

提取条件对大豆油体表面蛋白质去除效果的研究

赵路苹, 陈业明, 张彩猛, 华欲飞

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 在确定生豆浆一次超速离心提取大豆油体的适宜蔗糖浓度为 10% 的基础上, 研究了氯化钠、尿素、EDTA-2Na、SDS 和温度等提取条件对大豆油体表面蛋白质的影响, 并通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳表征油体表面蛋白质的变化。结果表明: 大于 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素和 $80 \sim 100^\circ\text{C}$ 加热处理 15 min 都有利于去除油体表面结合的大豆蛋白质, 得到高纯度的油体; 氯化钠和 EDTA-2Na 对去除表面结合的大豆蛋白质没有作用; SDS 可以取代油体蛋白, 破坏油体天然结构, 不利于油体的提取。

关键词: 大豆油体; 油体蛋白; 大豆蛋白质; 提取条件; SDS-PAGE

中图分类号: TS214.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)06-0835-05

Removing Effects of Extract Conditions on Surface Proteins from Soybean Oil Body

ZHAO Lu-ping, CHEN Ye-ming, ZHANG Cai-meng, HUA Yu-fei

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: After confirmed 10% sucrose was beneficial for extracting oil body from raw soybean milk at once ultra centrifugation, the effects of NaCl, urea, EDTA-2Na, SDS and different temperatures on surface proteins of soybean oil body were studied. The variation of oil body surface proteins was characterized by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results suggested that more than $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ urea and thermal treatment ($80 \sim 100^\circ\text{C}$, 15 min) were beneficial for removing soybean proteins which combined with oil body. However, NaCl and EDTA-2Na had no effect on removal of soybean proteins. While SDS was bad for oil body extraction because it could replace oleosins and break natural structure of oil body.

Key words: Soybean oil body; Oleosin; Soybean proteins; Extract conditions; SDS-PAGE

大豆是我国重要的油料作物, 油脂含量为 13.82%~23%^[1]。在大豆种子中, 脂质贮藏在亚细胞器颗粒中, 这些亚细胞器称为油体。大豆油体粒径为 $0.2 \sim 0.5 \mu\text{m}$, 主要成分为三酰甘油酯、磷脂和油体蛋白 (oleosin), 内部的液态基质为三酰甘油酯, 外部由一层磷脂覆盖, 上面镶嵌着由伸入三酰甘油酯的疏水肽段和覆盖在油体表面的亲水肽段构成的油体蛋白^[2-3]。大豆油体蛋白主要有 oleosin 24 kDa、oleosin 18 kDa 和 oleosin 17 kDa 3 种。油体集中了大豆的多不饱和脂肪酸, 同时含有维生素 E^[4] 和磷脂, 其特殊结构和含有的功能性成分, 使大豆油体在食品和化妆品中具有巨大的应用潜力。

目前, 已有关于大豆油体的提取率、分散稳定性、氧化稳定性和流变性^[5-7] 等方面的研究。相关研究在提取油体时, 大多需要加入多种化学试剂, 通过多次离心^[8-9], 步骤繁琐。本文考察了在一次离心的情况下, 不同化学试剂和温度对大豆油体表面蛋白的影响, 通过电泳表征油体表面蛋白的变

化, 为提取较纯的大豆油体提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料及试剂 大豆材料为南农 88-31, 购于南京农业大学国家大豆改良中心。氯化钠、尿素、乙二酸四乙酸二钠 (EDTA-2Na) 和十二烷基硫酸钠 (SDS) 均为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司。丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、溴酚蓝、巯基乙醇、三羧基氨基甲烷 (Tris)、甘氨酸、四甲基乙二胺 (TEMED) 和考马斯亮蓝 G250 购于美国 Sigma 公司。标准蛋白购于美国 Bio-Rad 公司。

1.1.2 仪器及设备 90 型磁力搅拌器, 上海沪西仪器分析厂; WH-1 微型漩涡混合仪, 上海沪西分析仪器厂; PHS-3C pH 计, 上海精密科学仪器有限公司; MJ-60BE01B 组织捣碎机, 美的电器有限公司; Optima L-XP 超速离心机, 美国 Beckman Coulter; ZETA-SIZER 2000, 英国 Malvern 公司; Mini-PROTE-

收稿日期: 2013-05-14

基金项目: 2012 年教育部基本科研—青年基金 (2050205)。

第一作者简介: 赵路苹 (1987-), 女, 硕士, 主要从事粮食、油脂及植物蛋白研究。E-mail: zhaolp0126@126.com。

通讯作者: 陈业明 (1982-), 男, 副教授, 主要从事粮食、油脂及植物蛋白研究。E-mail: chenyming19821213@gmail.com。

AN型垂直电泳仪,美国 Bio-Rad 公司; ChemiDoc XRS + 凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 生豆浆的制备 将 20 g 大豆浸泡在去离子水(1:9, w/w)中,在 4℃ 冰箱放置 18 h。向吸胀的大豆中加入新鲜去离子水至总重 200 g,用组织捣碎机以 $18\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度磨浆 90 s,用 4 层纱布过滤除去豆渣。滤液即为生豆浆(pH6.8)。

1.2.2 大豆油体的提取方法 对 Tzen 等^[8]的方法进行了改进,以便于考察不同提取条件对油体表面蛋白的影响。试验通过超速离心一次得到油体,首先确定超速离心时的蔗糖浓度。

向生豆浆中分别加入 0%、5%、10%、15%、20% 浓度的蔗糖(w/w),室温搅拌 10 min。将 8.5 g 上述混合溶液加入超速离心管中,并在超速离心管上层加 3 g 去离子水,于 4℃, $35\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 60 min。收集上浮(油体),用去离子水冲洗 3 次,去除表面粘附的溶液。提取的上浮以 1:10 (w/w) 溶于去离子水。

1.2.3 粒径测定 将 1.2.2 中 0~20% 蔗糖提取的油体用粒径/Zeta 电势仪(ZETA-SIZER 2000)测定粒径分布。

1.2.4 化学试剂对提取油体表面蛋白的影响 向生豆浆中加入不同浓度氯化钠、SDS、尿素、EDTA-2Na 后,在室温下用磁力搅拌器搅拌 20 min。再加入 10% (w/w) 蔗糖,搅拌 10 min。其中 EDTA-2Na 处理的生豆浆先调节 pH 为 9.0,再加 EDTA-2Na。按照 1.2.2 方法提取油体,提取的上浮以 1:10 (w/w) 溶于去离子水。

1.2.5 温度对提取油体表面蛋白的影响 将生豆浆分别在 50、60、70、80、90 和 100℃ 加热 15 min,立即冰浴 10 min,再加入 10% (w/w) 蔗糖,室温搅拌 10 min。按照 1.2.2 方法提取油体,提取的上浮以 1:10 (w/w) 溶于去离子水。

1.2.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) SDS-PAGE 参考 Laemmli^[10]的方法,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12.5%。样品溶解液为 $0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH6.8),1% SDS,2% 巯基乙醇和 0.02% 溴酚蓝。取油体样品 0.5 mL,加入 0.5 mL 样品溶解液,在漩涡混合仪上混匀,煮沸 3 min, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取下层清液上样。样品在浓缩胶中电流为 15 mA,样品进入分离胶后将电流调为 25 mA,溴酚蓝距前沿约 1 cm 时停止电泳,再固定、染色和脱色。用凝胶成像仪拍照。

2 结果与分析

2.1 不同蔗糖浓度对提取油体的影响

提取油体时,一般通过添加一定浓度的蔗糖,增加体系的密度,有利于油体上浮。试验首先考察了 0~20% 蔗糖浓度对提取的油体影响。

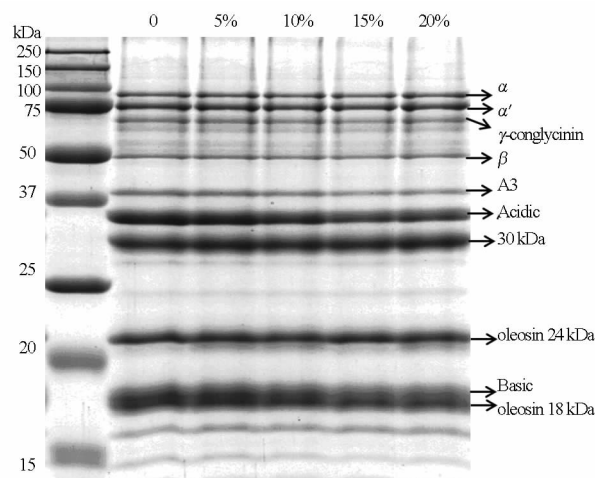


图1 蔗糖浓度对油体表面蛋白的影响

Fig. 1 The effect of sucrose concentration on surface protein of oil body

从图1可以看出,不同浓度的蔗糖对油体蛋白(oleosin 24 kDa 和 oleosin 18 kDa)没有影响,对伴大豆球蛋白(β 、 γ -伴大豆球蛋白)和 30 kDa 蛋白影响也不明显。蔗糖浓度为 0 和 5% 时,大豆球蛋白(A3、酸性肽链和碱性肽链)条带较深,但蔗糖浓度大于 10% 时条带稍有变浅。说明油体表面结合许多大豆蛋白质,随着体系密度的增加,油体表面结合的大豆球蛋白减少,而油体表面结合的其他蛋白没有明显变化。

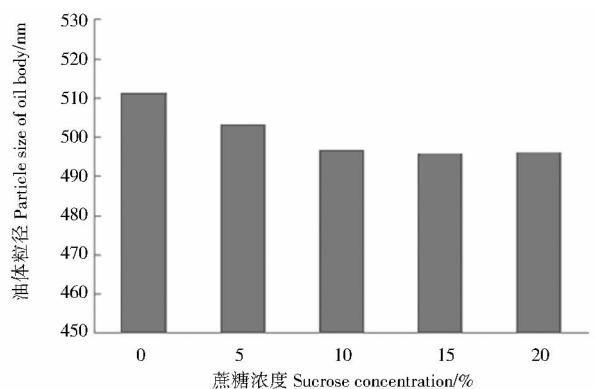
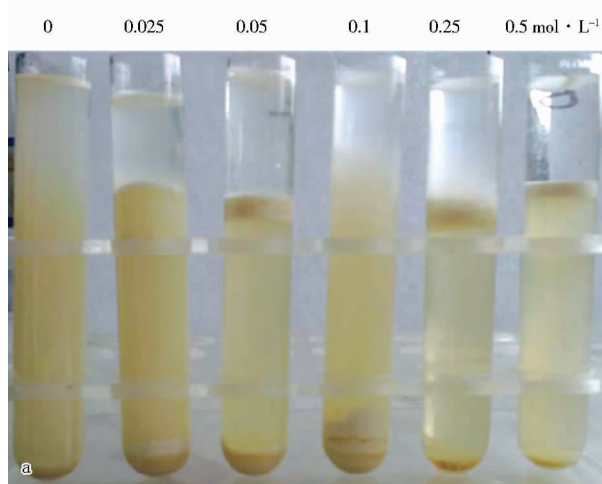


图2 蔗糖浓度对提取油体的粒径影响

Fig. 2 The effect of sucrose concentration on particle size of oil body

对不同蔗糖浓度处理提取的油体进行了粒径测定。从图 2 可以看出,随着蔗糖浓度的增加,所提取的油体粒径先逐渐减小然后趋于稳定。说明在一定范围内,随着体系密度的增加,所提取的油体表面结合的大豆蛋白质有所减少。并确定了后续考察不同条件提取油体时的蔗糖浓度为 10%。



a: 生豆浆超速离心后的现象;b: 电泳表征油体表面蛋白。

a: The phenomenon of soymilks after ultracentrifugation; b: SDS-PAGE analysis of surface proteins of oil bodies.

图 3 氯化钠对油体表面蛋白的影响

Fig. 3 The effect of NaCl concentration on surface protein of oil body

超速离心后,不添加氯化钠的生豆浆只有一层上浮,随着氯化钠增加,出现中间层,0.1 mol·L⁻¹时没有上浮和中间层,随后又开始有中间层和上浮,但是只有 0.025 和 0.05 mol·L⁻¹ 中间层紧密(图 3a)。可能是由于油体表面和大豆蛋白质中性条件下带有负电,0.025 和 0.05 mol·L⁻¹ 氯化钠导致油体和其他大豆蛋白质之间的静电斥力减弱,油体表面结合的大豆蛋白质增加,被大豆蛋白质包裹的油体密度增加,离心时上浮减少,中间层增加;当氯化钠为 0.1 mol·L⁻¹ 时,静电斥力最弱,结合有大量蛋白质的油体全部沉淀;氯化钠浓度增加到 0.25 mol·L⁻¹ 后,可能使大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白在盐溶液中的溶解性增加^[12],结合的油体数量减少。从图 3b 可看出,不同氯化钠浓度时,上浮油体结合了较多的大豆蛋白质,中间层油体结合的大豆蛋白质比上浮多。综上可知,添加 0 ~ 0.5 mol·L⁻¹ 氯化钠,不能去除油体表面的大多数大豆蛋白质,对提取纯油体不利。

2.2.2 尿素 尿素是一种强烈的破坏高分子内和分子间氢键的物质,在生物化学上用作蛋白质的变性剂,其作用机理主要是与蛋白质分子的氨基酸残基形成氢键从而破坏蛋白质的二级结构^[13]。

从图 4 可以看出,尿素对油体表面大豆蛋白质

2.2 化学试剂对提取油体表面蛋白的影响

2.2.1 氯化钠 氯化钠会改变蛋白质之间的静电作用力,可能会使油体表面结合的大豆蛋白种类或者数量发生变化。向生豆浆中加入 0 ~ 0.5 mol·L⁻¹ 氯化钠,提取的油体表面蛋白情况如图 3。

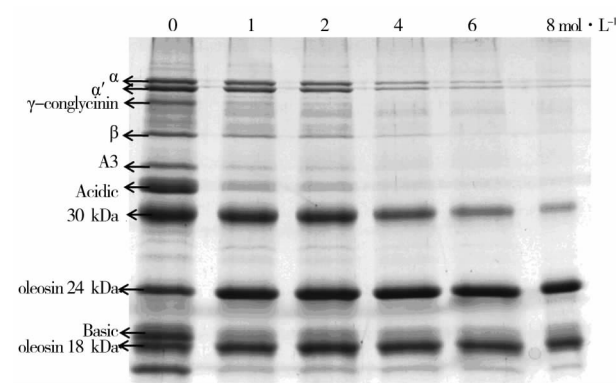
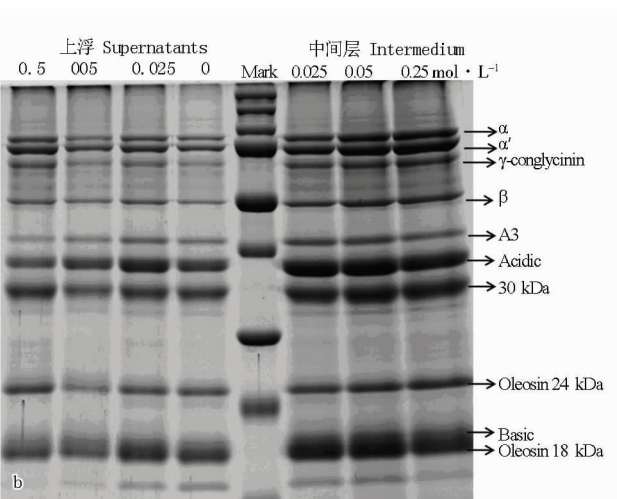


图 4 尿素对油体表面蛋白的影响

Fig. 4 The effect of urea concentration on surface protein of oil body

的影响很大。1 mol·L⁻¹ 尿素去除了大多数的大豆球蛋白和部分 β -伴大豆球蛋白;4 mol·L⁻¹ 尿素几乎去除所有的 β -伴大豆球蛋白和约 50% 的 30 kDa 蛋白;8 mol·L⁻¹ 尿素可以得到高纯度油体。结果说明尿素有利于去除油体表面大豆蛋白质及提取较纯的油体。

2.2.3 EDTA-2Na 部分大豆蛋白质可能通过钙桥结合到油体表面。EDTA 是一种金属离子螯合剂,对钙离子具有较强的螯合能力,并且 pH 大于 8 时螯合物较稳定^[14]。本试验选择生豆浆调节 pH9 作为对照组,考察 EDTA-2Na 对油体表面蛋白的影响。

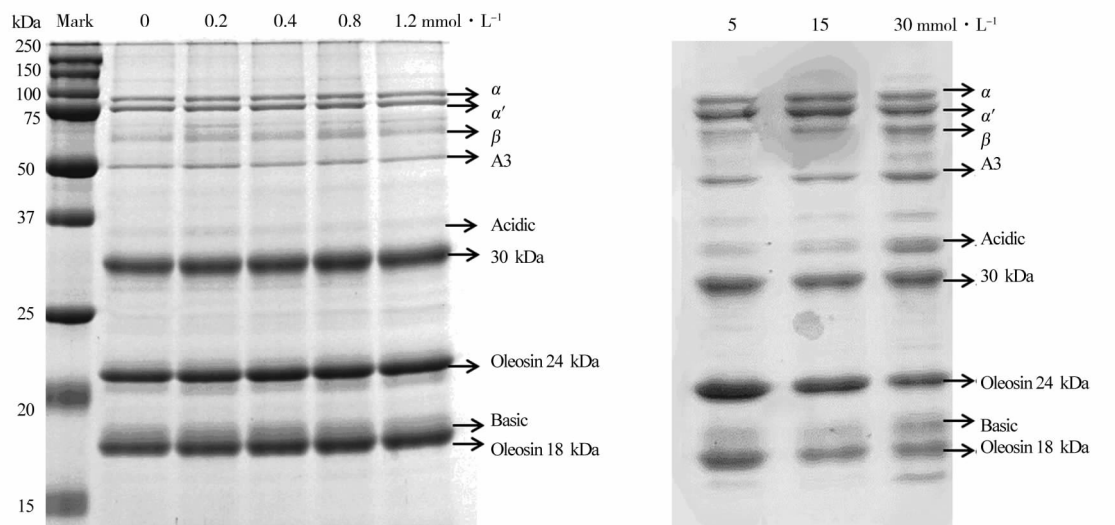


图5 EDTA-2Na 对油体表面蛋白的影响

Fig. 5 The effect of EDTA-2Na concentration on surface protein of oil body

从图5可以看出,用不同浓度 EDTA-2Na 处理的生豆浆提取油体,表面蛋白质的数量和种类都没有明显变化,说明油体和大豆蛋白质之间没有钙桥作用。并且当 EDTA-2Na 超过 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,油体表面结合的大豆蛋白质种类和数量增加。也就说明提取大豆油体时,加入 EDTA-2Na 对提取纯油体没有作用,甚至会有更多的其他蛋白结合在油体表面。

2.2.4 SDS SDS 是一种表面活性剂,可以破坏疏水相互作用^[15]。试验考察了 0~2.5% SDS 对油体表面蛋白质的影响。

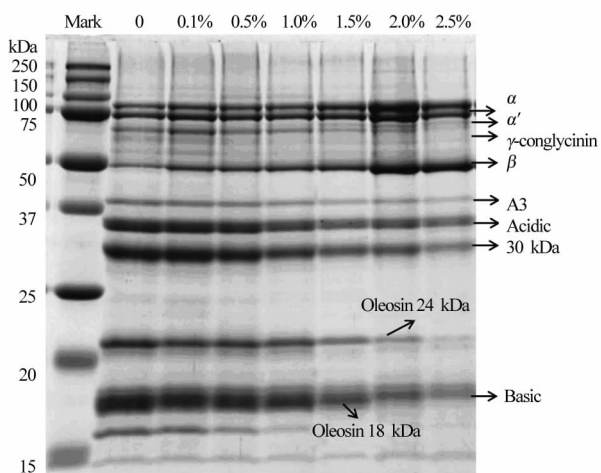


图6 SDS 对油体表面蛋白的影响

Fig. 6 The effect of SDS concentration on surface protein of oil body

从图6可以看出,随着 SDS 浓度的增加,油体蛋白(oleosin 24 kDa 和 oleosin 18 kDa)逐渐减少,当 SDS 达到 1.5% 时,oleosin 18 kDa 几乎全部消失,而 2.5% 时 oleosin 24 kDa 也完全消失。随着 SDS 浓度

的增加,大豆球蛋白和 30 kDa 蛋白逐渐减少,而 β -伴大豆球蛋白有增加的趋势,尤其是 SDS 为 2.0% 时增加明显。这很可能是因为油体特殊结构导致 SDS 取代了油体蛋白,从而使得油体蛋白随着 SDS 的增加而逐渐减少。oleosin 18 kDa 被完全取代需要的 SDS 浓度比 oleosin 24 kDa 完全取代需要的 SDS 浓度小。这可能是因为 oleosin 24 kDa 一级结构含有较长的中间疏水肽段,oleosin 18 kDa 的中间疏水肽段短,疏水肽段越长与油体中间的甘油三酯之间的疏水相互作用就越大,SDS 竞争取代油体蛋白时,与甘油三酯作用弱的优先被取代。因此,在提取油体时,SDS 会取代油体蛋白而使油体结构破坏,不利于油体的提取。但是,SDS 处理为分级分离不同分子量的油体蛋白提供了可能性。

2.3 温度对提取油体表面蛋白的影响

生豆浆中大豆球蛋白的变性温度为 $(90 \pm 2)^\circ\text{C}$, β -伴大豆球蛋白的变性温度为 $(70 \pm 2)^\circ\text{C}$ ^[17],并且油体不会与变性的蛋白质结合^[8]。所以,本试验探究了生豆浆分别在 50~100 $^\circ\text{C}$ 加热 15 min 对提取油体的表面蛋白影响。

图7表明,50 $^\circ\text{C}$ 和 60 $^\circ\text{C}$ 加热对油体表面蛋白质的影响不大;70 $^\circ\text{C}$ 时大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和 30 kDa 蛋白明显减少;80~100 $^\circ\text{C}$ 时大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白稍有减少,而 30 kDa 蛋白几乎全部消失。说明 70 $^\circ\text{C}$ 时蛋白质开始变性,从油体上解离下来;高于 80 $^\circ\text{C}$ 时,大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和 30 kDa 蛋白几乎全部从油体上解离,从而得到高纯度的油体。

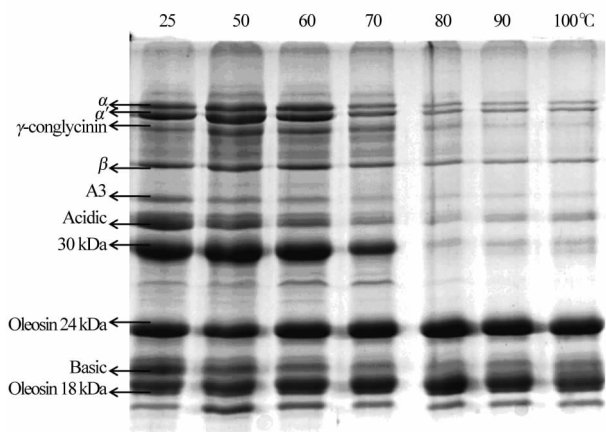


图7 不同温度对油体表面蛋白的影响

Fig. 7 The effect of temperature on surface protein of oil body

3 结 论

试验确定了超速离心提取大豆油体时添加蔗糖的浓度为 10%,在此基础上,考察了氯化钠、尿素、EDTA-2Na、SDS 和温度对油体提取的影响。SDS-PAGE 结果表明,大于 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素和 $80 \sim 100^\circ\text{C}$ 加热 15 min 的条件下提取油体,油体表面结合的大豆蛋白质去除效果明显,得到了较高纯度的油体;而氯化钠和 EDTA-2Na 处理生豆浆对去除表面结合的大豆蛋白质没有作用;SDS 可以取代油体蛋白,破坏油体天然结构,不利于油体的提取。

参考文献

- [1] 朱志华,李为喜,刘三才,等. 2002 年我国大豆 (*Glycine max*) 品种及种质资源的蛋白质和脂肪含量分析[J]. 植物遗传资源学报,2003,4(2):157-161. (Zhu Z H, Li W X, Liu S C, et al. Investigation on quality characters of soybean (*Glycine max*) varieties and germplasm grown in 2002[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2003, 4(2):157-161.)
- [2] Tzen J T, Huang A H. Surface structure and properties of plant seed oil bodies [J]. The Journal of Cell Biology, 1992, 117: 327-335.
- [3] Tzen J T C, Cao Y Z, Laurent P, et al. Lipids, proteins and structure of seed oil bodies from diverse species[J]. Plant Physiology, 1993, 101: 267-276.
- [4] Cercasov C, Manolescu B. Biochemical and therapeutical aspects of vitamin E[J]. Revue Roumaine de Chimie, 2005, 50: 419-432.
- [5] Chen B, McClements D J, Gray D A, et al. Physical and oxidative stability of pre-emulsified oil bodies extracted from soybeans[J]. Food Chemistry, 2012, 132: 1514-1520.
- [6] Iwanaga D, Gray D, Decker E A, et al. Stabilization of soybean oil bodies using protective pectin coatings formed by electrostatic deposition[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56: 2240-2245.
- [7] 吴娜娜,杨晓泉,郑二丽,等. 大豆油体乳液稳定性和流变性分析[J]. 农业工程学报,2002,28(S1):369-374. (Wu N N, Yang X Q, Zheng E L, et al. Analysis of stability and rheology of soybean oil body emulsions[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012, 28(Sup. 1): 369-374.)
- [8] Tzen J T C, Peng C C, Cheng D J, et al. A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination[J]. Journal of Biochemistry, 1997, 121: 762-768.
- [9] Jacks T J, Hensarling T P, Neucere J N, et al. Isolation and physicochemical characterization of the half-unit membranes of oilseed lipid bodies[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1990, 67: 353-361.
- [10] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [11] Chen Y, Ono T. Simple extraction method of non-allergenic intact soybean oil bodies that are thermally stable in an aqueous medium [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 7402-7407.
- [12] 莫重文,马宇翔,杨国龙. 蛋白质化学与工艺学[M]. 北京:化学工业出版社,2007:88-89. (Mo C W, Ma Y X, Yang G L. Protein chemistry and technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 88-89.)
- [13] 胡坤,赵谋明,林伟锋,等. 物理作用力对大豆分离蛋白凝胶结构特性的影响[J]. 食品科学,2005,26(6):69-73. (Hu K, Zhao M M, Lin W F, et al. Effect of physical force on texture properties of gels of soy protein isolates [J]. Food Science, 2005, 26(6): 69-73.)
- [14] 陈若愚,朱建飞. 无机与分析化学[M]. 大连:大连理工大学出版社,2007:240-245. (Chen R Y, Zhu J F. Inorganic and analytical chemistry [M]. Dalian: Dalian University of Technology Press, 2007: 240-245.)
- [15] 王璋,许时婴,汤坚. 食品化学[M]. 北京:北京轻工业出版社,1999:140-149. (Wang Z, Xu S Y, Tang J. Food chemistry [M]. Beijing: Chinese Light Industry Press, 1999: 140-149.)
- [16] Nikiforidis C V, Kiosseoglou V. Competitive displacement of oil body surface proteins by Tween 80-Effect on physical stability[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25: 1063-1068.
- [17] 汪立君,李里特,张晓峰,等. 利用 DSC 对大豆蛋白质热变性的研究[J]. 中国农业大学学报,2001,6(6):93-96. (Wang L J, Li L T, Zhang X F, et al. Study on soybean protein heating denaturation by DSC [J]. Journal of China Agricultural University, 2001, 6(6): 93-96.)