

选择性水解对大豆分离蛋白表面性质的影响

王 静¹, 陈 洁², 李 博³, 高红亮¹, 金明飞¹, 崔红亮⁴, 常忠义¹

(1. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200241; 2. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214000; 3. 上海工会管理职业学院, 上海 201415; 4. 平顶山金晶生物科技有限公司, 河南 平顶山 467215)

摘要:通过控制温度与 pH, 研究胃蛋白酶在不同处理条件下对大豆分离蛋白水解模式的影响及产物乳化性和起泡性的影响。结果表明: pH 2.0, 37℃ 时, 选择性水解 11S 组分; pH 3.8, 70℃ 时, 选择性水解 7S 组分; pH 2.0, 70℃ 时, 11S 组分与 7S 组分均被水解; pH 3.8, 37℃ 时, 11S 组分与 7S 组分几乎不发生水解。水解产物乳化特性显示 11S 被选择性水解后, 乳化活性与乳化稳定性均显著提高, 分别从 0.724, 25 min 提高到 1.716, 38.2 min; 7S 被选择性水解的蛋白乳化活性没有改善, 但乳化稳定性提高到 29.6 min; 而 11S 与 7S 均被水解后, 蛋白乳化活性提高到 1.417, 乳化稳定性则较差。各水解产物的起泡能力与泡沫稳定性均显著提高, 其中水解产物在 pH 4.5 处上清的起泡能力最强, 接近未水解蛋白的 4 倍, 7S 被水解的蛋白在 pH 4.5 处上清的泡沫稳定性最好, 约为未水解蛋白的 1.2 倍。

关键词: 11S; 7S; 选择性水解; 乳化特性; 起泡特性

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.06.0924

Effect of Selective Hydrolysis on Surface Properties of Soybean Protein Isolate

WANG Jing¹, CHEN Jie², LI Bo³, GAO Hong-liang¹, JIN Ming-fei¹, CUI Hong-liang⁴, CHANG Zhong-yi¹

(1. College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200241, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214000, China; 3. Shanghai Vocational Management College of Trade Union, Shanghai 201415, China; 4. Pingdingshan Tianjing Plant Albumen Co. Ltd, Pingdingshan 467000, China)

Abstract: Since 7S and 11S fractions in a soy protein isolate have many differences in chemical, physical and functional properties, there would be different effects on protein properties of selective hydrolysis of 7S and 11S. During the experiments, SPI was treated with controlled pH and temperature to make the specific component denatured, and the denatured component would be hydrolyzed by pepsin. The results revealed that when the temperature was 37℃, pH was 2.0, 11S was selectively hydrolyzed; and 7S was selectively hydrolyzed under the condition of 70℃, pH 3.8. When the temperature was 70℃, pH was 2.0, both 11S and 7S were hydrolyzed. All of the hydrolysis reactions were hard to happen at 37℃, pH 3.8. The determination of emulsifying properties of hydrolysates showed the hydrolysis of 11S could significantly improve emulsifying activity and emulsifying stability and make them increased to 1.716, 38.2 minutes; The hydrolysis of 7S could improve emulsifying stability to 29.6 minutes, while emulsifying activity had no improvement; The non-selective hydrolysis of 11S and 7S could improve emulsifying activity to 1.417, but emulsifying stability was worsen. Foaming capacity and foam stability of the hydrolysates were both significantly improved. All of the supernatant from hydrolysates centrifuged at pH 4.5 had more excellent foaming ability which was 4 times as high as unhydrolyzed protein. The foam stability of supernatant from protein with 7S component hydrolyzed was the best, which was 1.2 times as high as unhydrolyzed protein.

Key words: 11S; 7S; Selective hydrolysis; Emulsifying properties; Foaming properties

大豆分离蛋白主要由大豆球蛋白(11S)和 β -伴大豆球蛋白(7S)组成, 11S 与 7S 的营养性质和功能性质各不相同^[1], 因此, 专一水解 11S 或 7S 组分对蛋白性质必定会有不同的影响。然而, 现阶段进行的很多利用蛋白酶的水解作用改进大豆分离蛋白功能性的研究中, 却很少涉及 7S 或 11S 特定组分的专一水解。

天然大豆蛋白分子具有紧密的球状结构, 与酶作用的位点包裹在蛋白分子内部^[2]。常温时 pH 2.0 的酸处理, 使 11S 组分发生明显的亚基解离, 结构展开, 易于酶解, 而对 7S 的亚基解离几乎没有效果^[3]。pH 3.8 时, 70℃ 的高温处理会使 7S 结构展

开, 而 11S 则仍旧以致密紧凑的结构存在^[4]。

本文通过控制酸处理与热处理的条件使 11S 和 7S 结构分别展开, 在酶解时达到特定组分被选择性水解的效果。比较水解产物的乳化特性与起泡特性, 研究选择性水解对大豆分离蛋白表面性质的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

低温脱脂豆粕(山东禹王蛋白有限公司); 胃蛋白酶(上海生工生物工程技术有限公司), 酶活

收稿日期: 2014-08-11

基金项目: 质检公益性行业科研专项项目(201310255)。

第一作者简介: 王静(1988-), 女, 硕士, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: jing886600@163.com。

通讯作者: 常忠义(1968-), 男, 博士, 副教授, 主要从事微生物与食品生物化学研究。E-mail: zychang@bio.ecnu.edu.cn。

力 3 000 ~3 500 U·mg⁻¹;30% 丙烯酸胺/甲叉双丙烯酸胺溶液、N,N,N',N'-四甲基二乙胺、β-巯基乙醇,分析纯,美国 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

加热制冷循环器、RW20 型机械搅拌器、pH 计、JMS 型胶体磨、Avanti J-26XP 高效离心机、3K15 冷冻离心机、SJ203A-250 多功能搅拌机、Christ 冷冻干燥机、601 超级恒温水浴、磁力搅拌器、PowerPace Basic 电泳仪、Mini-PROTEAN Tetra Cells 垂直电泳槽、HY-5 回旋式振荡器、凝胶成像仪、匀浆机、紫外-可见分光光度计、微量进样器、实验室自制起泡性测定专用量筒。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆分离蛋白(SPI)的制备 采用“碱溶酸沉”法以低温脱脂豆粕为原料制备 SPI,在制备过程中尽可能避免加热或其他苛刻条件(如强酸或强碱等),获得无变性或极少变性的 SPI。

1.3.2 选择性水解大豆分离蛋白(SPI) 将蛋白配制成质量分数为 8% 的溶液,分为 4 组,采用不同的条件处理,对 SPI 进行水解。具体操作如下:蛋白溶液在某一条件下预处理 10 min 后,加入蛋白质量 0.04% 的胃蛋白酶,水解 1 h 后,灭酶,取样,再调节 pH4.5,5 000 g 离心,取上清留样。每组的水解条件见表 1。

表 1 水解的条件
Table 1 Hydrolysis conditions

实验号 Test No.	温度 Temperature/℃	pH
1	37	2.0
2	70	3.8
3	70	2.0
4	37	3.8

1.3.3 水解产物的 SDS-PAGE 凝胶电泳分析 将未处理的大豆分离蛋白(SPI)及水解过程中各步的水解产物进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析,分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%。电泳过程于恒流下进行,在浓缩胶中电流为 20 mA,进入分离胶后增至 40 mA。

1.3.4 水解产物乳化特性的测定 蛋白质的乳化特性以乳化活性(EA)和乳化稳定性(ES)表示,采用浊度法^[5]测定并对测定方法进行改进。具体操作如下:用 0.1 mol·L⁻¹的磷酸盐缓冲液调节蛋白溶液至 pH7.0、浓度 1%,取该溶液 30 mL,边搅拌边缓慢加入 10 mL 大豆油,然后以 17 000 r·min⁻¹高速匀浆 2 min 制成乳状液,用微量进样器从底部取 25 μL 乳状液,迅速与 25 mL 0.1% SDS 溶液混合均匀,在

500 nm 波长下比色,记录吸光度(A₀),此值即为乳化活性 EA;15 min 后再从底部取 25 μL 乳状液,同样稀释,比色,记录吸光度(A₁)。则乳化活性与乳化稳定性 ES 的表示方法为:

$$ES(\min) = A_0 \times t / (A_0 - A_1),$$

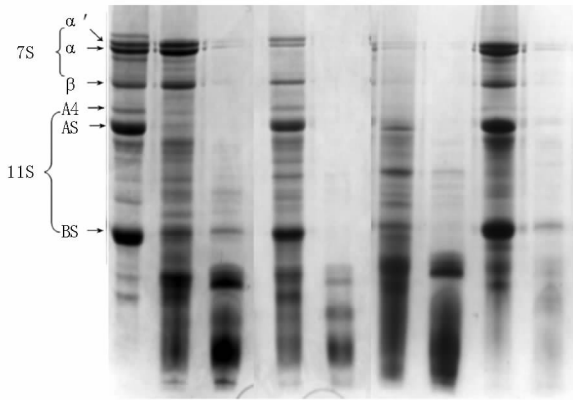
t 为两次测定乳化活性的时间间隔。

1.3.5 水解产物起泡特性的测定 采用高速搅打、测定泡沫体积的方法来衡量蛋白的起泡特性。蛋白的起泡特性包括起泡能力(FC)和泡沫稳定性(FS),将蛋白样品用 pH7.0 的 0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液配成 5% 的浓度,取 50 mL 倒入实验室自制的起泡性测定专用量筒中,用匀浆机在 17 000 r·min⁻¹转速下分 3 次搅打 3 min,每次 1 min;搅打后尽快记录泡沫体积(V₀),即为起泡性 FC,静置 30 min 后再次测定泡沫体积(V₁)。FS(%) = (V₁/V₀) × 100

2 结果与讨论

2.1 不同酸处理与热处理对 SPI 水解模式的影响

将调整好浓度的蛋白溶液在不同条件下分别水解,所取各样品的 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱见图 1。



从左至右分别为 SPI;pH2.0、37℃ 水解产物;pH2.0、37℃ 水解产物在 pH4.5 处离心上清;pH3.8、70℃ 水解产物;pH3.8、70℃ 水解产物在 pH4.5 处离心上清;pH2.0、70℃ 水解产物;pH2.0、70℃ 水解产物在 pH4.5 处离心上清;pH3.8、37℃ 水解产物;pH3.8、37℃ 水解产物在 pH4.5 处离心上清。

Electrophoresis band from left to right respectively represents SPI; Hydrolysate in pH2.0, 37℃; Supernatant from hydrolysate in pH2.0, 37℃ centrifuged at pH4.5; Hydrolysate in pH3.8, 70℃; Supernatant from hydrolysate in pH3.8, 70℃ centrifuged at pH4.5; Hydrolysate in pH2.0, 70℃; Supernatant from hydrolysate in pH2.0, 70℃ centrifuged at pH4.5; Hydrolysate in pH3.8, 37℃; Supernatant from hydrolysate in pH3.8, 37℃ centrifuged at pH4.5.

图 1 水解产物的 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱
Fig. 1 SDS-PAGE of hydrolysates

从图 1 可以看出,在 pH2.0、37℃ 的条件下酶解 1 h 后,泳道中对应 11S 组分的条带基本完全消失,

而对应 7S 组分的条带则未发生变化,说明该条件下胃蛋白酶专一水解 11S 球蛋白,对 7S 则几乎没有降解作用。且从 pH 2.0、37℃ 水解产物 pH4.5 处离心上清的图谱中还可以看出 11S 水解产物中有大量小分子量的蛋白,产物在等电点下有较高的溶解度。pH3.8、70℃ 水解 1 h 后,7S 亚基对应的条带颜色明显变浅,11S 亚基对应的条带几乎无变化,说明 pH3.8 时,70℃ 的热处理只对 7S 的水解有明显促进作用,对 11S 则几乎没有作用。70℃、pH2.0 的条件下水解 1 h 后,11S 与 7S 亚基对应的条带均基本消失,出现大量低分子量蛋白对应的条带,说明 70℃、pH2.0 的条件下,11S 与 7S 分别受酸处理与热处理的影响,均发生变性,空间结构展开,容易被胃蛋白酶作用。在 37℃、pH3.8 的条件下水解 1 h 后,只有 11S 的 A₄ 酸性亚基对应的条带颜色变浅,而 11S 组分其他亚基对应的条带与 7S 对应的条带均基本无变化,其上清的泳道中也只有很浅的条带出现,说明在 37℃、pH3.8 的条件下,大豆分离蛋白各组分仍旧以致密紧凑的结构存在,酶解均很困难,酶解产生的小分子量蛋白很少。

2.2 11S 与 7S 的选择性水解对蛋白乳化性质的影响

采用浊度法分别测定了未处理的大豆分离蛋白(SPI)、11S 被选择性水解的蛋白、7S 被选择性水解的蛋白、11S 和 7S 组分均被水解的蛋白的乳化活性(EA)和乳化稳定性(ES),结果如图 2 和 3。

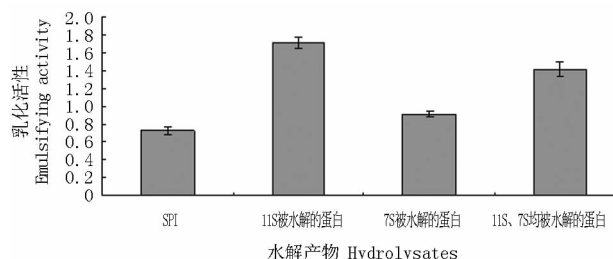


图2 水解产物的乳化活性

Fig. 2 Emulsifying activity of hydrolysates

蛋白一般通过两方面作用来稳定乳状液,一方面在制备乳状液的均质过程中降低水-油界面张力,另一方面在已分散油滴外围通过分子间交互作用形成分子层,抑制颗粒聚集^[6]。

就乳化活性而言,蛋白吸附至新的油-水界面的速度越快,并随即在界面上展开、重排和暴露疏水集团的能力越大,则将界面张力下降至低水平的能力越强,乳化活性就越强。从图 2 可知,11S 被水解的蛋白与 11S、7S 均被水解的蛋白,其乳化活性都比 SPI 有明显提高,且 11S 被水解的蛋白比 11S、7S 均被水解的蛋白提高的更多。7S 被水解的蛋白,其乳化活

性与 SPI 相比也有提高,但效果很小。这是由于 SPI 中 11S 是由二硫键连接酸性亚基和碱性亚基而成的六聚体^[7],具有致密紧凑的结构,分子量较大,迁移灵活性 and 表面疏水性较低,在高速均质时,分子扩散、吸附到水-油界面上的速度慢,降低界面张力的能力弱,乳化活性较差。11S 被水解后,球蛋白的紧密结构展开、分解,暴露出疏水基团,表面张力下降,容易进入油相,提高了分子迁移速度和重排速度,能够迅速降低界面张力,从而有利于乳化活性的提高。7S 组分的水解会释放出疏水基团,增加蛋白疏水性,有利于乳化性的提高,但由于水解 7S 的 α 亚基时会导致不溶性聚集体的形成^[8],又会影响乳化性,使得 7S 的水解对大豆分离蛋白的乳化活性没有明显作用。以上结果说明 11S 是限制大豆分离蛋白乳化特性的关键因素。

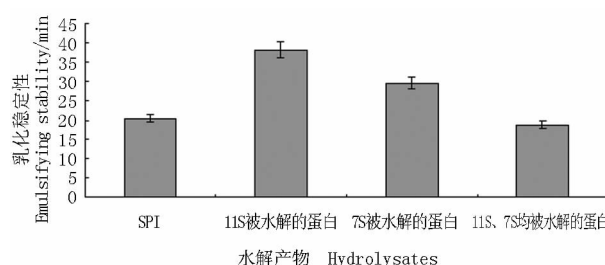


图3 水解产物的乳化稳定性

Fig. 3 Emulsifying stability of hydrolysates

如图 3 所示,11S 被水解的蛋白和 7S 被水解的蛋白的乳化稳定性显著提高,11S、7S 均被水解的蛋白的乳化稳定性反而比大豆分离蛋白略低。这一结果的产生是因为乳化稳定性除了与蛋白降低界面张力的能力有关,还与蛋白能否在油滴外围形成强度较大的刚性结构有关^[6]。蛋白的水解不仅使蛋白分解,暴露出疏水基团,并且有利于分子柔性较好的可溶性聚集体的形成^[9],聚集体能有效吸附到油-水界面降低表面张力,并通过共价和非共价相互作用形成强度较大的网络状结构,使乳状液稳定,故 11S 被水解的蛋白和 7S 被水解的蛋白乳化稳定性提高。11S、7S 均被水解的蛋白降低,可能是因为蛋白被完全分解,小分子肽含量大量增加,而分子量 10 kDa 以上是保证体系有良好乳化性的基本要求,分子量过小的蛋白在油-水界面无法形成强度大的刚性结构,形成的乳状液不稳定^[10]。

2.3 11S 与 7S 的选择性水解对蛋白起泡性质的影响

选择性水解对于产物的起泡性质也有很大影响,未水解的大豆分离蛋白(SPI)、11S 组分被水解的蛋白、7S 组分被水解的蛋白、11S 和 7S 组分均被水解的蛋白及它们在 pH4.5 时离心得到的上清的起泡能力和泡沫稳定性见图 4 和 5。

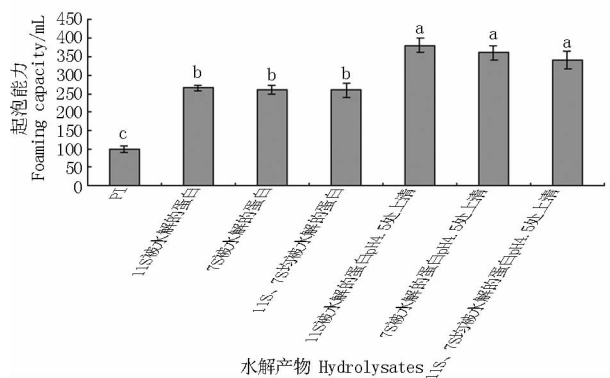


图4 水解产物的起泡能力

Fig. 4 Foaming capacity of hydrolysates

由图4可知,11S组分被选择性水解的蛋白、7S组分被选择性水解的蛋白、11S和7S组分均被水解的蛋白三者的起泡能力几乎没有差别,均显著高于未水解的大豆分离蛋白,且水解产物 pH4.5 处上清的起泡能力更加优秀,达到未水解蛋白的3~4倍。说明,11S组分与7S组分的水解均可提高蛋白起泡能力,这可能与水解作用导致蛋白分子疏水性及表面张力变化有关;pH4.5条件下可溶的小分子量肽段起泡能力特别强,这一现象与李维瑶^[11]研究,得出的分子量大小在5~10 kDa的水解蛋白含量越高起泡性越强的结论一致。

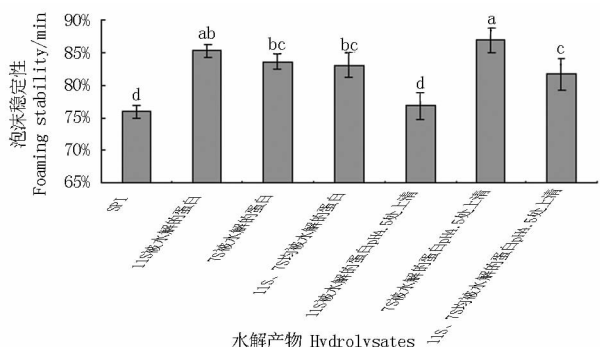


图5 水解产物的泡沫稳定性

Fig. 5 Foaming stability of hydrolysates

由图5可知,相对于未水解的大豆分离蛋白来说,水解后的蛋白,其泡沫稳定性均有较为明显的提高,且提高的程度基本相当;而它们在 pH4.5 处上清的泡沫稳定性则有较大差异,其中7S组分被水解后的蛋白,其上清的泡沫稳定性达86.88%,11S组分被水解后的蛋白,上清的泡沫稳定性只有76.88%,11S和7S组分均被水解的蛋白,在 pH4.5 处上清的泡沫稳定性居于两者之间,为81.76%。以上结果表明,水解可改善蛋白的泡沫稳定性。水解使蛋白暴露出疏水基团,大豆蛋白的部分肽链间的相互作用加强,形成了一个二维保护网络,使界面膜得以加强,这样就促进了泡沫的稳定^[12]。水解产物在 pH4.5 处上清的泡沫稳定性差异其原因尚不清楚,可能与肽的氨基酸组成、自由氨基含量等有关^[10,13]。

3 结 论

通过控制温度与 pH,胃蛋白酶可选择性水解大

豆分离蛋白的11S与7S组分,结果表明,pH2.0,37℃时,选择性水解11S组分;pH3.8,70℃时,选择性水解7S组分;pH2.0,70℃时,11S组分与7S组分均被水解;pH3.8,37℃时,11S组分与7S组分几乎不发生水解。水解模式不同,水解产物的乳化特性与起泡特性也不同,大豆蛋白体系11S被水解但7S保留,乳化活性与乳化稳定性均显著提高;7S被选择性水解的蛋白乳化活性没有改善,但乳化稳定性提高;而11S与7S均被水解后,蛋白乳化活性提高,乳化稳定性则较差。各水解产物的起泡能力与泡沫稳定性均显著提高,其中水解产物在 pH4.5 处上清的起泡能力更加优秀,达到未水解蛋白的3~4倍。

参考文献

- [1] Saio K, Watanshe T. Differences in functional properties of 7S and 11S soybean proteins[J]. Journal of Texture Studies, 1978, 9(1-2): 135-157.
- [2] 逯昕. 酶改性制备专用大豆分离蛋白的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008. (Lu X. Study on preparation of dedicated SPI by enzymatic modification[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.)
- [3] 源博恩. 亚基解离与重聚集对大豆蛋白结构和功能特性的影响[D]. 广州: 华南理工大学, 2012. (Yuan B E. Effect of subunits dissociation and aggregation on structure and functional properties of soy protein[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.)
- [4] Renkema J M S, Lakemond C M M, de Jongh H H J, et al. The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins[J]. Journal of Biotechnology, 2000, 79(3): 223-230.
- [5] Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins; Evaluation of a turbidimetric technique[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(3): 716-723.
- [6] Walstra P. Principles of emulsion formation[J]. Chemical Engineering Science, 1993, 48(2): 333-349.
- [7] Yuan Y J, Velev O D, Chen K, et al. Effect of pH and Ca²⁺-induced associations of soybean proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(17): 4953-4958.
- [8] Tang C, Wang X, Yang X. Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2009, 114(4): 1484-1490.
- [9] Sheen S J, Sheen V T. Effect of chemical and enzymatic degradation on the functional properties of fraction-1-protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988, 36(3): 445-450.
- [10] 刘瑾. 酶法改善大豆分离蛋白起泡性和乳化性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008. (Liu J. Enhancing the foaming and emulsifying properties of soybean protein isolate by enzymatic modification. [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.)
- [11] 李维瑶. 高起泡性大豆分离蛋白的研究及其在蛋糕中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2010. (Li W Y. Study on SPI with good foaming property and application in cake[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010.)
- [12] Garcra M C. Composition and characterization of soybean and relate products[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1997, 37(4): 361-391.
- [13] Wager J R, Guéguen J. Surface functional properties of native, acid-treated and reduced soy glycinin. 1. Foaming properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(6): 2173-2180.