

# 豆奶蛋白组分和胰蛋白酶抑制剂活性的热变化

黄惠华<sup>1</sup>, 郭乾初<sup>2</sup>, 梁汉华<sup>2</sup>, 高孔荣<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>华南理工大学食品工程系, 广东广州 510641; <sup>2</sup>香港理工大学, 香港)

**【摘要】目的:** 研究热处理对豆奶蛋白组分、巯基含量及胰蛋白酶抑制剂活性的影响。 **方法:** 以 95℃、120℃、140℃处理鲜豆奶,用 SDS-PAGE(十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺薄板凝胶电泳)分析经热处理和β-巯基乙醇处理后豆奶蛋白组分的变化;研究豆奶胰蛋白酶抑制剂活性的热变化;用 Ellman 试剂法测定巯基含量。 **结果:** 鲜豆奶中 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16号蛋白组分经热处理后逐步消失,出现分子量为 104 620的 17号蛋白质新组分,β-巯基乙醇处理证明此蛋白组分的出现与 12, 13, 14, 15, 16号蛋白组分的消失具有相关性,这些组分的次级结构主要靠二硫键结合;热处理使豆奶巯基含量急剧下降;热处理失活 90%的胰蛋白酶抑制剂,95℃处理需要 35 min, 120℃需 7 min,而 140℃只需 60 s左右。 **结论:** 热处理导致豆奶蛋白巯基的变化而引起蛋白组分的变化;胰蛋白酶抑制剂的热致死时间曲线表明,在 95~ 140℃范围内,温度增加 30℃,钝化 90%胰蛋白酶抑制剂的热处理时间缩短为原来的 1/10

**关键词:** 豆奶; 热处理; 电泳; 胰蛋白酶抑制剂; 巯基

**中图分类号:** R151.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0512-7955(2001)02-0140-06

加热是豆奶加工过程中重要的工艺参数,它除影响灭菌效果外,还影响大豆蛋白的营养价值与功能特性、抗营养因子的钝化以及产品的色泽、香气

大豆蛋白主要是沉降系数为 7S与 11S的球蛋白,这些蛋白质由多种可以互相聚合与解聚的亚基所组成。亚基间的聚合与解聚,直接影响到大豆蛋白的功能及豆奶产品的特性。胰蛋白酶抑制剂是大豆中主要的抗营养因子,其存在会导致许多动物的生长抑制作用<sup>[1]</sup>。通过物理方法例如加热和超声波处理可以失活胰蛋白酶抑制剂<sup>[2~4]</sup>;化学方法主要是对胰蛋白酶抑制剂活性中心的某些基团进行化学修饰、还原、封闭及酶解等<sup>[5~8]</sup>。从豆奶加工的角度看,加热是钝化胰蛋白酶抑制剂的最佳技术措施。因为加热,还可以灭菌。但加热会影响豆奶中蛋白质的聚合状态,从而影响大豆蛋白和豆奶产品的理化性质。

本研究以 95℃、120℃、140℃三种温度处理大豆的磨浆液,对其蛋白质进行 SDS-PAGE分析,同时对过程中的胰蛋白酶抑制剂活性变化进行研究

## 1 材料与 方法

### 1.1 大豆磨浆液的制备

按豆奶加工工艺进行。市售大豆,按 1:10的比例加水,于 5℃冰箱内浸泡过夜,然后打浆 5 min得到的混合浆,用尼龙袋过滤两次,弃去滤渣,即为鲜豆奶,固形物含量 6.7%。

### 1.2 鲜豆奶的热处理

在一个特制的螺旋状不锈钢毛细管中进行。管的内径 2 mm,壁厚 0.56 mm,可以装进 22 ml的物料。管两端安装有螺旋阀门。装好物料后,关上两端阀门,于 Tempunite Tu-16A型水(油)浴锅中,浸没于已预热至预定温度的传热介质中(95℃热处理的传热介质为水,120℃和 140℃热处理的为聚乙二醇 400)。开始的 10 s内连续来回摇动以迅速升温,用 T型热电偶插入毛细管进行的预试验测定表明,使管内物料达到预定温度(95~ 140℃)时所需的时

收稿日期: 2000-2-22

基金项目: 广东省自然科学基金项目(000454),香港理工大学资助项目(G.12.37.YB40)

作者简介: 黄惠华(1959-),男,工学博士,副教授

间为 6 s 左右 因此加热计时从毛细管浸没于传热介质 6 s 后开始 达到预定时间后 立即将毛细管移至冷水中冷却 冷却后于冰箱中 5℃ 左右存放。

### 1.3 SDS-PAGE

电泳仪为 Bio-Rad POWER PAC 300 型 (Bio-Rad 公司产品) 分离胶浓度为 7.5%, 交联度为 2.45%, 浓缩胶浓度为 2.5%, 交联度为 2.5%。样品预处理液为 pH 8.3, 0.1 mol/L 的 Tris 甘氨酸缓冲液 (内含 1.5% SDS, 10% 甘油及 0.02% 溴酚蓝), 预处理时按豆奶样品: 预处理液 = 1: 10 的比例混合, 于 95℃ 加热 3 min, 冷却后点样电泳 为了确定大豆蛋白中巯基的作用, 在预处理液中加入 10% β-巯基乙醇进行豆奶样品的另一种预处理 电泳的点样量为 30 μL, 稳压 150 V 用考马斯亮蓝 G-250 染色 以标准蛋白作同样的预处理和电泳, 根据其分子量与迁移率的关系, 作标准曲线, 通过标准曲线确定样品蛋白组分的分子量 标准蛋白购自上海丽珠东风生物技术有限公司, 其组成与分子量为: 碳酸酐酶, 分子量 (Mr): 31 000; 兔肌动蛋白, Mr: 43 000; 牛血清白蛋白, Mr: 66 200; 兔肌磷酸化酶, Mr: 97 400

### 1.4 胰蛋白酶活性和胰蛋白酶抑制剂活性的测定

胰蛋白酶活性的定义为在规定的实验条件下, 每 10 ml 反应混合液在 410 nm 处所增加 0.01 个吸光度, 用 TU 表示 每抑制一个胰蛋白酶活性单位, 定义为一个单位的胰蛋白酶抑制剂活性, 用 TIA 表示 胰蛋白酶和胰蛋白酶抑制剂活性的测定参照 Smith<sup>[9]</sup> 和美国化学会 (AACC) 推荐的方法进行 胰蛋白酶 (EC 3.4.21.4) 为猪胰脏胰蛋白酶, Sigma 公司产品 底物为 BAPNA (N-α-Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide-Hydrochloride, 苯甲酰-DL-精氨酸-p-硝基酰替苯胺盐酸盐, Acros Organics 公司产品) 胰蛋白酶用 0.001 mol/L 的 HCl 配制成 20 g/ml 的溶液 BAPNA 用适量二甲基亚砷溶解后, 用 pH 8.2, 0.05 mol/L 的 Tris 缓冲液配制成 0.4 mg/ml 的溶液 加样量试验表明, 测定系统中无鲜豆奶样品存在时, 胰蛋白酶的活性是 1 590 TU/mg, 此时抑制率为零; 加入不同的鲜豆奶样品, 胰蛋白酶活性下降 当鲜豆奶加样量达到 20 μl 时, 反应混合液中测不出 410 nm 处的吸光度, 胰蛋白酶的活性残留率趋向于零, 也就是胰蛋白酶活性的抑制率为 100% (通过计算得到鲜豆奶中胰蛋白酶抑制

剂的活性为 3 180 TIA/ml) 豆奶热处理后, 样品中胰蛋白酶抑制剂的残留活性, 残留率及对胰蛋白酶活性的抑制率介于上述的范围中 因此, 热处理后的样品加样量为 20 μl 测定程序如下:

测定中所用溶液均预热至 37℃ 吸 2 ml 胰蛋白酶溶液于具塞试管中, 加入 20 μl 热处理的豆奶样品、1.98 ml Tris 缓冲液及 5 ml BANPA 溶液, 于 Tempunite Tu-16A 型水 (油) 浴锅中用 37℃ 保温反应 10 min, 中间摇动 3 次, 加入 1 ml 30% 的乙酸溶液终止反应, 反应混合液用定量滤纸过滤, 用 1 cm 比色杯在 HITACHI U2000UV/VIS 分光光度计上测定其 410nm 的吸光度 空白为把乙酸溶液与 BAPNA 溶液的加入顺序对换, 即胰蛋白酶先与乙酸混合失活, BAPNA 溶液最后加入, 其它过程不变 通过样品测定的吸光率与空白读数相减, 所得值与样品加入量为零时的吸光率的差值, 即可算出样品中残留的胰蛋白酶抑制剂活性 测定重复 3 次。

### 1.5 豆奶蛋白质巯基的定量测定

采用 Beveridge 测定法<sup>[10]</sup> 将 0.2 ml 的鲜豆奶样品, 加入到 9.7 ml 的磷酸缓冲液 (pH 8.0, 0.1 mol/L 含 EDTA 1.2g/L, SDS 6g/L, 加入 0.1 ml 的 Ellman 试剂〔5, 5-二硫双 (2-硝基苯甲酸), Sigma 产品〕溶解于 pH 8.0, 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液中, 4 mg/ml) 显色 5 min 后, 用 2 号定量滤纸过滤, 用 1 cm 比色杯在 HITACHI U2000UV/VIS 分光光度计上测定其 412 nm 的吸光度 空白为 0.2 ml 样品, 加入到 9.8 ml 的磷酸缓冲液中, 不加 Ellman 试剂 得到样品的吸光值后, 以巯基转换成硫代硝基苯甲酸阴离子时的吸光系数  $\epsilon = 13\ 600 / (\text{mole} \cdot \text{cm})$  换算豆奶中的巯基含量 (mol/L) 测定时重复 3 次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 热处理对大豆蛋白电泳图谱的影响

经 95℃、120℃、140℃ 三种温度不同时间处理后所获得的豆奶蛋白的 SDS-PAGE 图谱表明, 其变化趋向基本上是一致的 (图 1) 从图 1 可见, 未受热处理的鲜豆奶有 16 个蛋白质组分, 而热处理后的样品均多出 1 个蛋白组分 (17 号带) 根据图中 17 种蛋白组分在电泳图谱中的位置, 通过分子量标准曲线确定其分子量分别是: 1 号带, 22 840; (2, 3) 号区带, 26 020; 4 号带, 30 080; 5 号带, 32 820; (6, 7) 号区带, 36 850; 8 号带, 46 500; 9 号带, 51 430; 10

号带, 56 920; 11号带, 65 790; 12号带, 70 740; 13号带, 76 060; (14, 15, 16)号区带, 90 500; 17号带, 104 620 从图 1中可以看到, 因受热处理影响而在不同时间里逐渐消失的蛋白组分有: 7, 11, 8, 12, 13号带和不易分开的 (14, 15, 16)号区带。7, 11号带是对热最敏感的组分, 一经热处理, 都会消失; 其次是12, 和 13号带, 用 95℃处理 8 min 120℃处理 5 min 140℃处理 15 s后消失; 分子量为 90 500左右的一组蛋白组分(含有不易分开的 14, 15, 16号带), 经 95℃热处理 30 min 120℃处理 8 min 140℃处理 40 s后逐渐消失; 95℃的热处理对 8号带基本无影响, 但是此蛋白组分经 120℃处理 1 min 140℃处理 12 s后逐渐消失

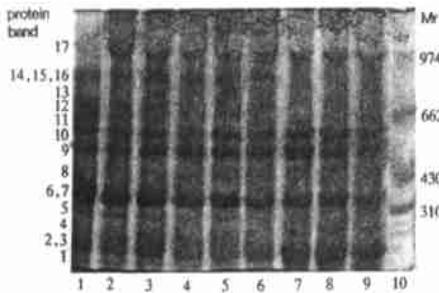


Fig. 1 SDS-PAGE of soymilk protein by varying thermal processing duration at 95℃.

lane 1 0 min; lane 2 1 min; lane 3 3 min; lane 4 8 min; lane 5 13 min; lane 6 20 min; lane 7 30 min; lane 8 60 min; lane 9 90 min; lane 10 protein standards

这些变化说明加热会引起大豆蛋白之间的聚合。大豆蛋白的聚合, 通常是亚基间以次级键的结合形式进行, 尤其是二硫键。17号带的出现与 7, 8, 11, 12, 13, (14, 15, 16)号带的消失, 是否存在相关性? 图 2为 95℃热处理并加β-巯基乙醇处理后的样品的 SDS-PAGE图谱。由于β-巯基乙醇的作用是打开蛋白质的二硫键 (HS-SH → -SH -SH) 而使其解聚, 因此图 2的 SDS-PAGE图谱与图 1明显不同。最明显的是, 因为热处理而出现的 17号带消失了。证明 17号带的亚基主要是以二硫键形式聚合的。在未经热处理的样品中(图 2中的 1号样品), 对热敏感的 12, 13, 14, 15, 16号带也因为β-巯基乙醇的解聚作用而消失, 而 11号带和 7, 8号带则表现出对β-巯基乙醇的稳定性。这也证明了 12, 13, 14, 15, 16号蛋白质的次级结构中主要也是靠二硫键结合。因此推断, 热处理后出现的 17号带, 很可能是由于 12, 13, 14, 15, 16号带以二硫键的形式聚合而成的。

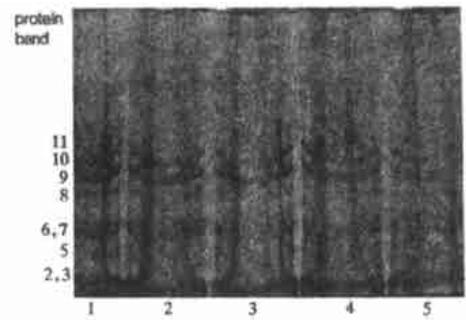


Fig. 2 SDS-PAGE patterns of soymilk protein by varying thermal processing duration at 95℃ with mercaptoethanol treatment

lane 1: 0 min; lane 2 30 min; lane 3 60 min; lane 4 90 min; lane 5 120 min

## 2.2 热处理过程中鲜豆奶的巯基含量变化

大豆蛋白中, 二硫键 (-S-S-) 是维持其二、三、四级结构的重要的次级键。二硫键的变化直接影响大豆蛋白的理化性质与功能特性。例如, 在二硫键裂开时, 会导致大豆蛋白尤其是 7S 和 11S 蛋白结构的伸展, 粘度变化。二硫键裂开时, 转变成巯基, 巯基与二硫键通常是互相转化的, 这可以通过巯基含量的测定进行判断。图 3显示热处理后, 豆奶的巯基含量急剧下降, 巯基向二硫键转化, 大豆蛋白中亚基之间的聚合作用增强。加热温度越高, 这种现象出现越快。如 95℃热处理时, 巯基含量在 8 min 处出现低谷, 120℃热处理, 巯基含量在 30 s 处出现低谷, 140℃热处理, 巯基含量在 12 s 处出现低谷。但图 3也表明, 在加热过程中, 有巯基含量增加现象, 如 95℃处理的 10 min 处, 120℃处理的 3 min 处以及 140℃处理的 60 s 处。这似乎表明加热处理中有大豆蛋白解聚的现象。但总的趋势是巯基含量不断下降, 直至最小, 这与 SDS-PAGE 图谱所大豆蛋白的聚合现象是一致的。

## 2.3 热处理对大豆胰蛋白酶抑制剂活性的影响

根据对胰蛋白酶活性和胰蛋白酶抑制剂活性的定义, 本实验测到的鲜豆奶中胰蛋白酶抑制剂的活性为 3 180 TIA / ml, 如果换算成另一种单位, 即按每克大豆干样品所抑制的纯胰蛋白酶毫克数表示, 则根据测到的胰蛋白酶抑制剂的活性 (1 590 TU / mg) 和鲜豆奶的固形物含量 (6.7%), 换算后的胰蛋白酶抑制剂活性是 30.76 mg / g 左右。此测定值与杨汝德、Smith 等人<sup>[4,9]</sup>的报道相近。本实验中, 鲜豆奶经热处理后, 胰蛋白酶抑制剂活性明显下降, 以样品

中胰蛋白酶抑制剂残留活性的百分率表示,经三种温度处理不同时间后的胰蛋白酶抑制剂活性变化见图 4,5

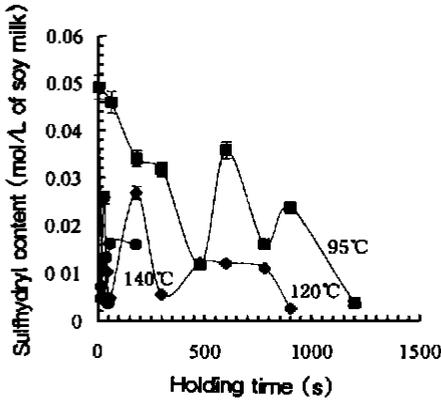


Fig. 3 Effect of temperature on sulfhydryl content in soy milk at 95 °C, 120 °C and 140 °C

Each point is the mean of three determinations

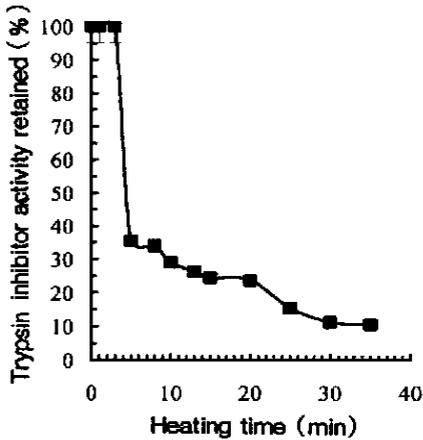


Fig. 4 Effect of heating time at 95 °C on trypsin inhibitor activity in soy milk

Each point is the mean of three determinations

图 4表明, 95 °C的热处理中,胰蛋白酶抑制剂的失活曲线表现为 3个部分。在开始的 3min,胰蛋白酶抑制剂活性下降甚微,从加热的第 3~ 5 min,热的失活作用显著加大,胰蛋白酶抑制剂活性表现出直线下降,此时胰蛋白酶抑制剂活性的残留率只有 35.4%左右。5 min以后,胰蛋白酶抑制剂的失活减缓,这一部分的胰蛋白酶抑制活性具有较强的耐热性,据认为通常是 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂,而易于受热影响而失活的那一部分,通常是 Kunitz胰蛋白酶抑制剂<sup>[1,3]</sup>。对于豆奶中胰蛋白酶抑制剂活性的失活程度,据认为失活率为 90% 时的效果最适宜<sup>[1]</sup>。从图 4中可以看出,95 °C 热处理时

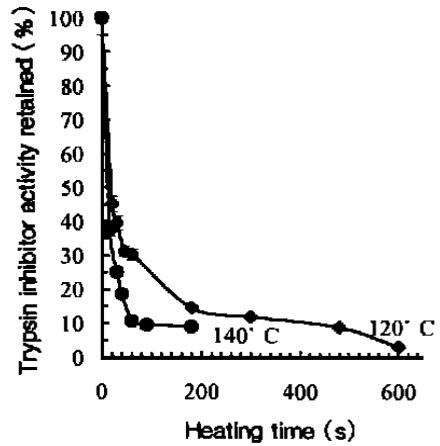


Fig. 5 Effect of UHT heat treatment on trypsin inhibitor activity in soy milk

Each point is the mean of three determinations

要达到失活 90% 的胰蛋白酶抑制剂活性,需要 35 min左右。此结果与 Van Buren所报道的结果相一致<sup>[1]</sup>。图 5中,用 120 °C和 140 °C热处理豆奶,大豆胰蛋白酶抑制剂的热失活显著加快。这一过程基本上表现为两部分,在热处理的前 60 s,胰蛋白酶抑制剂活性呈线性下降。120 °C热处理 60 s,胰蛋白酶抑制剂活性残留率为 30.3%,而 140 °C热处理 60 s,胰蛋白酶抑制剂活性残留率为 10.6%。60 s后,胰蛋白酶抑制剂热失活速度减缓。失活 90% 的大豆胰蛋白酶抑制剂活性,120 °C需要 7 min,而 140 °C只需要 60 s左右。根据这些结果,以温度作为横座标,失活 90% 胰蛋白酶抑制剂活性所需要的时间(对数形式)为纵座标作图,可得一条胰蛋白酶抑制剂失活 90% 的热致死时间曲线(TDT曲线, Thermal Death Time Curve),见图 6。此曲线表明,加热温度增加 30 °C,热处理所需要的时间可缩短至 1/10。

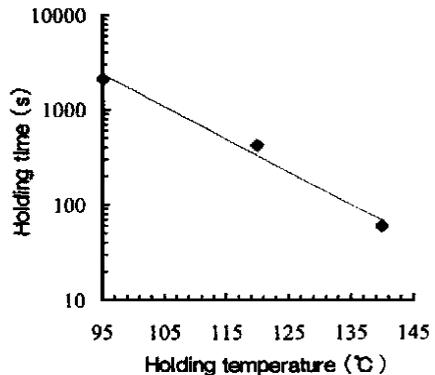


Fig. 6 Relationship between holding time and holding temperature for 90% inactivation of TIA in soy milk

Each point is the mean of three determinations

## 〔参 考 文 献〕

- [1] Hackler LR, Van Buren JP, Streinkraus KH, *et al.* Effect of heat treatment on nutritive value of soymilk protein fed to weanling rats[J]. *J Agri Food Chem*, 1998, 46: 281- 285.
- [2] Kwok KC, Niranjana K. Effect of thermal processing on soymilk [J]. *Inter J Food Sci Technol*, 1995, 30: 263- 295.
- [3] Hout RVD, Pouw M, Gruppen, H, *et al.* Inactivation kinetics study of the Kunitze soybean trypsin inhibitor and the Bowman-Birk inhibitor [J]. *J Agri Food Chem*, 1998, 46: 281- 285.
- [4] 杨汝德,梁汉华,郭乾初.超声波钝化大豆胰蛋白酶抑制素的研究 [J].华南理工大学学报, 1998, 26(4): 66- 71.
- [5] Friedman M, Grosjean OKK, Zahnley JC. Inactivation of soya bean trypsin inhibitors by thiols [J]. *J Sci Food Agri*, 1982, 33: 165- 172.
- [6] Kato Y, Matsuda T. Glycation of proteinous inhibitors Loss in trypsin inhibitory activity by the blocking of arginine and lysine residues at their reactive sites [J]. *J Agri Food Chem*, 1997, 45: 3826 - 3831.
- [7] Jiao JA, Yee BC, Kobrehel KK, *et al.* Effect of thioredoxin-linked reduction on the activity and stability of the Kunitze and Bowman-Birk soybean inhibitor proteins [J]. *J Agri Food Chem*, 1992, 40: 2333- 2336.
- [8] Vaintraub IA, Yattara HB. Proteolysis of Kunitze soybean trypsin inhibitor influence on its activity [J]. *J Agri Food Chem*, 1995, 43: 862- 866.
- [9] Smith C, Megen WV, Twaalfhoven L, *et al.* The determination of trypsin inhibitor levels in foodstuffs [J]. *J Sci Food Agri*, 1980, 32: 341- 350.
- [10] Bevenidge T, Jones L, Tung MA. Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey, soybean and albumen protein gels [J]. *J Agri Food Chem*, 1984, 32: 307- 412.

## CHANGES OF SDS PAGE PATTERNS OF SOYMILK PROTEIN AND TRYPSIN INHIBITOR ACTIVITY INDUCED BY HEATING

HU ANG Hui-hua<sup>1</sup>, KWOK Kin-cho<sup>2</sup>, LIANG Han-hua<sup>2</sup>, GAO Kong-rong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>South China University of Technology, Guangzhou 510641, China;

<sup>2</sup>The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, China)

**【Abstract】 Objective:** To evaluate the heating effects on SDS-PAGE patterns of soymilk protein, trypsin inhibitor activity and sulfhydryl bond content in soymilk. **Methods:** Soymilk samples were heated at 95 °C, 120 °C and 140 °C. SDS-PAGE was adopted to detect the pattern changes of soymilk proteins after heating and β-mercaptoethanol pretreatment. Trypsin activities were analyzed to detect the changes of trypsin inhibitor activities. Ellman method was used to detect sulfhydryl bond. **Results:** The protein bands of 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16 disappeared and one new band (band 17) with Mr of 104 620 appeared in the SDS-PAGE pattern of soymilk proteins after heated at 95 °C, 120 °C and 140 °C. The sulfhydryl bond content decreased after heating and this change contributed to the pattern change of soymilk protein by β-mercaptoethanol pretreatment and by determining the sulfhydryl bond content. The holding time to inactivate 90% of soy bean inhibitor activity at 95 °C, 120 °C and 140 °C were 35 min, 7 min and 60 s respectively. **Conclusion:** Heating treatment may change the sulfhydryl bond and SDS-PAGE pattern of soymilk proteins. The TDT curve indicates that the holding time required to inactivate 90% of soybean trypsin inhibitor could be reduced ten folds by raising 30 °C within the temperature range of 95-140 °C.

Key words: soymilk; thermal treatment; SDS PAGE; trypsin inhibitor; sulfhydryl bond