

## 氨处理对醇法大豆浓缩蛋白功能性和结构的影响

樊永华, 华欲飞

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘 要:**以氨做碱性剂通过均质、物化改性、喷雾干燥等手段对醇法大豆浓缩蛋白 (SPC) 进行改性, 以期获得功能性较好的醇法大豆浓缩蛋白。并研究了氨处理对醇法大豆浓缩蛋白的表面疏水性、巯基和二硫键、分子量分布等结构产生的影响。结果表明: 加入 3 mL 的氨水时得到溶解性、凝胶性和乳化性等功能性较好的大豆浓缩蛋白。氨处理对大豆浓缩蛋白的表面疏水性和分子量分布有影响, 大豆蛋白的表面疏水性指数, 随着加氨量的增加而增加, 大豆蛋白中的聚集体随着加氨量的增加而增加, 但氨处理对巯基和二硫键影响不大。

**关键词:**氨水; 醇法大豆浓缩蛋白; 功能性; 结构表征

**中图分类号:** Q518.4

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841 (2008) 05-0854-05

## Effect of Ammonia Treatment on Functionality and Structure of Alcohol Leaching Soybean Protein Concentrate

FAN Yong-hua, HUA Yu-fei

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

**Abstract:** To acquire functional alcohol leaching soy protein concentrate (SPC), ammonia was used as basic reagent and SPC was modified through the process of homogenizing, physical and chemical modification, spray dryness and so on. The structural changes of SPC after ammonia treatment was also determined. Result showed that better functional properties such as solubility, gel properties and emulsification properties could be acquired by adding 3 mL ammonia in protein. The surface hydrophobicity index ( $S_0$ ) of soybean protein and molecular weight distribution could be affected by ammonia treatment,  $S_0$  and aggregates increased with the increase of ammonia. However, ammonia treatment has little effect on the sulfhydryl and disulfide bond.

**Key words:** Ammonia; Alcohol; leaching; Soy protein concentrate; Functionality; Structural token

目前, 大豆浓缩蛋白的生产工艺主要有两种方法, 即稀酸浸提法和含水乙醇浸提法。相对于酸法大豆浓缩蛋白, 醇法大豆浓缩蛋白生产工艺中几乎无污水排放, 避免环境污染, 有利于副产品进一步利用, 提取液的浓缩物可进一步加工成低聚糖、异黄酮、皂甙等产品。但是由于醇溶液强烈的蛋白质变性和聚集作用, 使蛋白质溶解度较低 ( $NSI < 10\%$ ), 严重限制醇法大豆浓缩蛋白的应用范围。因此, 通过改性提高大豆浓缩蛋白溶解性及其他功能特性, 具有十分重要意义<sup>[1-2]</sup>。

通过调节大豆蛋白的 pH 值, 可以提高蛋白的溶解性、凝胶性、乳化性等功能性指标。用 NaOH 做碱性剂时产生盐, 产品有咸味, 而用氨做碱性剂由于氨具有挥发性, 能在真空及干燥过程中被去除, 不易

产生盐类物质, 且可以增加 pH 值, 有利于蛋白质溶解。从而有利于醇法大豆浓缩蛋白功能性。由于目前市场上对功能性浓缩蛋白需要的迫切性, 醇法大豆浓缩蛋白作为改性原料和氨做碱性剂的优越性, 以及用氨处理醇法大豆浓缩蛋白提高其功能性的研究很少。因此, 以氨做碱性剂对醇法大豆浓缩蛋白进行改性, 提高其溶解性、凝胶性和乳化性等功能性指标。并对氨处理对醇法大豆浓缩蛋白结构的影响进行了研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料与试剂

材料: 醇法大豆浓缩蛋白粉

试剂: 氨水, 1-苯氨-8-萘磺酸 (ANS), 考马斯亮

收稿日期: 2008-04-28

基金项目: “十一五”国家重点科技支撑计划资助项目 (2006BAD05A08)。

作者简介: 樊永华 (1983-), 女, 硕士研究生, 现主要从事植物蛋白方面的研究与开发。E-mail: fanyonghua1983@yahoo.com.cn。

蓝 G-250,5,5'-二硫代二硝基苯甲酸盐(DNTB),乙二胺四乙酸(EDTA),十二烷基硫酸钠(SDS),2-巯基乙醇,尿素,盐酸胍,三氯乙酸(TCA),10 种标准蛋白等。

## 1.2 仪器

Fluko FA25 型均质机,物性质构仪,F96 荧光分光光度计,UV-2100 分光光度计,Agilent1100 高效液相色谱仪等。

## 1.3 方法

1.3.1 氨处理醇法大豆浓缩蛋白的工艺条件 浓度 8% 的醇法大豆浓缩蛋白(样品总量 1500 mL)→加入不同量的氨水(0、1、2、3、4、5、6、8、10 mL)→搅拌→均质→物化改性→喷雾干燥。

### 1.3.2 功能性测定

1.3.2.1 溶解性(NSI)测定 根据汪家政<sup>[3]</sup>等的方法测定,NSI = 上清液含氮量/总含氮量 × 100%

1.3.2.2 凝胶性测定 大豆蛋白凝胶的制备:将大豆蛋白与去离子水按 1:4 的质量比搅拌混合,抽真空 30 min,90℃ 水浴 30 min,加热结束后迅速放入冰水浴中冷却,在 4℃ 下放置 24 h,取出陈化 30 min 即可进行下一步测量。质构性质测定参照王洪晶的方法<sup>[4]</sup>:用物性测定仪测定凝胶的强度(TPA 测定),选用直径为 10 mm 的圆柱状平头冲头。设定前进速度:2,冲压速度:1;后撤速度:2,冲压深度:20 mm;1 次测定过程中探头下压 2 次,每个样品重复 3 次测定过程,取平均值得到凝胶质构参数。选取凝胶硬度,粘性,内聚性和回复性 4 个参数对凝胶质构性质进行分析。

1.3.2.3 乳化性测定 大豆蛋白乳化体的制备:称取 7 份油和 3.5 份水高速剪切 1 min,再加入 1 份蛋白粉和 3.5 份水高速剪切 5 min,迅速加热到 90℃ (约 10 min),冷却,放入 4℃ 冰箱中过夜。乳化性质的测定:有无油水析出,乳化体的强度(除冲压深度为 10 mm 外和凝胶质构性质的测定一样)

1.3.3 结构表征 表面疏水性测定参照华欲飞<sup>[5]</sup>等的方法。

蛋白质的巯基(包括游离的和埋藏在疏水基团内部的 SH)和总巯基基团(包括 SH 和还原的 SS)含量的测定,是参考 Ellman<sup>[6]</sup>的方法。

巯基含量的测定<sup>[7]</sup>取 3 mL 的蛋白质溶液,加入 3 mL 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 含有 1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA 和 1% SDS 的磷酸盐缓冲液,再加入 0.1 mL DNTB,剧烈震荡后在 25℃ 条件下水浴 1 h。然后将混合物以

10 000 r · min<sup>-1</sup> 速度离心 30 min。以不加 DNTB 的为对照,取上清液在 412 nm 波长下测定吸光度,以 13 600 M<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup> 消光系数计算巯基含量。

总巯基基团含量的测定<sup>[8]</sup>取 1 mL 的蛋白质溶液,加入 0.05 mL 的 2-巯基乙醇和 4 mL 的尿素-盐酸胍溶液,将此混合物在 25℃ 条件下水浴 1 h 后取出,再加入 10 mL 的 12% 的三氯乙酸(TCA),在 25℃ 条件下再次水浴 1 h。然后将混合物以 5 000 r · min<sup>-1</sup> 速度离心 10 min。沉淀分散在 5 mL 的 12% 的 TCA 中,然后离心除去 2-巯基乙醇,如此重复两次。最后将沉淀溶解在 10 mL 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 含有 1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA 和 1% SDS 的磷酸盐缓冲液,再加入 0.08 mL DNTB,剧烈震荡后在 25℃ 条件下水浴 1 h。然后将混合物以 10 000 r · min<sup>-1</sup> 速度离心 30 min。以不加 DNTB 的为对照,取上清液在 412 nm 波长下测定吸光度,以 13 600 M<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup> 消光系数计算巯基含量。

分子量分布:分别称取 0.1 g 蛋白样品,配成 1% 的蛋白溶液,充分搅拌使其溶解(约 1 h),然后以 10 000 r · min<sup>-1</sup> 高速离心 10 min,取上清液通过 0.45 μm 的醋酸纤维素膜,收集滤液于 Agilent1100 高效液相色谱仪上样,色谱柱型号:Shodex KW-804 (日本 Shodex 公司),二极管阵列检测器(DaD),缓冲液同上,洗脱条件 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,220 nm 检测,柱温 30℃。以 10 种标准蛋白作相对分子质量的标准曲线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 功能性

2.1.1 溶解性(NSI) 由表 1 可以看出:改性后的大豆浓缩蛋白的水溶性 NSI 比原料金海大豆浓缩蛋白(NSI 为 4.52)显著提高,且随着加氨量的增加,大豆浓缩蛋白的水溶性明显提高,但当加氨量达到 10 mL 时反而降低了。因为加氨量的增加使 pH 值增加,当 pH 偏碱性时,会使蛋白质解离和解聚,促使溶解度增加。可能是由于部分蛋白质又发生了聚集。根据蛋白质化学理论<sup>[9]</sup>可知,调整醇法 SPC 的 pH 值,可使蛋白聚集体内静电作用破坏,有利于蛋白质微粒解体,同时亦可使蛋白质所带的静电荷增加,极性吸湿点增多,结合水的能力增强<sup>[2]</sup>。当 pH 偏碱性时,会使蛋白质解离和解聚,促使溶解度增加<sup>[10]</sup>。用氨水调节 pH 值时,其电离出的亲水基团与极性水分子相互作用形成水化层,包围于蛋白质分子周围形成颗粒的亲水胶体,削弱了蛋白质分子

之间的作用力,蛋白质分子表面极性基团越多,水化层越厚,蛋白质分子与溶剂分子之间的亲和力越大,所以 NSI 也越大<sup>[11]</sup>。但当碱性过强时,高静电荷引起的强烈的分子静电排斥作用,导致蛋白质分子膨胀和展开,造成不可逆的强烈变性,表现在碱性过强时,水溶性蛋白质随着碱性的增强而降低<sup>[5-6]</sup>。

表1 不同加氨量下大豆浓缩蛋白的溶解度

Table 1 Solubilities of different additive quantity of ammonia			
加氨量 Ammonia/mL	水分 Moisture/%	总氮 Protein/%	氮溶指数 Solubity/%
0	5.30	69.94	15.28
1	4.00	70.61	21.09
2	4.50	72.34	31.72
3	4.00	70.61	46.84
4	5.77	70.86	47.62
5	5.39	71.31	48.86
6	5.29	70.52	50.96
8	5.84	71.59	64.49
10	5.92	72.22	59.93

2.1.2 凝胶性 由表2可以看出:改性后的大豆浓缩蛋白的凝胶强度比原料金海大豆浓缩蛋白(凝胶强度为31.583 g)明显提高,随着加氨量的增加,大豆浓缩蛋白的凝胶强度呈先增加然后降低的趋势,当加氨量为3 mL时凝胶强度达到最大值,然后再增加加氨量则凝胶强度降低。粘性也是当加氨量为3 mL时最大,而弹性和内聚性变化则不大。这可能是由于加氨量的不同,导致蛋白溶液pH的不同,而pH可改变蛋白质功能基团电离(作用)和双电层厚度,影响蛋白质-蛋白质相互作用<sup>[12]</sup>。当加氨量从1 mL增加到3 mL(pH7~9),碱使蛋白质变性,内部基团暴露,有利于网络结构的形成。另外,氨处理和加热处理的共同作用使蛋白质分子适度变性,促进了蛋白质分子的溶解,使溶液中可利用的蛋白质分子增多,形成更多的蛋白质-蛋白质作用,使得到的

表2 不同加氨量下的凝胶指标

Table 2 Gel properties of different additive quantity of ammonia				
加氨量 Ammonia/mL	凝胶强度 Hardness/g	粘性 Adhesiveness/g·s	弹性 Springiness	内聚性 Cohesiveness
0	102.789	-151.171	0.980	0.579
1	120.309	-219.775	0.998	0.453
2	285.209	-496.365	0.999	0.711
3	310.815	-555.955	0.993	0.747
4	181.320	-277.233	0.965	0.707
5	174.902	-186.942	0.978	0.632
6	154.754	-236.723	0.999	0.589
8	68.617	-185.419	0.986	0.619
10	99.899	-252.075	0.999	0.589

蛋白凝胶强度增加。但是再增加加氨量则凝胶强度降低,这可能是由于pH的增加,负离子间静电排斥

作用增强,阻碍了蛋白质分子内或分子间的连接,从而降低了凝胶强度。但加氨量逐步增加后凝胶强度下降,可能是由于蛋白质部分发生了水解,具有较小的肽链,形成的凝胶强度较低。

2.1.3 乳化性 由表3可以看出:原料金海大豆浓缩蛋白不成乳化体,改性后浓缩蛋白的乳化体无油水析出,强度提高,弹性和内聚性则变化不大。由于改性后溶解性的增加有利于乳化性。在pH值较低时,氨水电离出亲水基团,蛋白质分子表面极性基团越多,水化层越厚,蛋白质分子与溶剂分子之间的亲和力越大,因而NSI也越大,乳化性能也随之提高。当pH值较高时,在强碱性条件的作用下,分子中各种次级键断裂,使其空间构象从紧密有序的状态变成松散无序的状态,经过均质处理后,剪切成大量的小分子的蛋白链,经过加热后聚集成降低了对油的包裹能力,乳化能力降低<sup>[11]</sup>。

表3 不同加氨量下大豆浓缩蛋白的乳化指标

Table 3 Emulsifying properties of different additive quantity of ammonia				
加氨量 Ammonia/mL	强度 Hardness/g	粘性 Adhesiveness /g·s	弹性 Springiness	内聚性 Cohesiveness
0	69.492	-106.854	0.928	0.558
1	35.492	-39.564	0.968	0.594
2	53.157	-73.589	0.963	0.548
3	68.951	-104.722	0.958	0.593
4	76.037	-56.098	0.954	0.532
5	87.302	-147.745	0.956	0.609
6	79.509	-128.96	0.956	0.579
8	63.009	-87.499	0.968	0.546
10	58.691	-84.055	0.966	0.632

2.2 结构表征

2.2.1 不同加氨量下的表面疏水性 从图1可以

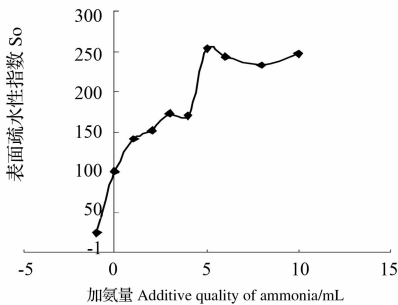


图1 加氨量对大豆蛋白表面疏水性的影响

Fig.1 Effect of ammonia on hydrophobicity index( $S_0$ ) on soybean protein surface

-1 表示氨改性的原料金海醇法大豆浓缩蛋白,下同。  
“-1” indicate the raw material of soy protein concentrate before ammonia treatment. Same as below.

看出:氨改性后的大豆浓缩蛋白的表面疏水性呈现平缓上升的趋势。由于表面疏水性和蛋白表面结构性质相关,通过表面疏水性的变化,可以判断蛋白聚集的情况。蛋白质疏水性的增加是由于蛋白质解折叠,疏水性的脂肪族与芳香族氨基酸侧链基团暴露所致,表明反应后的大豆蛋白构象已发生了改变。

2.2.2 巯基和二硫键 不同加氨量下的游离巯基含量测定结果见图 2。由图 2 可以看出:改性后的游离巯基都变小了,通常游离巯基含量的降低意味着反应后的蛋白质发生了变性,或者通过形成分子间的二硫键而聚集,或者发生了氧化。

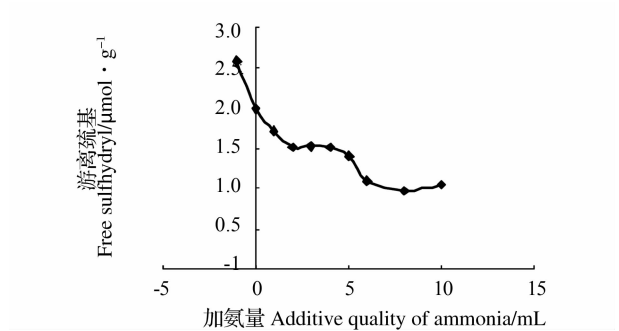


图 2 加氨量对大豆蛋白游离巯基的影响  
Fig.2 Effect of ammonia on free sulfhydryl of soybean protein

从图 2~4 可以看出:游离巯基和二硫键都减小了,说明没有发生巯基与二硫键交换的过程,且可能由于巯基氧化成非二硫键形式的其它形式的基团,

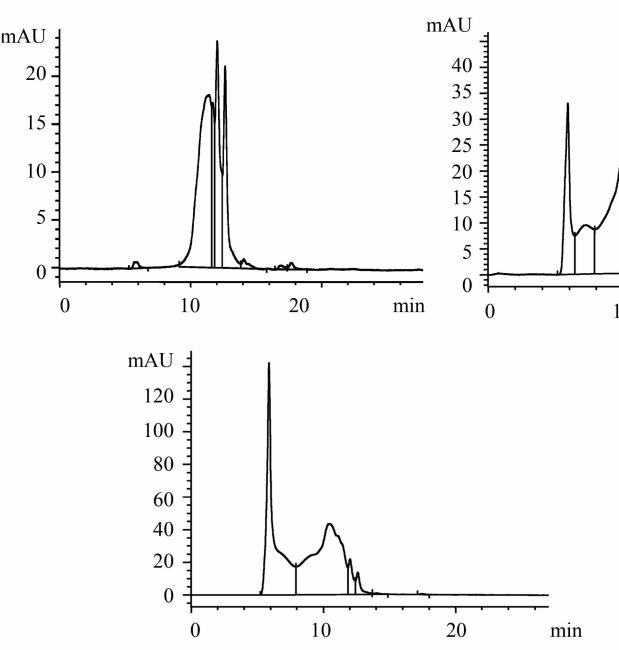


图 5 不同加氨量下的大豆蛋白的分子量分布  
Fig.5 Effect of ammonia on molecular weight distributing of soybean protein

出,加氨量对巯基和二硫键的影响不大。

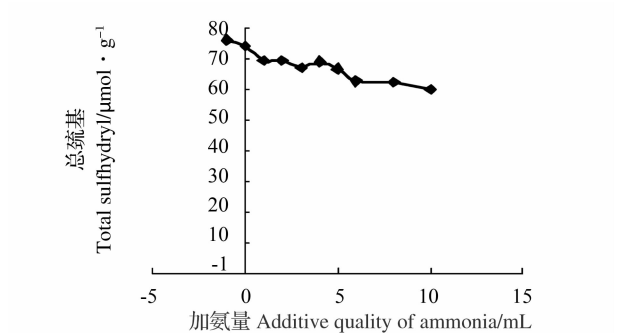


图 3 加氨量对大豆蛋白总巯基的影响  
Fig.3 Effect of ammonia on total sulfhydryl of soybean protein

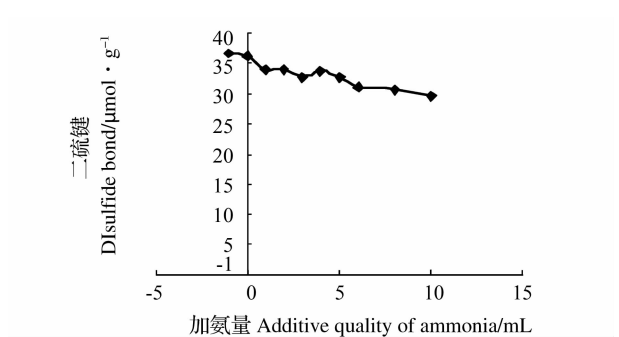


图 4 加氨量对大豆蛋白二硫键的影响  
Fig.4 Effect of Ammonia on disulfide of soybean protein

2.2.3 不同加氨量下的分子量分布 分子量分布能够反映蛋白不同聚集程度分子的比例。从图 5 可

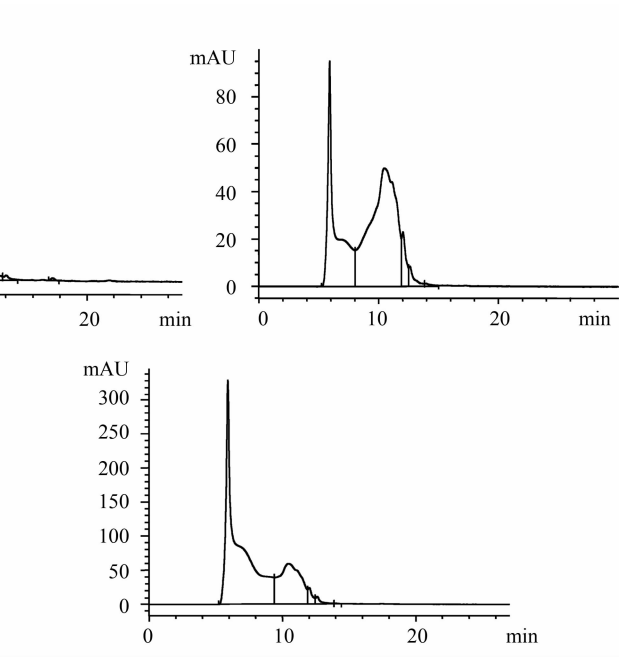


图 5 不同加氨量下的大豆蛋白的分子量分布  
Fig.5 Effect of ammonia on molecular weight distributing of soybean protein

以看出,各蛋白的主要峰均为4个,分别在5.91、10.50、12.00和12.60 min处,根据标准蛋白分子量分布曲线,可以推知它们的相对分子质量大于6 700 000,39 000,5 000和2 000。在5.91 min处为粒径较大的聚集体部分,未加氨处理时含量为0.38%,随着加氨量的增加聚集体的含量也是逐渐增加至70.9%。其余的3个峰为7S和11S的亚基和多肽链。未加氨的蛋白几乎都是亚基和多肽链。随着加氨量的增加,亚基等其它组分的绝对含量下降。

### 3 结论

大豆蛋白的功能性是指在食品加工、制取、配制、烹调、贮藏及销售过程中所表现出来的理化性质的总称。采用氨处理醇法大豆浓缩蛋白可以提高其溶解性、凝胶性、乳化性等功能性指标。氨处理对大豆浓缩蛋白的表面疏水性和分子量分布有影响,大豆蛋白的表面疏水性指数,随着加氨量的增加而增加,大豆蛋白中的聚集体随着加氨量的增加而增加,氨处理对巯基和二硫键影响不大。

### 参考文献

- [1] 张梅,周瑞宝,马智刚. 功能性大豆浓缩蛋白性能测定及应用研究[J]. 粮食与油脂,2004(4):21-23. (Zhang M, Zhou R B, Ma Z G. Properties and application of functional soy protein concentrate[J]. Cereals and Oils,2004(4):21-23. )
- [2] 张梅,周瑞宝,米宏伟,等. 醇法大豆浓缩蛋白物理改性研究[J]. 粮食与油脂,2003(8):3-5. (Zhang M, Zhou R B, Mi H W, et al. Physical modification of alcohol leaching soy protein concentrate[J]. Cereals and Oils,2003(8):3-5. )

(上接第853页)

- [14] 罗钦,陈人弼,宋永康. 鱼粉中寡肽和游离氨基酸的测定方法[J]. 福建农业学报,2005,20(4):285-288. (Luo Q, Chen R B, Song Y k. Determination method of oligopeptides and free amino acids in fish meal[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2005,20(4):285-288. )
- [15] GB/T6432-1994. 饲料工业标准汇编[S]. 北京:中华人民共和国国家标准,2002:70-72. (GB/T6432-1994. Feed industry standards compilation[S]. Beijing:National Standards of the People's Republic of China, 2002:70-72. )
- [16] 王文平. 植物样品中游离氨基酸总量测定方法的改进[J]. 北京农学院学报,1998,13(3):10-13. (Wang W P. Improving the method for determining the total dissociative amino acid in fresh plant tissue[J]. Journal of Beijing Agricultural College,1998,13

- [3] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000. (Wang J Z, Fan M. Protein technical manuals[M]. Beijing: Science Press,2000. )
- [4] 王洪晶. 脂肪氧合酶对大豆分离蛋白凝胶性质影响研究[D]. 无锡:江南大学食品学院,2006. (Wang H J. Study on enzymatic properties and inhibition mechanism of lipoxygenase[D]. School of Food Science and Technology, Jiangnan University,2006. )
- [5] 华欲飞,Steve W Cui, Qi Wang,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):43-48. (Hua Y F, Steve W Cui, Qi Wang, et al. Rheological properties of different soy protein isolate gels[J]. Chinese Cereals and Oils Association, 2003,18(6):43-48. )
- [6] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,1959,82:70-77.
- [7] Boatright W L, Hettiarachchy N S. Effect of lipids on soy protein isolate solubility[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society,1995,72(12):1439-1444.
- [8] Beveridge T, Toma S J, Nakai S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent[J]. Journal of Food Science,1974,39:49-51.
- [9] 江志伟,沈蓓英,潘秋琴. 蛋白质加工技术[M]. 北京:化工工业出版社,2002. (Jiang Z W, Shen P Y, Pan Q Q. Protein process technology[M]. Beijing:Chemical Publishing Company,2002. )
- [10] 孟橘,石姗姗,张骊. 醇法大豆浓缩蛋白改性工艺条件的研究[J]. 中国油脂,2006,31(11):73. (Meng J, Shi S S, Zhang L. Study on modification technics condition[J]. China Oils,2006,31(11):73. )
- [11] 王金胜. 基础生物化学[M]. 北京:中国林业出版社,2003:47-49. (Wang J S. Basical biochemistry[M]. Beijing:China Forestry Publishing Company,2003:47-49. )
- [12] 王洪晶,华欲飞. 大豆分离蛋白凝胶研究进展[J]. 粮食与油脂,2005(2):3-5. (Wang H J, Hua Y F. Research advance in soybean protein isolate gel[J]. Cereals and Oils,2005(2):3-5. )

(3):10-13. )

- [17] 万琦,陆兆新,吕凤霞,等. 枯草芽孢杆菌生产大豆多肽溶液的加工功能特性研究[J]. 食品科学,2003,24(11):99-102. (Wan Y, Lu Z X, Lü F X, et al. Functional properties of soybean peptide solution produced by bacillus subtilis[J]. Food Science, 2003,24(11):99-102. )
- [18] 刘唤明,邓楚津. 发酵法生产大豆肽的研究[J]. 饲料工业,2006,27(19):4-5. (Liu H M, Deng C J. Studies on soybean peptides produced by microorganism fermentation[J]. Feed Industry, 2006,27(19):4-5. )
- [19] 万琦. 微生物法生产脱苦大豆功能性多肽的研究[D]. 南京:南京农业大学,2003. (Wan Q. Studies on the functional debittering soybean peptide produced by microorganization fermentation[D]. Nanjing:Nanjing Agricultural University,2003. )