

文章编号: 1009-038X(2003)03-0012-06

# 凝固剂种类对大豆蛋白质组分 7S 和 11S 胶凝能力的影响

钟芳, 王璋, 许时婴  
(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

**摘要:**在分离纯化得到具有较高纯度大豆蛋白 7S 和 11S 组分的基础上,采用动态流变仪测定了不同凝固剂单独作用于 7S 和 11S 时的胶凝曲线.结果表明,在采用葡萄糖酸内酯(GDL)作为凝固剂时,在 GDL 质量浓度 0.5 g/dL,60 °C 条件下,11S 组分的胶凝速度明显高于 7S 组分,但反应后期两者形成的凝胶强度相当.转谷氨酰胺酶(TGS)更有利于 11S 的胶凝,在 TGS 作用下,11S 凝胶的强度约为 7S 凝胶的 3 倍.而以木瓜蛋白酶(papain)为凝固剂时,低酶用量条件下对胶凝起主要作用的是 11S 组分,而高酶用量条件下起主要作用的是 7S 组分,在各自适宜的 papain 用量条件下,11S 组分凝胶的强度高于 7S 组分.

**关键词:**大豆蛋白; 7S; 11S; 凝固剂; 凝胶

**中图分类号:** Q 51

**文献标识码:** A

## Gelation Ability of Soy 7S and 11S Proteins as Affected by Different Coagulants

ZHONG Fang, WANG Zhang, XU Shi-ying

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** Dynamic viscoelastic study on gelation of soy 7 S and 11 S proteins by different coagulants were tested to compare the relative gelation capacities of the two major soy protein components. The results suggested that when glucono- $\delta$ -lactone (GDL) was used as coagulant at 0.5 g/dL usage level and 60 °C, gelation speed of 11S was obviously higher than that of 7S, but the gel strength of each were about equal at the later stage; transglutaminase(TGS) was more effective in gelating 11S, storage modules( $G'$ ) of the 11S gel formed by the action of TGS was about two times higher than that of 7S gel; higher papain concentration was propitious to coagulate 11S and the reverse was true at lower papain concentration, the strength of 11S gel was higher than that of the 7S gel when they were treated at each individual suitable papain usage levels.

**Key words:** soy protein; 7S; 11S; coagulant; gelation

随着美国 FDA 宣布大豆能减少冠心病危险以来,大豆作为健康食品在全球范围内受到越来越多

的关注<sup>[1]</sup>.目前,对于大豆蛋白的功能性质以及生理活性,研究人员已进行了深入细致的研究.在此

收稿日期: 2002-09-30; 修回日期: 2002-12-12.

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK200269)资助课题 国家自然科学基金项目(20206011)资助课题.

作者简介: 钟芳(1972-),女,河南新乡人,副教授,工学博士.

万方数据

基础上,采用基因改性的方法来改变大豆组成以改善其加工及功能性质的研究也成为新的研究热点,其中包括改变大豆蛋白的两个主要组分 7S 和 11S 的比例<sup>[2]</sup>。

在改变大豆蛋白中两主要组分的比例时,多数研究者倾向于减少 7S 的含量,因为研究表明 7S 是大豆蛋白的主要过敏源<sup>[2]</sup>。但由于 7S 和 11S 组分在胶凝、乳化等功能性质方面存在差异,因此两组分比例的改变必然会对大豆蛋白的功能性质产生影响。

很多学者对 7S 和 11S 组分的胶凝性质进行比较。Utsumi 和 Kinsella 在比较 7S 和 11S 的热胶凝能力时发现,经 80 °C、30 min 预热处理后,7S 凝胶的强度明显高于 11S 凝胶<sup>[3]</sup>;Saio 等人的研究则证实,在采用硫酸钙为凝固剂时,11S 形成的凝胶强于 7S 凝胶<sup>[4]</sup>。而关于采用 GDL 作为凝固剂时的情况,各学者报道结果不一,M. P. Ji<sup>[5]</sup>等人认为 7S/11S 的比例不会影响大豆蛋白的凝胶强度,而 Hashizume 等人的研究却表明,11S 凝胶强于 7S 凝胶<sup>[6]</sup>。从这些研究报道不难看出,凝固剂种类是影响 7S 和 11S 的相对胶凝能力的重要因素。因此,作者在分离出较高纯度 7S 和 11S 组分的基础上,测定在不同凝固剂作用下两组分单独凝固时的动态胶凝特性,比较两组分的胶凝能力,并推测在特定凝固剂作用下改变大豆蛋白组成对其胶凝能力可能产生的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

大豆:市售东北大豆;GDL(D-葡萄糖酸- $\delta$ -内酯)常州瀚兴化工有限公司产品;木瓜蛋白酶(papain)商品酶制剂;转谷氨酰胺酶(TGS):日本味之素公司;其它试剂均为分析纯。流变仪(AR1000 Rheometer)英国 TA Instrument;电泳仪:BS432 型稳流稳压电泳仪,电泳槽:垂直板电泳槽。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 大豆蛋白主要组分 7S 和 11S 的粗分离和部分纯化

1) 脱脂豆粕 整粒大豆筛选→粉碎→石油醚脱脂→脱脂豆粕

2) 7S 和 11S 组分的粗分 见文献[7]。

3) 7S 和 11S 组分的纯化 见文献[8]。

1.2.2 部分纯化的 7S 和 11S 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE) 采用不连续电泳凝胶。分离胶:10 g/dL,浓缩胶:3 g/dL;电泳条件:恒流 10 mA 制胶方法参见文献[9,10]。所采用的相对分子

质量标准蛋白(pharmacia 公司产品)为:牛血清蛋白(相对分子质量 67 000)、鸡蛋白蛋白(相对分子质量 43 000)、碳酸酐酶(相对分子质量 30 000)、胰蛋白酶抑制剂(相对分子质量 20 100)和  $\alpha$ -乳清蛋白(相对分子质量 14 400)。

1.2.3 7S 和 11S 蛋白的预热处理 取冷冻干燥得到的 7S 和 11S 样品溶于水中配成 8 g/dL 的溶液,调节其 pH 至 7.0,在 90 °C 水浴中保温 30 min。

1.2.4 GDL 作为凝固剂时 7S 和 11S 样品胶凝性质 取 1 mL 已经热处理的 7S(或 11S)溶液(8 g/dL)加入 0.5 mL 新鲜配制的 1.5 g/dL 的葡萄糖酸内酯(GDL)溶液搅拌均匀后迅速加入平台上,随即降下流变测定夹具并开始测量。测定时参数设定:夹具:40 mm 平行板(使用油封和溶剂盖);样品间隙:1 000  $\mu$ m;震荡时间扫描参数:恒温 55 °C;频率:1 Hz;应力 0.5 Pa。

1.2.5 papain 作为凝固剂时 7S 和 11S 样品胶凝性质 取 1 mL 已经热处理的 7S(或 11S)溶液(8 g/dL)加入 0.5 mL 新鲜配制的木瓜蛋白酶(papain)溶液,搅拌均匀后迅速加入平台上(混合液中 papain 的质量浓度分别为 0.33 g/dL,0.167 g/dL),随即降下流变测定夹具并开始测量。测定时参数设定:夹具:40 mm 平行板(使用油封和溶剂盖);样品间隙:1 000  $\mu$ m;震荡时间扫描参数:恒温 40 °C;频率:1 Hz;应力 0.5 Pa。

1.2.6 TGS 作为凝固剂时 7S 和 11S 样品胶凝性质 取 1 mL 已经热处理的 7S(或 11S)溶液(8 g/dL)加入 0.5 mL 新鲜配制的 TGS 溶液,搅拌均匀后迅速加入平台上(混合液中 TGS 的量为 4 U/g 蛋白质),随即降下流变测定夹具并开始测量。测定时参数设定:夹具:40 mm 平行板(使用油封和溶剂盖);样品间隙:1 000  $\mu$ m;震荡时间扫描参数:恒温 35 °C;频率:1 Hz;应力 0.5 Pa。

## 2 结果与讨论

### 2.1 7S 和 11S 的分离纯化和纯度鉴定

采用 Thanh V. H. 等人建立的 7S 和 11S 粗分离工艺<sup>[7]</sup>以及由 Setsuko I. 等人建立的 7S 和 11S 纯化工艺来制备具有一定纯度的 7S 蛋白和 11S 蛋白<sup>[8]</sup>。Thanh V. H. 等人建立的 7S 和 11S 粗分离工艺是以 11S 具有在 pH 6.4 条件下冷沉的性质为依据的,而 Setsuko I. 等人建立的 7S 和 11S 纯化工艺则以硫酸铵分级沉淀为主要手段。纯化得到的 7S 和 11S 组分的纯度可用 SDS-PAGE(SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)进行检测。

标准蛋白质、7S 和 11S 组分的 SDS-PAGE 图谱见图 1.7S 组分中最主要的成分是  $\beta$ -伴球蛋白( $\beta$ -conglycinin),它由  $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  4 种亚基组成.根据蛋白质相对分子质量与相对迁移率的关系计算,图 1 中 7S 组分的电泳图谱中 4 条主要的蛋白带所对应的亚基相对分子质量,从上至下依次为 81 000,72 000,51 000 和 46 000,这与文献报道的 7S 球蛋白的 4 种亚基的相对分子质量基本吻合<sup>[11,12]</sup>.11S 组分中最主要的成分是大豆球蛋白(glycinin),每个大豆球蛋白分子由 12 条多肽链、6 个酸性亚基和 6 个碱性亚基两两结合形成 6 个亚单位.图 1 中 11S 组分的电泳图谱中 4 条主要的蛋白带所对应的亚基相对分子质量,从上至下依次为 41 000,37 500,19 600 和 16 000,分别与文献报道的酸性亚基相对分子质量(41 000 和 37 500)和碱性亚基相对分子质量(19 600 和 16 000)相吻合<sup>[11,12]</sup>.从制备的 7S 和 11S 组分的 SDS-PAGE 图谱中可以看出,还能发现存在少量的杂带,但可以认为它们已具有相当高的纯度,可作为纯化的组分用于实验.

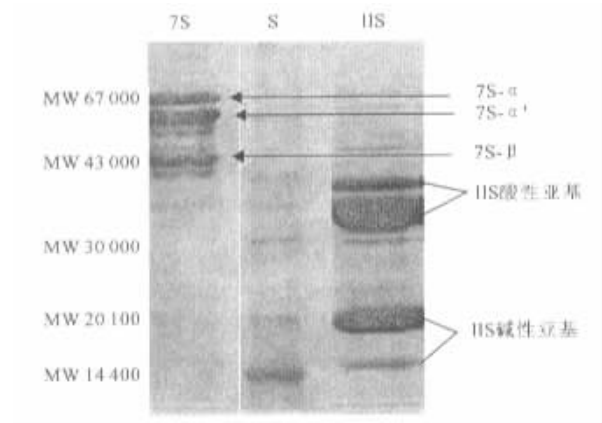


图 1 标准蛋白,7S 和 11S 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE of standard 7S and 11S protein(s)

2.2 GDL 作为凝固剂时 7S 和 11S 的胶凝特性

葡萄糖酸内酯(GDL)是目前最为常见的豆腐凝固剂,它在高温和碱性条件下可分解为葡萄糖酸.由于大豆蛋白质的等电点在 pH 4.5 左右,因而在中性条件下,浆料中的大豆蛋白分子表现为带负电荷,酸凝固剂在水中释放的质子( $H^+$ )会使得变性大豆蛋白质表面带负电荷的基团减少,蛋白质分子之间的静电斥力减弱,有利于蛋白质分子的凝结.从图 2 和图 3 所示 7S 和 11S 组分在 GDL 作用下单独胶凝时的流变学曲线可以看出,在相同蛋白质质量浓度(5.33 g/dL)和相同温度(55  $^{\circ}C$ )条件下,GDL 质量浓度 0.5 g/dL,7S 组分的胶凝速度明显低于 11S 组分.7S 组分的胶凝存在一个诱导期,当反应时间

至 750 s 后才开始出现显著胶凝,储能模量( $G'$ )的增大与反应时间之间基本符合一级动力学关系.11S-GDL 体系的  $G'$  在 GDL 作用初期就随反应时间的延长呈线性上升,至 400 s 左右上升趋于平缓,此后  $G'$  随反应时间的延长没有显著变化,处于平衡期.两组分胶凝过程动态变化趋势的显著差异分析应该与其不同的等电点有关,7S 的等电点为 4.4,而 11S 的等电点为 5.8 左右<sup>[8]</sup>.因此,在 GDL 作用下,中性的蛋白质溶液首先接近 11S 的等电点使其出现明显的胶凝.虽然两组分的胶凝动力学不同,但比较图 2 和图 3 可以看出,反应后期 7S-GDL 体系的  $G'$  数值与 11S-GDL 体系的  $G'$  相当,且其  $G'$  曲线仍处于上升期.也就是说,在采用 GDL 作为凝固剂时,GDL 添加量,体系 pH 的下降程度是影响 7S 和 11S 组分对凝胶贡献大小的主要因素,随着 GDL 添加量的增大,起主要作用的组分将由 11S 转变为 7S.

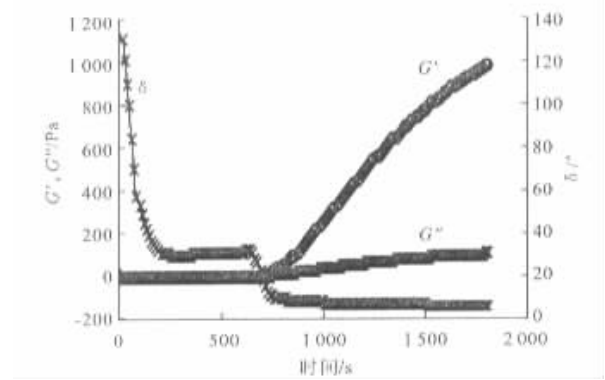


图 2 7S - GDL 体系的胶凝特性曲线

Fig.2 Gelation profiles of 7S-GDL system

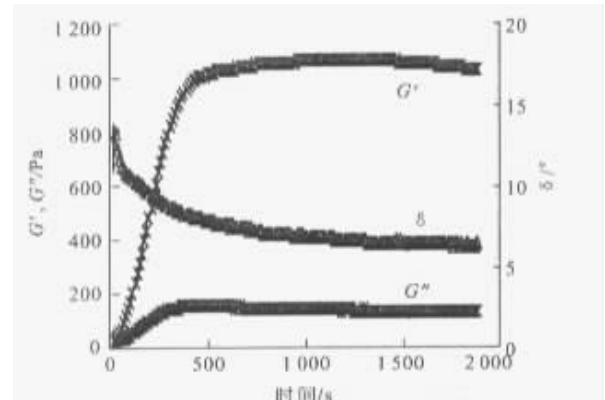


图 3 11S-GDL 体系的胶凝特性曲线

Fig.3 Gelation profiles of 11S-GDL system

2.3 转谷氨酰胺酶(TGS)作为凝固剂时 7S 和 11S 的胶凝特性

转谷氨酰胺酶(EC 2.3.2.13)是一种氨基转移酶,它催化肽链中谷氨酸残基的  $\gamma$ -羧基酰胺和各种

伯胺的转氨基反应.当肽链上的赖氨酸残基上的 $\epsilon$ -氨基作为酰基受体时就会形成分子间的 $\epsilon$ -( $\gamma$ -谷氨酸)赖氨酸交联<sup>[13]</sup>.大豆蛋白是该酶的良好底物,Masahiko等人的研究表明,转谷氨酰胺酶有使豆乳胶凝的能力<sup>[13]</sup>.

转谷氨酰胺酶胶凝7S和11S的胶凝曲线分别如图4和图5所示.从两图中 $G'$ 和 $G''$ 曲线来看,7S和11S在TGS作用下的胶凝都呈现两段式,起初 $G'$ 和 $G''$ 都随反应时间的延长而上升,至2000s左右出现转折,此后 $G'$ 的上升速度减慢而 $G''$ 开始下降.这种变化趋势可以转谷氨酰胺酶胶凝大豆蛋白的机理方面得到部分的解释.根据酶反应的一般规律,酶反应初期,大豆蛋白中可参与共价交联的氨基酸残基数量较多,因而反应速度快.肽链间通过共价交联发展网络结构的速度也较快,在交联还没有足以形成强的凝胶之前,就导致 $G'$ 和 $G''$ 的同时上升.反应后期,随着凝胶网络结构的形成,体系的流动性下降, $G''$ 下降,同时随着酶反应速度减慢, $G'$ 的上升也逐渐放缓.另比较图4和图5中 $G'$ 和 $G''$ 的绝对数值可以发现,在采用TGS作为凝固剂时,11S组分的胶凝能力远远高于7S组分,两者所形成的凝胶强度相差约3倍.

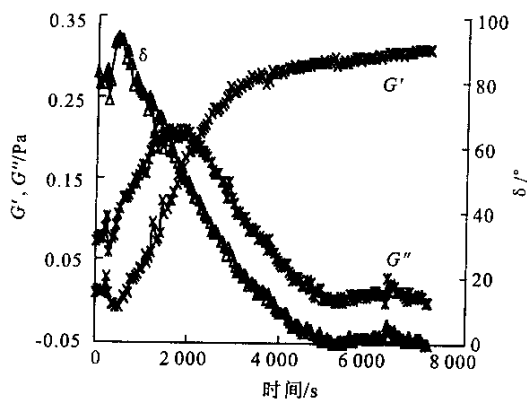


图4 7S-TGS体系的胶凝特性曲线

Fig.4 Gelation profiles of 7S-TGS system

## 2.4 木瓜蛋白酶作为凝固剂时7S和11S的胶凝特性

早在20世纪70年代,日本学者Utaka和Fukazawa就在研究中发现无花果蛋白酶(ficin)有使大豆蛋白胶凝的能力<sup>[14]</sup>.此后,1980年,日本学者Fuka和Matsuoka也报道菠萝蛋白酶(bromelain)可促使大豆蛋白凝固<sup>[15,16]</sup>.1987年,Katsumi首次报道了某些商品微生物蛋白酶制剂具有使大豆蛋白胶凝的功效<sup>[17]</sup>.作者在前期研究中定量比较了6种商品酶制剂胶凝大豆分离蛋白(SPI)能力,其中papain诱发SPI形成的凝胶强度最高<sup>[18]</sup>.因此,以papain为

代表讨论以蛋白酶作为凝固剂时7S与11S胶凝能力的相对大小.

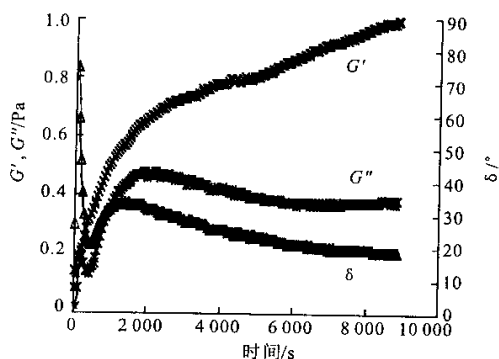


图5 11S-TGS体系的胶凝特性曲线

Fig.5 Gelation profiles of 11S-TGS system

蛋白酶胶凝大豆蛋白时需控制水解度在一定的范围内,否则酶反应程度过高反而会导致胶凝能力的下降甚至不能形成凝胶<sup>[18]</sup>.图6是7S-papain体系的胶凝特性曲线,从图6a可以看出,当papain的添加量为0.133 g/dL时,在实验设定的反应条件下就足以导致7S组分的过度水解而使得反应后期体系的 $G'$ 下降.降低papain添加量至0.067 g/dL,在反应过程中,体系的 $G'$ 持续上升,至2000s时 $G'$ 达到400 Pa左右.图7所示为11S-papain体系的胶凝曲线.实验首先在适宜于7S的papain质量浓度条件下进行,从图7a可以看出,11S组分在papain的作用下不仅没有形成凝胶,反而使体系的 $G'$ 值随反应的进行持续下降,损耗角持续上升.这一结果的产生有两种可能的原因:一是papain的作用不能使11S组分胶凝;二是所采用的papain活力过高.降低papain的质量浓度至0.033 g/dL,从图7b可以看出,此时 $G'$ 和 $G''$ 的变化趋势与图6a中的相应曲线类似,可见,papain具有使11S组分胶凝的能力,但胶凝所需的papain活力远远低于作用于7S组分时的情况.进一步降低papain质量浓度至0.0167 g/dL,如图7c所示,在实验条件下,体系的 $G'$ 持续上升,且 $G'$ 的绝对数值远远高于7S-papain(0.067 g/dL)体系.也就是说,在各自适宜的酶用量条件下,papain诱发11S形成的凝胶强度高于其诱发7S组分形成的凝胶,且适宜于11S的papain用量是7S的1/4.

通过以上的讨论可以得到这样的结论:在采用papain作为大豆蛋白凝固剂时,在一定范围内,低酶用量条件下对胶凝起主要作用的是11S组分,而高酶用量条件下起主要作用的是7S组分.无论从经济的角度还是从得到高凝胶强度的角度,papain都更适合于用作11S组分含量高的大豆蛋白的凝固剂.

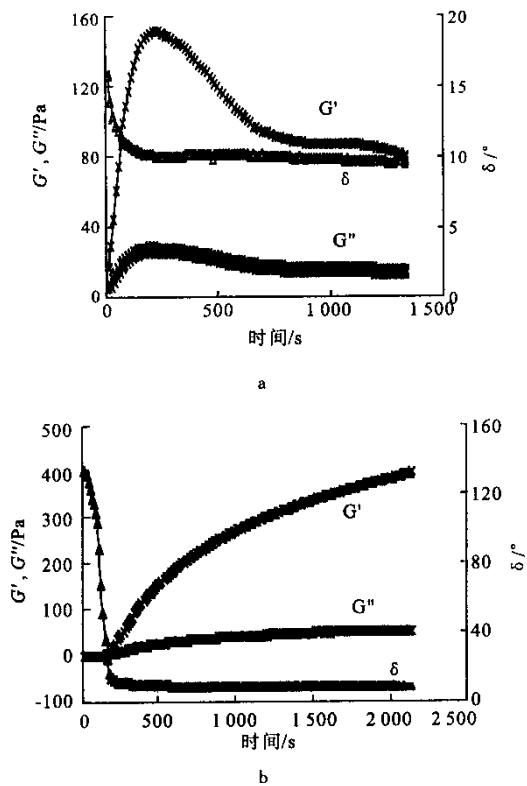


图 6 7S - Papain 体系的胶凝特性曲线 (图 a. papain 0.133 g/dL 图 b. papain 0.067 g/dL)

Fig.6 Gelation profiles of 7S-papain system (a. papain 0.133 g/dL ; b. papain 0.067 g/dL)

3 结 论

大豆蛋白 7S 组分和 11S 组分单独胶凝时的相对凝胶强弱不仅受凝固剂种类的影响,而且对于同一种凝固剂而言,改变凝固剂用量也会导致起主要作用的组分类型发生变化.以 GDL 作为凝固剂时,随着 GDL 添加量的增大,起主要作用的组分将由 11S 转变为 7S 在 TGS 作用下作为凝固剂时,11S 组分的胶凝所形成的凝胶强度约为 7S 组分凝胶的

3 倍 而以 papain 为凝固剂时,低酶用量条件下对胶凝起主要作用的是 11S 组分,而高酶用量条下起主要作用的是 7S 组分.

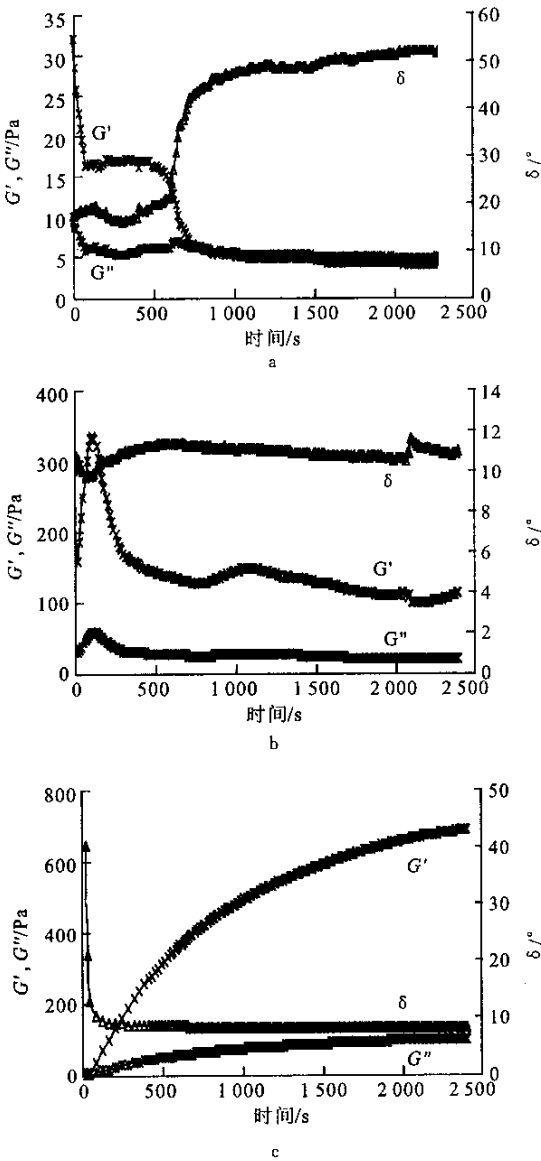


图 7 11S - Papain 体系的胶凝特性曲线 (图 a. papain 0.067 g/dL 图 b. papain 0.033 g/dL 图 c. papain 0.0167 g/dL)

Fig.7 Gelation profiles of 11S-papain system (a. papain 0.067 g/dL ; b. papain 0.033 g/dL ; c. papain 0.0167 g/dL)

参考文献：

[ 1 ] Pszczola D E. Soy : why it 's moving into the mainstream[J] . **Food Tech**,2000, 54(9) :76 – 86.

[ 2 ] Fukushima D. Review :Recent progress in research and technology on soybeans[J] . **Food Sci Technol Res**, 2001,7(1) :8 – 16.

[ 3 ] Utsumi S, Kinsella J E. Force involve in soy protein gelation : effect of various reagents on the formation, hardness and solubility oh heat-induced gels made from 7S, 11S and soy isolate[J] . **J Food Sci**,1985, 50 :1278 – 1282.

[ 4 ] Saio K, Kamiya M. Food processing characteristics of soybean 11S and 7S proteins[J] . **Agric Biol Chem**,1969, 33, 1301 – 1308.

[ 5 ] Ji M P, Cai T D, Chang K C. Tofu yield and textural properties from three soybean cultivars as affected by ratio of 7S and 11S proteins [J] . **J Food Sci**,1999, 64 :763 – 767.

[ 6 ] Hashizume K, Nakamura N, Watanabe T. Influence of ionic strength on conformation changes of soybean proteina caused by heating, and relationship of its conformation changes to gel formation[J] , **Agric Biol Chem**,1975, 39 :1339 – 1347.

[ 7 ] Thanh V H, Shibasaki K. Major protein of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization[J] . **J Agric Food Chem**,1976,24 :1117 – 1121.

[ 8 ] Iwabuchi S, Yamauchi F. Determination of glycinin and  $\beta$ -congiycinin in soybean proteins by immunological methods[J] . **J Agric Food Chem**, 1987,35 :200 – 205.

[ 9 ] 李建武, 萧能庚, 余瑞元,等. 生物化学实验原理和方法 [M] .北京 北京大学出版社,1997.

[10] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M] .北京 科学出版社, 1999.

[11] Abtahi S, Aminlari M. Effect of sodium sulfite, sodium bisulfite, cysteine, and pH on protein solubility and SDS-PAGE of soybean milk base[J] . **J Agric Food Chem**, 1997,45 :4768 – 4772.

[12] Lillford P T, Wright D J. Influence of isoelectric precipitation on the solubility of soya bean proteins[J] . **J Sci Food Agric**,1981, 32 :315 – 327.

[13] Nonaka M, Sakamoto H, Toiguchi S. Retort-resistant Tofu prepared by incubation with microbial transglutaminase[J] . **Food Hydrocol- loids**, 1996,10 :41 – 44.

[14] Utaka K, Fukazawa C. Gelation mechanism of soybean proteins treated by ficin [A] . Repot of the 39th Daizu Shokushi Kaihatus Kenkyukai [C] .Toyko Saiensu-sha Co.Ltd,1976.

[15] Fuke Y, Masakatsu S, mtsuoka H. Coagulation of soy milk by proteolytic enzyme treatment[J] . **J Jap Soc Food Sci Technol**,1980, 27 :275.

[16] Fuke Y, Masakatsu S, mtsuoka H. Nature of stem bromelain treatments on the aggregation and gelation of soybean proteins[J] . **J Food Sci**, 1985,50 :1283 – 1288.

[17] Murata K, Kusakabe I, Kobayashi H. Studies on the coagulation of soymilk-protein by commercial proteinase[J] . **Agric Biol Chem**, 1987, 51 :385.

[18] 钟芳,王璋,许时婴.大豆蛋白的酶促速凝[J] .无锡轻工大学学报,2002,21(6) :559 – 563.

(责任编辑 杨 萌)