

文章编号:1673-1689(2008)06-0107-04

Ellman's 试剂测定脱脂豆粕中巯基含量

田其英, 湛卉, 华欲飞

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用 3 种不同方法对干热处理后的脱脂豆粕进行处理, 再加入 Ellman's 试剂来测定脱脂豆粕中的巯基含量。通过理论和数据分析得到, 方法二即脱脂豆粕、尿素-SDS 溶液和 Ellman's 试剂相混合反应可用于测定脱脂豆粕中的巯基含量。

关键词: 脱脂豆粕; Ellman's 试剂; 巯基含量; 方差分析

中图分类号: TS 201.21

文献标识码: A

Sulphydryl Content of Defatted Soy Flour Determinated by Ellman's Reagent

TIAN Qi-ying, CHEN Hui, HA Yu-fei

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

Abstract: The dry heated defatted soy flour was treated with three different methods respectively. then the sulphydryl content of defatted soy flour was determinated with Ellman's reagent. Through analyzing of the theory and the results, we concluded that method 2, namely mixed reaction of defatted soy flour, Urea-SDS solution and Ellman's reagent, can determined exactly sulphydryl content of defatted soy flour.

Key words: defatted soy flour; Ellman's reagent; sulphydryl content; variance analysis

蛋白质中的巯基(-SH)和二硫键(-S-S-)具有很高的化学活性, 在发挥蛋白质的食品功能性方面起着重要作用。如凝胶的形成, 蛋白质的成膜性等都与-SH 转化成-S-S-有关^[1]。除了加热、高压、氧化剂和还原剂处理能引起巯基和二硫键的变化^[1], 脱脂豆粕中含有的脂肪氧合酶催化氧化作用也能影响巯基含量的变化。脂肪氧合酶具有特异性催化含顺, 顺-1,4-戊二烯结构的不饱和脂肪酸及酯的氢过氧化作用, 生成的脂质氢过氧化物具有很高的氧化活性。在面粉中加入少量的含脂肪氧合酶活力的大豆粉, 能改进面粉的色泽和强化面筋蛋白质的

三维网络结构。这是因为脂肪氧合酶氧化生成的氢过氧化物能够除去面粉中的色素和氧化面筋蛋白质的巯基生成二硫键^[2]。

脱脂豆粕是制备大豆蛋白的原料。测定豆粕中巯基含量对判断豆粕氧化程度和研究大豆蛋白的功能性质有着重要参考价值。本试验测定的脱脂豆粕的巯基是游离的巯基, 它包括暴露在蛋白质表面的巯基和埋藏在蛋白质分子内部的巯基两部分。利用 Ellman's 试剂, 前人曾测定过面粉、面筋和大豆分离蛋白中的巯基含量^[3-5]。然而对于复合体系脱脂豆粕, 其巯基含量的测定尚未见报道。本

收稿日期: 2007-07-10.

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划项目(TRT0532).

作者简介: 田其英 (1980-), 男, 山东聊城人, 粮食、油脂与植物蛋白工程硕士研究生. Email: tqyo612@163.com

试验利用 Ellman's 试剂,分别对 3 种不同处理方法测得的脱脂豆粕巯基含量进行分析,期望找到一个测定脱脂豆粕巯基含量较好的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

低温豆粕,作者所在江南大学实验室自制;尿素、盐酸胍、SDS、EDTA,中国医药(集团)上海化学试剂公司产品;10 mmol/L Ellman's 试剂即 5,5'-二硫代-2-硝基苯甲酸(DTNB);Sigma 公司产品;Tris-甘氨酸缓冲溶液,pH 值 8.0;0.1 mol/L pH 值 8.0 磷酸盐缓冲溶液;尿素-盐酸胍溶液(8 mol/L 尿素和 5 mol/L 盐酸胍溶于 Tris-甘氨酸缓冲溶液);尿素-SDS 溶液(8 mol/L 尿素和 1 g/dL SDS 溶于水)。

1.2 仪器

恒温水浴锅,UV2100 紫外可见分光光度计,旋涡振荡仪,微量注射器。

1.3 方法

1.3.1 脱脂豆粕干热灭酶处理 将脱脂豆粕装入螺口具塞玻璃试管中,旋紧管帽。分别在设定温度水浴中保持 30 min,立即冰水浴冷却,待冷却至室温后取出。

1.3.2 蛋白质的测定 考马斯亮蓝法,测可溶蛋白质浓度。

1.3.3 脂肪氧合酶活力的测定 粗酶液的配制:取 0.5 g 脱脂豆粕,加 20 mL 去离子水,磁力搅拌 25 min,3 000 r/min 离心 15 min,上清液稀释 100 倍为待测粗酶液。取 0.3 mL 酶液于试管中,加入 2 mL 底物乳状液(2.24×10^{-3} mol/L 亚油酸分散于含 0.5 μ L/mL 吐温-20 的 0.2 mol/L、pH 值 9.0 的硼酸缓冲液中)混匀后放入 30 $^{\circ}$ C 水浴中振荡并开始计时,反应 3 min 后迅速加入 5 mL 无水乙醇终止反应,然后加入 5 mL 蒸馏水混匀并测定反应液的吸光度(空白样中无水乙醇和底物的加入顺序相反)。以 1 min 内 3 mL 反应体系在 234 nm 的吸光度增加 0.001 作为一个酶活力单位^[6]。

1.3.4 脱脂豆粕的巯基含量测定方法

1) 方法一:取 75 mg 脱脂豆粕和 1 mL Tris-甘氨酸缓冲溶液混合,再加入 4.7 g 盐酸胍,摇匀再将体积补加到 10 mL,室温下搅拌 30 min,离心取豆粕上层液 1 mL 与尿素-盐酸胍溶液 4 mL 混合,再加入 0.05 mL Ellman's 试剂,在室温下反应 1 h,每 15 min 振摇一次,然后混合物 10 000 r/min 离心 30 min,以不加 Ellman's 试剂的为对照,取上清液

在 412 nm 波长下测定吸光度^[3]。

2) 方法二:取 40 mg 脱脂豆粕悬浮于 0.9 mL 尿素-SDS 混合液中,加入 0.1 mL Ellman's 试剂,振摇后室温下反应 1 h,每 15 min 振摇一次,离心(13 600 g 转速离心 15 min),取 0.1 mL 上清液用 1 mL 尿素-SDS 混合液来稀释,以未加 Ellman's 试剂的作对照,在 412 nm 波长下测定吸光度^[4]。

3) 方法三:取 75 mg 脱脂豆粕溶解于 10 mL 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 值 8.0),该磷酸盐缓冲液含有 1 mmol/L EDTA 和质量分数 1% SDS,在室温下搅拌 30 min。取 3 mL 脱脂豆粕溶液,加入 3 mL 磷酸盐缓冲液(同上),再加入 0.1 mL Ellman's 试剂,剧烈振摇后在 25 $^{\circ}$ C 条件下水浴 1 h,然后混合物以 10 000 g 速度离心 30 min。以不加 Ellman's 试剂的为对照,取上清液在 412 nm 波长下测定吸光度^[5]。

2 结果与讨论

在温度分别为 25~100 $^{\circ}$ C 条件处理下,测定脱脂豆粕的酶活力和可溶蛋白质的质量浓度(见表 1)。

表 1 不同温度处理脱脂豆粕的酶活力和可溶性蛋白质质量浓度

Tab. 1 Lipoxigenase activity of defatted soy flour dealt with different temperature and soluble protein content of 1,3 methods

加热 温度/ $^{\circ}$ C	酶活力/ (U/mg)	可溶性蛋白质质量浓度/(mg/mL)	
		方法一	方法三
25	3 528	4.27	4.11
60	3 280	4.21	4.05
70	2 528	4.25	4.10
80	2 160	4.18	3.88
90	1 302	3.84	3.74
100	33	3.60	3.62

由表 1 可知,随着加热温度的上升,脱脂豆粕中脂肪氧合酶的活力逐渐下降,在 70 $^{\circ}$ C 以后下降加快。脱脂豆粕中可溶性蛋白质质量浓度随着加热温度上升而逐渐减小,在 80 $^{\circ}$ C 以后减小明显。鄯全等人^[7]在研究干热灭酶温度对酶活及 NSI 的影响时,也得到相同的结论。这些变化与豆粕中蛋白质热变性有关。

应用方法一、二和三分别测定不同干热处理脱脂豆粕的巯基含量,每一种材料豆粕在每种方法中进行 3 次平行试验,试验数据见表 2。

由表 2 可知,3 种不同方法测得的脱脂豆粕巯基含量:方法一的最高;方法二的次之;方法三的最低。Beveridge(1974)等人^[3]利用方法一测得的面粉巯基含量比有关报道偏高,这是由于面粉混浊的溶液在测定时易产生一定的吸收。没加热的游离巯基含量比加热样品的高得多,这与 Ou 等人^[1]测得加热豆奶巯基含量变化一致。这种变化可能与蛋白质变性反应、分子内二硫键聚集和氧化反应有关^[5]。方法一和方法三测得的豆粕巯基含量随着加热温度的升高呈下降的趋势,这与加热引起蛋白质变性和脂质氧化反应引起蛋白质聚集导致的蛋白质溶解度降低有关。游离巯基变化除了与温度有关外,还受二硫键含量、pH 值、缓冲液、压力和添加的抑制剂等因素影响^[6]。

表 2 试验数据表
Tab. 2 Experimental data

处理 方法	温度/ ℃	巯基含量/(μmol/g)				和	均值
方法一	25	8.087	7.989	7.791	23.867	7.955	
	60	7.762	7.770	7.672	23.204	7.705	
	70	7.012	7.061	7.258	21.331	7.110	
	80	7.150	6.953	7.002	21.105	7.035	
	90	6.886	7.082	7.033	21.001	7.000	
	100	6.907	7.054	6.907	20.868	6.956	
方法二	25	7.032	6.971	6.910	20.913	6.971	
	60	4.400	4.500	4.379	13.279	4.426	
	70	5.722	5.662	5.783	17.167	5.722	
	80	5.764	5.724	5.744	17.232	5.744	
	90	6.247	6.308	6.369	18.924	6.308	
	100	6.540	6.519	6.519	19.578	6.526	
方法三	25	4.987	5.022	5.040	15.049	5.016	
	60	4.620	4.690	4.532	13.842	4.614	
	70	4.716	4.627	4.769	13.875	4.704	
	80	4.207	4.400	4.172	12.779	4.260	
	90	4.225	4.260	4.470	12.955	4.318	
	100	4.571	4.624	4.589	13.784	4.595	

食品原料经高温处理能引起游离巯基和二硫键含量发生变化,原因可能是二硫键的分解和再形成、半胱氨酸的降解和产生其它含硫化合物^[9]。Li 等人^[10]研究发现经高温(120℃)挤压后的小扁豆粉的巯基含量增加。Ou 等人^[1]在 95℃加热豆奶并测定其游离巯基含量,发现巯基含量随着加热时

间的延长是先减小后增大,这个结果与本实验方法二测得的加热豆粕的巯基含量结果相一致。大豆蛋白质主要是由球状蛋白质组成,球状蛋白质具有圆而紧密的三维结构和较强的内部疏水性,因而变性温度较高,达到 90℃以上^[11]。蛋白质变性伸展使内部巯基暴露;再者加热引起的热聚集体和酶促聚集体,可通过有机变性剂,如尿素、SDS、盐酸胍等,将其变性伸展开。在 60℃左右脂肪氧合酶有一个激活态,使豆粕中的酶激发出更高的活力^[7],所以其对巯基的氧化性增大。随着温度增加酶活力不断下降,酶催化氧化巯基的能力下降,所以豆粕的巯基含量增加。由以上可知,方法二测得的结果与理论分析相符。

对于不同脱脂豆粕巯基含量的测定,试验只考察了一个因子 A,方法一、方法二、方法三 3 种样品处理方法为因子 A 的 3 个水平,在每个水平下进行了 3 次重复试验,其方差分析结果见表 3。

表 3 方差分析表
Tab. 3 Variance analysis

温度/ ℃	来源	平方 和(S)	自由 度(f)	均方	F 比
25	因子 A	13.430	2	6.715	746.111
	误差 e	0.054	6	0.009	
	总计 T	13.484	8		
60	因子 A	20.719	2	10.359	2071.800
	误差 e	0.027	6	0.005	
	总计 T	20.746			
70	因子 A	9.307	2	4.654	465.400
	误差 e	0.058	6	0.010	
	总计 T	9.365	8		
80	因子 A	11.572	2	5.786	642.889
	误差 e	0.052	6	0.009	
	总计 T	11.624	8		
90	因子 A	11.631	2	5.815	528.636
	误差 e	0.063	6	0.011	
	总计 T	11.694	8		
100	因子 A	9.491	2	4.745	1581.667
	误差 e	0.016	6	0.003	
	总计 T	9.507	8		

如果给定显著性水平 $\alpha=0.05$,故 $1-\alpha=0.95$,查 F 分布表查得 $F_{0.95}(2,6)=5.143$ 。由于不同干热温度处理的豆粕的 F 值均明显大于 5.143,所以

在显著性水平 $\alpha=0.05$ 水平上因子 A 是显著的。这表明在显著性水平 $\alpha=0.05$ 水平上,方法一、方法二、方法三 3 种样品处理方法测得的不同干热温度处理的豆粕巯基含量存在显著差异。即 3 种样品处理方法测得的不同豆粕的巯基含量存在系统误差,方法一和方法三是不可取的。

3 结 语

利用 Ellman's 试剂与脱脂豆粕中的蛋白质巯

基反应生成 412 nm 处有最大吸收的有色化合物来测定巯基含量是可行的。方法二将脱脂豆粕、尿素-SDS 溶液和 Ellman's 试剂相混进行反应,可以避免尿素-SDS 等有机变性剂溶液溶解蛋白质过程中部分不溶解现象,使可溶性和不溶性蛋白质与 Ellman's 试剂都能发生反应。通过理论和实验数据分析得知,方法二适用于测定脱脂豆粕中的巯基含量。

参考文献(References):

- [1] Ou Shiyi, Kwok K C, Wang Youg, et al. An improved method to determine SH and - S-S- group content in soymilk protein[J]. *Food Chemistry*, 2004, 88: 317-320.
- [2] 钟立人. 食品科学与工艺原理[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [3] 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(9): 49-51.
- [4] Maforimbo E, Skurray G R, Nguyen M. Evaluation of L-ascorbic acid oxidation on SH concentration in soy-wheat composite dough during resting period[J]. *LWT*, 2007, 40: 338-343.
- [5] Huang Youru, Hua Yufei, Qiu Aiyong. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation[J]. *Food Research International*, 2006, 39: 240-249.
- [6] 钟芳, 王璋, 许时婴. 3 种脂肪氧合酶酶活测定方法[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20: 77-80, 91.
ZHONG Fang, WANG Zhang, XU Shi-ying. Comparison of three different methods for determination of lipoxygenase activity[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2001, 20: 77-80, 91. (in Chinese)
- [7] 鄢全, 王洪晶, 华欲飞. 脱脂豆粕中脂肪氧合酶的干热灭酶工艺研究[J]. 中国油脂, 2006(4): 13-16.
YAN Quan, WANG Hong-jing, HUA Yu-fei. Denaturation of lipoxygenase in defatted soybean meal by dry heating[J]. *Chinaoils*, 2006(4): 13-16. (in Chinese)
- [8] Ko Wen-Ching, YU Chi-Cheng, Hsu Kuo-Chiang. Changes in conformation and sulfhydryl groups of tilapia actomyosin by thermal treatment[J]. *LWT*, 2007, 40: 1316-1320.
- [9] Aslaksen M A. Evaluation of content and digestibility of disulfide bonds and free thiols in unextruded and extruded diets containing fish meal and soybean protein sources[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2006, 128: 320-330.
- [10] Li M, Lee T C. Effect of extrusion temperature on the solubility and molecular weight of lentil bean flour proteins containing low cysteine residues[J]. *Agric Food Chemistry*, 2000, 48: 880-884.
- [11] Tezuka M, Yagasaki K, Ono T. Changes in characters of soybean glycinin groups I, IIa, and IIb caused by heating[J]. *Agric Food Chemistry*, 2004, 52: 1693-1699.

(责任编辑: 杨 萌)