

基于豆浆模拟体系大豆油体的提取研究

Extraction of soybean oil body based on soymilk model system

田其英^{1,2} 华欲飞¹ 陈业明¹

TIAN Qi-ying^{1,2} HUA Yu-fei¹ CHEN Ye-ming¹

孔祥珍¹ 张彩猛¹ 王静²

KONG Xiang-zhen¹ ZHANG Cai-meng¹ WANG Jing²

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏食品药品职业技术学院食品学院, 江苏 淮安 223005)

(1. Food College, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. Food College, Jiangsu Food and Pharmaceutical Science College, Huai'an, Jiangsu 223005, China)

摘要:为构建以大豆油体为酶促作用底物的豆浆模拟体系来研究豆浆中的挥发性风味,在油体提取中分别研究 pH 和提取次数对生豆浆中大豆油体成分、粒径、风味物质的影响,并分析其成分和含量。结果表明:提取 pH 值从 7 增大到 11,油体蛋白质含量减少了 38.40%、中性脂含量增加了 7.26%、磷脂含量减少了 49.31%;油体粒径减小了 89.2 nm,并趋于稳定;所含挥发性风味物质的量也从 129.80 $\mu\text{g}/\text{L}$ 减少到 52.17 $\mu\text{g}/\text{L}$;提取油体中脂肪氧合酶在 pH 值 > 9 时已经不存在。通过以上比较可知在 pH 10 条件下提取的油体纯度、稳定性均较好,对所含的风味物质影响也较少,作为豆浆模拟体系的底物组分最为合适。

关键词:大豆油体;提取;油体蛋白;豆浆;风味物质

Abstract: In order to study the volatile flavor of soymilk, a soymilk simulation system with soybean oil body as substrate was constructed. The effects of different pH on the components, particle size and flavor of soybean oil body extracted from soybean milk were studied in the oil body extraction process. The results showed that when the extraction pH increased from 7 to 11, the content of oil body protein decreased by 38.40%, the neutral fat content increased by 7.26%, and the phospholipid content decreased by 49.31%. The oil particle size decreased gradually by 89.2 nm and tended to be stable. Volatile flavor substances were also gradually reduced from 129.80 $\mu\text{g}/\text{L}$ to 52.17 $\mu\text{g}/\text{L}$. When the pH > 9, the effect of lipoxigenase in extracted oil body was negligible. According to the comparison above, the purity and stability of oil body extracted under the condition of pH 10

were better, and the flavor substances contained in the oil body were also less. It can be seen that the oil body extracted at pH 10 is the most suitable substrate component of soybean milk simulation system.

Keywords: oil body; extraction; oleosins; soy milk; flavor

大豆是重要的粮油作物之一,油脂含量在 20% 以上,所含油脂贮存在大豆油体中。大豆油体的主要成分有 3 种,分别为中性脂(主要为甘油三脂)、油体蛋白和磷脂^[1]。大豆经过浸泡、磨碎制成的豆浆中存在着大量的油体,这些油体释放的脂质及其产物可以作为酶促氧化的底物,被脂肪氧合酶催化氧化后产生大量的挥发性风味物质。Andre 等^[2]研究发现在此酶促氧化产生大豆制品豆腥味的过程中,关键的酶是脂肪氧合酶(Lipoxygenase, Lox)。为了探索豆制品挥发性风味的形成机理,很多研究者^[3-4]选用不饱和脂肪酸为底物,Lox 或 Lox 同工酶为催化剂。此外,还对大豆的品种、种植地域、贮藏期、加工工艺等对豆腥味的形成进行了大量研究^[5-7]。而以脂质贮存细胞器大豆油体为底物的研究还未见报道。为进一步研究豆浆在磨浆过程中的风味形成机理,可以建立豆浆风味形成模拟体系,即以一定浓度的大豆油体,加上一定活力的 Lox、磷脂酶等,混合均匀制成乳浊液。大豆油体作为模拟体系中的底物组分,其提取的效果对试验结果有着重要影响。

大豆油体可看成一种天然的乳化油滴粒子,其内部脂质被单层磷脂—内源性蛋白质组成的生物膜包裹保护起来^[8]。然而在磨浆过程中,油体在机械、酶等作用的同时其表面会吸附一些大豆蛋白组分。为除去油体表面吸附的蛋白,以往研究者^[9-11]分别用一定浓度尿素、氯化钠、蔗糖等提取或进行加热、调节 pH 处理都取得了一定的纯化效果。为保证提取油体的纯度和稳定性,以及减少对豆浆风味形成模拟体系

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:31301496)

作者简介:田其英,男,江南大学在读博士研究生。

通信作者:华欲飞(1962—),男,江南大学教授,博士。

E-mail: yfhua@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2018-05-09

的影响,本研究拟选用蔗糖为提取试剂,通过调整提取次数和 pH 来提取满足相应要求的油体。以期对植物油体的提取纯化和相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆:嫩江富民农副产品有限公司;

蔗糖:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

丙烯酰胺、 N,N' -甲叉双丙烯酰胺、溴酚蓝、巯基乙醇、三羧基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸、四甲基乙二胺(TEMED)、考马斯亮蓝 G250:分析纯,美国 Sigma 公司;

标准蛋白:美国 Bio-Rad 公司;

磁力搅拌器:90 型,上海泸西仪器分析厂;

漩涡混合仪:WH-1 微型,上海泸西分析仪器厂;

pH 计:PHS-3C 型,上海精密科学仪器有限公司;

组织捣碎机:MJ-60BE01B 型,美的电器有限公司;

超速冷冻离心机:HitachiCR21G 型,日本日立公司;

粒径/Zeta 电势仪,ZETA-SIZER 2000 型,英国 Malvern 公司;

垂直电泳仪:Mini-PROTE836AN 型,美国 Bio-Rad 公司;

凝胶成像仪:ChemiDocXRS+型,美国 Bio-Rad 公司;

气质联用仪:SCIONSQ-456-GC 型,美国 bruker 公司。

1.2 方法

1.2.1 生豆浆的制备 将 20 g 大豆浸泡在 9 倍质量的去离子水中,于 4 °C 冰箱放置 18 h。向吸胀的大豆中加入新鲜去离子水至总重为 200 g,用组织捣碎机以 18 000 r/min 磨浆 90 s,用 4 层纱布过滤除去豆渣,滤液称为生豆浆。

1.2.2 大豆油体的提取 对赵路莘等^[10]的方法进行了改进,以便于得到纯度和稳定性均较好的大豆油体。向生豆浆中分别加入 15%浓度的蔗糖,室温搅拌 10 min,调节 pH 值。转移到离心管中,在 4 °C 条件下,19 000 r/min 离心 30 min,收集上浮物提取油体,或再将所得油体均匀溶解于 10 倍质量的水中,添加相同浓度的蔗糖,调回原来的 pH 值,在相同条件下离心,重复上述操作。上浮物即为大豆油体。

1.2.3 粒径测定 用粒径/Zeta 电势仪测粒径分布。

1.2.4 油体的显微镜观察 滴 1 滴合适浓度的乳液在载玻片上,盖好盖玻片,在 400×显微镜(10 倍目镜×40 倍物镜)下观察大豆油体。通过测量并计算显微镜照片中油体的粒径范围和平均粒径。

1.2.5 油体主要成分(中性脂、蛋白质、磷脂)含量的测定

参照文献^[12]。

1.2.6 挥发性风味物质的检测 对 Jung 等^[13]的检测方法进行改进。提取的油体按照得率进行溶解稀释,以浓度为 0.502 5 mg/mL 的 2-甲基-3-庚酮溶液为内标物,萃取温度 40 °C、萃取时间 30 min、解吸时间 7 min、萃取头为 85 μ m CAR-PDMS,测定风味物质。

1.2.7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) SDS-

PAGE 根据文献^[14]的方法,样品处理修改如下:样品溶解液为 0.25 mol/L Tris-HCl(pH 6.8),1% SDS,2% 巯基乙醇和 0.02% 溴酚蓝。取油体样品 0.5 mL,加入 0.5 mL 样品溶解液,在漩涡混合仪上混匀,煮沸 3 min,12 000 r/min 离心 10 min,取下层清液上样。

2 结果与分析

2.1 提取次数对大豆油体蛋白和外源性蛋白的影响

大豆油体蛋白主要为 24,18,16 kDa 3 种相对分子质量的蛋白质。其中,24 kDa 油体蛋白含量最多,其次是 18 kDa 油体蛋白,16 kDa 油体蛋白含量最少^[15]。在磨浆过程中,吸附到油体表面的蛋白主要有 β -伴大豆球蛋白(图 1 条带中的 $\alpha + \alpha'$ 、 β),大豆球蛋白如图 1 条带中的酸性肽链 3(A3)、酸性肽链(Acidic)和碱性肽链(Basic), γ -伴大豆球蛋白,30 kDa 蛋白和脂肪氧合酶等^[9]。由图 1 可知,从生豆浆中提取油体随着提取次数的增加,油体蛋白的总量在减少,其中 $\alpha + \alpha'$ 、 β 、 γ -伴大豆球蛋白、A3、Acidic、Lox 减少较多,24 kDa 蛋白有所减少,Basic、18 kDa 和 30 kDa 蛋白变化不大。随着提取次数的增加,吸附蛋白减少越多表明其与油体蛋白的吸附力越弱。这也说明在中性条件下外源性蛋白与油体的结合力大小并不相同,超过 3 次提取还会导致油体内源性蛋白的脱离。脂肪氧合酶是油脂催化氧化形成风味物质的关键酶,会导致风味物质的大量产生,需要尽可能减少其存在。

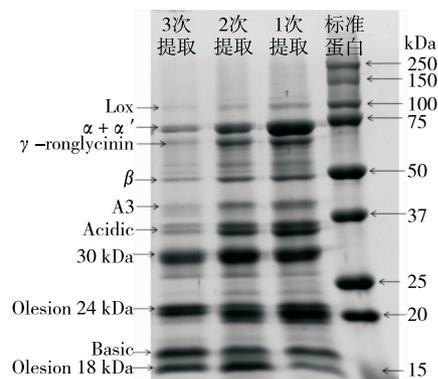


图 1 提取次数对油体表面蛋白的影响

Figure 1 The effect of different extraction times on surface protein of oil body

2.2 提取 pH 值对大豆油体蛋白和外源性蛋白的影响

由图 2 可知,从生豆浆中提取油体的蛋白质逐渐减少,当提取 pH 值 > 9 时,油体中附着的 β -伴大豆球蛋白、大豆球蛋白中的 A3 和 Acidic、 γ -伴大豆球蛋白和脂肪氧合酶以及内源性蛋白 18 kDa 减少较为明显,它们与油体蛋白的吸附力较弱;30 kDa 蛋白只在 pH 值达到 11 时才有较大幅度的减少;Basic 和 24 kDa 油体蛋白随着 pH 值的增大基本不变,Basic 与油体蛋白的吸附力较强。说明在碱性条件可以破坏大多数外源蛋白与油体之间的相互作用,导致提取的油体蛋白含量降低,在较高碱性条件下可以得到纯度较好的油体。这与 Chen 等^[16]的研究结果基本一致。

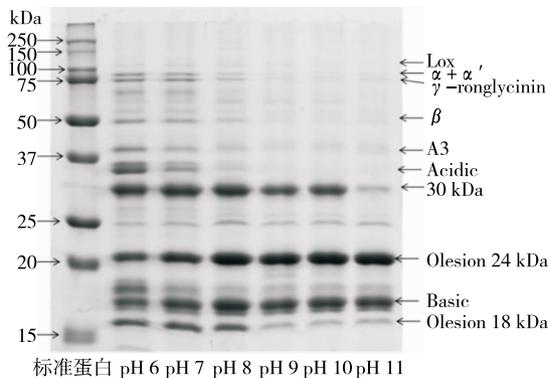


图 2 提取 pH 值对油体表面蛋白的影响
Figure 2 The effect of different pH values on surface protein of oil body

2.3 提取 pH 对大豆油体主要成分含量的影响

大豆油体可看成是内部为甘油三酯中性脂,外层由蛋白质-磷脂膜包裹的乳化油滴粒子^[8]。由表 1 可知,随着提取油体 pH 值的增大,中性脂肪含量呈增大的趋势,磷脂和蛋白质含量呈减小的趋势,其中蛋白质变化趋势与 2.2 结果相一致。造成磷脂含量减少的原因可能是,在碱性条件下促进了外源性蛋白和油体蛋白脱离油体,影响了磷脂和油体蛋白结构,使少量磷脂脱离油体析出;再者强碱环境使磷脂分子结构遭到一定程度的破坏,导致磷脂含量减少。

表 1 不同 pH 下提取大豆油体的主要成分及含量

Table 1 The components and contents of soybean oil body extracted at different extraction pH %

提取 pH	蛋白质	中性脂	磷脂
7	8.41±0.15	85.56±0.13	5.84±0.09
8	7.12±0.09	87.70±0.15	5.01±0.12
9	6.02±0.06	89.28±0.18	4.59±0.10
10	5.54±0.10	90.37±0.27	3.93±0.05
11	5.18±0.08	91.78±0.20	2.96±0.06

2.4 提取 pH 对大豆油体形态及粒径的影响

和其他油料种子中的油体相比较,大豆油体因较低的油与界面蛋白比,故体积较小,其直径在 0.2~0.5 μm^[16-17]。利用 400×显微镜观察提取的大豆油体,如图 3 所示,油体形状比较规则、完整,呈小球体,直径在 0.33~0.43 μm,油体直径随着提取 pH 值的增大呈下降的趋势。

对不同 pH 值下提取的油体进行粒径测定,并进行单因

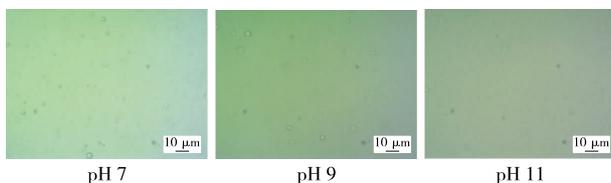


图 3 不同 pH 值下提取大豆油体的显微结构(400×)

Figure 3 The microstructure of oil body was extracted under different pH values (400×)

素方差分析,结果见表 2。由结果 F 值 $> F$ 临界值,并且 P 值 $(7.84E-09) < 0.01$,可以判定不同 pH 值下提取的油体粒径大小具有显著型差异。从图 4 可知,当提取油体 pH 值 > 8 时,所提取的油体粒径减小显著,当提取 pH 值 > 10 时,油体粒径减小变缓。说明随着提取 pH 值的增大,提取油体的表面结合力较小的蛋白质先脱离油体,而结合力较大的蛋白质相对较少且脱离难度加大,同时伴随着油脂的损失,导致油体粒径相应的变化。

表 2 油体粒径方差分析

Table 2 Variance analysis of oil particle size

差异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	F 临界值
组间	17 072.99	5	3 414.598	1 129.414	7.84E-09	4.387
组内	18.14	6	3.023			
总计	17 091.13	11				

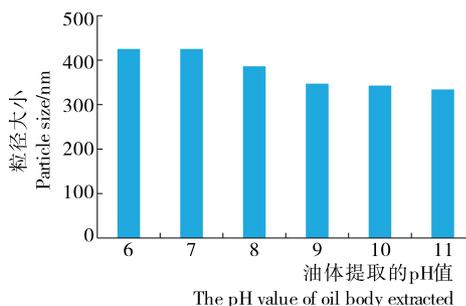


图 4 pH 值对提取油体的粒径影响

Figure 4 The effect of pH values on particle size of oil body

2.5 提取 pH 对大豆油体挥发性风味成分的影响

豆浆的气味特征是由多种挥发性风味物质共同产生的结果,Kobayashi 等^[18]研究豆浆气味的组成,分离出了 36 种气味成分(其中有 4 种为未知成分)。根据前人^[19]对豆浆风味贡献度大下分析归类及本研究中鉴定出来的挥发性风味物质情况,选择醛、醇、酮、呋喃类等 16 种风物质作为研究对象。

由表 3 可知,随着提取 pH 值的增大,提取油体的风味物质总量逐渐减少,在 pH 值 > 9 时大豆脂肪氧合酶含量减少,活性减弱,导致风味物质总量骤减,pH 10 和 pH 11 条件下提取油体含有的风味物质的量分别占豆浆风味的 3.65% 和 3.38%。强碱性提取的大豆油体中催化酶完全被洗脱干净,依然存在少量的风味物质,这主要是油体吸附豆浆生成的风味物质导致的^[20]。

3 结论

从生豆浆中提取油体,提取次数增加和提取 pH 值增大,会促进解离油体表面附着的外源性蛋白,使所提取的油体蛋白含量减少;但对油体蛋白 24 kDa 和油体蛋白 18 kDa 影响不大,从而使得在较高 pH 值下提取的油体保持了其形态的规则和完整。为了保持豆浆模拟体系中大豆油体的纯度、稳定性和避免脂肪氧合酶等的影响,选用在 pH 10 下提

表3 豆浆和提取油体的风味物质

Table 3 The flavor substances of soybean milk and oil body extracted

风味物质	μg/L					
	豆浆	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11
戊醛	13.40	1.56	1.31	1.01	0.85	0.89
1-戊烯-3-酮	4.92	0.55	0.11	0.00	0.00	0.00
己醛	705.00	81.00	65.40	59.30	44.20	40.50
反-2-戊烯醛	22.60	6.70	2.80	2.00	0.00	0.00
庚醛	10.70	2.10	1.50	1.30	1.10	1.00
反-2-己烯醛	81.20	8.50	6.12	3.10	1.98	1.96
2-戊基呋喃	1.33	0.55	0.54	0.51	0.45	0.44
3-辛酮	42.30	1.52	0.74	0.48	0.10	0.00
正戊醇	15.20	2.58	1.20	0.88	0.33	0.29
反-2-庚烯醛	35.60	10.31	6.65	4.66	2.71	2.63
1-辛烯-3-酮	17.00	0.51	0.35	0.33	0.08	0.00
反-2-庚烯醛	35.60	2.60	0.55	0.21	0.00	0.00
己醇	366.40	5.88	1.52	1.00	0.54	0.51
壬醛	11.30	4.24	4.20	4.02	3.58	3.53
1-辛烯-3-醇	175.00	0.62	0.13	0.00	0.00	0.00
反-2-壬烯醛	4.66	0.58	0.54	0.53	0.43	0.42
合计	1 542.21	129.80	93.66	79.33	56.35	52.17

取3次所得的大豆油体最为合适。

本研究提取的合适油体只是作为豆浆模拟体系的底物成分,在此模拟体系中油体在酶解或酶催化作用下的氧化反应和风味形成还有待进一步研究。

参考文献

[1] IWANAGA D, GRAY D A, FISK I D, et al. Extraction and characterization of oil bodies from soy beans: A natural source of pre-emulsified soybean oil[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2007(55): 8 711-8 716.

[2] ANDRE E, HOU K W. The presence of a lipid oxidase in soybean[J]. Comptes Rendus Acad Sci(Paris), 1932(194): 645-647.

[3] ZHUANG Hong, HILDEBRAND D F, ANDERSEN R A, et al. Effects of polyunsaturated free fatty acids and esterified linoleoyl derivatives on oxygen consumption and c6 aldehyde formation with soybean seed homogenates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(8): 1 357-1 364.

[4] NISHIBA Y, FURUTA S, HAJIKA M, et al. Hexanal accumulation and DETBA value in homogenate of soybean seeds lacking two or three lipoxygenase isozymes[J]. J. Agric. Food Chem., 1995(43): 738-741.

[5] SHI Xiao-di, LI Jing-yan, WANG Shu-ming, et al. Flavor characteristic analysis of soymilk prepared by different soybean cultivars and establishment of evaluation method of soybean cultivars suitable for soymilk processing[J]. Food Chemistry, 2015, 185: 422-429.

[6] YUAN Shao-hong, CHANG Kow-china. Selected odor compounds in soymilk as affected by soybean materials and direct steam injection[J]. Food Sci., 2007, 72: 481-486.

[7] WILKENS W F, MATTICK L R, HAND D B. Effect of processing method on oxidative off-flavors of soybean milk[J]. Food Technol, 2011, 21: 1 630-1 634.

[8] ANTHONY H C Huang. Oil bodies and oleosins in seeds[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 43(4): 177-200.

[9] 陈业明, 赵路苹, 熊小辉, 等. 热处理对大豆油体表面的油体蛋白和外源性蛋白影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(22): 106-113.

[10] 赵路苹, 陈业明, 张彩猛, 等. 提取条件对大豆油体表面蛋白质去除效果的研究[J]. 大豆科学, 2013, 32(6): 835-839.

[11] 陈雅静, 赵路苹, 华欲飞, 等. 植物种子油体的提取及其性质的初步研究[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(5): 62-67.

[12] 曹艳芸, 陈业明, 华欲飞. 高碱性提取的大豆油体的成分变化研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(3): 37-41.

[13] JUNG D M, EBELLER S E. Headspace Solid-Phase microextraction method for the study of the volatility of selected flavor compounds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003(51): 200-205.

[14] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.

[15] LIN Li-jen, TAI S K, PENG Chi-chung, et al. Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies[J]. Plant Physiology, 2002, 128(4): 1 200-1 211.

[16] CHEN Ye-ming, ONO T. Simple extraction method of non-allergenic intact soybean oil bodies that are thermally stable in an aqueous medium[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 7 402-7 407.

[17] TING J T, LEE K, RATNAYAKE C, et al. Oleosin genes in maize kernels having diverse oil contents are constitutively expressed independent of oil contents[J]. Planta, 1996, 199(1): 158-165.

[18] KOBAYASHI A, TSUDA Y, HIRATA N, et al. Aroma constituents of soybean [Glycine max (L.) Merril] milk lacking lipoxygenase isozymes[J]. J. Agric. Food Chem., 1995, 43: 2 449-2 452.

[19] YUAN Shao-hong, CHANG S K. Selected odor compounds in soymilk as affected by chemical composition and lipoxygenases in five soybean materials[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(2): 426-431.

[20] MEYNIER A, RAMPON V, DALGALARRONDO M, et al. Hexanal and t-2-hexenal form covalent bonds with whey proteins and sodium caseinate in aqueous solution[J]. International Dairy Journal, 2004, 14(8): 681-690.