

酰化对芸豆分离蛋白 热学特性的影响研究

马雯,尹寿伟*,唐传核,杨晓泉

(华南理工大学轻工与食品学院,广东广州 510640)

摘要:从参与酰化反应基团的视角,运用热分析(DSC)技术,研究了不同酰化阶段芸豆分离蛋白热学性质的变化规律。芸豆分离蛋白(KPI)的酰化过程存在两个主要的酰化阶段,酸酐-蛋白比为0~0.1(乙酰化)和0~0.2(琥珀酰化)g/g,为 ϵ -氨基(Lys)酰化阶段(N-酰化);再增加酸酐与蛋白比, ϵ -氨基酰化基本完成,反应进入羟基(Thr,Ser)酰化阶段(O-酰化)。在N-酰化阶段,琥珀酰化诱导KPI的热稳定性增加,而焓变(ΔH)略有降低,乙酰化不影响KPI的热稳定性和焓变(ΔH);羟基酰化阶段,酰化导致KPI变性温度(T_d)降低,伴随焓变(ΔH)急剧下降。

关键词:芸豆分离蛋白,酰化,热学特性

Study on effect of acylation on thermal properties of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate

MA Wen, YIN Shou-wei*, TANG Chuan-he, YANG Xiao-quan

(Department of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The objective was to investigate the acylation-induced change in thermal properties of kidney bean protein isolate (KPI) by differential scanning calorimetry (DSC) techniques. The possible reactive amino groups of proteins, taking part in the acylation of KPI were explored. The relationships between thermal properties of acylated KPI and acylated stage were established. The data indicated that the acylation of KPI included two stages. One was the acylation of ϵ -amino groups (N-acylation), the other was the acylation of hydroxyl groups (O-acylation). In the N-acylation stage, the degree of the N-acylation sharply increased to about 93%~94% with the anhydride levels increasing from 0 to 0.1 (acetylation) or 0.2g/g (succinylation). The O-acylation (Thr, Ser) distinctly occurred only when the N-acylation was nearly completed. In the N-acylation case, succinylation led to the increases in the thermal stability, the decreases in the enthalpy changes (ΔH), while the T_d and the ΔH of KPI were unaffected by the acetylation. In the O-acylation case, the acylation led to the decreases in T_d of KPI, accompanied with the sharp decrease in ΔH .

Key words: kidney bean protein isolate; acylation; thermal properties

中图分类号: TS210.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)07-0092-04

Phaseolus 属豆类是一类丰富而优质的植物蛋白资源,具有相对均一的蛋白组成,独特的结构特点,日益引起国内外食品工作者的关注。芸豆是 *Phaseolus* 属豆类中具有代表性的蛋白资源,其产量仅次于大豆蛋白。芸豆籽粒富含的蛋白质(20%~30%干基),氨基酸组成相对较均衡^[1]。清蛋白(11.5%~31%)和球蛋白(46%~81%)是芸豆籽粒的主要贮藏蛋白,其中芸豆球蛋白(Phaseolin)占总球蛋白的76%以上;另一种球蛋白是植物凝集素^[2]。芸豆球蛋白具有良好的功能特性,而分离蛋白(KPI)功能特性相对较差,这源于分

离蛋白制备过程中的酸碱诱导的蛋白构象改变。分离蛋白是豆类蛋白资源(如大豆)的主要利用形式^[2],芸豆分离蛋白较差的功能特性在一定程度上限制其在食品加工中的应用,因而对芸豆分离蛋白改性可以增进蛋白资源的利用。此外,较低的消化性能也是制约芸豆蛋白资源利用的重要因素(In vitro digestibility)^[3]。本研究小组采用酰化改善了芸豆分离蛋白功能特性和体外消化性能^[3]。酰化修饰能显著改善食物蛋白的功能性,如王月等采用四元二次正交旋转组合设计实验法优化出琥珀酰化大豆分离蛋白溶解性的最佳工艺条件^[4];王喜波等采用超声辅助琥珀酰化技术有效提高大豆蛋白的乳化活性^[5]。酰化改善芸豆蛋白功能性和消化性能的同时,可能造成蛋白结构构象的改变。琥珀酰化引入带负电荷的亲水性基团,乙酰化

收稿日期:2011-05-27 * 通讯联系人

作者简介:马雯(1987-),女,硕士,研究方向:粮油及植物蛋白工程。

基金项目:广东省自然科学基金博士启动项目(104510064101005149)。

过程中引入的是中性的疏水性基团,会导致蛋白分子间/分子内侧链基团之间的相互作用发生改变,从而影响到蛋白的热稳定性和有序结构。DSC技术是一种重要的研究蛋白构象稳定性和变性程度的技术手段。程序升温过程中,破坏氢键会产生吸热峰,破坏疏水性相互力或蛋白发生聚集产生放热峰^[6]。在蛋白的DSC图谱中,变性温度(T_d)反映蛋白的热稳定性,焓变(ΔH)是指吸热峰的面积,代表未变性蛋白的比例,与蛋白的有序结构相关^[7]。本研究从参与酰化反应的基团角度入手,通过探讨酸酐与蛋白比对酰化芸豆分离蛋白热学特性的影响,建立酰化与蛋白热稳定性(T_d)和焓变(ΔH)之间的关联性,从而为这一类蛋白资源的利用打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

芸豆分离蛋白 自制;琥珀酸酐、乙酸酐 购自Sigma公司;其他化学试剂 均为分析纯。

Q100 DSC 美国TA Instruments公司;2501PC紫外-可见分光光度计 日本岛津;CR22G高速冷冻离心机 日本日立;Alpha-4冷冻干燥机 德国Christ公司。

1.2 实验方法

1.2.1 芸豆分离蛋白制备工艺流程 称取100g脱脂芸豆粉分散于2L去离子水(1:20, w/v),用2mol/L NaOH溶液调分散液的pH至8.0,间歇添加NaOH溶液以维持溶液的pH,室温下搅拌2h后,于20℃离心(12000×g, 30min),弃其沉淀物,调节上清液的pH为4.5,而后于20℃离心(6000×g, 20min)。所得沉淀物经两次水洗后(pH=4.5),分散于适量的去离子水中,用2mol/L的NaOH溶液将pH调到7.0,冷冻干燥后于-20℃贮存备用。芸豆分离蛋白(KPD)的蛋白含量为89%(干基)。

1.2.2 酰化处理 琥珀酰化根据Franzen等报道的方法^[8],稍加改动。称取2g芸豆分离蛋白分散在80mL去离子水中(蛋白浓度为2.5%, w/v)。在室温下磁力搅拌1h后,用2mol/L NaOH溶液调节溶液pH至8.0。向溶液逐渐添加琥珀酸酐,维持溶液的pH在7.5~8.5的范围。待溶液pH稳定在8.0后,再继续反应1h,使酰化反应完全,然后用1mol/L HCl溶液将溶液pH调至7.0,以终止反应。反应液在4℃透析48h以除去残余的琥珀酸酐,之后冷冻干燥得到琥珀酰化芸豆蛋白。对照样品的制备过程中不添加酰化试剂,乙酰化蛋白的制备过程中用乙酸酐代替琥珀酸酐,其余操作与琥珀酰化蛋白制备一样。

1.2.3 氨基酰化度的测定 氨基酰化度(N-酰化度)的测定根据Habeeb报道的方法^[9],稍作改动。首先,蛋白样品溶于50mmol/L磷酸缓冲液(含50mmol/L NaCl, pH8.5)中,蛋白浓度为1%(w/v)。添加1mL 0.1%的TNBS溶液到等体积的蛋白溶液中,在60℃保温2h后,反应液快速冷却至室温。顺序添加1mL 10% SDS和0.5mL 1mol/L HCl终止反应。在335nm下比色,对照样品的吸光度值设为100%,用吸光度值降低程度来表征N-酰化程度。

1.2.4 羟基(Ser和Thr)酰化度测定 羟基酰化度

(O-酰化度)的测定采用Gounaris等报道的碱性羟胺法^[10]。将2mol/L $\text{NH}_2\text{OH}-\text{HCl}$ 溶液,3.5mol/L NaOH溶液和去离子水按2:1:1(v/v/v)配制得到测试液。2mL测试液加入1mL蛋白溶液(5mg/mL)中,混合液在40℃下保温2h后,添加1.0mL 3mol/L HCl以终止反应。添加1.0mL 0.37mol/L FeCl_3 (在0.1mol/L HCl中)显色。放置15min后,离心,上清液在540nm条件下比色。用540nm的吸光度值表示O-酰化度。

1.2.5 巯基含量测定 巯基含量测定采用经Beveridge改进后的Elman法^[11],稍作改动,巯基酰化度(S-酰化度)为酰化蛋白的巯基含量比上对照样品的巯基含量。主要试剂配制及测试方法如下:

a. Tris-Gly缓冲液(pH8.0):精确称取10.418g Tris,6.756g甘氨酸,1.489g EDTA二钠,加去离子水定容至1000mL。

b. Tris-Gly-8M Urea溶液:在Tris-Gly缓冲液中加入480.48g尿素。

c. DTNB溶液(4mg/mL):4mg DTNB试剂溶于1mL Tris-甘氨酸缓冲液(A)。

巯基含量测定:添加15mg蛋白样品至5.0mL测试液中(B液),添加50 μL C溶液,在25℃保温1h后,于25℃离心(13600×g, 10min),上清液在412nm比色。巯基含量的计算公式如下:

$$\text{SH}(\mu\text{mol/g}) = 73.53 \times A_{412} \times D / C$$

式中: A_{412} -除去试剂空白后样品的吸光度值;D-稀释倍数;C-蛋白质含量。

1.2.6 热学特性分析 精确称取1mg蛋白质放入铝盒中,加入10 μL 10mmol/L磷酸缓冲溶液(pH=7.0),压盘。以空铝盘为对照,温度扫描范围:0~120℃,升温速率:10℃/min,保护气氮气流速:50mL/min。采用the universal analyzer 2000软件计算蛋白质的变性温度(T_d)和焓变(ΔH)。

2 结果与讨论

2.1 酰化度

蛋白的酰化反应主要是分子中的亲核基团攻击酸酐的羰基碳原子所诱发的一类亲核取代反应。 ϵ -氨基(Lys)具有较低的pK值和较弱的空间位阻,表现出较强的亲核能力。侧链基团,如酪氨酸的酚羟基及组氨酸的咪唑基团均可以参与酰化反应,但是酰化产物不稳定,如酪氨酸酚羟基的酰化产物在pH>5情况下分子内催化水解。因而, ϵ -氨基(Lys)、脂肪族羟基(Thr, Ser)和巯基(Cys)是芸豆分离蛋白中可能参与酰化反应的主要基团。图1~图3为芸豆分离蛋白中这三种侧链基团参与酰化反应的情况。

N-酰化度依赖于参与反应的酰化试剂种类和用量。在乙酸酐与蛋白比低于0.1g/g时,N-酰化度随酸酐与蛋白比增加而迅速增加,乙酸酐与蛋白比为0.1g/g时达到93%~94%,酸酐与蛋白比再继续增加,N-酰化度仅增加2%~3%。琥珀酰化度呈现出与乙酰化度相似的变化趋势,只是琥珀酰化度达到93%~94%需要的酸酐与蛋白比较乙酰化高,为0.2g/g(图1)。在相同酸酐与蛋白比的情况下,尤其在低于0.2g/g时,乙酰蛋白具有较高的酰化度,表明乙酸酐比琥珀酸酐

具有更强的活性,这主要归因于乙酸酐具有较小的空间位阻效应。

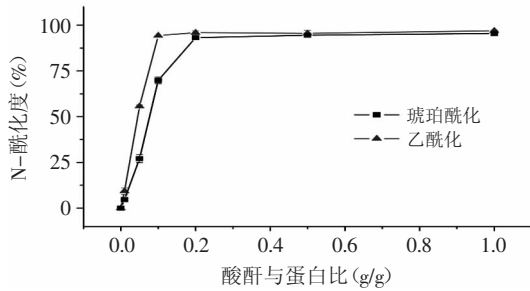


图1 酸酐与蛋白比对N-酰化度的影响图

Fig.1 Influence diagram of anhydride and protein ratio on N-acylation degree

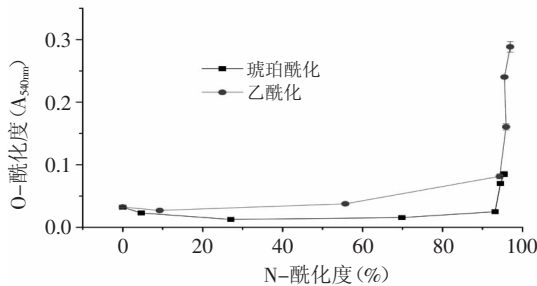


图2 N-酰化度与O-酰化度之间的关系

Fig.2 Relationship of N-acylation degree and O-acylation degree

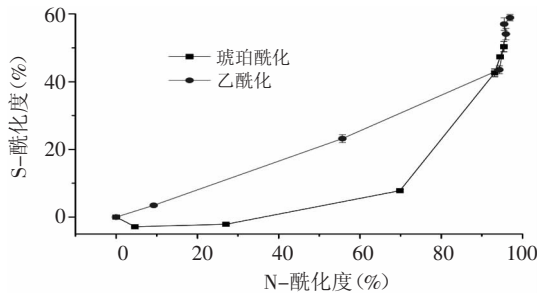


图3 N-酰化度与S-酰化度之间的关系

Fig.3 Relationship of N-acylation degree and S-acylation degree

图2显示,ε-氨基(Lys)与羟基(Ser和Thr)具有一定的竞争性,ε-氨基具有更强的活性。在N-酰化度低于93%~94%时,即酸酐与蛋白比低于0.1g/g(乙酰化)或0.2g/g(琥珀酰化)时,羟基(Ser和Thr)不参与酰化反应,参与酰化反应的基团主要是Lys的ε-氨基,反应产物主要是N-酰化产物;而当Lys的ε-氨基的N-酰化度达到93%~94%,再继续增加酸酐与蛋白比例,N-酰化度仅增加2%~3%,羟基(Ser和Thr)开始参与酰化反应(见图1、图2)。

随着ε-氨基酰化反应的进行,巯基逐步参与反应,这与Franzen、Kinsella的报道不一致^[8],他们认为,大豆蛋白中的巯基几乎不参与酰化反应。两种蛋白的巯基参与酰化反应的结果差异,主要源于巯基在蛋白分子中的分布差异。芸豆分离蛋白巯基分布于分子表面,较低的空间位阻效应有利于其参与酰化反应^[12];而在大豆蛋白中巯基主要分布在分子内部,不利于酰化反应的进行。

2.2 DSC分析

酰化芸豆分离蛋白热学特性DSC技术研究见图4~

图6。在对照样品的DSC图谱上,呈现出一个明显的吸热峰,归属为芸豆球蛋白(phaseolin)的变性(图4)。酰化对芸豆分离蛋白热稳定性(T_d)的影响依赖于所用的试剂种类以及酰化反应所处的阶段。在Lys的ε-氨基酰化阶段,琥珀酰化诱导芸豆分离蛋白的 T_d (反映热稳定性)从91.1℃逐渐增加至95.70~96.2℃;在羟基酰化阶段, T_d 逐渐下降至92.2℃。在ε-氨基(Lys)酰化反应阶段,带负电荷的琥珀酰基团取代带正电荷的ε-氨基(Lys),导致芸豆蛋白表面负电荷堆积(电负性剧增)。因此琥珀酰化蛋白分子间的静电排斥效应抑制程序升温过程中的蛋白-蛋白相互作用,而蛋白-蛋白聚集物的形成导致蛋白不可逆变性。乙酰化与琥珀酰化存在着较大的差异,ε-氨基(Lys)的酰化阶段,乙酰化芸豆分离蛋白的 T_d 与对照相似或略高;而羟基酰化阶段,乙酰化芸豆分离蛋白的 T_d 逐渐下降。当酸酐与蛋白比达到1.0g/g,乙酰化芸豆分离蛋白的DSC图谱上的吸热峰消失,表明蛋白完全变性;而在琥珀酰化芸豆分离蛋白的DSC图谱上,除在92.20℃出现一个吸热峰外,在77.5℃时呈现了一个焓变仅为0.21J/g的弱的吸热峰(图5),表明广泛的琥珀酰化导致芸豆分离蛋白构象改变,出现具有不同构象状态的蛋白组分。这一点在native-PAGE图谱中得到印证,较低的迁移率处出现了一条额外的蛋白谱带^[13]。羟基(Ser和Thr)酰化阶段,琥珀酰化和乙酰化导致蛋白的热稳定性降低,这与荧光光谱分析结果一致^[13]。

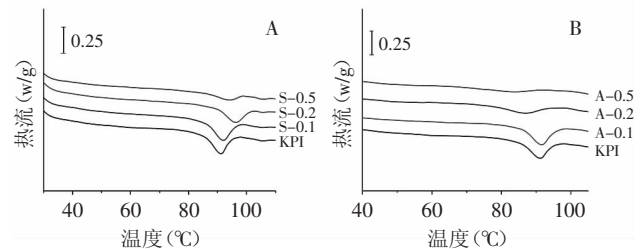


图4 对照和酰化芸豆分离蛋白的DSC图谱

Fig.4 DSC map of isolate protein in control and acylation

kidney bean

注:A:琥珀酰化;B:乙酰化。

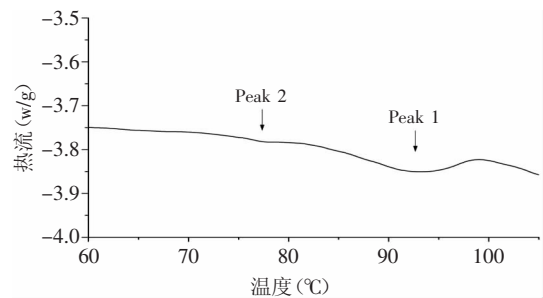


图5 琥珀酰化芸豆分离蛋白的DSC图谱

Fig.5 DSC map of isolate protein in succinylation kidney bean

注:酸酐与蛋白比为1.0g/g。

焓变(ΔH)是蛋白热学特性的一个重要指标。图6给出了在不同酰化阶段,芸豆分离蛋白焓变的变化规律。在ε-氨基酰化阶段,琥珀酰化和乙酰化呈现不同的变化趋势,琥珀酰化芸豆分离蛋白的焓变,随N-酰化度增加从14.17降至9.25J/g;而乙酰化情况,蛋白

的焓变基本上保持不变(图6A);在羟基酰化阶段,随O-酰化度增加,琥珀酰化和乙酰化芸豆分离蛋白的焓变均逐渐降低(图6B)。

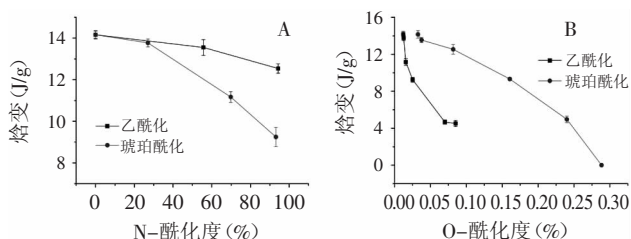


图6 酰化芸豆蛋白的焓变与N-酰化度(A)和O-酰化度(B)之间的关系

Fig.6 The relationship of acylation kidney bean protein enthalpy change, N-acylation degree (A) and O-acylation degree (B)

3 结论

3.1 芸豆分离蛋白的酰化过程存在两个主要的酰化阶段,在酸酐-蛋白比为0~0.1(乙酰化)g/g和0~0.2(琥珀酰化)g/g时,N-酰化度从0迅速增加至93%~94%,为Lys的氨基酰化阶段;再增加酸酐与蛋白比,羟基(Thr, Ser)才开始参与酰化反应,为羟基(Thr, Ser)酰化阶段。

3.2 ϵ -氨基酰化阶段,琥珀酰化诱导KPI的变性温度(反映热稳定性)从91.1℃逐渐增加至95.70~96.2℃,乙酰化KPI的热稳定性基本不变;羟基酰化阶段,琥珀酰化KPI的变性温度逐渐下降至92.2℃,乙酰化芸豆分离蛋白的变性温度逐渐下降。

3.3 在Lys的 ϵ -氨基的酰化阶段,KPI的构象基本上不变;羟基酰化导致芸豆分离蛋白分子伸展和变性,酸酐与蛋白比为1.0g/g,乙酰化导致KPI完全变性,而琥珀酰化造成KPI出现不同构象状态的组分。

参考文献

[1] Sathe S K. Dry bean protein functionality[J]. Critical Reviews

in Biotechnology, 2002, 22: 175-223.

[2] Romero J, Sun S M, McLeester R C, et al. Heritable variation in a polypeptide subunit of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris* L[J]. Plant Physiology, 1975, 56: 776-779.

[3] Yin SW, Tang CH, Wen QB, et al. Effects of acylation on the functional properties of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(E): 488-494.

[4] 王月, 张东杰. 琥珀酰化改性高溶解度大豆分离蛋白的工艺优化[J]. 食品与机械, 2011, 27(3): 119-122.

[5] 王喜波, 迟玉杰, 胥伟. 超声辅助琥珀酰化改性大豆蛋白研究[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(5): 6-13.

[6] Ellepola SW, Ma C-Y. Thermal properties of globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds[J]. Food Research International, 2006, 39: 257-264.

[7] Koshiyama I, Hamano M, Fukushima D. A heat denaturation study of the 11S globulin in soybean seeds[J]. Food Chemistry, 1981, 6: 309-322.

[8] Franzen K L, Kinsella J E. Functional properties of acetylated and succinylated soy protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1976, 24: 788-795.

[9] Habeeb AFSA. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulphonic acid[J]. Analytical Biochemistry, 1966, 14: 328-336.

[10] Gounaris A D, Perlmann G E. Succinylation of pepsinogen [J]. Journal of Biological Chemistry, 1967, 242: 2739-2745.

[11] Beveridge T, Toma S J, Nakai S. Determination of SH and S-S groups in some food proteins using Ellman's reagent[J]. Journal Food Science, 1974, 39: 49-51.

[12] Yin SW, Tang CH, Wen QB, et al. Functional and conformational properties of phaseolin (*Phaseolus vulgaris* L.) and kidney bean protein isolate. A comparative study[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90: 599-607.

[13] 尹寿伟. 芸豆蛋白的物化修饰及相关构效机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2009.

(上接第91页)

测和延长[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 106-111.

[2] 杨文鹤, 孙翠玲, 潘云娜, 等. 水产品中致病微生物的快速检测方法[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 402-406.

[3] Gram L, Dalgaard P. Fish spoilage bacteria—problems and solutions[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(1): 262-266.

[4] Mc Meekin T A, Olley J. Predictive microbiology: towards the interface and beyond[J]. Food Microbial, 2002, 73(2): 395-407.

[5] Pin C, Baranyi J. Predictive models as means to quantify the interactions of spoilages organisms[J]. Food Microbiology, 1998, 41(1): 59-72.

[6] Gram L, Huss H H. Microbiological spoilage of fish and products[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33(1): 121-137.

[7] Gram L, Dalgaard P. Fish spoilage bacteria—problems and solutions[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(1): 262-266.

[8] 郭全友, 许钟, 杨宪时. 冷藏养殖大黄鱼品质变化特征及细

菌相分析[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(2): 216-222.

[9] 王玉婷, 邵秀芝, 冀国强. 大黄鱼冷藏过程中品质变化及腐败菌的分析及抑菌研究[J]. 肉类研究, 2010(11): 11-15.

[10] 曹荣, 薛长湖, 许加超, 等. 太平洋牡蛎细菌菌相分析及-20℃冻藏过程中菌相变化[J]. 食品工业科技, 2008, 29(6): 107-110.

[11] 陈曼, 李赤, 邱逸斯, 等. 富贵竹黑腐病拮抗菌H5的抑菌机制及相关特性研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(4): 529-532.

[12] 李建慧, 马会勤, 陈尚武. 葡萄多酚抑菌效果的研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(2): 100-107.

[13] 申迎宾, 范子剑, 麻浩. 响应面法优化发芽豇豆积累 γ -氨基丁酸工艺条件的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 10-16.

[14] Richards R, Michael E. Antibacterial action of silver nitrate [J]. Biomed Lett, 1991, 45: 183-188.

[15] 张杰, 张宇. 银离子消毒剂的杀菌作用、机制、影响因素及应用[J]. 中国感染控制杂志, 2007, 6(3): 214-216.

[16] 刘健, 王海雁, 赵淑江. 牛津杯法测定五倍子对大黄鱼病原弧菌的体外抑菌活力[J]. 海洋科学, 2009, 33(11): 44-47.