

大豆蛋白7S和11S组分分离方法的优化

朱晓烨, 迟玉杰, 刘红玉*

(东北农业大学食品学院, 教育部大豆生物学重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 对分离大豆蛋白中7S和11S组分的Nagano法的条件进行了优化。对浸提液、浸提条件、还原剂的添加和除去中间组分等关键步骤进行了改进。采用凯氏定氮法和SDS-PAGE分析, 得到的结果表明: 浸提液选择水, 调pH9.0, 料液比为1:15, 45℃提取1h, 采用两次浸提法, 添加还原剂NaHSO₃的量为0.01mol/L。在分离过程中, pH6.4时获得11S组分, pH5.4时除去中间组分, 于pH4.8时获得7S组分。优化后的方法其提取率和蛋白纯度与Thanh法和Nagano法相比得到提高。

关键词: 大豆蛋白, 7S, 11S, 分离, 优化

Optimization of separation method of 7S and 11S in soy protein

ZHU Xiao-ye, CHI Yu-jie, LIU Hong-yu*

(Department of Food Science, Northeast Agriculture University, Administration of Education Key Laboratory of Soy-Biology, Harbin 150030, China)

Abstract: The conditions for extraction and separation of 11S and 7S fractions from soybean protein were optimized. The factors affecting extraction effect, including extraction solution, extraction conditions, the addition of reducing agent and removal intermediate fraction were improved. The result was investigated by Kjeldahl method and SDS-PAGE, which indicated the defatted soybean meal was extracted with water (pH9.0) at 45℃ for 1h. The meal-to-water ratio was 1:15 and the meal was extracted twice then by adding reducing agent NaHSO₃ 0.01mol/L. The 11S fraction was precipitated at pH6.4. The insoluble intermediate fraction was removed by centrifugation at pH5.4 and 7S fraction was obtained at pH4.8. Under these conditions, the yield and purity of 11S and 7S fractions could be increased than that by Thanh method and Nagano method.

Key words: soy protein; 7S; 11S; isolation; optimization

中图分类号: TS201.2⁺1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2011)07-0267-04

大豆蛋白是一种优质的植物蛋白资源, 由于其营养价值高, 成本低, 并且具有凝胶性、乳化性、起泡性等多种功能特性, 被广泛应用于食品工业中。根据大豆蛋白的沉降特性, 可分为2S、7S、11S和15S四种主要组分, 它们分别占15%、34%、41.9%和9.1%^[1]。其中最重要的是7S β-伴球蛋白(β-conglycinin)和11S大豆球蛋白(glycinin)。β-伴球蛋白是一个三聚体糖蛋白, 包括α'、α和β三个亚基, 分子量在150~200kDa之间。大豆球蛋白是分子量在300~360kDa之间的六聚体, 分为酸性亚基A_{1a}、A_{1b}、A₂、A₃、A₄、A₅和碱性亚基B_{1a}、B_{1b}、B₂、B₃、B₄等11个亚基, 它们通过二硫键结合形成酸碱配对的二聚体^[2]。7S和11S组分在理化性质和功能特性方面均有很大差异。例如, 在凝胶型大豆分离蛋白中, 两种组分比例不同的大豆蛋白表现出不同的凝胶

性。因此, 将7S和11S从大豆蛋白中分离出来进行单独研究是十分有必要的。11S和7S的分离方法有很多^[3], 应用最多的是Thanh法^[4]和Nagano法^[5]。许多研究者都采用这两种方法制备7S和11S组分, 并研究其功能特性和结构特点。Nagano法分离的7S和11S比Thanh法纯度更高, 但得率很低。本研究对Nagano法的条件进行优化, 希望能够提高两组分得率和纯度, 从而为进一步研究7S和11S的组成与大豆分离蛋白凝胶性之间的关系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

脱脂大豆粉 哈高科; 亚硫酸氢钠、硫酸铜、硫酸钾、β-巯基乙醇、十二烷基硫酸钠(SDS)、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、过硫酸氨(AP)、四甲基乙二胺(TEMED)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、甘氨酸(Gly)、考马斯亮蓝R-250 均为分析纯。

pH计 上海精密科学仪器有限公司, pH5-3C; 高速冷冻离心机 上海离心机机械研究所, GL-21M; 电泳仪 北京六一, DYY-6C; 凯氏定氮仪 上海纤检仪器有限公司, LNK-871。

收稿日期: 2010-06-28 * 通讯联系人

作者简介: 朱晓烨(1985-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学。

基金项目: 大豆生物学省部共建教育部重点实验室开放基金项目(SB08C03); 东北农业大学科学研究基金。

1.2 蛋白浸提液的单因素实验

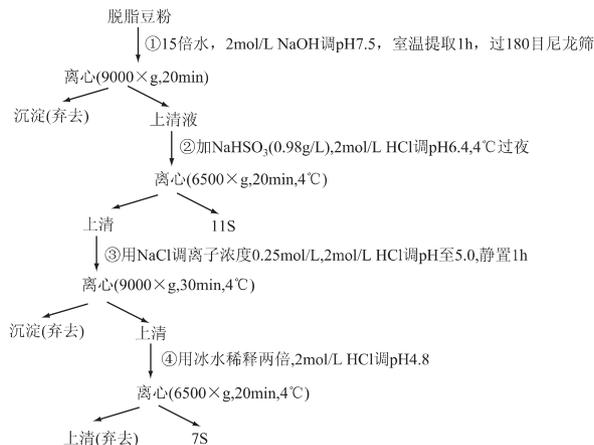


图1 Nagano法分离11S和7S组分的工艺流程图

1.2.1 蛋白浸提液种类的选择 首先对步骤①中浸提液种类进行选择,使用水、Tris-HCl缓冲液和磷酸缓冲液为蛋白浸提液,其他按Nagano法进行蛋白的浸提,用凯氏定氮法测定蛋白液的蛋白浓度,选择最佳的浸提液。

1.2.2 浸提次数的选择 分别对一次、两次、三次浸提的提取效果进行评价,拟选择出最佳的提取次数。多次浸提法,即将步骤①中离心所得沉淀重新用水溶解进行浸提。将多次浸提后的离心沉淀烘干,用凯氏定氮法测定蛋白含量。

蛋白提取率(%) = (脱脂豆粉中的蛋白含量 - 离心沉淀中的蛋白含量) / 脱脂豆粉中的蛋白含量 × 100%

1.3 蛋白浸提液的正交实验

在步骤①中,影响脱脂豆粉中蛋白溶出的因素主要有蛋白浸提液的pH、温度、料液比和浸提时间。选择 $L_9(3^4)$ 正交表进行四因素三水平实验,优化浸提蛋白的条件。

蛋白需要足够的浸提液才能够溶出,但浸提液的增加意味着离心工作量的增加,降低了蛋白的提取效率。由于11S中碱性亚基的等电点为8.0~8.5^[6],因此pH8.0~8.5的浸提液提取蛋白的效果可能比pH7.5更好。在很多方法中,蛋白的浸提是在室温下进行的,温度波动较大,使用恒温水浴更有利于工艺流程的控制。实际上,较高的温度有利于蛋白的溶出,但是过高的温度则会造成蛋白变性,7S和11S蛋白的变性温度分别为72℃和90℃^[7]。综合考虑,确定了正交实验的参数范围。

表1 蛋白浸提液与浸提条件的正交实验因素水平表 $L_9(3^4)$

水平	因素			
	A 料液比	B pH	C 温度(℃)	D 时间(h)
1	1:10	8.0	35	0.5
2	1:12.5	8.5	40	1.0
3	1:15	9.0	45	1.5

浸提程序按Nagano法,根据蛋白提取率选取最佳参数。

1.4 还原剂添加量的选择

还原剂能作用于大豆蛋白的二硫键,使难溶的

聚合物解聚,增加溶解度,因此很多分离7S和11S的方法都添加还原剂。曾被使用的还原剂有 β -巯基乙醇和 NaHSO_3 。由于 β -巯基乙醇的毒性和价格,本研究选用 NaHSO_3 作为还原剂。有资料表明,每摩尔11S球蛋白分子中至少包含20个二硫键^[8],Nagano法中添加0.98g/L(0.0082mol/L)的 NaHSO_3 ,浓度较低,不足以打断蛋白中所有的二硫键。本文尝试在步骤②时分别添加0.0082、0.0090、0.0100mol/L NaHSO_3 作为还原剂进行比较,其他提取分离程序按Nagano法。分别用凯氏定氮法和SDS-PAGE进行蛋白得率和蛋白纯度的分析。

1.5 制备7S过程中pH的确定

在Nagano法中,步骤③用2mol/L HCl调pH5.0,静置后离心除去11S和7S的中间组分。但有研究表明, α 和 α' 的等电点分别为5.2和5.3^[9],在分离出11S组分后调pH5.0会使部分 α 和 α' 亚基沉淀为中间产物而损失。因此本研究拟提高除去中间产物时的pH,以期在不影响7S纯度的基础上提高7S的得率。

实验对Nagano法步骤③中,将pH分别调至5.6、5.4、5.2、5.0进行离心(9000×g, 20min, 4℃)除去中间组分,继续分离获得7S,将样品进行电泳,使用凝胶分析软件分析7S的纯度。

1.6 分析方法

1.6.1 蛋白质浓度的测定 凯氏定氮法,按GB/T5009.5-2003方法测定($N \times 6.25$)。每组样品测3次取平均值。

1.6.2 SDS-PAGE分析 用SDS-PAGE鉴定分离效果和蛋白组分纯度。用不连续垂直板状凝胶电泳,浓缩胶浓度为4%、分离胶浓度为12%,凝胶厚度1mm,上样量10 μ L。分离胶时恒压80V,浓缩胶时恒压120V,考马斯亮蓝R-250染色,用凝胶分析软件进行分析(BandScan5.0)。

2 结果与讨论

2.1 浸提液的单因素实验

2.1.1 浸提液种类的确定 根据表2浸提实验结果表明:三种浸提液均能成功提取大豆蛋白,其中水和Tris-HCl缓冲液的提取效果较好。水的提取效果稍好于Tris-HCl缓冲液,加上对于提取成本的考虑,仍旧选择水作为浸提液。

表2 不同浸提液对蛋白提取率的影响

浸提液种类	水	Tris-HCl缓冲液	磷酸缓冲液
蛋白提取率(%)	64.68	64.64	62.08

2.1.2 浸提次数的确定 进行不同次数的浸提实验,浸提效果用蛋白提取率评价,见表3。在进行一次浸提后,蛋白提取率为67.64%,这意味着有大约32%的蛋白在离心中损失掉了;而进行二次浸提后,蛋白提取率提升至75.98%;三次浸提的提取率提升得不再显著,因此采用二次提取为宜。

表3 浸提次数对蛋白提取率的影响

浸提次数	1	2	3
蛋白提取率(%)	67.64	75.98	78.61

2.2 蛋白浸提液与浸提条件的正交优化实验

根据正交实验结果,影响蛋白提取率的因素顺序为: pH > 料液比 > 温度 > 时间,最优条件为 A₃B₃C₃D₂,即用 pH9.0 的水溶液进行提取,料液比为 1:15,在 45℃ 下提取 1h。此时蛋白提取率为 71.46%,并且发现,此时浸提出的蛋白溶液较为均匀,不必过 180 目尼龙筛。

表 4 蛋白浸提液与浸提条件的正交实验设计及结果分析

实验号	A	B	C	D	蛋白提取率 (%)
1	1	1	1	1	63.38
2	1	2	2	2	65.94
3	1	3	3	3	68.75
4	2	1	2	3	64.51
5	2	2	3	1	67.08
6	2	3	1	2	69.19
7	3	1	3	2	68.26
8	3	2	1	3	69.15
9	3	3	2	1	70.45
K ₁	66.023	65.517	67.240	66.970	
K ₂	67.060	67.390	67.100	67.797	
K ₃	69.287	69.463	68.030	67.603	
R	3.264	3.946	0.930	0.827	

2.3 还原剂的添加

由表 5 可知,增加还原剂 NaHSO₃ 的添加量至 0.0100mol/L 可以在保证 7S 和 11S 组分纯度分别在 92% 以上和 93% 以上,并明显提高 11S 的得率。因此,通过增加还原剂的添加量提高 11S 的得率是可行的。

表 5 还原剂添加量对 7S、11S 提取率的影响

还原剂添加量 (mol/L)	组分得率 (%)		组分纯度 (%)	
	7S	11S	7S	11S
0.0082	8.02	9.39	92.63	93.09
0.0090	8.09	10.84	92.94	93.19
0.0100	8.26	11.37	92.87	93.21

2.4 制备 7S 过程中 pH 的确定

将不同 pH 条件下除去中间组分,所分离得到的 7S 样品进行电泳,电泳图使用凝胶分析软件进行分析,7S 的纯度用 SDS-PAGE 图谱上亚基光密度值占整个泳道光密度值的百分比表示,结果如表 6 所示。

表 6 不同条件得到的 7S 纯度分析

样品	1	2	3	4
除去中间组分的 pH	5.6	5.4	5.2	5.0
7S 纯度 (%)	74.8	93.4	93.6	93.7

将 pH 调至 5.6 除去中间组分,7S 的纯度较低,这说明此时还有一部分 11S 没有沉淀。若 pH 调至 5.4,蛋白纯度只比 pH5.0 时下降了 0.3%,且仍能达到 93% 以上,因此可以将除去中间组分该步骤的 pH 从 5.0 改至 5.4。

2.5 不同方法分离 7S 和 11S 效果的比较

使用优化的 Nagano 方法分离出 7S 和 11S,与 Thanh 法、Nagano 法分离所得的蛋白得率、纯度进行比较,其 SDS-PAGE 图见图 2。

根据电泳图谱,使用凝胶分析软件 (BandScan5.0) 分析蛋白纯度,用图谱上亚基的光密

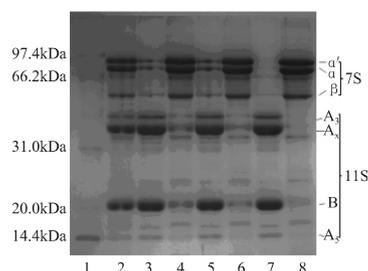


图 2 不同方法分离 7S 和 11S 的 SDS-PAGE 图

注: 1.低分子量标准蛋白; 2.大豆分离蛋白(SPI); 3.Thanh 法 11S; 4.Thanh 法 7S; 5.Nagano 法 11S; 6.Nagano 法 7S; 7.优化方法 11S; 8.优化方法 7S。

度值占整个泳道光密度值的百分比表示,同时用凯氏定氮法测定蛋白提取率,结果见表 7。

表 7 不同分离方法对 7S、11S 蛋白的得率、纯度的影响

分离方法	组分得率 (%)		组分纯度 (%)	
	7S	11S	7S	11S
Thanh 法	17.80	12.87	65.9	78.0
Nagano 法	7.09	12.83	92.9	89.2
优化的 Nagano 法	12.63	15.20	94.1	93.2

经过比较可以看出,Thanh 法的 7S 得率虽然很高,但纯度低,这是由于该法分离 7S 之前没有进行中间组分的去除; Nagano 法的 7S 纯度很高,但是得率较低;优化后的 Nagano 方法其蛋白提取率和蛋白纯度都得到了提高。

3 结论

综合以上实验结果,对 Nagano 法的关键步骤作出如下改进:提取液为水,调 pH9.0,最适浸提温度 45℃,最适浸提料液比 1:15,浸提宜采用两步浸提法,不必过筛;还原剂宜用 0.01mol/L 的亚硫酸氢钠;除去中间组分的 pH 宜提高到 5.4。

操作流程:用水将脱脂豆粉按料液比 1:15 溶解后调节 pH9.0,于 45℃ 水浴中低速搅拌 1h,浸提液常温下离心(9000 × g,20min),沉淀重新溶解,调节 pH9.0,45℃ 水浴中搅拌 1h 后再次离心,合并上清液,添加 0.01mol/L NaHSO₃,用 2mol/L HCl 调 pH 至 6.4,4℃ 下贮藏过夜。离心(6500 × g,20min,4℃),沉淀用水洗 2 次后用蒸馏水溶解,调 pH 至 7.5,冷冻干燥得 11S 组分;上清液加 NaCl 调离子浓度 0.25mol/L,用 2mol/L HCl 调 pH 至 5.4,离心(9000 × g,30min,4℃),上清液加入等体积冰水,用 2mol/L HCl 调 pH 至 4.8,离心(6500 × g,20min,4℃),沉淀水洗 2 次后用蒸馏水溶解,调 pH 至 7.5,冷冻干燥后得 7S 组分。

参考文献

- [1] Fukushima D. Recent progress of soybean protein foods: Chemistry, technology, and nutrition [J]. Food Reviews International, 1991, 7(3): 323-351.
- [2] Maruyama N, et al. Structure - Physicochemical Function Relationships of Soybean β - Conglycinin Constituent Subunits [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(12): 5278-5284.
- [3] 徐婧婷,任建华,叶凌凤,等.实验室规模分离大豆蛋白 7S

(下转第 273 页)

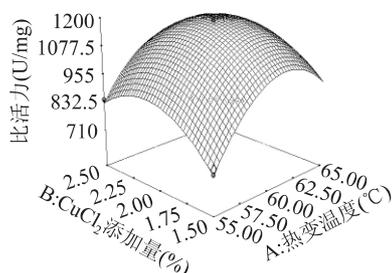


图5 热变温度和CuCl₂体积分数对SOD比活力影响的响应面

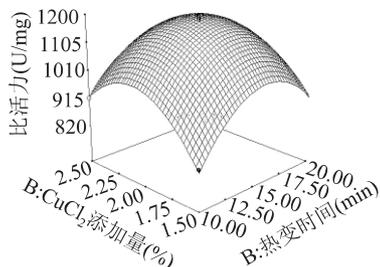


图6 热变时间和CuCl₂体积分数对SOD比活力影响的响应面

行验证实验,测得鹅血粗酶液中SOD的比活力为1144.896U/mg蛋白,达到理论预测值的95%,说明采用响应面分析法优化得到的提取工艺参数准确可靠,按照所建立的模型进行预测,在实践中是可行的。

3 结论

采用热变性法从鹅血中提纯SOD,利用实验设计软件Design-Expert,通过响应面分析法建立粗酶液中SOD热变性提取工艺的数学回归模型,并对各因子对SOD比活力(响应值)的影响进行了分析,得出影响鹅血粗酶液SOD比活力的各因素顺序依次为:热变时间>热变温度>CuCl₂体积分数;鹅血SOD热变性提取工艺的最佳参数为:热变温度60℃,热变时间15.3min,0.01mol/L CuCl₂体积分数2.08%,在此条件下,SOD比活力为1144.896U/mg蛋白。

参考文献

[1] 李朝国,林辉.湖北省鹅业发展现状及优势[J].中国禽业导刊,2005,22(4):10-11.
 [2] 赵朔,于长青,谢宁.酶法水解鹅血蛋白工艺参数研究[J].食品工业科技,2007(5):146-148.

(上接第269页)

和11S组分技术研究进展[J].大豆科学,2010,29(2):325-331.
 [4] Thanh VH, Okubo K, Shibasaki K. Isolation and characterization of the multiple 7S globulins of soybean proteins[J]. Plant Physiology, 1975, 56(1):19-22.
 [5] Nagano T et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7 S globulin from soybeans[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(6):941-944.
 [6] Iwabuchi S, Yamauchi F. Determination of glycinin and β-conglycinin in soybean proteins by immunological methods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35(2):200-205.

[3] 范守城,张云茹,张昌莲.鹅血的抗癌机理及其药物开发[J].上海畜牧兽医通讯,2006(3):50-51.
 [4] 杨卫健,张双全.超氧化物歧化酶的研究及应用前景[J].淮阴师范学院学报:自然科学版,2002,1(4):82-85.
 [5] 王明艳,鲁加峰,王晓顺,等.响应面法优化天冬多糖的提取条件[J].食品科学,2010,31(6):91-95.
 [6] 李云雁,胡传荣.实验设计与数据处理[M].北京:化学工业出版社,2005:79-112.
 [7] 李艳红,刘坚,张涛,等.酶解鹰嘴豆蛋白制备抗氧化肽工艺优化研究[J].农业工程学报,2008,24(1):268-273.
 [8] CHANDRIKA L P, FEREDDOON S. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2005, 93(1):47-56.
 [9] HOU X J, CHEN W. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from Wild edible BaChu mushroom by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72(1):67-74.
 [10] 王文平,郭祀远,李琳,等.考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J].食品研究与开发,2008,29(1):115-117.
 [11] 吴素玲,张卫明,孙晓明,等.刺梨SOD活力测定研究[J].食品科学,2005,26(11):58-61.
 [12] 赵海霞,孙文华.羊血中Cu,Zn-SOD酶活的研究[J].食品工业科技,2007,28(10):133-135.
 [13] 熊子文,罗丽萍,张丽丽.响应面法优化野蒿总黄酮的超声波提取工艺[J].食品科学,2010,31(8):38-41.
 [14] WU Y, CUI S W, TANG J, et al. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2007, 105(4):1599-1605.
 [15] 葛静微,罗均,李小定,等.响应面分析法优化血红素提取工艺[J].食品科学,2010,31(8):60-64.
 [16] MALIHE A, HABIBOLLAH Y, NADER B, et al. Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by Aspergillus niger[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 154(15):694-702.
 [17] SILVA E M, ROGEZ H, LARONDELLE Y. Optimization of extraction of phenolics from Ingaedulis leaves using response surface methodology[J]. Separation and Purification Technology, 2007, 55(3):381-387.

[7] Bairy E, Tosh S, Corredig M, et al. Protein Subunit Composition Effects on the Thermal Denaturation at Different Stages During the Soy Protein Isolate Processing and Gelation Profiles of Soy Protein Isolates[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2008, 85(6):581-590.
 [8] Deak NA, Murphy PA, Johnson LA. Effects of reducing agent concentration on soy protein fractionation and functionality[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(3):C200-C208.
 [9] Zheng HG, Yang XQ, Ahmad I. Soybean β-conglycinin constituent subunits: Isolation, solubility and amino acid composition[J]. Food Research International, 2009, 42(8):998-1003.