

使用圆二色性光谱分析二级结构 对大豆分离蛋白表面疏水性的影响

王辰¹,江连洲^{2,*}

(1.大理大学,云南大理 671003;

2.东北农业大学,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:旨在采用圆二色性光谱手段研究二级结构对我国六种经常使用的大豆品种制备而成的分离蛋白的表面疏水性的影响。实验先是对六个品种的大豆进行分离蛋白的提取,并对其性质进行测定,包括溶解度和表面疏水性;再对六种大豆分离蛋白的二级结构进行测定和分析;通过 SPSS 软件对六种大豆分离蛋白的表面疏水性和二级结构的数值进行线性相关性分析,探究二者之间的构效关系。研究中发现六个品种的大豆分离蛋白的二级结构、溶解性、表面疏水性都差异显著($p < 0.05$),表面疏水性的大小随着 α -螺旋含量升高而减小,随着无规则卷曲和 β -折叠含量增大而提高,因 β -转角含量变化的影响不明显。SPSS 线性相关性分析表明品种间的表面疏水性与 β -转角含量线性关系不显著,与无规则卷曲、 β -折叠含量呈正向相关,与 α -螺旋含量呈负向相关。

关键词:大豆分离蛋白,表面疏水性,圆二色性光谱

Effect of secondary structure determined by CD spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate

WANG Chen¹,JIANG Lian-zhou^{2,*}

(1.Dali University,Dali 671003,China;

2.Northeast Agriculture University,Harbin 150030,China)

Abstract: CD (circular dichroism spectra) was applied to research on the relationship between surface hydrophobicity(SH) and secondary structure in six varieties of soy protein isolate (SPI). First step was the extraction of SPIs,the functional abilities (surface hydrophobicity and solubility) and the secondary structure of the six varieties of SPI were measured and analyzed.Through SPSS software,the numerical linear correlation between surface hydrophobicity and secondary structure of six varieties of soybean protein isolate was analyzed to explore the structure-activity relationship between them.The results revealed that there were significant differences ($p < 0.05$) between the secondary structure and the functional abilities (surface hydrophobicity and solubility). The SH of the six varieties of SPI increased with the decrease of α -helix content,and decreased with the increase of random coil and β -sheet content,and the linear relationship between the SH and β -turn content was not obvious. SPSS linear correlation analysis showed that the SH of the six varieties of SPI had no significant linear relationship with β -turn content,positively related to random coil and β -sheet content,and negative correlated to α -helix content.

Key words: soybean protein isolate; surface hydrophobicity; circular dichroism

中图分类号:TS207.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2016)14-0134-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.14.018

大豆分离蛋白(Soybean Protein Isolate,SPI)是一种蛋白纯度在90%以上的功能性食品添加剂或食品原料,它的提取原料是低变性的脱脂豆粕,人们利用碱溶酸沉的原理和现代化的加工手段将其提取而成,其在食品工业中的生产占有重要的地位^[1-4]。溶解性对于蛋白质来讲是一个极其重要的物理性质。疏水作用影响着蛋白质的结构,水合性质以及其他重要的功能性^[5-6]。由于蛋白质具有大分子结构,分子间的相互作用对蛋白质的功能性有着重要的影响,蛋白质分子表

面的亲疏基团决定着表面疏水性^[7-8]。蛋白质表面疏水性对于蛋白质发挥功能性质至关重要。

华欲飞等^[9]等研究了三种不同大豆分离蛋白的凝胶性能,原料差异使得大豆分离蛋白的表面疏水性产生很大的不同,证实了表面疏水性是影响大豆蛋白凝胶性能的重要因素;徐红华等^[10]研究了挤压膨化处理工艺对大豆粕蛋白质表面疏水性影响,研究表明高物料水分、高温挤压膨化、低转速时,表面疏水性会提高。目前国内针对大豆蛋白表面疏水性的研究,主要集中

收稿日期:2015-12-29

作者简介:王辰(1987-),女,硕士,助教,研究方向:粮食、油脂及植物蛋白工程,E-mail:cc198772@163.com。

* 通讯作者:江连洲(1960-),男,博士,教授,研究方向:粮食、油脂及植物蛋白工程,E-mail:jlzname@163.com。

在两个方面:一是研究大豆蛋白表面疏水性与其它功能性的关系,二是研究物理改性^[11]、化学改性^[12-13]、生物改性^[14-15]对大豆蛋白表面疏水性的影响。对于品种差异与功能性关系的研究,主要集中在乳化性、凝胶型等功能特性,对于表面疏水性显见报道。

圆二色性光谱作为一种充分被应用于蛋白质构象研究的光谱技术,因其准确迅速地反映出蛋白质空间构象的特点而备受学者们青睐^[16]。因此本实验采用统一方法实验室自制大豆分离蛋白,利用远紫外区域圆二色性光谱对六个品种大豆分离蛋白的二级结构进行测定,分析品种差异对大豆分离蛋白表面疏水性的影响,争取更深层次的挖掘 SPI 的功能特性关系,解决其在肉制品或饮料等生产过程中的溶解性差和分散性不良等现象,为今后开发大豆分离蛋白特定产品而进行分子设计和重组提供重要的理论指导和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆分离蛋白 实验室自制(原料大豆品种为中黄 13,东农 46,黑农 46,皖豆 34,五星 4,冀 n58); Lowry 法试剂盒 分析纯,上海荔达生物科技有限公司;硫酸铜、硫酸钾、氢氧化钠 以上试剂均为分析纯,天津市光复精细化工研究所;盐酸、硫酸 以上试剂均为分析纯,北京新光化工试剂厂;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠 以上试剂均为分析纯,天津市东丽区天大化学试剂厂;1-苯胺基-8-萘磺酸(ANS) 色谱纯, Sigma 公司。

5430 小型高速离心机 德国 Eppendorf 公司; THZ-80 型水浴恒温振荡器 江苏金坛亿通电子有限公司; TU-1800 型紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; FD5-3 型冷冻干燥机 美国 SIM 公司; PHM200 型酸度计 法国雷迪美特公司; 电子分析天平(0.0001 g) 北京赛多利斯仪器系统有限公司; PC396 型电子秒表 深圳市惠波工贸有限公司; J-810 型圆二色谱仪 日本 JASCO 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆分离蛋白的制备流程 参照王辰等^[17]的方法。原料大豆经去皮、破碎后粉碎过 60 目筛,然后在 40 °C 条件下采用正己烷萃取以制备脱脂豆粕。将脱脂豆粕按 1:15 的质量比与水混合,用 2 mol/L NaOH 调 pH 至 8.0,搅拌 1.5 h 后,将其悬浮液在 4 °C 条件下 10000 × g 离心 30 min,取上清液用 2 mol/L HCl 调 pH 至 4.5。静置后在 4 °C 条件下 6000 × g 离心 30 min,取蛋白沉淀水洗 2 次,最后取沉淀分散于水中并用 2 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0。再在 4 °C 条件下 10000 × g 离心 30 min,除去少量的不溶物,将其蛋白溶液冷冻干燥后粉碎即得粉末状大豆分离蛋白。所有步骤均在室温条件下进行。

1.2.2 溶解度和表面疏水性测定 参照王辰等^[17]的方法。

1.2.3 圆二色谱(CD)检测 参照陈勇等^[18]的方法。

1.2.4 线性相关性分析 采用 SPSS V17.0 软件 Duncan's multiple range test 方法。

1.3 统计分析

采用 SPSS V17.0 软件对数据进行 ANOVA 差异显著性分析($p < 0.05$ 为显著性差异),线性相关性采用 SPSS V17.0 软件 Duncan's multiple range test 方法。采用 CDPro 软件包分析、Origin 8.0 软件进行图谱分析和图表制作。每个实验重复 3 次,结果表示为平均数 $\bar{x} \pm s$ 。

2 结果与讨论

2.1 大豆分离蛋白的溶解性与表面疏水性

六种大豆分离蛋白的性质数值大小如图 1 和图 2 所示,品种间的两种性质均存在显著性差异($p < 0.05$)。对六种大豆分离蛋白的溶解性和表面疏水性二者数值进行 ANOVA 差异显著性分析,得知二者之间存在非常显著的负相关($r = -0.865, p = 0.026$)。

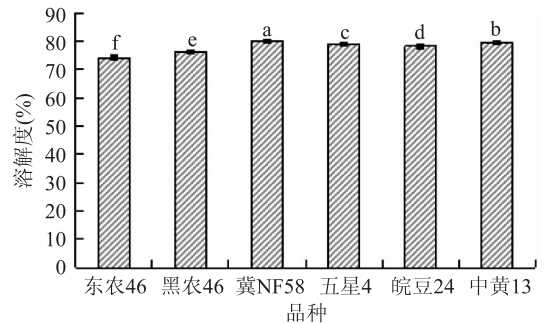


图1 六种品种大豆分离蛋白的溶解度

Fig.1 The solubility of six varieties of SPIs

注:图中字母(a~f)表示不同品种大豆分离蛋白 $p < 0.05$ 水平的差异显著性;图2、表1同。

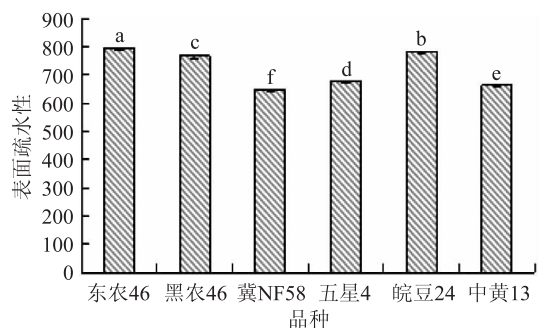


图2 六种品种大豆分离蛋白的表面疏水性

Fig.2 The surface hydrophobicity of six varieties of SPIs

分析原因可能是由于蛋白质的溶解性与蛋白质分子表面的亲水性/疏水性的平衡有关,当这种平衡发生改变,两种性质随之改变,表面的疏水性残基的多少起着决定性作用,疏水性残基相对较多具有较好的表面疏水性^[19-21]。Paraman 等^[22]对大米蛋白研究中也发现二者之间存在负的相关性, Hayawaka and Nakai^[23]曾报道表面疏水性与不溶解性成正相关。然而, Boatright and Hettiarachchy^[24]研究表明大豆分离蛋白的溶解性和表面疏水性呈现正相关,相似的结论在大米蛋白中得到证明^[25]。

2.2 圆二色谱(CD)检测结构的分析

圆二色谱(250~200 nm)是一种测量蛋白质二级结构的灵敏技术,能够表征主链构象,尤其在水溶性

表1 六种大豆分离蛋白的二级结构构成比例(%)

Table 1 Content of the secondary structure in six varieties of SPIs(%)

品种	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
皖豆 24 号	15.9 ± 0.1 ^e	32.1 ± 0.1 ^b	22.4 ± 0.1 ^a	30.5 ± 0.2 ^a
冀 NF58	26.5 ± 0.2 ^a	24.5 ± 0.3 ^f	21.0 ± 0.2 ^b	26.6 ± 0.1 ^e
黑农 46 号	17.1 ± 0.1 ^d	31.0 ± 0.1 ^c	22.2 ± 0.3 ^a	29.7 ± 0.1 ^b
东农 46 号	15.8 ± 0.1 ^e	32.7 ± 0.1 ^a	22.5 ± 0.2 ^a	29.1 ± 0.1 ^c
五星 4 号	21.9 ± 0.1 ^c	28.5 ± 0.1 ^d	22.1 ± 0.4 ^a	27.6 ± 0.1 ^d
中黄 13 号	22.7 ± 0.2 ^b	27.4 ± 0.2 ^e	22.5 ± 0.1 ^a	27.5 ± 0.1 ^d

蛋白溶液中。它能直接用来解释蛋白的二级结构四种类型的含量。本实验采用 200~250 nm 远紫外光谱下测定六种品种大豆分离蛋白的圆二色谱,测定结果如图 3 所示。图 3 纵坐标为蛋白的平均摩尔椭圆率大小,通过 CDPRO 软件分析圆二色谱图数据,计算 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角与无规则卷曲的含量见表 1。由表 1 可知,六种大豆分离蛋白的 α -螺旋含量大小依次为 26.5% (冀 NF58) > 22.7% (中黄 13 号) > 21.9% (五星 4 号) > 17.1% (黑农 46 号) > 15.9% (皖豆 24 号) > 15.8% (东农 46 号),而 β -折叠含量大小顺序为 32.7% (东农 46 号) > 32.1% (皖豆 24 号) > 31.0% (黑农 46 号) > 28.5% (五星 4 号) > 27.4% (中黄 13 号) > 24.5% (冀 NF58),无规则卷曲的含量依次为 30.5% (皖豆 24 号) > 29.7% (黑农 46 号) > 29.1% (东农 46 号) > 27.6% (五星 4 号) > 27.5% (中黄 13 号) > 26.6% (冀 NF58)。他们的 β -转角含量变化不明显,中黄 13 号、五星 4 号、黑农 46 号、皖豆 24 号、东农 46 号的 β -转角含量在 22.1% ~ 22.5% 之间,比冀 NF58 含量高约 1%。

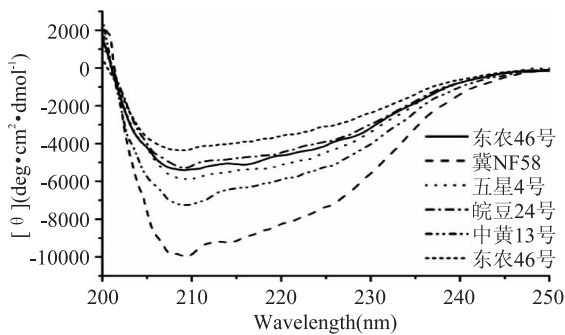


图3 六种大豆分离蛋白的圆二色谱

Fig.3 Far-UV CD spectra of six varieties of SPIs

通过分析数据可知,六种大豆分离蛋白的二级结构主要以 β -折叠和无规则卷曲为主,这一现象与前人报道是一致的^[26-27]。不同品种大豆分离蛋白的二级结构存在差异,除 β -转角含量无显著性差异外,其他三种结构存在显著性差异。通过不同品种大豆分离蛋白二级结构含量的比较,随着 α -螺旋含量的降低, β -折叠及无规则卷曲含量显著升高, β -转角含量增加不明显。导致蛋白质分子表面疏水性较大的原因可能是因为当蛋白质分子内无序结构含量相对较高时,蛋白质分子的无序性增加,隐藏在内部的疏水性位点更多的显露出来,这一现象佐证了王辰等^[17]关于利用红外光谱法对大豆分离蛋白品种差异与表面疏水性构效关系的研究结论。

2.3 相关性分析

通过本实验的研究可以得出:对六种大豆分离蛋白的二级结构与表面疏水性二者数值进行线性相关性分析,六种大豆分离蛋白的 β -折叠含量与表面疏水性之间存在极显著的线性正相关,相关系数为 0.950 ($p < 0.01$);无规则卷曲含量也同样与其存在极显著的正相关,相关系数为 0.923 ($p < 0.01$); α -螺旋含量与表面疏水性之间具有极明显的线性负相关,相关系数为 -0.968 ($p < 0.01$); β -转角含量与表面疏水性之间无显著的线性关系。

表2 六种大豆分离蛋白的二级结构与表面疏水性相关性分析

Table 2 The relationship between surface hydrophobicity (SH) and secondary structure in six varieties of soy protein isolate (SPI)

二级结构	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
相关性	-0.968	0.950	无	0.923

3 结论

不同品种大豆分离蛋白的表面疏水性与品种密切相关,表面疏水性随着大豆蛋白的二级结构中 α -螺旋含量降低而增大, β -折叠及无规则卷曲含量升高而增大。通过本实验的研究,明确了二级结构对疏水性的影响规律,为今后开发大豆分离蛋白特定产品而进行分子设计和重组提供重要的理论指导和技术支持。

参考文献

- [1] Castro R F, Marina M L, Garfa M C. Perfusion Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Intact Soybean Proteins for the Characterization of Soybean Cultivars [J]. J Chromatogr A, 2007, 1170:34-43.
- [2] Srinivasan Damodaran. Food protein and their applications [M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1997.
- [3] Marsman G J P, Gruppen H, J de Groot. Effect of toasting and extrusion at different shear levels on soy protein interactions [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46:2770-2777.
- [4] Fukushima D. Recent progress of soybean protein foods: Chemistry, Technology and Nutrition [J]. Food Reviews International, 1991, 7:323-351.
- [5] Keerati-u-rai M, Corredig M. Heat-induced changes in oil-in-water emulsions stabilized with soy protein isolate [J]. Food Hydrocolloids, 2009a, 23(8):2141-2148.
- [6] Keerati-u-rai M, Corredig M. Effect of dynamic high pressure homogenization on the aggregation state of soy protein [J]. Journal

of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57: 3556-3562.

[7] Damodaran S. Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation [J]. J Agric Food Chem, 1988, 36: 262-269.

[8] Sheard P R, Fellows A, Ledward D Aa, et al. Macromolecular charges associated with the heat treatment of soya isolate [J]. Food Technology, 1988, 21: 55-60.

[9] 华欲飞, Steve W C, Yoshinori M. 不同大豆分离蛋白凝胶的流变学性质[J]. 中国粮油学报, 2003, 18(6): 43-48.

[10] 徐红华, 申德超. 不同挤压参数对大豆粕蛋白质结构的影响[J]. 农业工程学报, 2003, 23(7): 267-271.

[11] Ren C G, Tang L, Zhang M, et al. Structural characterization of heat-induced protein particles in Soy Milk [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57: 1921-1926.

[12] Puppo M C, Anon M C. Soybean protein dispersions at acidic pH. Thermal and rheological behavior [J]. Journal of Food Science, 1999, 64: 50-56.

[13] Petrucci S, Anon M C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 2. Surface properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42: 2170-2176.

[14] Wu W U, Hettiarachchy N S, Qi M. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration [J]. J Amer Oil Chemists Soc, 1998, 75(7): 845-850.

[15] Babiker E F E, Khan M A S, Matsudomi N, et al. Polymerization of soy protein digests by microbial transglutaminase for improvement of the functional properties [J]. Food Research International, 1996, 29: 627-634.

[16] 洪法水. Pb^{2+} 对 α -淀粉酶活性的影响及其光谱学研究 [J]. 光谱学与光谱学分析, 2003, 23(3): 583-586.

[17] 王辰, 江连洲, 魏东旭, 等. 不同品种大豆分离蛋白结构与表面疏水性的关系 [J]. 食品科学, 2012, 33(9): 39-42.

(上接第 133 页)

[24] Liu Z, Cheng F, Zhang G. Grain phytic acid content in japonica rice as affected by cultivar and environment and its relation to protein content [J]. Food Chemistry, 2005, 89(1): 49-52.

[25] 戴传波, 李建桥, 李健秀, 等. 植酸制取的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2007(2): 239-241.

[26] 赵宁春, 张其芳, 程方民, 等. 氮、磷、锌营养对水稻籽粒植酸含量的影响及与几种矿质元素间的相关性 [J]. 中国水稻科学, 2007, 21(2): 185-190.

[27] Wei W U, Cheng F M, Liu Z H, et al. Difference of phytic acid content and its relation to four protein composition contents in grains of twenty-nine japonica rice varieties from Jiangsu and Zhejiang provinces, China [J]. Rice Science, 2007, 14(4): 311-314.

[28] Itani T, Tamaki M, Arai E, et al. Distribution of amylose, nitrogen, and minerals in rice kernels with various characters [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50: 5326-5332.

[29] Lohani U C, Pandey J P, Shahi N C. Effect of degree of polishing on milling characteristics and proximate compositions of barnyard millet (*Echinochloa frumentacea*) [J]. Food and

[18] 陈勇, 王晶, 江连洲, 等. 不同辐照剂量对红豆分离蛋白结构及特性的影响 [J]. 中国粮油学报, 2015, 30(4): 54-57.

[19] Shimada K, Cheftel J C. Determination of sulfhydryl groups and disulfide bonds in heat-induced gels of soy protein isolate [J]. Agriculture and Food Chemistry, 1988, 36: 147-153.

[20] Kato A, Nakai S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins [J]. Biochem Biophys Acta, 1980, 624(1): 13-20.

[21] 吴海波, 齐宝坤, 江连洲, 等. 大豆分离蛋白热性质及其空间构象对表面疏水性的影响 [J]. 中国粮油学报, 2014, 29(10): 42-46.

[22] Paraman I, Hettiarachchy N S, Schaefer C, et al. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of enzyme-modified rice endosperm protein [J]. Cereal Chemistry, 2007, 84(4): 343-349.

[23] Hayakawa S, Nakai S. Relationship of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins [J]. Food Sci, 1985, 50: 486-491.

[24] Boatright W L, Hettiarachchy N S. Soy protein isolate solubility and surface hydrophobicity as affected by antioxidants [J]. Food Science, 1995, 60(4): 798-800.

[25] Xiong H, Chen X D, Ruan X, et al. Comparison of functional and structural properties of native and industrial process-modified proteins from long-grain indica rice [J]. Cereal Science, 2012, 56(3): 568-575.

[26] Fukushima D. Internal structure of 7S and 11S globulin molecules in soybean proteins [J]. Cereal Chem, 1968, 45(3): 203-224.

[27] Sreerama N, Venyaminov S Y U, Woody R W. Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy [J]. Protein Science, 1999, 8(2): 370-380.

Bioprocess Technology, 2012, 5(3): 1113-1119.

[30] 王章存, 申瑞玲, 姚惠源. 大米蛋白开发利用 [J]. 粮食与油脂, 2004(1): 12-14.

[31] Flávia Fernandes Paiva, Vanier N L, Berrios J D J, et al. Physicochemical and nutritional properties of pigmented rice subjected to different degrees of milling [J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2014, 35(1): 10-17.

[32] Lamberts L, De Bie E, Vandeputte G E, et al. Effect of milling on colour and nutritional properties of rice [J]. Food Chemistry, 2007, 100(4): 1496-1503.

[33] Juliano B O, Bechtel D B. The rice grain and its gross composition [M]. Rice Chemistry and Technology, 1985(4): 15-17.

[34] 张美, 杨登想, 张丛兰. 不同品种大米营养成分测定及主成分分析 [J]. 食品科技, 2014, 8: 147-152.

[35] Schlemmer U, Frolich W, Prieto R M, et al. Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2009, 53(2): 330.

[36] 杨月欣. 中国食物成分表(2) [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2011.