第14卷 无锡轻工大学学报 Vol.14
第4期 JOURNAL OF WUXI UNIVERSITY OF LIGHT INDUSTRY 1995 No.4

不溶性大豆浓缩蛋白物理改性机理的研究

华欲飞 谷文英 沈培英 刘复光

（食品资源科学与工程系）

摘要 从分子间作用力的角度，研究了醇法浓缩大豆蛋白(ALSPC)的物理增溶机理。通过蛋白质溶出物分布可知，分子间力均匀作用于各个ALSPC蛋白分子，而MSPC蛋白分子则通过共价键形成聚集体，聚集体间无任何形式的作用力。荧光光谱证明疏水性基团处于聚集体内部，因而具有可溶性蛋白结构。对可溶性聚集体的形成机理进行了研究。

主题词 大豆；蛋白；蛋白质改性

中图分类号 TS201.21

0 引 言

醇浸出法是主要的大豆浓缩蛋白(Soy Protein Concentrate，简称SPC)生产工艺，该工艺具有无需排放废水，产品色泽浅，风味清淡等优点。另一方面，由于醇溶液强烈的蛋白质变性和聚集作用，使得蛋白质溶解度较低(NSI<10%)，严重限制了醇法SPC的应用范围。通过研究发现，在优化工艺条件下(pH8，温度110℃，时间5min)，物理改性法处理可使醇法SPC溶解度从10%左右提高到70%以上，乳化，起泡，吸油等功能性质也能随之得到改善。[1]

所谓物理改性是指利用热，电，机械能等能量形式的改性方法，[2]它具有费用低，无毒副作用以及对产品营养性能影响较小等优点。然而，物理改性过程意味着蛋白质进一步变性，一般情况下，这将导致溶解度降低。从这个意义上讲，醇法SPC的物理改性增溶突破了关于蛋白质变性及溶解度的传统观念。

为了能够深入地认识物理改性方法，本文对加热-均质过程中蛋白结构变化机理进行了研究，通过测定蛋白质在不同溶剂中的溶解度以及蛋白质溶出物分子量分布，推测各种次级键强度和空间分布。并根据大豆蛋白的物理化学特征，提出醇法SPC的物理改性增溶机理。

收稿日期：1995-03-18

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1) 醇法大豆浓缩蛋白(ALSPC)从低温脱溶脱脂大豆粉制取,按照文献所定工艺条件进行加热-均质改性,得到改性大豆浓缩蛋白(MSPC). 酸法大豆浓缩蛋白(AWSPC),大豆分离蛋白(SPI)均从国内某厂购得。

2) 0.025mol 磷酸缓冲液、SDS 溶液、6mol 尿素溶液中蛋白质溶解测定:溶剂分别为 0.5mol 磷酸缓冲液,0.025mol(0.7%)SDS 水溶液和 6mol 脲溶液,溶解时温度为 25℃,搅拌 1h,离心(3000r/min)20min,凯氏定氮法测上清液中蛋白质含量(6.25×mol),当溶剂为脲溶液时,用 280nm 紫外吸收测定蛋白质:

$$\text{溶解度}=\frac{\text{上清液中蛋白质量}}{\text{总蛋白质}}$$

3) 蛋白质溶出物分子量分布:用凝胶层析法测定,分离条件为:1×80cm 层析柱,装填 Sepharose-6B 凝胶(瑞典 Pharmacia 公司产品),洗脱液为 0.1mol 磷酸缓冲液+0.4mol NaCl(pH7.6),流速为 7ml/h,用兰葡聚糖 2000 求得空体积为 18ml,当溶剂为 6mol 尿素溶液时,洗脱液改为 0.5% (W/V) SDS 溶液,其余条件不变。

4) 蛋白质荧光光谱测定:仪器为日立-635 荧光分光光度仪,1cm 石英比色皿,激发波长:280nm.

5) 蛋白质表面疏水性测定:采用 ANS(1-苯胺基-8-萘磺酸盐)荧光探针法[3],蛋白质样品悬浮于 0.1mol 磷酸缓冲液中(pH7.0),在高速均质机上均质(10000r/min,1min),离心(3000r/min,20min). 上清液用同一磷酸缓冲液逐步稀释后,加入 ANS 溶液(1.6×10^{-6} mol). 测定蛋白质-ANS 溶液的荧光强度,$\lambda_{ex}=390$nm,$\lambda_{em}=470$nm,以荧光强度对蛋白质浓度作图,曲线开始时的斜率为蛋白质的表面疏水性。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质分子间作用力在增溶过程中的变化

大豆蛋白样品在各种溶剂中的溶解度见表 1.

表 1 各种溶剂中蛋白质溶解度

	MSPC	ALSPC	AWSPC	SPI
缓冲液(pH7.0)	67.5	14.3	23.22	3.8
SDS 溶液(0.025mol)	68.1	40.5	55.0	60.5
尿素溶液(6mol)	73.1	65.3	92.7	93.5

蛋白质在水中溶解时,蛋白分子间的相互作用力必须在水的作用下瓦解并被蛋白分子-水分子相互作用所取代,另一方面,不溶性蛋白分子间必定存在更强的作用力。在 0.025mol SDS 溶液中,蛋白质吸附大量带电的 SDS 分子后,同性电荷产生斥力,如果这种斥力足以克服蛋白分子间的作用力,将使其溶解;如分子间作用力较强,则蛋白质仍不能溶解。高浓度(6mol)尿素溶液是一种较强的蛋白质变性剂,可破坏除二硫键之外的所有次级键(非共价键)[4]

因此,不溶性蛋白质分子间作用力的强度是不同的,按照键能从低到高,可分为较弱的

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

次级键，较强的次级键和共价键作用力。DS1，DS2 和 DS3 分别反映了上述各种作用力使蛋白质溶解度降低的百分数，其中：

$$DS1 = SDS - SUL$$

$$DS2 = USUL - SDS$$

$$DS3 = 1 - USUL$$

图 1 表示不同样品中 DS1，DS2 和 DS3 的相对大小，通过比较可发现，醇法 SPC 蛋白质分子间主要是非共价键(DS1 和 DS2)和相对较少的共价键(DS3)作用力，产生这种分子间作用力模式的变性方式为热醇变性。醇法 SPC 经加热-均质处理成为 MSPC 后，分子间作用力模式发生很大变化，非共价键基本消失(DS1 和 DS2 很小)，而共价键则成为主要作用力(DS3 较大)。由此，高温均质法通过减少不溶性蛋白质内键能较低的非共价键增加溶解度。

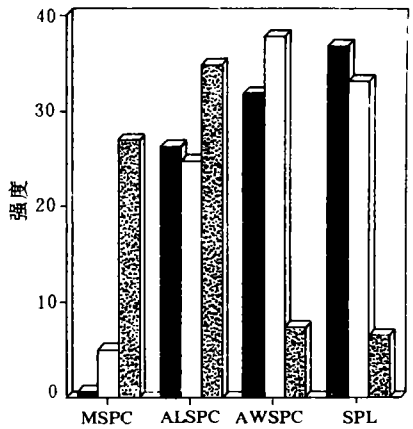


图 1 大豆蛋白样品分子间作用力模式

DS1 DS2 DS3

作为对比，图 1 同时给出了 AWSPC 和 SPI 的分子间作用力模式。一般情况下，它们应具备较高的溶解度，但本文中这两种样品的溶解度都很低，可能是生产过程中工艺条件控制不当所致。图 1 显示，SPI 和 AWSPC 的分子间作用力主要是非共价键，共价键作用力范围很小。根据这种作用力模式推断，由于不存在键能较高的共价键，通过加热－均质处理，SPI 和 AWSPC 的溶解度将被大幅度提高。

2.2 蛋白质分子间作用力分布的变化

ALSPC 和 MSPC 溶出物经过 Sepharose-6B 凝胶层析后(图 2)，得到三个组分(F1，F2 和 F3)．各组分的紫外光谱见图 3，F1 和 F2 在 280nm 处有蛋白质的特征吸收，F3 则没有。因此，根据层析保留体积判断，这三个组分依次是：蛋白分子聚集体、蛋白分子和非蛋白组分。

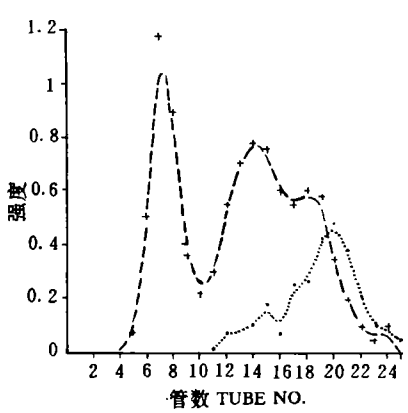


图 2 蛋白质溶出物凝胶层析谱图

—·— ALSPC —+— MSPC

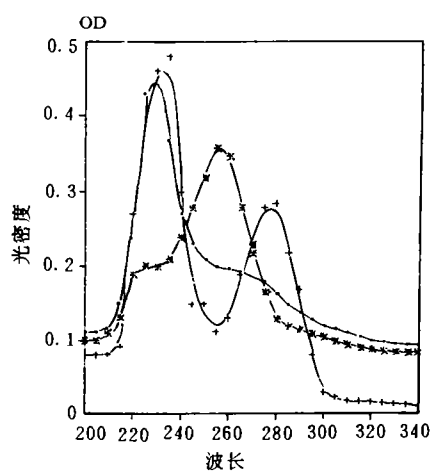


图 3 蛋白质溶出物紫外吸收曲线

ALSPC 蛋白溶出物分布主要集中在 F2，其它组份的含量很小。与此相反，MSPC 溶出

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

物以F1.为主,F2相对较小,因此,MSPC亦被称之为"可溶性蛋白聚集体"(Soluble Protein Aggregates)[5]。

图4所示为ALSPC和MSPC在6mol尿素溶液中溶出物的凝胶层析谱图。与图2进行对比后可发现,ALSPC在尿素溶液中溶解时,F2的含量大大增加,然而F1含量的增长却很小,另一方面,MSPC在尿素溶液中除了F2稍有增加外,F1的含量与在水溶液中基本相同。变性大豆蛋白以分子聚集体(F1)和分子(F2)两种方式溶解,其主要原因是分子间作用力在凝聚态蛋白质内的空间分布不均匀所致,只有当蛋白分子间作用力强、聚集体间作用力较弱时,才会以蛋白分子聚集体的方式溶解。ALSPC在尿素溶液中F1均远远小于F2,说明ALSPC在溶解时蛋白质分子均匀地从凝聚态解离进入溶液,表明ALSPC的分子间非共价键作用力均匀地分布。相反,MSPC的蛋白分子聚集体即使在6mol尿素溶液中也不被破坏(即图4中F1的含量与图2中F1的含量基本相同),说明MSPC的聚集体内蛋白质分子间具有很强的作用力,且包括共价键。另一方面,即使在水中MSPC也很容易以分子聚集体的形式溶解,说明蛋白分子聚集体间的作用力很弱。

以上实验结果表明,高温均质增溶使得原先广泛,均匀地分布在ALSPC蛋白分子间的作用力"区域化",转变为MSPC中在蛋白分子聚集体局部空间分布的共价键作用力。

2.3 可溶性蛋白质聚集体的形成机理

增溶后使广泛分布于蛋白分子之间的作用力集中在分子聚集体内,而聚集体间的作用力则减弱。可以认为,大豆蛋白本身的结构及物化性质是这一转变重要的内在因素,而加热以及高速均质提供了必不可少的外部条件。

Shimada和Matsushita[6]在研究了多种蛋白质的热变性后的聚集行为发现,若疏水性氨基酸的mol百分比小于31.5%,则为凝胶型(Gelation),如大于31.5%则为凝聚型(Coagulation). 凝聚型蛋白(如鸡蛋白)加热变性后,分子间能随机地结合形成不溶性的蛋白质凝块(Coagulum),相反,热变性凝胶型蛋白(如大豆蛋白)形成凝胶是一个有序的过程。进一步的研究证明,溶液中大豆蛋白加热凝胶按如下步骤进行[7]:

大豆蛋白分子→可溶性蛋白聚集体(Soluble Aggregate)→巨蛋白聚集体(Macro-aggregate)→凝胶(Gel).

其中的蛋白聚集体被认为是具有束状结构,相互间必须正确取向,才能结合成为凝胶。另外,Yamagishi等人发现[8],若在大豆蛋白溶液中加入巯基封闭试剂NEM(N-乙基马来酰胺),则加热时体系将停留在可溶性聚集体阶段,而不会进一步发展,这一现象说明分子间二硫键在由聚集体转变为凝胶的过程中起着重要作用。

ALSPC在高温时其蛋白质加速溶解,蛋白分子随之热变性并形成聚集体,但由于高速均质产生的剪切及搅拌作用,流体中任何一个很小的部份都相对于另一部份作高速运动,-SH和-S-S-基团之间无法正确取向并形成二硫键,防止了聚集体的进一步聚合。然而在蛋白聚集体内,蛋白分子位置相对固定,有利于聚集体内二硫键的形成,这反过来又降低了-SH基团浓度及聚集体间形成二硫键

通过上述分析可知,MSPC的蛋白分子聚集体具有一疏水核心,外层被亲水基团包围,类似于天然可溶性蛋白分子结构。

荧光发射光谱(图5)部分证实了以上观点,MSPC溶出物F1组分(蛋白分子聚集体)的荧光发射波长为$\lambda=334nm$,与天然大豆蛋白的基本相同(332~333nm),说明聚集体内的疏

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

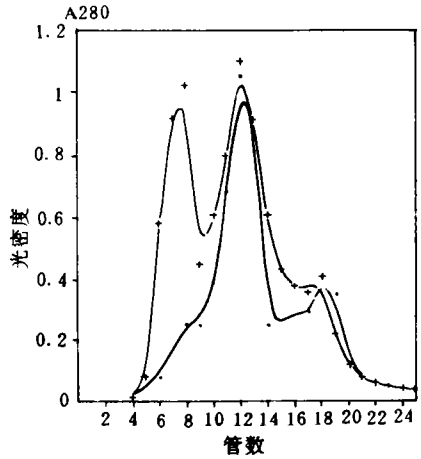


图 4 6mol 脲溶液中溶出物凝胶层析谱图

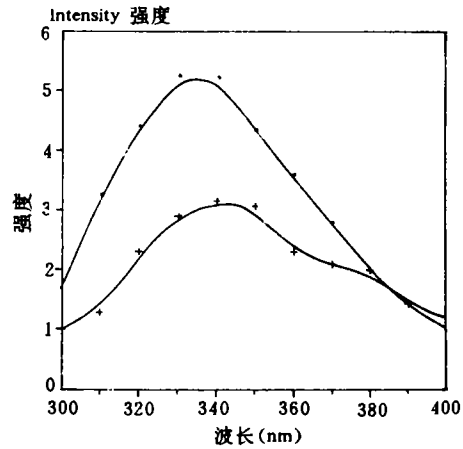


图 5 MSPC 溶出物荧光发射光谱

—·— F1 —+— F2

水性基团不与水分子相接触;但 F2 组分,即溶出物中蛋白质分子的荧光发射波长为 340nm,证明蛋白质分子已经变性,疏水基团与水接触[9]。

表 2 各种大豆蛋白样品的 ANS 表面疏水性

样品	F1	F2	AI.SPC	AWSPC	SPI
疏水性	512.58	157.30	76.88	162.83	222.0

从表中可见,蛋白分子聚集体具有大得多的 ANS 表面疏水性,其结论与荧光发射光谱不一致,因为若疏水基团在聚集体内部,则不可能有大的疏水性。这一矛盾可能与 ANS 作为疏水性探针的某些至今仍不清楚的作用机制有关[10,11],Damodaran 注意到,虽然变性牛血清蛋白(BSA)比天然 BSA 的表面疏水基团多得多,但用荧光法测定的表面疏水性却较低。他认为 ANS 疏水性虽然与蛋白质的功能性质有较好的相关性,但它并不能代表蛋白质表面疏水性,而是蛋白质的非极性空穴(Nonpolor Cavities)所表现的疏水性,这些空穴可容许 ANS 分子进入,但水分子不能进入[12]。

3 结 论

1) 醇法大豆浓缩蛋白分子间存在较强的次级键(DS2)和二硫键(DS3),经过物理改性增溶,成为 MSPC 后,破坏了次级键,但二硫键相互作用的变化较小。

2) 醇法大豆浓缩蛋白分子间作用力分布较为均匀,但 MSPC 的蛋白质分子间作用力分布则不同,主要集中在蛋白分子聚集体内,而聚集体间没有作用力。

3) 形成可溶性蛋白分子聚集体的主要原因有二;首先,大豆蛋白属"凝胶型"而不是"凝聚型"蛋白,其次,高速均质使蛋白质溶液产生剧烈运动,蛋白分子聚集体之间无法相互结合。

4) 荧光发射光谱证实:可溶性蛋白分子聚集体的结构为类似于天然大豆蛋白的"巨分子"。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参 考 文 献

1 华欲飞等. 醇法大豆浓缩蛋白的物理改性:[博士学位论文]. 无锡轻工业学院,1993
2 Nakai S. Hydrophobic Interactions in Food Systems. 1990
3 Kato A, Nakai S. Biochim. Biophys. Acta. 1980,62:413
4 Baldman R L, Eisenberg D. Protein Engineering. Alan R. Liss INC,1987. 127
5 Howard P A. U. S. Patent, 4234620. 1980
6 Shimada K, Matsusita S. J. Agric. Food Chem. 1980,28:413
7 Damodaran S J. J. Agric. Food Chem. 1988,36:262
8 Yamagishi T, et al. Agric. Biol. Chem. 1983,47:1229
9 Demchenko A P. Ultroviolet Spectroscopy of Proteins. Springer-Verlag, Heidelberg, West Germany,1986
10 Laurence D J R. Biochem. J. 1952,51:168
11 Yamagishi T, et al. Agric. Biol. Chem. 1983,47:2475
12 Damodaran S J. Plant Proteins (J. E. Kinsella & W. G. Soucie eds.), 1990. 21

Mechanisms of Physical Modification of Insoluble SPC

Hua Yufei Gu Wenying Shen Peiying Liu Fuguang

(Dept. Food Resources Sci. & Eng.)

Abstract Physical modification of alcohol leaching soy protein concentrate (ALSPC) to increase solubility was studied. It was found that, in ALSPC solution, all protein molecules are interalted with each other by noncovalent force, in modified ALSPC however, protein molecules form aggregates through covalent interactions, but scarcely any interaction exists between aggregates, it dissolves mainly in the form of aggregates . Fluorescence spectroscopy further proved that the hydrophobic groups are located in the interior of aggregates. An explanation for the formation of the soluble protein aggregate during modification is given.

Subject-words Soybean; Protein; Protein modification

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net