

离子交换法制备低植酸含量大豆蛋白的研究

陶然¹, 范玲慧¹, 李雯¹, 吕莹², 郭顺堂¹

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 北京农学院 食品科学与工程学院, 北京 102206)

摘要:大豆食品中的植酸会阻碍多种矿物离子及蛋白的吸收, 为了提高大豆蛋白的营养吸收性, 加工中应去除植酸。本文研究了离子交换法脱除大豆分离蛋白中植酸的方法和效果, 并进一步考察了处理后大豆蛋白的理化性质。结果表明: 透析、超滤与离子交换法进行比较, 阴离子交换后植酸含量下降 77%, 较优于其他方法。后采用离子交换法去除大豆蛋白中的植酸, 对不同树脂、不同蛋白状态及酸碱度对植酸的去除效果进行比较, 以确定植酸去除的最优方案。与其他树脂相比, D201 树脂对植酸的吸附率达到 $12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在 pH7.0 的条件下可将植酸含量降低到 $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 下降约 90%。制备的低植酸含量的大豆蛋白等电点向右偏移, 溶解性略有下降, 分散速度有所提高。

关键词:植酸; 大豆蛋白; 阴离子交换树脂

中图分类号: R151.3

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2015.02.0293

Preparation of Low-phytate Soy Protein by Ion Exchange

TAO Ran¹, FAN Ling-hui¹, LI Wen¹, LYU Ying², GUO Shun-tang¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: Phytic acid in soybean food can affect the absorption of many mineral and protein. In order to improve the nutrient absorption of soy protein, phytic acid should be removed in processing. This paper studies the method and effect of removing phytic acid in soybean isolated protein by ion exchange method, and also the physical and chemical properties of soybean protein after ion exchange processing. The methods of dialysis, ultrafiltration and ion-exchange are compared, the method of anion exchange decrease the content of phytic acid by 77%, which is superior to other methods. An optimal phytate removing method was chosen by comparing the phytate removing effect in different kinds of resins, protein stages and pH values. The results showed that the resin adsorption rate of D201 was as high as $12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ resin. Under the condition of pH7, it could reduce the phytate level by 90% to a concentration of $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ protein. Isoelectric point (pI) of the low-phytate soybean protein showed a right shift, with a decreasing solubility and an increasing dispersion speed.

Keywords: Phytate; Soybean protein; Ion exchange of anion

植酸简称为肌醇六磷酸, 是豆类、谷类种子中磷的主要贮存方式^[1]。植酸磷约占大豆总磷含量的 67% ~ 75%^[2-3]。在食物营养中植酸阻碍了多种矿物离子如钙、锌的吸收, 对蛋白的消化、溶解度、凝胶性等也存在一定影响^[4-6]。因此, 为了提高大豆蛋白的营养吸收性, 加工中应去除植酸。有研究发现, 利用植物本身的植酸酶或添加微生物产生的植酸酶诱导植酸水解可去除大部分植酸^[7], 例如发芽大麦中的植酸酶可将植酸去除达到 90% 以上^[8]。超滤或渗滤也是去除植酸的方法之一^[3,9-10]。Rham 等研究发现, 大豆抽提物在 pH6.5 时单独透析 48 h, 可除去约 60% 的植酸。在 pH6.7 时超滤可以去除 65% 的植酸^[11-12]; 而采取间歇超滤法在 pH6.7 时可以将植酸的去除率提高至 92%。上述方法虽然有效, 但并不适合大豆蛋白的连续化的生产。

离子交换树脂是一种在交联聚合物结构中含

有离子交换基团功能的高分子材料, 根据不同的功能类型, 它具有选择吸附和催化等功能, 适合食品工业中成分的分离和提纯^[13]。本文对不同的阴阳离子树脂去除大豆分离蛋白中植酸效果进行了分析, 并进一步考察了处理后大豆蛋白的理化性质, 为今后离子交换法制备低植酸含量大豆蛋白工业化技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

低温脱脂豆粕, 金海粮油工业有限责任公司(秦皇岛); D001 强酸性大孔树脂; D201、D001、D301、D152 大孔树脂; 考马斯亮蓝 G-250, Sigma; 12 水合磺基水杨酸, Promega corporation; 植酸钠, Sigma。

1.2 仪器与设备

HL-2 恒流泵: 上海沪西分析仪器厂; SD-1000

收稿日期: 2014-07-25

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划(2012BAD34B03)。

第一作者简介: 陶然(1990-), 女, 硕士, 主要从事食品科学研究。E-mail: 512342691@qq.com。

通讯作者: 郭顺堂(1962-), 男, 教授, 博导, 主要从事蛋白质加工利用研究。E-mail: shuntang@cau.edu.cn。

喷雾干燥器:东京理化器械株式会社;FD-1C-50 冻干机:北京博医康实验仪器有限公司;SP-2100UV 紫外可见分光光度计:上海光谱仪器有限公司;LXJ-IIB 离心机:上海安亭科学仪器厂;12 kDa 透析膜;10 kDa 超滤膜;离子交换柱($\varnothing 0.8 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ 、 $\varnothing 5 \text{ cm} \times 35 \text{ cm}$)。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆分离蛋白提取 低变性脱脂豆粕→豆粕与水(1:15)高速搅拌 1.5 h (pH 至 8.0)→离心($4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),沉淀弃去上清液调节 pH4.5,静置 30 min→离心($1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)→得酸沉大豆蛋白→水洗沉淀 2 次→沉淀为大豆分离蛋白。

1.3.2 透析、超滤法低植酸含量大豆蛋白的制备 将上述大豆分离蛋白复溶于水,调节 pH7.0,使复溶后的固形物达到 15%~20% 后进行喷雾干燥或冷冻干燥,得喷雾干燥分离蛋白或冻干分离蛋白;将复溶液用截留分子量 12 kDa 的透析袋在 4℃ 下兑 10 倍水透析 24 h,每 4 h 换 1 次水,将透析后的上清液冻干得到透析冻干分离蛋白;将复溶液用截留分子量 10 kDa 的膜在 4℃ 下超滤 24 h,浓缩蛋白冻干后得到超滤分离蛋白。并参照 GB/T 5009.153-2003 测定蛋白中的植酸含量。

1.3.3 离子交换法低植酸大豆蛋白的制备 制备大豆分离蛋白→复溶至 5% 大豆蛋白溶液 (pH8.0)→剪切 5 min→进入离子交换柱 ($\varnothing 5 \text{ cm} \times 35 \text{ cm}$)→流出液调 pH7.0→喷雾干燥(仅过阴/阳离子交换柱的为阴/阳离子交换分离蛋白,先过阳离子交换柱再过阴离子交换柱的为阴阳离子交换分离蛋白)。并参照 GB/T 5009.153-2003 测定蛋白中的植酸含量。

1.3.4 离子交换树脂对植酸吸附能力的测定 配制 200 mL 1% 大豆分离蛋白溶液,调 pH 至 8.0,测定单位体积中植酸含量。向大豆分离蛋白溶液中分别加入不同体积 D001 与 D201 的离子交换树脂 (V) (树脂体积分别是 40, 8, 2 mL), 搅拌 2 h, 过滤得蛋白溶液,并用少量蒸馏水冲洗树脂后合并,得离子交换蛋白溶液,测量总体积 V2,并测定单位体积中植酸含量。

$$\text{树脂对植酸的吸附能力} = \frac{(200 \times C1 - V2 \times C2)}{V}$$

C1-单位体积大豆分离蛋白溶液的植酸含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); C2-单位体积离子交换大豆分离蛋白的植酸含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); V2-离子交换大豆分离蛋白溶液的体积 (g); V-树脂体积 (mL)。

1.3.5 对离子交换法处理不同 pH 大豆蛋白的分析 将酸沉大豆蛋白溶液复溶至蛋白浓度为 5% 的

不同 pH (6.0、7.0、8.0、9.0) 的溶液,剪切后过离子交换柱,将交换液调 pH 至 7.0,喷雾干燥得不同 pH 下脱植酸的大豆蛋白喷雾干燥粉,测量植酸含量。

1.3.6 大豆蛋白溶解度分析 采用 Bradford 法^[14] 分析。室温下,精确称取蛋白粉 1.0 g,加入 100 mL 蒸馏水,磁力搅拌 60 min,取 5 mL 样品转入到离心管中, $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取 0.5 mL 上清液,稀释 10 倍,测可溶性蛋白含量。

1.3.7 大豆蛋白 Zeta 电位分析 将 SPI 冻干粉、SPI 透析后冻干粉、阳离子树脂处理后冻干 SPI 粉、阴离子树脂处理冻干 SPI 粉分别配制成 1% 蛋白溶液,调节 pH 至 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 测量不同 pH 下 Zeta 电位, Zeta 电位零点处即为等电点。

1.3.8 蛋白粉的分散速度分析 参考 Jinapong 等^[15] 和孟旭等^[16] 的方法,作适当的修改。室温下,在 50 mL 烧杯中加入 20 mL 去离子水,精确称取 0.2 g 蛋白粉加入后搅拌 30 s,用 60 目滤网过滤,所得滤液取 5 mL 于烘箱中 105℃ 烘干至恒重,称重。按下列公式计算蛋白粉的分散速度。

$$\text{分散速度}(\%) = \frac{5 \text{ mL 滤液固形物质量}(\text{g}) \times 4}{0.2 \text{ g}} \times 100$$

1.3.9 蛋白粉的润湿性分析 参考 Jinapong 等^[15] 及孟旭等^[16] 的方法,并作适当的修改。室温下,在 100 mL 烧杯中加入 60 mL 去离子水,加入 0.3 g 蛋白粉,记录从加入开始到粉体全部浸润所需要的时间。

1.4 数据分析

采用 Excel 2007 和 Origin 8.0 软件进行分析处理和方差分析,结果以“平均值 ± 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 透析、超滤及离子交换法去除大豆蛋白植酸效果的比较

如图 1 所示,透析处理后植酸含量为 $8.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白,相较于未处理蛋白约降低了 10%,超滤后植酸含量下降至 $5.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白,降低了 47.6%。植酸的游离有利于去除,但植酸的游离状态一方面与大豆品种有关,另一方面,蛋白溶液的 pH 也有很大影响,当 $\text{pH} \leq 6.5$ 时,植酸与蛋白的结合较弱,游离植酸较多,有利于除去^[3]。而本研究中蛋白溶液(复溶) pH 为 7.2 左右,由此,可能影响了超滤法和透析法除去植酸的效果。

另一方面,本研究比较了不同类型离子交换树脂对植酸的吸附能力。经测定 D001 树脂的植酸吸附率为 $3.12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,而 D201 树脂的植酸吸附率

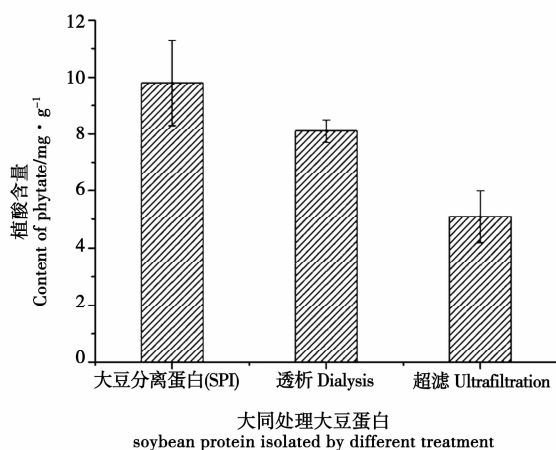


图1 透析和超滤对大豆蛋白中植酸含量的影响

Fig. 1 The influence of dialysis and ultrafiltration on content of phytate of SPI

为 $11.78 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。强碱性阴离子树脂 D201 的植酸吸附率要远远高于强酸性树脂 D001。

而从图 2 可知,离子交换树脂处理降低了蛋白粉中的植酸含量,在 pH8.0 条件下,阳离子交换后植酸含量从 $9.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 下降为 $8.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,降幅仅为 12%,而阴离子交换后植酸含量为 $2.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,下降幅度达 77%。因此,阴离子交换树脂的植酸去除量远高于阳离子交换树脂,这与树脂的吸附率的测量结果相一致;另一方面,将阴阳离子树脂联合使用,并与单一树脂使用时的效果进行了比较,植酸的含量相比单独采用阴离子交换时无明显的差异,说明在阴离子交换过程中,与阳离子相连接的植酸可能也在负离子交换中除去。

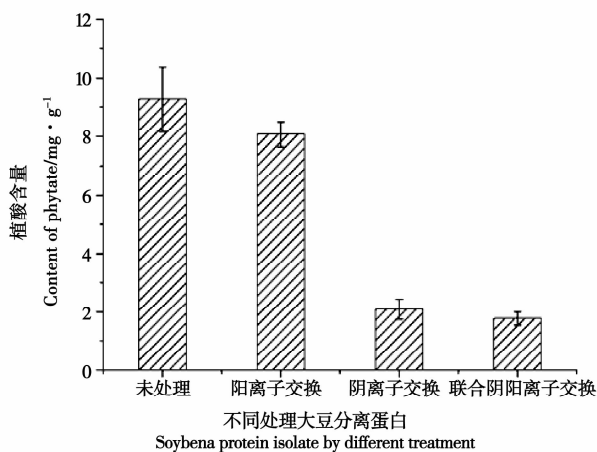


图2 不同离子交换树脂处理后大豆蛋白植酸含量

Fig. 2 Content of phytate after ion exchange by different resin treatments

2.2 不同类型离子交换树脂对植酸的去除效果

离子交换树脂根据离解的基团的性质,可分为阳离子交换树脂、阴离子交换树脂。其中,阳离子交换树脂可分为强酸性、弱酸性,阴离子交换树脂可分为

强碱性和弱碱性。本试验选择了强碱阴离子交换树脂 D201、弱碱阴离子交换树脂 D301、强酸阳离子交换树脂 D001、弱酸阳离子交换树脂 D152,比较了 4 种类型树脂对大豆分离蛋白中植酸的去除效果。由图 3 可知,D201、D301、D001、D152 树脂对大豆分离蛋白中的去除率分别为 90.8%、74.1%、26.3%、0。强碱性离子交换树脂主要是含有较强的反应基,可以和所有的阴离子进行交换,所以强碱性阴离子交换树脂对植酸的吸附效果最好^[1]。因此,对于大豆分离蛋白中植酸的去除情况,相比于透析、超滤与阳离子交换树脂,阴离子(D201)交换型树脂的植酸去除量要高于其他树脂和其他的方法。

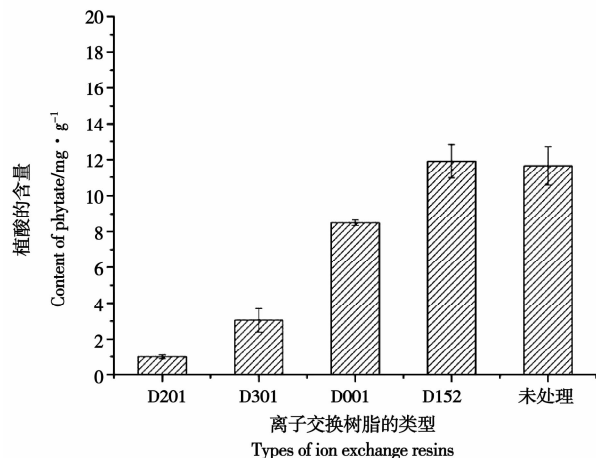


图3 不同类型离子交换树脂对植酸的去除效果

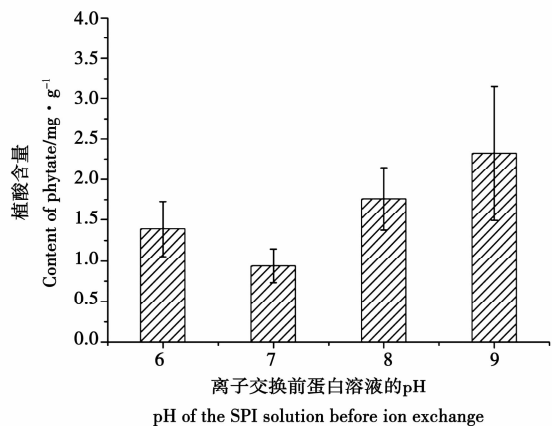
Fig. 3 Removing effect of phytic acid with different types of ion exchange resin

2.3 pH 对植酸脱除效果的影响

pH 不同时,植酸与蛋白及盐离子的结合力不同,因此蛋白溶液的 pH 会影响植酸与离子交换树脂的结合量。如图 4 所示,当酸沉蛋白复溶至 pH = 7.0 时,所得蛋白中植酸含量最低,为 $0.94 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,较之未处理大豆蛋白($9.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)下降了 90%,而 pH 为 9.0 时,去除效果最差(植酸含量为 $2.32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。这一结果说明 pH = 9.0 时植酸与蛋白组分结合最强,进行离子交换时植酸的结合状态已经被改变。而 pH7.0 时,进行离子交换时植酸与蛋白组分的结合最弱,呈游离状态的植酸较多,有利于植酸的去除。因此,采用离子交换处理前必须调整蛋白溶液的 pH,使植酸呈游离状态,有利于去除。

据文献报道,pH8.0 时大豆分离蛋白中某些蛋白组分具有与植酸强烈的结合作用,pH9.0 时结合更强,而在 pH6.0 ~ 6.5,植酸与蛋白组分的结合最弱^[2]。但本试验中 pH7.0 较 pH6.0 时植酸去除效果更好。这是由于离子交换过程中树脂基团的解离导致溶液本身的酸碱度发生变化,过阴离子树脂

交换柱的蛋白溶液的终 pH 有所下降(图 6),虽然样品液 pH 为 7.0,但由于离子交换引起的质子的释放使 pH 发生变化,导致植酸与蛋白的结合力变化;这可能是植酸被最大吸附时 pH 不同的原因。



4 不同 pH 蛋白溶液 D201 树脂离子交换处理后植酸含量
Fig. 4 Content of phytate in SPI powder after D201 resin treatment to different pH values protein solutions

2.4 脱植酸后蛋白粉的溶解性

对上述不同 pH 进行离子交换脱植酸蛋白的样品调 pH 至 7.0 后喷雾干燥,并分析了蛋白粉的溶解性。从图 5 可以看出,pH8.0 处理组的可溶性蛋白含量为 73%,高于对照(63%)等其他处理组。虽然 pH6.0 和 pH7.0 处理组蛋白的植酸含量低,但是溶解度却减小,分别为 45% 和 56%。这可能是由于在离子交换过程中,蛋白与树脂之间发生吸附交换反应,且此酸碱度下蛋白本身的溶解度不高,最终产品的溶解度也受到一定的影响。

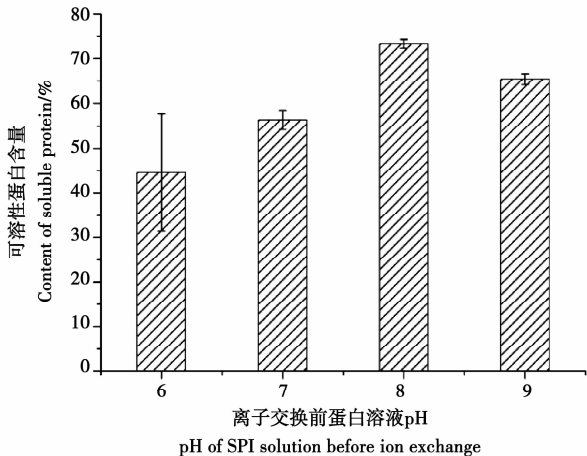


图 5 不同 pH 蛋白溶液离子交换处理后得蛋白粉的可溶性蛋白含量

Fig. 5 Content of soluble protein in SPI powder after D201 resin treatment to different pH protein solutions

2.5 离子交换后蛋白 Zeta 电位的变化

对经阴阳离子树脂处理后大豆蛋白 zeta 电位的

变化进行了分析,结果如图 6 所示。透析处理的样品在中性和酸性领域 Zeta 电位略有变化,其他领域与大豆蛋白相同,没有变化。Zeta 电位为 0 时的 pH 为蛋白的等电点 (PI),从图 6 可以看出,样品经阳离子交换后 PI 减小,而经阴离子交换后 PI 增加至 pH5.1,蛋白的净电荷量发生变化。当溶液 pH 小于 PI 时,蛋白的 Zeta 电位绝对值升高,但在大于 PI 的 pH 范围内 Zeta 电位的绝对值减小,Tsumura 等^[6]报道,植酸酶处理后豆乳的 Zeta 电位略有增大,一方面豆乳与蛋白体系存在不同,另一方面,离子交换树脂在去除植酸同时,还改变了其它离子也影响了溶液的电位和稳定性。

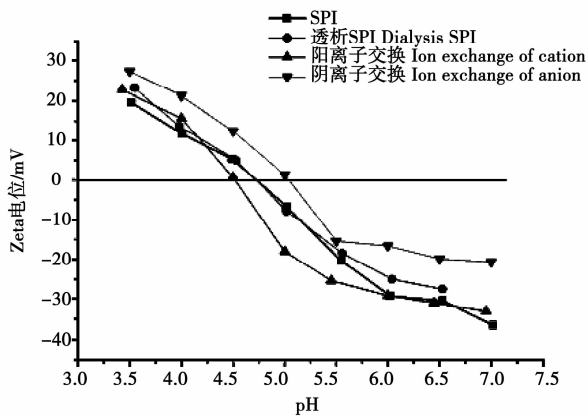


图 6 离子交换处理后大豆蛋白的 Zeta 电位

Fig. 6 Zeta potential of SPI after resin treatments

2.6 蛋白粉的分散速度

分散性和润湿性是蛋白粉体使用性能的重要指标。如图 7 所示,低植酸蛋白的分散性从 60.6% 上升至 66.4%,分散性略有提高。可能是由于不溶性植酸-蛋白质复合物的解离引起的,这种改变有利于处理后的蛋白更好地分散溶解于水中。

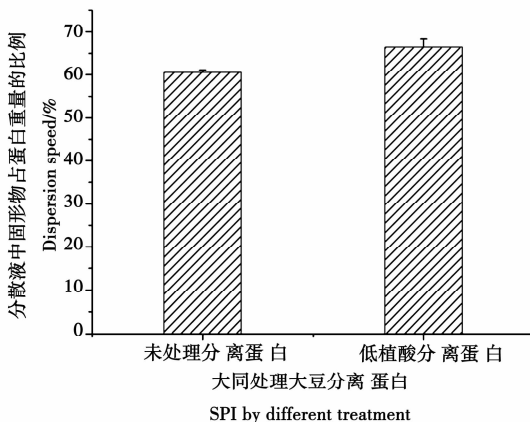


图 7 低植酸大豆分离蛋白的分散速度

Fig. 7 Dispersibility of SPI powder with low content of phytate

3 结论与讨论

不同类型离子交换树脂对植酸的吸附能力不同,阴离子型 D201 树脂的单位吸附植酸的能力要高于 D001 树脂。这是由于溶液中植酸易解离出质子而本身带较多负电荷,可与强碱性阴离子树脂中的负离子(Cl^-)进行交换吸附,从而导致植酸被大量吸附。理论上阳离子型树脂不能吸附呈负电性的植酸根离子,但是蛋白溶液中有少部分的植酸与阳离子、蛋白或结合了蛋白的阳离子结合,这样阳离子树脂会和少部分阳离子物质结合,从而也导致了少量的植酸吸附。当采用酸沉复溶的蛋白作为原料时,D201 的植酸吸附率可达到 $12.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本试验的结果与 Brooks 等人以单独的阳离子树脂处理除去大部分的钙、镁离子和约 30% 植酸的结果是一致的^[2]。

通过比较不同方法对植酸的去除效果可以看出,与透析法相比,阳离子交换树脂处理后的植酸含量与透析处理的植酸量相近,而阴离子交换树脂处理后植酸含量比透析法降低了 60%,说明在阴离子交换过程中,部分结合植酸的状态发生了改变,阴离子交换树脂不仅可以除去游离植酸,也可以除去部分结合植酸。因此,D201 强碱性阴离子树脂有较好的植酸脱除效果,当蛋白溶液 pH 为 7.0 时,蛋白质中的植酸约从 $9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 降低到 $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,去除率达到 90%,植酸去除效果远好于透析与超滤法。离子交换法脱植酸后大豆蛋白的 Zeta 电位有所改变,阴离子交换使蛋白等电点向右偏移,其大豆蛋白粉的分散性略有提高。

参考文献

[1] 张瑞. 植酸的提取、分离与纯化工艺研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2013. (Zhang R. Study on technology of extraction, separation and purification of phytic acid[D]. Hefei:Hefei University of Technology,2013.)

[2] Brooks J R, Morr C V. Phytate removal from soy protein isolates using ion exchange processing treatments[J]. Journal of Food Science, 1982,47(4):1280-1282.

[3] Ali F, Ippersiel D, Lamarche F, et al. Characterization of low-phytate soy protein isolates produced by membrane technologies [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010,11(1):162-168.

[4] Carnovale E, Lugaro E, Lombardi-Boccia G. Phytic acid in faba

bean and pea: effect on protein availability[J]. Cereal Chemistry, 1988,65(2):114-117.

[5] Kuiper G G, Lemmen G J, Carlsson B. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta[J]. Endocrinology, 1998, 10:139(10):4252-4263.

[6] Tsumura K, Saito T, Kugimiya W. Influence of phytase treatment on the gelation property of soymilk[J]. Food Science and Technology Research, 2004,10(4):442-446.

[7] 范玲慧. 婴儿豆基粉原料中植酸含量及致敏性递减化技术的研究[D]. 北京:中国农业大学,2012. (Fan L H. The research of reduction technology of phytate and allergy of soy-based infant formula[D]. Beijing: China Agricultural University, 2012.)

[8] 南昌希,周丽萍. 大麦内源酶去除大豆植酸的研究[J]. 食品研究与开发,2005(5):35-37. (Nan C X, Zhou L P. Study on removing phytic acid in soybean using endogenous enzyme of barley [J]. Food Research And Development,2005(5):35-37.)

[9] 孙艳梅,张永忠,王伊强,等. 大豆 β -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮糖苷的研究[J]. 中国粮油学报,2006,21(2):86-89. (Sun Y M, Zhang Y Z, Wang Y Q, et al. Hydrolysis of soybean isoflavone glucosides by β -glucosidases from soybean[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2006, 21(2): 86-89.)

[10] Badger T M, Gilchrist J M, Pivik R T, et al. The health implications of soy infant formula[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2009,89(5):1668-1672.

[11] Mondor M, Ippersiel D, Lamarche F, et al. Effect of electro-acidification treatment and ionic environment on soy protein extract particle size distribution and ultrafiltration permeate flux[J]. Journal of Membrane Science, 2004,231(1):169-179.

[12] 龚云表,石安富. 合成树脂与塑料手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1993:367. (Gong Y B, Shi F A. Manual of synthetic resin and plastic [M]. Shanghai:Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1993: 367.)

[13] 钱庭宝,朱常英. 离子交换树脂在食品工业中的应用[J]. 现代化工,1987(4):15. (Qian T B, Zhu C Y. Application of ion exchange resin in food industry[J]. Modern Chemical Industry, 1987(4):15.)

[14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-258.

[15] Jinapong N, Suphantharika M, Jarnong P. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration [J]. Journal of Food Engineering, 2008, 84: 194-205.

[16] 孟旭,汤坚. 方便豆腐粉的物理化学特性及其生产工艺[J]. 食品与发酵工业,2004,30(4):58-65. (Meng X, Tang J. Study on properties of instant tofu powder and its processing method [J]. Food and Fermentation Industries, 2004, 30(4): 58-65.)