

大豆分离蛋白磷酸化改性研究

申世强¹, 傅亮^{1,*}, 徐康¹, 孙颖莺², 陈勇²

(1.暨南大学食品科学与工程系, 广东广州 510632;

2.佛山市广粮饮料食品有限公司, 广东佛山 528137)

摘要:采用低摩尔比的三氯氧磷(POCl_3)/蛋白质对大豆分离蛋白(SPI)进行磷酸化改性。利用响应面法确定了最佳改性工艺条件,并且研究了最佳工艺条件下改性后SPI功能特性的变化。结果表明,最佳改性工艺条件为:SPI浓度4%,反应时间30min, POCl_3 体积0.20mL,pH10.00。磷酸化SPI等电点由4.25降低至3.75,溶解性和乳化能力有明显提高。

关键词:大豆分离蛋白,改性,响应面,溶解度,乳化性

Study on phosphorylation of soybean protein isolate

SHEN Shi-qiang¹, FU Liang^{1,*}, XU Kang¹, SUN Ying-ying², CHEN Yong²

(1.Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2.Foshan Guangliang Drink and Food Inc., Foshan 528137, China)

Abstract: Soybean protein isolate (SPI) was phosphorylated to various degrees by low-molar ratio of POCl_3 /Protein. Using the response surface test to determine the best modification process conditions, and research the optimum conditions of modified SPI functional properties. Results showed that the best modification process conditions were: SPI concentration 4%, reaction time 30min, POCl_3 volume 0.20mL, pH10.00. Phosphorylation SPI isoelectric reduced from 4.25 to 3.75, caused significant increases in solubility and emulsion capacity.

Key words: soybean protein isolate (SPI); modification; response surface; solubility; emulsifying

中图分类号: TS201.2⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)06-0141-05

大豆分离蛋白(SPI)是以低变性脱脂大豆粉或浓缩大豆蛋白为原料,经碱、酸等一系列处理后得到的组分较均一、机能特性较强的蛋白质。其主要成分是 β -伴球蛋白(7S)和11S球蛋白。SPI中的次要成分则具有很大的不均匀性^[1],主要有 γ -伴球蛋白、7S碱性球蛋白、脂肪氧合酶、 β -淀粉酶、植物凝集素以及胰蛋白酶抑制剂等^[2]。蛋白质改性是人为地对蛋白质结构进行修饰,从而改善产品的相容性和功能性。目前常用的蛋白质改性方法包括物理法、化学法、酶法和基因工程方法等。磷酸化是一种较为有效的化学改性方法,蛋白质的磷酸化是有选择地利用蛋白质侧链的活性基团,如Ser、Thr的-OH及赖氨酸的 ϵ -NH₂,分别接近一个磷酸根基团,从而引进大量的磷酸根基团,磷酸根基团的引进增加了蛋白质的电负性,提高了蛋白质分子之间的静电斥力,使之在食品体系中更易分散,相互排斥,因而提高了溶解度和聚结稳定性,降低了等电点,这对于大豆分离蛋白的开发应用是极为有利的^[3-6]。 POCl_3 作为磷酸化试剂,在国内鲜有详细研究,本文利用响应面法得出最佳改性条件,并研究了改性前后SPI功能性

变化。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

大豆分离蛋白 山东万得福产,蛋白质含量 $\geq 90\%$;磷标准储备液 1000 $\mu\text{g/mL}$; POCl_3 、正己烷、钼酸铵、对苯二酚、亚硫酸钠 均为分析纯。

FD-1 冷冻干燥机 北京博医;90-2 型定时恒温磁力搅拌器 上海沪西;722 型可见光分光光度计 上海菁华;PHS-3C 型 pH 计 上海精科;KDC-12 低速离心机 科大创新。

1.2 实验方法

1.2.1 SPI的磷酸化 SPI用蒸馏水配成50mL不同浓度的溶液。 POCl_3 溶解到正己烷中配成20% POCl_3 的溶液,SPI溶液搅拌30min,逐滴加入 POCl_3 反应一定时间后,用分滴漏斗将反应混合液油-水相分离,水相透析48h,然后冷冻干燥,分析。

1.2.2 磷酸化程度的分析 分别吸取标准储备液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL至20mL试管中,依次加入2mL钼酸铵溶液,1mL亚硫酸钠溶液,加水定容至20mL,混匀,静置30min,在660nm处测定其吸光度,由此绘制标准曲线,计算出回归系数。准确称量干燥样品用钼蓝比色法测定其含磷量,同时测量试样的吸光度,在标准曲线上查得试样液中的磷含量。

收稿日期:2009-07-17 * 通讯联系人

作者简介:申世强(1982-),男,硕士研究生,研究方向:植物蛋白。

原蛋白作为空白,磷酸化程度以每 100g 蛋白质所含磷的克数表示^[7]。

1.2.3 磷酸化 SPI 的制备 首先进行大豆分离蛋白磷酸化的单因素实验,然后根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理,选取三氯氧磷体积、SPI 浓度、pH 和反应时间的四因素三水平共 27 个实验(包括 3 个中心点),进行响应面分析,以确定最佳的改性工艺^[8],实验因素与水平的取值见表 1。

表 1 响应面实验因素水平表

因素	水平		
	-1	0	1
A 三氯氧磷体积 (mL)	0.15	0.2	0.25
B SPI 浓度 (%)	3	4	5
C pH	9.5	10	10.5
D 反应时间 (min)	20	30	40

1.2.4 溶解度的测定 采用双缩脲法测定^[9]。

1.2.5 乳化活性的测定^[10-12] 以 1/15mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液配制 0.25% 的大豆分离蛋白溶液 45mL,分别调节 pH 为 2~11,高剪切分散乳化机 10000r/min 均质 1min 后加入 15mL 大豆油,10000r/min 均质 30s 后立即从底部吸取 50 μL 乳浊液加入到 5mL 0.1% SDS 溶液中,摇匀后在 500nm 测定吸光度 A_0 ;乳浊液室温静置 24h 后吸取 40 μL 如前测定吸光度 A_1 ;然后在 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30min,冷却后如前测定吸光度 $A_{80^{\circ}\text{C}}$ 。

乳化活性指数的表示方法: $\text{EAI}_0 = 2T / (1 - \varphi) C$, $T = 2.303 A_0 / L$

乳状液稳定性的表示方法: $\text{ES\%} = (\text{EAI}_{\text{max}} - \text{EAI}_{80^{\circ}\text{C}}) / \text{EAI}_{\text{max}} \times 100\%$

式中: $\text{EAI}_{\text{max}} - \text{EAI}_0$ 、 EAI_1 中的较大值; L - 比色皿的宽度,1cm; C - 乳化前蛋白质浓度,0.25%; φ - 油相的体积分数。

2 结果与分析

2.1 磷标准溶液的绘制

从图 1 可知,回归方程: $y = 0.0051x + 0.0022$, $R^2 = 0.9992$,式中: y - 吸光度; x - 磷标准溶液($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。

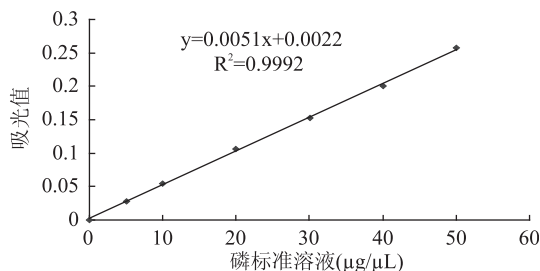


图 1 磷标准曲线

2.2 影响大豆分离蛋白磷酸化程度及其溶解度的单因素实验

2.2.1 SPI 浓度对磷酸化程度及其溶解度的影响

取三氯氧磷体积为 0.2mL、pH 为 10.00、时间为 0.5h, SPI 浓度分别取 2%、4%、5%、6%、8%,测定改性后蛋白的磷酸化程度和溶解度。从图 2 可以看出,磷酸化程度随底物蛋白浓度的增加而增加,当 SPI 质量分数达到 4% 时,磷酸化程度最大,之后随底物浓度

的增大而降低。SPI 的溶解度与电负性相关,电负性增加的幅度又与磷酸化程度相关,所以磷酸化程度最高时,溶解度相应最高。由图 2 可见,其它功能特性也在 4% 时最大,之后呈下降趋势,故 SPI 质量分数 4% 为最优改性条件。

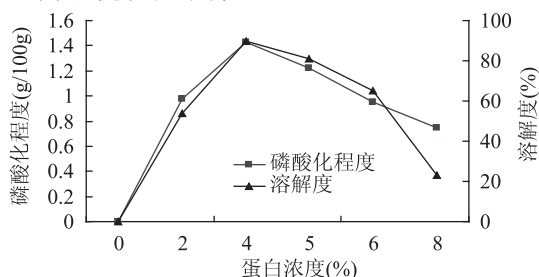


图 2 SPI 浓度对磷酸化程度及其溶解度的影响

2.2.2 反应时间对磷酸化程度及其溶解度的影响

取三氯氧磷体积为 0.2mL、pH 为 10.00、SPI 质量分数取 4%,反应时间分别取 0、5、10、15、30、60min,测定改性后蛋白的磷酸化程度和溶解度。由图 3 发现,在其它条件一定的情况下,磷酸化反应迅速进行,磷酸化程度和溶解度迅速增加,30min 时达到最高;在 30min 以后,磷酸化程度和溶解度增幅缓慢;此后再增加反应时间,指标并没有明显增加。其功能特性因与溶解度相关,30min 内反应趋于平衡后变化不大,故取反应时间 30min。

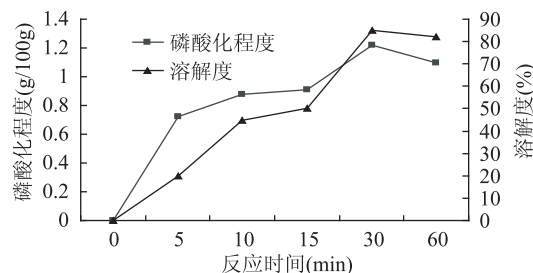


图 3 时间对磷酸化程度及其溶解度的影响

2.2.3 反应 pH 对磷酸化程度及其溶解度的影响

取三氯氧磷体积为 0.2mL、时间为 0.5h, SPI 质量分数取 4%, pH 分别取 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0,测定改性后蛋白的磷酸化程度及其溶解度。从图 4 可以看出,随 pH 的增加,磷酸化程度先增加后减少,在 pH10.0 附近达到最大。蛋白质分子在 pH 较高的碱性环境中氨基表现活性,反应较易进行, SPI 的磷酸化程度也较高。磷酸化程度高,引进的磷酸根基团多,蛋白质体系的电负性增加,蛋白质分子之间的静电斥力提高,因而溶解度提高;但 pH 过高, SPI 会被碱改性而变性,反而不利于磷酸根与其结合,磷酸化程度和溶解度自然也就降低。

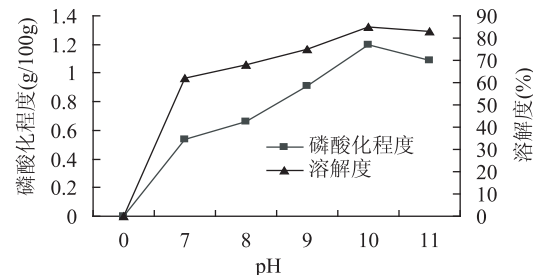


图 4 pH 对磷酸化程度及其溶解度的影响

表3 响应面分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Pr > F	显著性
模型	0.48	14	0.034	28.62	<0.0001	显著
A	0.22	1	0.22	187.19	<0.0001	
B	0.0034	1	0.0034	0.29	0.6014	
C	0.00507	1	0.00507	0.43	0.5255	
D	0.00154	1	0.00154	1.30	0.2765	
AB	0.009	1	0.009	0.76	0.4007	
AC	0.00608	1	0.00608	5.13	0.0428	
AD	0.00144	1	0.00144	0.12	0.7335	
BC	0.017	1	0.017	14.14	0.0027	
BD	0.000506	1	0.000506	0.43	0.5258	
CD	0.012	1	0.012	10.30	0.0075	
A ²	0.090	1	0.090	75.68	<0.0001	
B ²	0.00328	1	0.00328	2.76	0.1222	
C ²	0.11	1	0.11	91.61	<0.0001	
D ²	0.041	1	0.041	34.80	<0.0001	
残差	0.014	12	0.001186			不显著
失拟	0.014	10	0.001417	15.44	0.0623	
纯误差	0.000182	2	0.00009			
总平方和	0.49	26				

2.2.4 POCl₃ 加入量对磷酸化程度及其溶解度的影响 SPI 质量分数取 4%、时间为 0.5h、pH 取 10.0, 加入三氯氧磷体积分别为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8mL, 测定改性后蛋白磷酸化程度及其溶解度。实验结果如图 5 所示, 磷酸化程度及其溶解度随 POCl₃ 含量的增加先增大后有所降低, 当 POCl₃ 加入量为 0.2mL 时, 磷酸化程度最大。

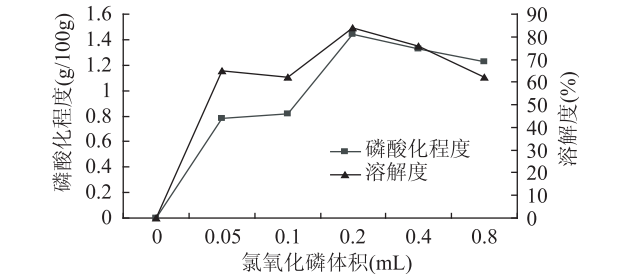


图5 POCl₃ 含量对磷酸化程度及其溶解度的影响

2.3 响应面分析

2.3.1 磷酸化反应的响应面分析 依据上述单因素实验, 使用响应面设计法 (RSM), 进行三氯氧磷体积、SPI 浓度、pH 和反应时间的四因素三水平共 27 个实验 (包括 3 个中心点) 的响应面分析实验, 以确定最佳的改性工艺, 实验结果如表 2 和表 3 所示。

利用 Design-Expert Software7.1 对表 2 中的实验数据进行分析后, 推荐使用二次方程式的数学模型。大豆分离蛋白磷酸化的数学模型如下:

磷酸化 (mg/mL) = 1.06 + 0.14A - 0.005B + 0.0065C - 0.011D + 0.015AB - 0.039AC - 0.006AD + 0.064BC - 0.011BD - 0.055CD - 0.13A² + 0.025B² - 0.14C² - 0.088D²

模型的可靠性可从方差分析及相关系数来分析。由方差分析 (表 3) 可知, 模型在 P≤0.001 时水平极其显著, 表明实验设计可靠。相关系数 (R) 越接近 1, 说明模型的预测值与实验值的相关性越好。本研究的 R² = 0.9706, 说明模型能够很好地描述实验结果。

表2 响应面实验设计表

实验号	A	B	C	D	磷酸化程度 (g/100g)
1	0.15	4	10	20	0.681
2	0.2	4	10	30	1.062
3	0.2	4	9.5	20	0.75
4	0.25	4	10.5	30	0.89
5	0.2	4	10	30	1.045
6	0.15	4	9.5	30	0.642
7	0.2	3	10	20	1.042
8	0.25	4	10	20	1.01
9	0.2	5	9.5	30	0.881
10	0.2	4	10.5	20	0.87
11	0.2	3	9.5	30	0.983
12	0.25	3	10	30	1.059
13	0.15	5	10	30	0.769
14	0.15	4	10	40	0.68
15	0.15	3	10	30	0.818
16	0.2	5	10	40	0.964
17	0.2	4	10.5	40	0.746
18	0.2	4	10	30	1.061
19	0.25	4	10	40	0.985
20	0.2	3	10.5	30	0.867
21	0.15	4	10.5	30	0.74
22	0.2	5	10	20	1.028
23	0.2	5	10.5	30	1.02
24	0.2	4	9.5	40	0.847
25	0.25	5	10	30	1.07
26	0.2	3	10	40	1.023
27	0.25	4	9.5	30	0.948

由表 3 回归模型系数显著性检验结果可知, 模型的一次项三氯氧磷体积 A 高度显著; 二次项 A²、C² 和 D² 极其显著; 交互项 BC 和 CD 高度显著, AC 显著; 其他交互项不显著。表明各影响因素对于大豆分离蛋白磷酸化的影响不是简单的线性关系。

RSA 方法的图形如图 6~图 8 所示。图 6~图 8 中的图形是特定响应值 Y 分别与对应的因素 A、B、C、D 构成的一个三维空间图, 可以直观地反映各因

素以及它们之间的交互作用对响应值的影响。从实验所得响应值分析图可看出,它们在反应过程中的相互关系,确定合适的工艺条件。

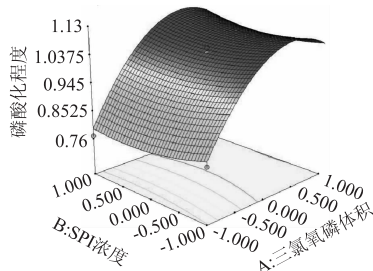


图6 POCl_3 体积与 SPI 浓度交互作用对磷酸化的影响

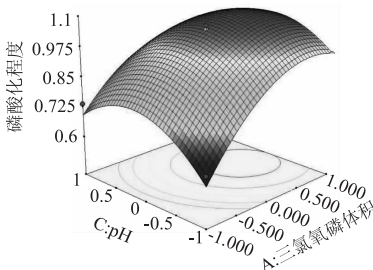


图7 POCl_3 体积与 pH 交互作用对磷酸化的影响

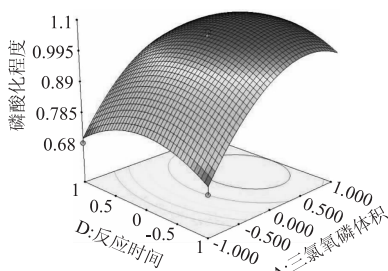


图8 三氯氧磷体积与反应时间交互作用对磷酸化的影响

由响应面实验可以得到软件推荐的最佳工艺如下:三氯氧磷体积为 0.23mL、SPI 浓度为 5.00%、pH 为 10.11 和反应时间为 27.85min,其磷酸化含量为 1.1273g/100g。

2.3.2 验证实验 根据响应面实验所推荐的最适条件,三氯氧磷体积为 0.23mL(取 0.25mL)、SPI 浓度为 5.00%、pH 为 10.11(取 10)和反应时间为 27.85min(取 28min),经三次平行实验,测得磷酸化含量为 1.1450g/100g,与理论值 1.1273g/100g 差异不显著,说明该预测值是可靠的。

2.4 大豆分离蛋白功能特性研究

2.4.1 溶解性 溶解性是指在特定条件下样品中的蛋白质进入溶液或胶体分散液的数量,并且这些已溶解的物质不会被中度离心力所沉淀。由于溶解性随着磷酸化程度增加而增加,取最佳改性工艺条件下的磷酸化 SPI,测不同 pH 下的溶解度与原 SPI 进行对比。

从图 9 可以看出, pH2.0~3.5、4.0~7.0 时, SPI 经磷酸化改性后,溶解性大于 SPI,而且等电点从 4.25 偏移至 3.75,这可能是由于改性后的蛋白质中引进了一定数量的磷酸根基团,这些磷酸基团与水分子可能形成了大量的氢键,蛋白质体系中的电负性增加,提高了蛋白质分子之间的静电斥力,使之在溶液体系中更易分散,相互排斥,因而其在酸性条件下也有较高的溶解性,这对于大豆蛋白的开发应用是极

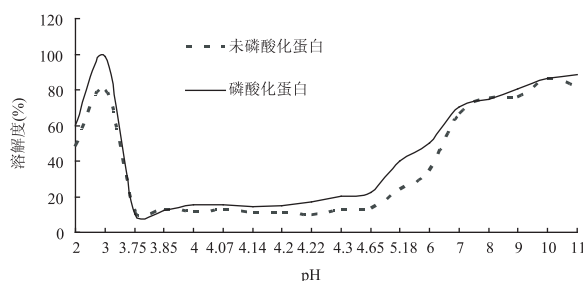


图9 磷酸化前后 3% SPI 的溶解性与 pH 的关系

为有利的。

2.4.2 乳化特性 蛋白质是大分子物质,含有很多极性和非极性基团,具有亲水和亲油的能力,可以分散在油相和水相之间,在油滴周围形成一层膜,从而避免油滴聚集,在油水混合体系中起到乳化作用。

如图 10 示, SPI 的乳化活性随 pH 的升高而增加,但在偏酸性范围 (pH3~6) 内其乳化活性较小;而在 pH 大于 6 时,磷酸化 SPI 的溶解性增大,乳化活性也随之增强;在 pH9.0 时,乳化活性由 0.11 增加至 0.15 m^2/g 。由此可以推断,蛋白质的乳化性能与其溶解性之间密切相关。磷酸化 SPI 的乳化活性增强,可能是由于磷酸化使分子间的排斥作用大于吸引作用,增强了 SPI 的溶解性,而且 P-SPI 暴露了疏水基团,提高了蛋白质的亲油性,有利于蛋白质在乳化过程中在油-水界面扩散和重排定位,一定程度上提高了 SPI 的乳化性。

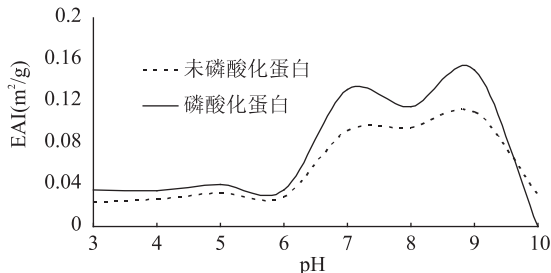


图10 磷酸化前后 SPI 乳化活性与 pH 的关系

图 11 显示,在 pH4.5 左右,即大豆分离蛋白的等电点附近,磷酸化 SPI 比原 SPI 乳状液的稳定性高,虽然不溶性蛋白质的乳化活性较小,但不溶性蛋白质颗粒可以稳定已吸附的蛋白质膜,阻止表面形变或解析,因此常常起到稳定作用。因为界面蛋白质膜的形变或解析均发生在乳状液失去稳定作用之前。有研究者认为,蛋白质的疏水性越大,界面的蛋白质浓度也越大,使界面张力变小,乳状液更稳定。

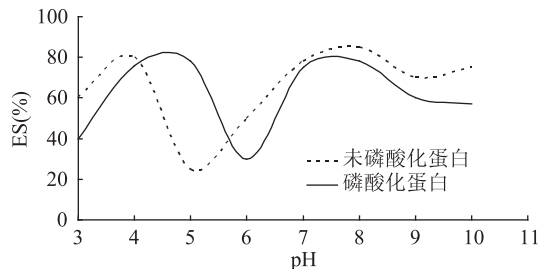


图11 磷酸化前后 SPI 乳状液稳定性与 pH 的关系

3 结论

3.1 大豆分离蛋白浓度与 POCl_3 的体积对磷酸化反
(下转第 147 页)

表4 不同谷氨酸发酵液结束后滞留时间对谷氨酸提取的影响

发酵结束处理方法	结晶镜检	分离后母液 GA(%)	提取一次收率 (%)
立即放罐浓缩	镜检 GA 大小均匀,界面清晰	2.45	88.1
滞留 1h 浓缩	镜检 GA 大小均匀,界面清晰	2.54	88.0
滞留 3h 浓缩	镜检 GA 结晶细小,界面一般	2.68	87.3
滞留 6h 浓缩	镜检 GA 结晶细小,有 β 结晶,界面模糊	3.56	80.2
结束升温 65℃ (滞留 1h 浓缩)	镜检 GA 均匀、界面清晰	2.48	88.2
结束升温 65℃ (滞留 3h 浓缩)	镜检 GA 均匀、界面清晰	2.52	88.1
结束升温 65℃ (滞留 6h 浓缩)	镜检 GA 均匀、界面清晰	2.55	88.0

果见表4。

从表4可以看出,谷氨酸发酵液结束后如果不及
时放罐进行浓缩处理,会对谷氨酸提取的结晶和
收率造成一定的负面影响,这可能主要是因为虽然
发酵已经结束,但谷氨酸细菌及因为停空气后可能
会导致杂菌的浸入,从而导致细菌的继续生长代谢
活动,产生了新的杂质和消耗了部分谷氨酸,所以影
响了结晶和谷氨酸的提取收率。但是,如果将不能
及时放罐的谷氨酸发酵液进行升温做巴氏消毒处
理,滞留一定的时间对谷氨酸的结晶和提取收率影
响并不大。

3 结论

当然,谷氨酸发酵液的质量对于谷氨酸结晶和
提取收率来说影响因素很多,本文没有做进一步的
实验研究,比如,不同发酵液的培养基组成、不同菌

种、不同的发酵方式等等。这就在以后的实验中继
续进行研究。本文针对企业存在的问题进行实验研
究,取得了较好的效果。

参考文献

[1] 李平凡,邓毛程,邱玉美,等.味精行业清洁生产审核[J].
中国酿造,2008(8):34-36.
[2] 李平凡,何立新,吴海峰.超滤膜在谷氨酸发酵液除菌中
的清洗工艺研究[J].食品工业科技,2008(9):129-132.
[3] 李平凡,邓毛程,林波.谷氨酸发酵液对超滤膜通量影响
研究[J].中国酿造,2009(4):112-114.
[4] 天津轻工业学院,无锡轻工业学院,大连轻工业学院.工
业发酵分析[M].北京:中国轻工业出版社,1983,3.
[5] 于信令.味精工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,
1994,10.

(上接第144页)

应的影响比较显著。应用响应面法得到的最佳磷酸
化条件为:三氯氧磷体积为0.25mL、SPI浓度为
5.00%、pH为10和反应时间为28min,其磷酸化含量
为1.1273g/100g。

3.2 大豆分离蛋白经磷酸化修饰后,在一定的酸性
条件下即 pH2.0~3.5,4.0~7.0 时溶解性提高,pH 大于
6 时乳化活性提高,乳化稳定性在 pH4.5 附近明显
增加。

3.3 在最佳改性工艺下磷酸化 SPI 性质有明显改
变,为进一步扩展大豆分离蛋白应用提供渠道。

参考文献

[1] Petruccelli S, Anon M C. Relationship between the Method of
Obtention and the Structural and Functional Properties of Soy
Protein Isolates (1). Structural and Hydration Properties [J].
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(10): 2161
-2169.
[2] Puppo M C. Soybean Protein Dispersions at Acid pH: Thermal
and Rheological Properties [J]. Journal Food Science, 1999, 64
(1): 50-56.
[3] Matheis G. Chemical phosphorylation of food protein [J].
Agric Food Chem, 1984, 32: 699-705.
[4] Ferrel Sung H Y. Chemical phosphorylation of food proteins by

sodium trimetaphosphate [J]. Food Sci, 1982, 48: 716-719.
[5] Kito M. Properties of Spray Dried Powder of Phosphorylated
SPI [J]. Nippon Shokuhin kogyo Gakkaishi, 1985, 32(9): 629.
[6] Sitohy M. Phosphorylation of β -Lactoglobulin under mild
conditions [J]. Agric Food Chem, 1995, 43: 49-52.
[7] 国家质量监督检验检疫总局职业技能鉴定指导中心组.
食品质量检验 [M]. 北京: 中国计量出版社, 2005: 193-195.
[8] 姚玉静, 杨晓泉, 张新会. 大豆分离蛋白的磷酸化改性研
究 [J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(10): 5-8.
[9] S E Ortiz, J R Wagner. Hydrolysates of native and modified
soy protein isolates: structural characteristics, solubility and
foaming properties [J]. Food Research International, 2002, 35:
511-518.
[10] K N Pearce, J E Kinsella, B Bilgi S Celik. Solubility and
emulsifying properties of barley protein concentrate [J]. European
Food Research and Technology, 2004, 218(5): 437-441.
[11] R D Waniska, J K Shetty, J E Kinsella. Protein-stabilized
emulsions: effects of modification on the emulsifying activity of
bovine serum albumin in a model system [J]. J Agric Food
Chem, 1981, 29: 826-830.
[12] Y T Huang, John E Kinsella. Effects of phosphorylation on
emulsifying and foaming properties and digestibility of yeast
protein [J]. Journal of Food Science, 1987, 52(6): 1684-1688.