey proteins [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008(2):302-307.)
- [6] 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.
- [7] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227:680-685.
- [8] 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.)
- [9] Morr C V. Current status of soy protein functionality in food systems [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1990, 67:265-271.
- [10] Kevin N, Pearce J E, Kinsella. Emulsifying properties of protein: Evaluation of a turbidimetry technique [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(3):237-244.
- [11] Bernard E, Alistair S, Grandison, et al. Emulsifying properties of soy protein isolates obtained by microfiltration [J]. Journal Science of Food Agriculture, 2002, 82:267-272.
- [12] Ren C G, Tang L, Guo S T. Structural characterization of heated-induced protein particles in soy milk [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57:1921-1926.
- [13] Rackis J J, Honig D H, Sessa D J, et al. Soybean whey proteins-recovery and amino acid analysis [J]. Journal of Food Science, 1971, 136:10-13.
- [14] 帖向宇, 郭顺堂. 大豆乳清蛋白的热稳定分析及其与球蛋白的相互作用研究[J]. 食品工业科技, 2006(9):77-80. (Tie X Y, Guo S T. The thermal stability of soybean whey protein and its interaction with soybean globulin during heating [J]. Science and Technology of Food Industry, 2006(9):77-80.)
- [15] 黄友如, 华欲飞, 裴爱泳. 大豆分离蛋白功能性及其影响因素[J]. 粮食与油脂, 2003(5):12-15. (Huang Y R, Hua Y F, Qiu A Y. Functional properties of soy protein isolate and affecting factors [J]. Journal of Cereals and Oils, 2003(5):12-15.)
- [16] 胡坤, 黄景初, 陈秀华. 干热处理对大豆分离蛋白乳化与起泡性能的影响[J]. 现代食品科技, 2008, 24(7):641-654. (Hu K, Huang J C, Chen X H. Effects of dry-heat treatment on emulsifying and foaming properties of soy protein isolates [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(7):641-654.)