

热聚集大豆蛋白分子量分布及其与 κ -卡拉胶相行为的研究

董 蝶,孔祥珍,华欲飞

(江南大学 食品学院,食品科学与技术国家重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘 要:制备了不同的热聚集大豆蛋白,并采用体积排阻色谱(SEC-HPLC)对其分子量分布进行了表征。结果表明:热处理后的大豆蛋白主要由聚集体、中间体和未聚集部分组成,聚集体比例随加热时蛋白浓度的增加而增加。选取 5% 和 1% 大豆蛋白热聚集体和 κ -卡拉胶对蛋白质-多糖的相行为进一步研究,结果蛋白浓度不同发生明显的宏观相分离所需的卡拉胶的浓度不同,5% 大豆蛋白热聚集体和 κ -卡拉胶的混合体系具有较窄的均相区域,表明蛋白质粒子的大小影响其与多糖的相分离行为。

关键词:大豆蛋白;热聚集体;体积排阻色谱; κ -卡拉胶;相分离

中图分类号:TQ646.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2010)06-1033-05

Molecular Weight Distribution of Heat-induced Soy Protein Aggregates and Phase Behavior of Heat-induced Soy Protein Aggregates/ κ -carrageenan Mixtures

DONG Die, KONG Xiang-zhen, HUA Yu-fei

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: During the heating processing, the formation of soy protein aggregates is prevalent in soy foods. In this paper, heat-induced soy protein aggregates of different protein concentration were prepared, then the molecular weight distribution of them were analyzed by high performance size exclusion chromatography (SEC-HPLC). The SEC-HPLC results suggested that, the heated solutions were composed of aggregate, intermediate species and un-aggregated molecules, and the ratio of aggregate fraction increased as the protein concentration increased. Phase behaviors of 5% soy protein aggregate / κ -carrageenan mixture and 1% soy protein aggregate / κ -carrageenan mixture were also studied. The results suggested that, the mixtures with different protein concentration must add different amount of κ -carrageenan when macro phase separation occurred, and 5% soy protein aggregate / κ -carrageenan mixtures had narrower stable region. It suggested that the size of protein affected the phase behavior of protein / polysaccharide mixtures.

Key words: Soy protein; Heat-induced aggregate; SEC-HPLC; κ -carrageenan; Phase separation

蛋白质和多糖是大多数食品的主要组成部分,这 2 种生物大分子都具有增稠性、凝胶性以及一些表面性质。在某种程度上,蛋白质和多糖决定了整个食品体系的结构以及物理、化学性质,它们的行为常受到另一种成分的存在的影响。在水溶液中,蛋白质和多糖体系在一范围内或者是相容的或者是不相容的。如果二者是热力学不相容的,那么二者将分离成两相;如果二者是热力学相容的,那么二者将共同存在于一个单相体系中^[1]。在特定的食品体系中,相分离现象更加明显。研究表明,影响蛋白和多糖体系相行为的参数主要包括 pH 值、离子强度、离子类型、生物大分子结构、热处理及高压、剪切等处理方式^[2-3]。

大豆蛋白是营养丰富、价格低廉的植物蛋白,

是一种优质的动物蛋白质替代资源,随着对大豆蛋白功能性质及营养特征的了解,对大豆蛋白食品的开发逐渐增加。目前,大豆蛋白饮料广受消费者的关注和喜爱。但大豆蛋白饮料在加工和贮存期间容易分离沉淀,严重影响产品外观和商品价值。如何解决分离沉淀现象是生产大豆蛋白饮料的关键之一。卡拉胶是一种硫酸酯海藻多糖,因其硫酸酯基含量和结构的不同,卡拉胶可以有多种类型,最常用的是 κ -卡拉胶、 ι -卡拉胶和 λ -卡拉胶。它们都是强阴离子多糖,在一般 pH 条件下,卡拉胶都带正电荷。卡拉胶是食品工业中常用的胶凝剂、稳定剂和持水剂,在食品工业中应用广泛,在大豆蛋白饮料生产中常被用作稳定剂。

收稿日期:2010-07-14

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(JUSRP10919);国家自然科学基金资助项目(20876069)。

第一作者简介:董蝶(1986-),女,在读硕士,主要从事粮食油脂及植物蛋白方面的研究。E-mail:dongdiedie@126.com。

通讯作者:华欲飞,教授,博士生导师。E-mail:yfhua@sytu.edu.cn。

目前,几乎所有的大豆制品的加工都包括热处理,热处理容易导致大豆蛋白聚集,聚集体的结构则会因蛋白质浓度、盐浓度等条件的不同而发生改变^[4]。同时研究发现,高分子体系的不对称性是影响相分离行为的重要因素^[5]。另外,为了提高大豆蛋白的附加值,人们一直试图研究大豆蛋白与其它食用高分子的复合物,并取得了一定的进展。构造不同结构的大豆蛋白聚集体-多糖的混合体系并研究其相行为和微观结构对实际体系中大豆蛋白食品的微结构设计具有重要的理论指导意义。

该文通过热处理制备了不同浓度的大豆蛋白聚集体并对其分子量分布进行表征,对大豆蛋白和 κ -卡拉胶的相行为进行了初步的探索性研究,旨在为明确大豆蛋白热聚集和相分离的关系以及大豆蛋白饮料的生产提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

低变性脱脂豆粕:山东谷神有限公司; κ -卡拉胶:美国 Sigma 公司。所有其它化学试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆蛋白的制备 脱脂豆粕过 80 目筛后,采用 85% 的乙醇在常温下(25℃)搅拌浸提 1 h,料液比为 1:5,搅拌后用滤布式离心机离心将酒精分离,自然晾干,直到豆粕无酒精味为止。干燥后的原料经碾磨后过 80 目筛,4℃下保藏。

醇洗豆粕按 1:15 的料液比加入去离子水充分混合,用 2 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0,室温下低速搅拌 1 h,以 10 000 r·min⁻¹ 在 4℃ 离心 30 min,弃去沉淀。上清液用 2 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液调节 pH 值至 4.5,以 10 000 r·min⁻¹ 在 4℃ 离心 30 min,弃去上清液,得到蛋白质凝乳。经水洗后,加入去离子水并用 2 mol·L⁻¹ 的 NaOH 将溶液回调至 pH7.0,经搅拌充分溶解后,溶液在 4℃ 以 10 000 r·min⁻¹ 离心 30 min 以弃去少量不溶物质,上清液经透析 24 h 除盐后冷冻干燥,干燥的大豆蛋白在 4℃ 条件下保存。

1.2.2 热诱导大豆蛋白聚集体的制备 大豆蛋白粉末溶解于去离子水中,磁力搅拌 2 h,配制成浓度为 1、2、3、4 和 5% (wt %) 的溶液,溶液以 10 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后取上清液。蛋白溶液转移到具塞试管中,沸水浴中加热 15 min 后迅速用冰浴冷却至室温。

1.2.3 SEC-HPLC 研究天然大豆蛋白及其聚集体的相对分子量分布 采用 SEC-HPLC 研究天然大豆蛋白和大豆蛋白热诱导聚集体的分子量分布,使用 Agilent 高效液相系统和 Shodex KW-804 蛋白柱以及 Agilent 紫外检测器。柱子的洗脱极限为 1 000 KDa,

分离柱效大于 20 KDa。流动相为 50 mol·L⁻¹ 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0),洗脱速率为 1 mL·min⁻¹,洗脱液在 280 nm 处检测,柱温为 25℃。3 次重复。

用于蛋白柱曲线校正的 10 种标准物质分别是:甲状腺球蛋白(Mw: 669 000)、醛缩酶(Mw: 158 000)、牛血清白蛋白(Mw: 67 000)、卵白蛋白(Mw: 43 000)、过氧化物酶(Mw: 40 200)、腺苷酸激酶(Mw: 32 000)、激血球素(Mw: 17 000)、核糖核酸酶 A(Mw: 13 700)、aprotinin(Mw: 6 500)和维生素 B12(Mw: 1 350)。

1.2.4 热聚集大豆蛋白与 κ -卡拉胶相行为 选择 1% 和 5% 大豆蛋白热聚集体和 κ -卡拉胶进行相行为的研究。 κ -卡拉胶溶液的制备参考文献[6-7]。

用结合离心、化学分析和目测等方法建立的相图,来表征大豆蛋白热聚集体和 κ -卡拉胶的相行为。配制大量不同浓度配比的大豆蛋白聚集体/ κ -卡拉胶混合体系,在 25℃ 水浴中放置 48 h 后,3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,观察体系是否发生相分离。试验中,大豆蛋白的浓度采用凯氏定氮法测得, κ -卡拉胶的浓度采用苯酚-硫酸法测得。

2 结果与讨论

2.1 大豆蛋白的制备

用醇洗豆粕制备的大豆蛋白,蛋白含量为 98.9% (干基),溶解度接近 100%。其蛋白含量较高,能满足试验要求。Huang 等的研究表明具有较大分子量和粒径的非热诱导聚集体主要通过非共价作用结合。试验中对脱脂豆粕的醇洗虽然会轻微改变蛋白质的结构,但同时抑制了豆粕中其它成分导致的蛋白质聚集^[8],也通过去除残余脂质明显改善大豆蛋白的功能性质^[9]。因此,选取以醇洗豆粕中提取的蛋白作为试验原料。

2.2 大豆蛋白的热聚集体分子量分布

采用 SEC-HPLC 研究了不同浓度大豆蛋白热诱导聚集体的分子量分布,与天然蛋白的分子量分布进行比较。

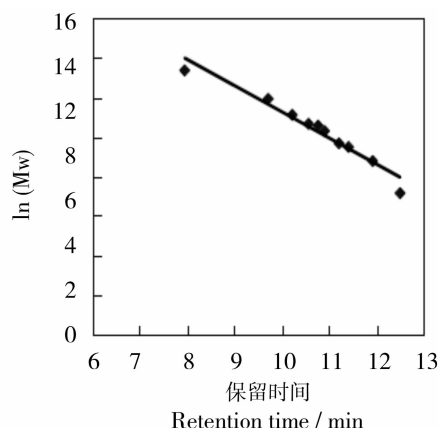
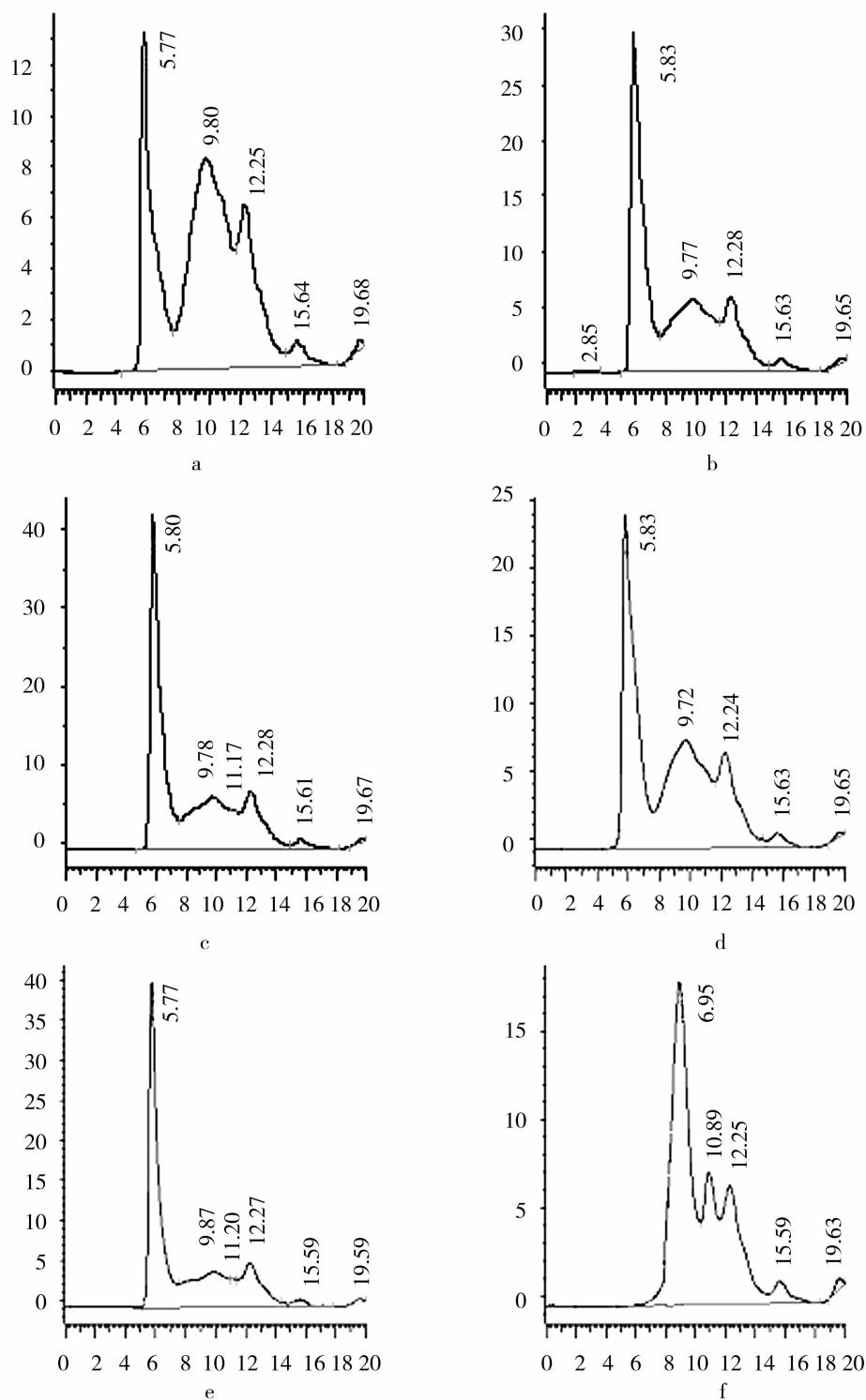


图1 Shodex KW-804 蛋白柱的标准曲线

Fig.1 Standard curve of Shodex protein KW-804 column



(a-e) 分别为 1%、2%、3%、4% 和 5% 的大豆蛋白热聚集体, (f) 为天然蛋白。

图中, 横坐标代表的是保留时间 (min), 纵坐标代表的是信号强度 (μV)

(a-e) stands for 1%、2%、3%、4%、5% heat-induced soy protein aggregates respectively, (f) stands for native soy protein

The abscissa stands for retention time (min), the ordinate stands for signal intensity (μV)

图 2 大豆蛋白热聚集体及天然大豆蛋白的相对分子量分布

Fig. 2 Relative molecular weight distribution of heat-induced soy protein aggregates and native soy protein.

图 1 是 Shodex KW-804 蛋白柱的标准曲线, 大豆蛋白聚集体分子量的计算都是依据此标准曲线进行的。从图 2(f) 中可以看出, 保留时间为 8.93

的峰所占比率为 61.69%, 与标准曲线对照可知其分子量约为 300 KDa, 保留时间为 10.89 的小峰对应的分子量为 100 KDa, 所占面积为 11.91%。这 2

个峰分别代表了完整的大豆球蛋白分子和亚基。热处理后的大豆蛋白的色谱图见图2(a-e),可以发现5.8 min左右洗脱出一个很大的峰即对应为蛋白的聚集体,因为柱子的洗脱极限为 10^6 ,因此估计此聚集体的分子量要大于 10^6 ;同时在聚集体的峰和非聚集的分子和亚基的峰之间,观察到有分子量为 2×10^5 到 10^6 的中间体部分存在,表明这部分的聚集程度相对较低。由图中还可以看出,大豆蛋白热聚集体中间体的分子量是不均一的,也就是说每个聚合物分子可以由不同数目的单体分子聚合而成。从表1中可以看出,随着大豆蛋白浓度的增加,热处理后,中间体部分的含量逐渐降低,取而代之的是聚集体部分的增加,表明体系的多分散性程度逐渐降低。

表1 大豆蛋白热聚集体的聚集体及中间体部分的含量

Table 1 Aggregate and intermediate fractionsof heat-induced soy protein aggregates

大豆蛋白聚集体样品 Samples of heat-induced soy protein aggregates / %	聚集体部分 Aggregates / %	中间体部分 Intermediate species / %
1	26.0	49.0
2	46.5	32.8
3	50.1	27.0
4	60.4	25.7
5	75.5	8.2

从表1中同时可以看出,1%和5%的大豆蛋白热聚集体的聚集体部分和中间体部分的比例相差很大,即表示分子量相差较大,可以作为有代表性的聚集体来研究与κ-卡拉胶的相分离。

3.3 大豆蛋白热聚集体和κ-卡拉胶的相图

图3、图4分别是25℃、pH7.0时5%大豆蛋白热聚集体/κ-卡拉胶混合体系和1%大豆蛋白热聚集体/κ-卡拉胶混合体系的相图。从图上看,相图可以近似看做为双曲线结构,但双曲线结构不对称,二者的形状也不完全相同。这可能是由于κ-卡拉胶与大豆蛋白热聚集体分子量、分子结构不同以及二者的亲水性不同造成的^[10]。从相图中可以看到,双节线把混合体系分成2个区域:均相区域(双节线下部)和不稳定区域(相分离区域,双节线上部)。体系发生宏观相分离后,上层κ-卡拉胶含量比下层要高,下层大豆蛋白则比上层的要高。

从图3中可以看出,随着蛋白质浓度的增加,发生明显的宏观相分离所需要的卡拉胶临界浓度降低。对所选用的5%蛋白质热聚集体来说,当蛋白质浓度为1%时,发生明显的宏观相分离需要的卡拉胶临界浓度为0.15%;而当蛋白质浓度增加到

4%时,发生明显的宏观相分离需要的卡拉胶临界浓度为0.08%。

从图3和图4的比较中可以发现,5%大豆蛋白热聚集体/κ-卡拉胶混合体系具有较窄的均相区域。对蛋白质聚集体来说,当蛋白质浓度为1%时,相分离需要的卡拉胶浓度分别为0.23%(1%大豆蛋白热聚集体)和0.15%(5%大豆蛋白热聚集体)。在蛋白质浓度为1%、卡拉胶浓度为0.2%的混合体系中,1%大豆蛋白热聚集体/κ-卡拉胶混合体系没有显示出相分离,5%大豆蛋白热聚集体/κ-卡拉胶混合体系显示出了明显的相分离。这与Croguennoc等^[11]的结论是一致的,他们证明大的聚集体优先相分离,并且在一定的卡拉胶浓度下,只有大于一定尺寸的聚集体才能与卡拉胶发生相分离。

从图5中可以看到所拍摄的实际相分离体系,从左到右分别列出了不同蛋白和κ-卡拉胶浓度的体系,其混浊的下层相和相对透明的上层相性状均不相同。

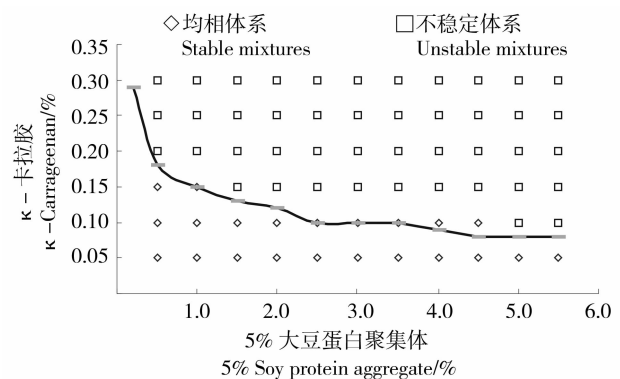


图3 25℃, pH7.0时5%大豆蛋白热聚集体/κ-卡拉胶混合体系的相图

Fig.3 Phase diagrams of 5% heat-induced soy protein aggregate/κ-car systems established at 25℃, pH 7.0

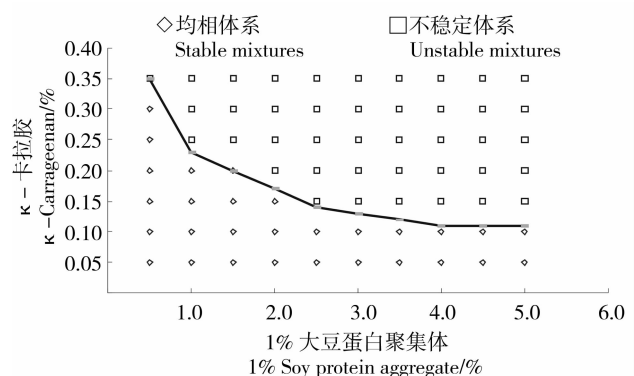


图4 25℃, pH7.0时1%大豆蛋白热聚集体/κ-卡拉胶混合体系的相图

Fig.4 Phase diagrams of 1% heat-induced soy protein aggregate/κ-car systems established at 25℃, pH 7.0

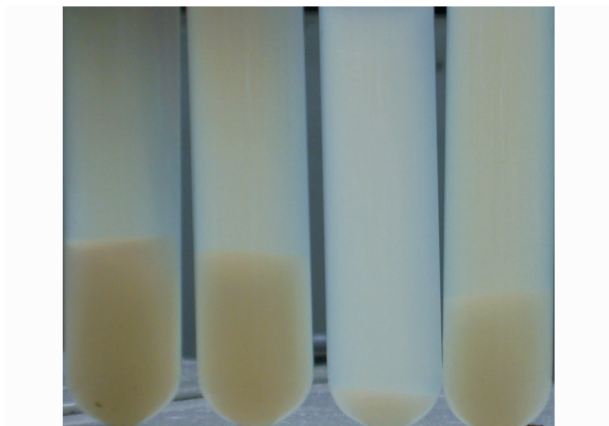


图 5 相分离体系

Fig. 5 Phase separated systems

3 结论

大豆蛋白在热处理过程中会发生聚集,在此过程中,随着大豆蛋白浓度的增加,聚集体部分的比例逐渐增加,中间体部分比例逐渐减少。在大豆蛋白热聚集体和 κ -卡拉胶的相分离过程中,蛋白质的浓度越高,发生宏观相分离所需的 κ -卡拉胶的临界浓度越低。相图的结果证明 5% 大豆蛋白热聚集体和 κ -卡拉胶的混合体系具有较窄的均相区域,表明蛋白质的大小对其与多糖的相分离行为有一定影响。

参考文献

- [1] Quiroga C C, Bergenstahl B. Rheological behavior of amylopectin and β -lactoglobulin phase-segregated aqueous system [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74:358-365.
- [2] 李向红,裴爱海,华欲飞,等. 蛋白质-多糖相分离性质及其研究进展[J]. 粮食与油脂, 2006(9):14-15. (Li X H, Qiu A H, Hua Y F, et al. Phase separation properties of protein and polysaccharide and its study process [J]. Journal of Cereals & Oils, 2006(9):14-15.)
- [3] 陈昀,赵谋明,孙哲浩. 蛋白质与多糖类交互作用研究进展[J]. 食品科学, 2001, 22(4):90,93. (Chen Y, Zhao M M, Sun Z H. Advances in interaction between proteins and polysaccharides [J]. Food Science, 2001, 22(4):90,93.)
- [4] 华欲飞, Cui S, Wang Q, 等. 不同大豆分离蛋白凝胶的流变学性质[J]. 中国粮油学报, 2003, 18(6):37-41. (Hua Y F, Cui S, Wang Q, et al. Rheological properties of different soy protein isolate gels [J]. Journal of The Chinese Cereals and Oils Association, 2003, 18(6):37-41.)
- [5] Tanaka H. Viscoelastic phase separation [J]. Journal of Physics: Condensed Matter, 2000, 12:R207-R264.
- [6] 李向红. 大豆蛋白聚集体-多糖混合体系相行为及微观结构的研究[D]. 无锡:江南大学, 2008. (Li X H. Phase behavior and microstructure of soy protein aggregate-polysaccharide mixtures [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.)
- [7] 李向红,华欲飞,刘展,等. 大豆蛋白热诱导聚集体和 κ -卡拉胶混合体系相行为及微观结构的研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(9):12-18. (Li X H, Hua Y F, Liu Z, et al. Phase separation study of soy protein aggregates and κ -carrageenan mixtures [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24(9):12-18.)
- [8] Huang Y R, Hua Y F, Qiu A Y. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation [J]. Food Research International, 2006, 39:240-249.
- [9] Hua Y F, Huang Y R, Qiu A Y, et al. Properties of soy protein isolate prepared from aqueous alcohol washed soy flakes [J]. Food Research International, 2005, (38): 273-279.
- [10] 周家华,吴国杰. 大豆蛋白-羟丙基淀粉混合物分相和流变性研究[J]. 食品工业科技, 2005(10):69-70. (Zhou J H, Wu G J. Phase separation and rheology of soy protein-hydropropyl starch blends [J]. Science and technology of food industry, 2005(10): 69-70.)
- [11] Croguennoc P, Durand D, Nicolai T, et al. Phase separation and association of globular protein aggregates in the presence of polysaccharides: 1. Mixtures of preheated β -lactoglobulin and κ -carrageenan at room temperature [J]. Langmuir, 2001, (17):4372-4379.