

利用球磨机提高大豆浓缩蛋白乳化性的研究

高 珊¹,江连洲^{1*},宋宏哲²,娄 巍¹,范佳璐¹

(1.东北农业大学食品学院,黑龙江哈尔滨 150030;

2.黑龙江省双河松嫩大豆生物工程有限责任公司,黑龙江哈尔滨 150008)

摘要:采用球磨机对大豆浓缩蛋白进行改性,经球磨机处理的大豆浓缩蛋白乳化性明显提高。球磨机改性蛋白的最佳条件为转速 80r/min,球磨时间 1h,大豆浓缩蛋白填充量 10g,大豆浓缩蛋白含水量 85%,pH11。改性后浓缩蛋白的 EAI 为 114.893m²/g,提高了 120%。SDS-PAGE 电泳图谱对比分析了改性前后大豆浓缩蛋白的结构变化,研究表明,醇法大豆浓缩蛋白经过球磨机适当处理后蛋白质各组分含量发生了改变,蛋白乳化性能有明显提高,拓宽了其在食品行业应用的领域。

关键词:球磨机,大豆浓缩蛋白,乳化性,改性

Study on enhancing the emulsibility of soybean protein concentration by ball milling

GAO Shan¹,JIANG Lian-zhou^{1*},SONG Hong-zhe²,LOU Wei¹,FAN Jia-lu¹

(1.College of Food Science,Northeast Agricultural University,Harbin 150030,China;

2.Heilongjiang Shuanghe Songnen Soybean Bio-engineering Co.,Ltd.,Harbin 150008,China)

Abstract:The soybean protein concentration(SPC) was modified by ball milling in this experiment,the emulsibility was enhanced significantly after treatment.The optimum condition for ball milling were:rotational speed 80r/min,milling time 1h,fill content of SPC 10g,water content of SPC 85%,pH11.The EAI of SPC was determined after the ball milling which was 114.893m²/g,increased by 120%.The analysis on the change of SPC structure and conformation was studied with SDS-PAGE electrophoresis which showed that the various components content of the soybean protein was changed after ball milling.The protein emulsification was markedly improved,and the application area in the food industry was widened.

Key words:ball milling;soybean concentration protein;emulsibility;modification

中图分类号:TS201.2⁺1

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2010)08-0102-04

大豆浓缩蛋白是从脱脂大豆片或脱脂大豆粉中除去低分子可溶性非蛋白成分制得的大豆蛋白制品,其主要成分是蛋白和细胞壁多糖,蛋白质含量干基在 65% 以上^[1]。2000 年全世界大豆浓缩蛋白的总产量约为 33 万 t,其中约 31 万 t 为醇法大豆浓缩蛋白^[2]。醇法大豆浓缩蛋白的蛋白质含量很高,但由于在加工过程中受到乙醇的作用,蛋白分子结构发生改变,大量的疏水基暴露,氮溶解指数(NSI)降低,某些功能性质(如乳化性)减弱,影响了其在食品工业中的应用^[3]。目前,针对蛋白改性有很多方法,其中包括物理改性、化学改性、酶改性和基因改性等等。物理改性由于具有费用低、无毒副作用以及对产品营养性能影响较小等优点被广泛应用^[4]。球磨机是粉碎研磨的一种常用设备,工作原理是当电机

通过齿轮带动筒体旋转时,磨介在摩擦力、压力和旋转产生的离心力共同作用下研磨物料。物料在机械球磨处理后,其分散性、化学活性也相应升高^[5]。原因在于球磨过程中,当物质受到冲击、剪切、压缩、拉伸或摩擦等机械力作用时,所施加的机械能一部分以各种形式储于物质内部,由此引起物质发生结构及物理化学性质变化(即机械力化学效应)^[6]。本研究利用球磨机上述作用特性,对醇法大豆浓缩蛋白进行改性研究,寻求一种新的物理改性方法,简化传统的改性工艺。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

醇法大豆浓缩蛋白 黑龙江双河松嫩大豆生物工程有限责任公司;氨水 天津市东丽区天大化学试剂厂;三羟甲基胺基甲烷(Tris)、丙烯酰胺(Acr)、N,N'-甲叉双丙烯酰胺(Bis) Sigma 公司;十二烷基磺酸钠(SDS) Amresco 公司;D532A 标准分子量蛋白 宝生物工程(大连)有限公司;考马斯亮蓝

收稿日期:2009-09-15 * 通讯联系人

作者简介:高珊(1984-),女,硕士研究生,研究方向:农产品深加工。

基金项目:农业部大豆产业技术体系资助项目(nycytx-004)。

R250、 β -巯基乙醇、甘氨酸 北京索莱宝科技有限公司;丙三醇 分析纯,上海试剂三厂;甲醇 分析纯,天津市巴斯夫化工有限公司;冰乙酸 分析纯,天津市津东天正精细化学试剂厂;大豆色拉油 市售。

球磨机 南京南大天尊电子有限公司;pH 仪 上海伟业仪器厂;真空干燥箱 大连第四仪表厂;高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司;AM-77s均质机 NIHOHSEIKI KAISHA LID ACE HOMOGENIZER;KQ-100 超声波清洗机 昆山市超声仪器有限公司;UV-2550 紫外分光光度计 日本岛津有限公司;电泳仪 POWERPAC BASIC POWER SUPPLY、电泳槽 Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System BIO-RAD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 球磨机处理方法 大豆浓缩蛋白与氨水在筒体内混合,放入 16 个直径为 1cm 的钢球,将筒体对称地放入球磨机,固定筒体后设置参数,进行处理。

1.2.2 乳化性的测定^[7] 配制 0.2% 的大豆浓缩蛋白分散液(pH8.05, 0.05mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液),取 1mL 花生油与 3mL 大豆浓缩蛋白分散液于高速分散机均质 1min,立即从乳化液底部取 0.1mL,用 0.1% 的 SDS 溶液稀释到 50mL,测定 500nm 处的 A_0 ,每个样品重复三次,取平均值。

$EAI(m^2/g) = 2 \times 2.303 \times A_0 \times \text{稀释倍数} / (c\varphi \times 10000)$

式中: A_0 为 0min 时吸光值; c 为蛋白分散液浓度, g/mL; φ 为油相体积分数。

1.2.3 凝胶电泳^[8-9] 参照 Kong (2006) 和郭尧君 (1999) 的 SDS 不连续电泳方法。使用 12% 的分离胶, 5% 的浓缩胶, 样品液最终蛋白浓度为 3mg/mL, 于 -20°C 贮存备用。

2 结果与讨论

2.1 球磨处理的单因素分析

2.1.1 转速的影响 本实验球磨机处理条件为:时间 2h, SPC 填充量 9g, 含湿量 70%, pH 为 9。研究了转速分别为 50、70、90、110、130、150r/min 时,对大豆浓缩蛋白乳化性的影响,结果见图 1。

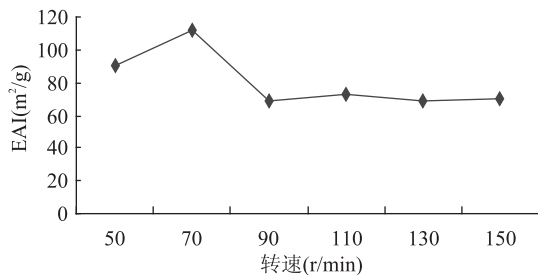


图 1 不同球磨转速对 SPC 乳化性的影响

从图 1 可以看出,当球磨机转速在 70r/min 时 SPC 的乳化性明显提高,而转速在 90~150r/min 时乳化性变化不明显。原因是当球磨机转速过大时,钢球随球磨机转动所产生的离心力与其重力相等,磨介在筒体内壁做圆周运动^[10]。此时钢球与 SPC 没有充分接触摩擦,只对处在上层的 SPC 有摩擦作用。

而当转速在 50r/min 时,转速又太低,钢球与 SPC 摩擦不激烈,产生改变 SPC 分子结构的能量较小。

2.1.2 时间的影响 本实验球磨机处理条件为:转速 70r/min, SPC 填充量 9g, 含湿量 70%, pH 为 9。实验分别选择了球磨时间为 1、2、3、4、5h 对大豆浓缩蛋白的乳化性影响进行研究,结果见图 2。

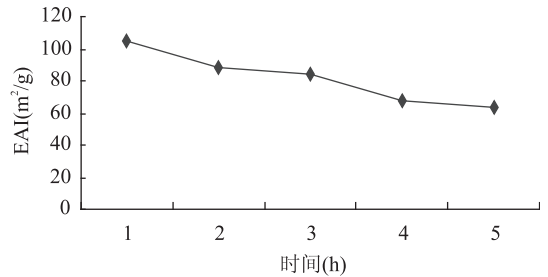


图 2 时间对 SPC 乳化性的影响

从图 2 可以看出,当球磨处理 1h 时 SPC 的乳化性提高最大,随着球磨处理时间的延长,SPC 的乳化性逐渐降低。原因可能是球磨处理 1h 时,所产生新的 SPC 分子结构中,亲水基和亲油基的比例最佳,乳化性能最高,随着作用时间的延长,球磨的摩擦作用破坏了 SPC 这些结构,使乳化性降低。

2.1.3 SPC 填充量的影响 球磨机处理条件:转速 70r/min, 时间 1h, 含湿量 70%, pH 为 9。SPC 填充量对大豆浓缩蛋白的乳化性影响如图 3。

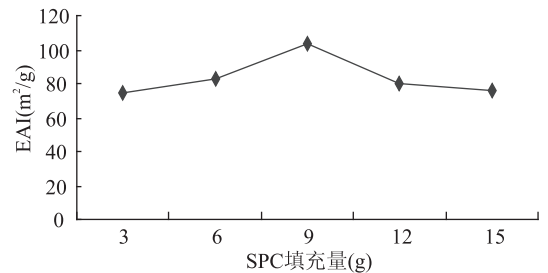


图 3 不同磨介钢球与 SPC 比例对 SPC 乳化性的影响

磨介钢球与 SPC 作用程度的大小取决于钢球在筒体内部的运动状态,一般情况下,钢球呈泄落状态运动对 SPC 的作用最大。而钢球的运动状态与球磨机的直径、转速、磨介总质量、SPC 填充量等多因素有关,从图 3 可以看出,当 SPC 填充量为 9g 时,SPC 的乳化性最大。

2.1.4 SPC 含湿量的影响 球磨机处理条件为:转速 70r/min, 时间 1h, SPC 填充量 9g, pH 为 9。水作为化学反应的常用介质,由于与物料分子之间存在氢键、范德华力等,可促进反应的进行,但考虑到水的量过大会影响磨介对物料的作用效果,也不利于后序干燥,所以控制含湿量在一定范围内。本实验蛋白含湿量选择 60%~100%。蛋白含湿量对大豆浓缩蛋白的乳化性影响如图 4。

从图 4 可以看出,随着含湿量的增加,球磨处理后的 SPC 乳化性呈先增加后减小的趋势。球磨机是依靠磨介对物料的冲击和摩擦所产生的挤压力与剪切力来作用物料的^[11]。当含湿量过低时,蛋白质颗粒聚集在一起,不易与钢球充分接触摩擦,所以产生的机械力化学效应小;含湿量过大,蛋白质颗粒的韧性增强,不利磨介与蛋白的摩擦;本实验研究中含湿

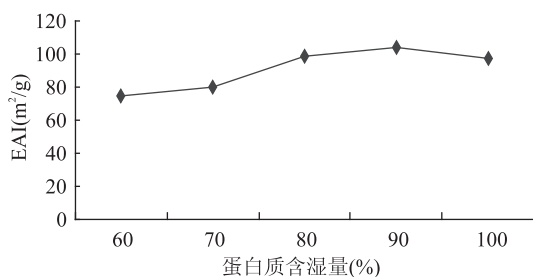


图4 不同SPC含湿量对SPC乳化性的影响

量达到90%时,SPC的乳化性最大。

2.1.5 pH的影响 由于蛋白质的等电点偏酸性,单纯向蛋白质中加水不利于SPC的溶解,本实验选择以氨水调节SPC的pH在8~12之间,使SPC远离其等电点。一方面氨水为非极性分子,它可以与SPC中残余的羧基、羟基等结合,使SPC的分子结构重组;另一方面,氨水具有挥发性,可在后续干燥处理时除去,不产生盐类物质^[12]。球磨处理条件:转速70r/min,时间1h,SPC填充量9g,含湿量90%,pH选择8~12。pH对大豆浓缩蛋白的乳化性影响如图5。

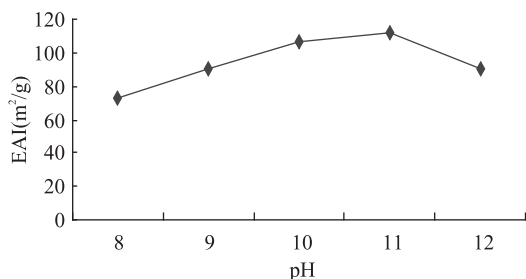


图5 不同pH对SPC乳化性的影响

从图5可以看出,随着pH从8提高到11,SPC的乳化性随之逐渐增大,当pH达到11时SPC的乳化性提高最明显。当pH为12时,SPC的乳化性又降低,可能由于氨的数量过多时,阻碍了SPC分子之间的键合所致。

2.2 正交实验确定球磨处理的最佳工艺条件

根据单因素实验结果,以SPC的乳化性为测定指标,对影响乳化性的主要因素选取五因素进行 $L_{18}(3^5)$ 正交实验,以确定球磨机处理大豆浓缩蛋白的最佳工艺条件。其正交实验设计及正交实验结果见表1,表2所示。

表1 正交实验的因素与水平

水平	A 转速 (r/min)	B 蛋白填充量 (g)	C 时间 (min)	D 含湿量 (%)	E pH
1	60	8	40	85	9
2	70	9	60	90	10
3	80	10	80	95	11

由表2可知,5个因素中对改性结果的影响程度为 $E > A > C > D > B$,说明pH对实验结果的影响最大,其次是转速、时间、含湿量、蛋白填充量。最佳工艺条件是 $A_3B_3C_2D_1E_5$,最佳参数组不在正交表中,因此补充了一组验证实验,通过验证实验结果得到改性蛋白的EAI为 $114.893\text{m}^2/\text{g}$ 。

2.3 凝胶电泳

如图6所示,泳道1为醇法大豆浓缩蛋白的电泳

表2 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	E	乳化性 EAI (m ² /g)
1	1	1	1	1	1	71.196
2	1	2	2	2	2	88.060
3	1	3	3	3	3	71.346
4	2	1	1	2	2	71.944
5	2	2	2	3	3	87.411
6	2	3	3	1	1	72.942
7	3	1	2	1	3	114.352
8	3	2	3	2	1	58.523
9	3	3	1	3	2	93.198
10	1	1	3	3	2	70.547
11	1	2	1	1	3	88.459
12	1	3	2	2	1	100.233
13	2	1	2	3	1	76.784
14	2	2	3	1	2	112.556
15	2	3	1	2	3	102.029
16	3	1	3	2	3	106.320
17	3	2	1	3	1	93.448
18	3	3	2	1	2	92.101
k_1	81.640	85.190	86.712	91.934	78.854	
k_2	87.278	88.076	93.157	87.851	88.068	
k_3	92.990	88.641	82.039	82.122	94.986	
R	11.350	3.451	11.118	9.812	16.132	

图谱,泳道2为经过球磨处理后的醇法大豆浓缩蛋白的电泳图谱。通过泳道的颜色可以看出,经过球磨处理的大豆浓缩蛋白溶解性有所提高。球磨处理前后的SPC电泳图谱通过GIS图像分析软件分析,分离出10种蛋白组分。如图7所示,经过球磨机处理的大豆浓缩蛋白各蛋白组分发生了变化。

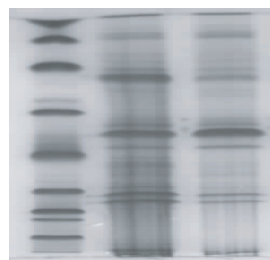


图6 球磨处理前后SPC的电泳图谱

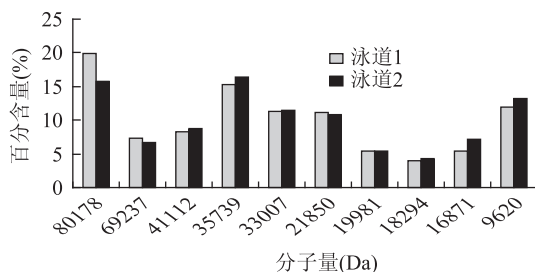


图7 球磨处理前后各蛋白组分的百分含量

3 结论

利用球磨机对醇法大豆浓缩蛋白改性,简化了改性的工艺路线,突破了传统改性工艺中水用量大、高压高温的特点,降低了对设备的要求和能源消耗,是醇法大豆浓缩蛋白改性技术的一次飞跃。该方法

(下转第107页)

X-5树脂处理对 ACE 抑制活性影响较大,而弱极性和极性的三种树脂 XAD761、AB-8 和 101 树脂处理后酶解液的 ACE 抑制活性稍有升高,这可能是因为这三种树脂选择性地吸附了酶解液中极性较高的多肽或其他成分,使得酶解液中 ACE 抑制活性较高的低极性多肽成分相对富集,导致酶解液的 IC₅₀ 值降低。极性树脂 XAD7HP 处理后酶解液的 IC₅₀ 值有所提高,该树脂是一种极性大孔聚烷酯吸附树脂,对多肽有一定的吸附效果,可应用于多肽和蛋白的纯化,从表 2 中可以看出,其对总氮的吸附较其他极性和弱极性树脂高,推断其对 ACE 抑制活性的多肽有较多的吸附,导致酶解液 ACE 抑制活性的降低。

3 结论

鳀鱼酶解液经不同树脂静态处理后 ACE 抑制活性有所变化,该变化与树脂的极性有关。非极性树脂处理会导致酶解液 ACE 活性的降低,其中非极性大孔吸附树脂 H103 处理后 IC₅₀ 值由 9.10mg 提高到了 17.58mg, ACE 抑制活性降低最明显。某些极性和弱极性树脂处理会稍微提高鳀鱼酶解液的 ACE 抑制活性。通过树脂处理这一简单快速的方法,可以达到富集鳀鱼酶解液活性多肽的效果。

参考文献

- [1] 张丽霞,赵海燕,张石革,等.血管紧张素转换酶抑制剂的研究与应用进展[J].中国药房,2007,18(35):87-89.
- [2] Karak H, Karak H, Doi K, et al. Antihypertensive effect of tryptic hydmlysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats[J]. CompBiochem Physiol-c, 1990, 96(2):367-378.
- [3] 董玉莲,闻克威,李宝才,等.水产下杂鱼鳀鱼氮营养价值研究[J].食品与发酵工业,2000,26(6):27-31.
- [4] 王长云,刘洋,薛长湖,等.鳀鱼蛋白酶水解物的提取[J].水产学杂志,1996,9(1):7-11.

(上接第 104 页)

改性的大豆浓缩蛋白可以显著提高大豆浓缩蛋白的乳化性,最佳工艺条件为球磨机的转速 80r/min, SPC 填充量 10g, 球磨机处理时间 1h, SPC 的含水量 85%, pH11, 所得改性大豆浓缩蛋白的 EAI 为 114.893m²/g, 同比提高了 120%。

参考文献

- [1] 石彦国,杨泽慧,孙冰玉.醇浓度对醇法大豆浓缩蛋白浸提液中溶出蛋白的影响[J].中国粮油学报,2005,20(4):65-67.
- [2] Chajuss D. Soy protein concentraie: processing, properties and prospects[J]. Inform, 2001(12):1176-1180.
- [3] Anupam Malhotra, John N Coupland. The effect of surfactants on the solubility, zetapotential and viscosity of soyprotein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18:101-108.
- [4] 宋宏哲,赵勇,白志明.醇法大豆浓缩蛋白的改性技术综述[J].粮油食品科技,2008,16(2):30-32.
- [5] 陈玲,鹿艳生,李冰,等.利用球磨改变绿豆淀粉颗粒形貌

- [5] 毋瑾超,朱碧英,胡锡钢,等.复合酶法制备鳀鱼活性寡肽的研究[J].东海海洋,2003,21(2):43-49.
- [6] 王瑛瑛,王璋,陈尚卫,等.花生 ACE 抑制活性肽的分离纯化与结构鉴定[J].食品科学,2008,29(10):341-344.
- [7] Cheison Seronei Chelulei, 王璋, 许时婴. 大孔吸附树脂提取苦味乳清蛋白水解物及其功能性质和生物活性的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(8):103-107.
- [8] 王进,何慧,石燕玲,等.玉米大豆复合 ACE 抑制肽风味控制研究[J].中国粮油学报,2008,23(5):65-68.
- [9] 周明明,徐伟,薛长湖,等.鳀鱼酶解技术的条件优化[J].食品工业科技,2009(2):158-160.
- [10] 李剑君,李稳,高新,等.AB-8 型大孔吸附树脂吸附葛根素过程的研究[J].西安交通大学学报,2000,34(4):78-81.
- [11] E Anzenbacherova, P Anzenbacher, K Macek, et al. Determination of enzyme(angiotensin convertase) inhibitors based on enzymatic reaction followed by HPLC [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001(24):1151-1156.
- [12] Mei - Hsien Lee. The mucilage of yam (*Dioscorea batatas Decne*) tuber exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activities[J]. Bot Bull Acad Sin, 2003, 44:267-273.
- [13] Chris J van Platerink, Hans - Gerd M Janssen, Johan Haverkamp. Development of an at - line method for the identification of angiotensin - I inhibiting peptides in protein hydrolysates [J]. Journal of Chromatography B, 2007, 846:147-154.
- [14] Mullally M M. Angiotensin - I - converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey protein[J]. Int Dairy J, 1997, 7:299-303.
- [15] Slizyte R, Dauksas E, Falch E, et al. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products[J]. Process Biochemistry, 2005, 40:2021-2033.
- [6] 及糊表观粘度研究[J].食品工业科技,2004,25(12):49-52.
- [6] 段善海,徐大庆,缪铭.物理法在淀粉改性中的研究进展[J].食品科学,2007,28(3):361-365.
- [7] E Molina, A Papadopoulou, D A Ledward. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins[J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15:263-269.
- [8] Kong B H, Xiong Y L, Caodi F, et al. Influence of Gender and Spawning on Meat Quality of Australian Red Claw Crayfish (*Cherax quadricarinatus*) Stored at 2°C [J]. Journal of Food Science, 2006, 71(6):320-325.
- [9] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999:123-160.
- [10] 张峻,齐崴,韩志慧,等.食品微胶囊、超微粉碎加工技术[M].化学工业出版社,2005:256-266.
- [11] 胡莉莉,张正茂,郭蕾,等.球磨条件对水溶性大米淀粉理化特性的影响[J].食品科技,2007(8):94-97.
- [12] 樊永华,华欲飞.氨处理对醇法大豆浓缩蛋白功能性和结构的影响[J].大豆科学,2008,27(5):854-858.