高静压处理对芸豆分离蛋白的聚集行为研究

黎亢抗，马雯，尹寿伟，唐传核，杨晓泉，齐军茹
（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：采用排阻色谱-多角度激光光散射-折光联用技术（SEC-MALLS-RI）研究高静压处理（HP）对芸豆分离蛋白分子量分布的影响规律，揭示HP导致KPI聚集-解离行为。根据Debye plot方法，计算出芸豆球蛋白的绝对分子量为161 kDa，200 MPa HP处理解离KPI的可溶性聚集物，而400和600 MPa HP处理诱导不溶性聚集物向可溶性聚集物转化，改善KPI的溶解度（PS）。

关键词：芸豆分离蛋白；聚集；解离；高静压；溶解度
文章篇号：1673-9078(2012)3-252-255

Effect of High Pressure on Aggregation Behavior of Kidney Bean (*Phaseolus Vulgaris* L) Protein Isolate

LI Kang-kang, MA Wen, YIN Shou-wei, TANG Chuan-he, YANG Xiao-quan, QI Jun-ru
(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The influence of high pressure (HP) treatment (200-600 MPa) on molecular distribution of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L) protein isolate (KPI) was investigated by High-performance size-exclusion chromatography combined with multi-angle laser light scattering technique (HPSEC-MALLS), to explore the possible HP-induced protein association-dissociation behavior. The molecular weight (Mw) of phaseolin, the major component in KPI, calculated based on the Debye plot, was about 161 kDa. HP treatment at 200 MPa led to dissociation of soluble aggregates (at void volume), while HP treatment at 400 and 600 MPa led to dissociation of insoluble aggregates in KPI, thus improved PS.

Key words: kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein; association; dissociation; high pressure; solubility

*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（蛋白质量容易调控），结构独特的特点，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。芸豆籽粒含丰富的蛋白质（20~30 %干基），氨基酸组成相对较均衡[1]。目前芸豆蛋白利用率还较低，是一种潜在的豆类蛋白资源[2]。

芸豆球蛋白（phaseolin）具有良好的功能特性，如在中性和碱性下几乎能完全溶于去离子水中，其乳化活性指数甚至超过乳化标准物酪蛋白或清蛋白；而分离蛋白（KPI）功能特性相对较差，这主要源于在蛋白制备过程中酸碱诱导下蛋白构象的改变[3,4]。分离蛋白是豆类蛋白资源（如大豆）的主要利用形式，芸豆分离蛋白较差的功能特性在一定程度上限制这类蛋白资源在食品加工中的应用。因而对芸豆分离蛋白改性可以增进芸豆蛋白资源的利用。本课题组研究了高压微射流处理对芸豆蛋白物化和功能特性的影响，结果表明芸豆蛋白具有紧凑的空间构象和较高的热稳定性，高压微射流处理可破坏维系蛋白聚合物之间的次级相互作用力，诱导不溶性蛋白聚合物解聚，改善蛋白质的溶解度和乳化活性指数；但不影响维系蛋白二级、三级构象的次级相互作用力[3]。

高静压处理技术被认为是食品加工最有潜力和发展前途的一种物理改性技术。近些年来高静压对球蛋白物化性质、功能特性和分子构象的影响引起了广泛关注[4,5]。高压对蛋白影响不仅取决于外部因素，如pH，温度，离子强度等，也与及蛋白分子结构构象相关，如分子内二硫键的含量和分子间疏水性相互作用力的强弱等因素。高压处理可以破坏分子内部的疏水相互作用力和静电相互作用力，氢键对高压处理不敏感。高压处理主要是影响蛋白质的三级和四级结构，而对蛋白质二级结构影响较小[6,7]。与乳蛋白相比，植物蛋白的高压修饰研究比较少，对于芸豆蛋白的相关研究尚未见报道。本文采用高效排阻色谱–光散射–折光联用技术（SEC-MALLS-RI）研究高静压对芸豆分离蛋白解离–聚集行为的影响。

收稿日期：2011-08-30
基金项目：广东省自然科学基金资助项目(10451064101005149)
作者简介：黎亢抗(1989-)，男，硕士研究生，主要从事植物蛋白研究
通讯作者：尹寿伟(1980-)，男，讲师，主要从事植物蛋白研究

1 材料与方法

1.1 试验材料和仪器

材料：芸豆分离蛋白，自制；牛血清白蛋白（BSA），美国 Fitzgerald 公司；牛血清白蛋白（monomer），Sigma 公司；其它化学试剂均为国产分析纯。

仪器：Dynamic light scattering、UV detectors 和 RI detectors （ Wyatt Technology Corp ）；UUPF/3L/700MPa 超高压处理设备，内蒙古包头科发新型高技术食品机械有限责任公司；2501PC 紫外-可见分光光度计，日本岛津公司；CR22G 高速冷冻离心机，日本日立公司。

1.2 实验方法

1.2.1 芸豆分离蛋白的制备

芸豆分离蛋白的制备采用碱提-酸沉工艺。市售红芸豆经过脱皮、冻干、粉碎、脱脂后风干制成脱脂芸豆粉。100 g脱脂芸豆粉分散于2 L去离子水（1:20，g/mL）中，用2 mol/L的NaOH调分散液pH至8.0，间歇添加NaOH以维持溶液的pH值，室温下搅拌2 h，后于20 ℃离心（12000 *g*，30 min），弃其沉淀物，调节上清液的pH为4.5，而后离心（6000 *g*，20 ℃，20 min）。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2 mol/L的NaOH将pH调到7.0，冷冻干燥后贮存于-20 ℃备用。

1.2.2 高静压处理

超高压处理设备UUPF/3L/700Mpa，传压介质为葵二酸二辛酯，最高工作压力为700 Mpa，腔体容积为3 L。高压腔外壁为循环水，压力、温度和时间等参数通过计算机自动记录。

将一定量的芸豆分离蛋白溶液（30 mg/mL）装入聚乙烯塑料袋，经真空密封、热封后置于高压腔内，旋紧上盖后进行高静压处理。升压速率和降压速率均为250 MPa/min，达到压力后保压20min。蛋白质溶液分别在200±10、400±10和600±10 Mpa压力下处理。控制高压腔外壁循环水的温度为25 ℃。高压处理后的蛋白样品经冷冻干燥后置于-20 ℃保存备用。

1.2.3 溶解度测定

称取100 mg蛋白样品分散于10 mL的去离子水中，磁力搅拌30 min，然后用1 mol/L NaOH或HCl调节溶液的pH到7.0，再搅拌30 min后，在20 ℃离心（12000 *g*，20 min）。上清液经过适度稀释，采用福林酚法测定蛋白质含量[8]，以牛血清白蛋白为标准物制作标准曲线。蛋白质的溶解度表示为上清液质量蛋白浓度占总蛋白浓度的百分比。

1.2.4 分子量分布

采用高效排阻色谱（HPSEC）和多角度激光光散射（MALLS）联用技术研究高静压对芸豆分离蛋白分子量分布的影响，按照Zhao等报道的方法[9]。色谱条件如下：两根TSK柱（G4000 PW_{XL} + TSK G6000 PW_{XL}）串联，分离的分子量范围为2000~8000 000 Da，流动相为50 mM磷酸缓冲液（包含50 mmol/L NaCl，pH 7.4）。流动相先过0.2 μm膜，而后再过0.02μm过滤膜。采用两个辅助的模拟信号输入确保外部检测器如折光（RI）和紫外（UV）检测器的顺畅连接。为了避免余压对折光（RI）检测器的影响，A Dawn EOS photometer检测器置于色谱柱和紫外（UV）检测器之后，折光（RI）检测器之前。动态光散射采用QELS在线测试单元（Wyatt Technology Corp.，Santa Barbara，CA）。安装在MALLS检测器read head部位的光纤接收器用于计数。采用ASTRA软件分析和处理色谱数据，排阻色谱图中各组分的分子量计算根据Debye plot方法[9]。dn/dc几乎不具有氨基酸组成依赖性，其值为±0.185，n和c分别代表每个数据单元的折光指数和样品浓度。

实验中采用多模式分析得到粒径分布，所获得的值具有很好的一致性及可重复性；操作温度为室温，波长和散射角度分别固定在632 nm和90°，固定在90°所得值对评价平均粒径的变化具有重要作用。牛血清白蛋白（BSA）单体被用来标准化各类检测器信号，基于90°激光检测器信号。

2 结果与讨论

2.1 溶解度

高静压处理对芸豆分离蛋白溶解度（pH=7.0）的影响如图1所示。对照芸豆分离蛋白（KPI）的溶解度约77%，高于Di Lollo等报道碱提酸沉得到的无定形态的芸豆分离蛋白（约65.7%），而低于柠檬酸-冷沉技术所得到的晶态芸豆蛋白（85~90%）[10]。高静压处理对芸豆分离蛋白溶解度的影响依赖于所施压力水平。200 MPa高静压处理对芸豆分离蛋白的溶解度没有明显的影响（P>0.05），400和600 MPa高静压处理显著改善芸豆分离蛋白的溶解度（P<0.05），见图1。这一结果与排阻色谱分析结果是相一致的(见图4)。高静压处理400和600 MPa改善芸豆分离蛋白的溶解度主要源于压诱导不可溶性聚合物向可溶性聚合物转变。Puppo等研究高静压处理对大豆分离蛋白的溶解度的影响，报道了相似的结论[11]。而Chapleau等研究高压处理对羽扇豆蛋白溶解度的影响，指出在压力200 MPa或更高情况下，高静压处理诱导蛋白溶解度下降（出现蛋白聚集行为）[12]。这种差异主要归因于蛋白种类（11S或7S球蛋白）和构象稳定性的不同。

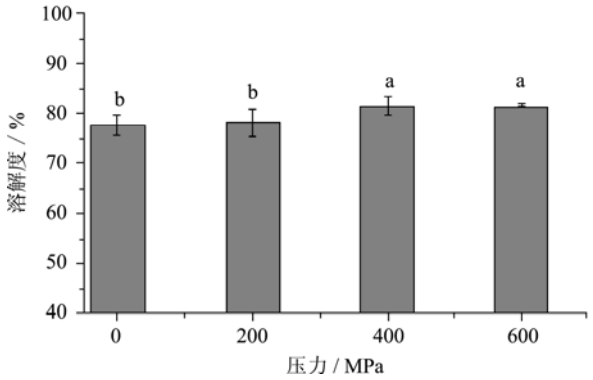


图 1 对照和高静压处理芸豆分离蛋白的溶解度

Fig.1 Solubility of the kidney beanprotein isolate with or without high pressure (HP) treatment

注：不同字母(*a-b*)表示溶解度差异的显著性($P < 0.05$)

2.2 SEC-MALLS-RI 分析

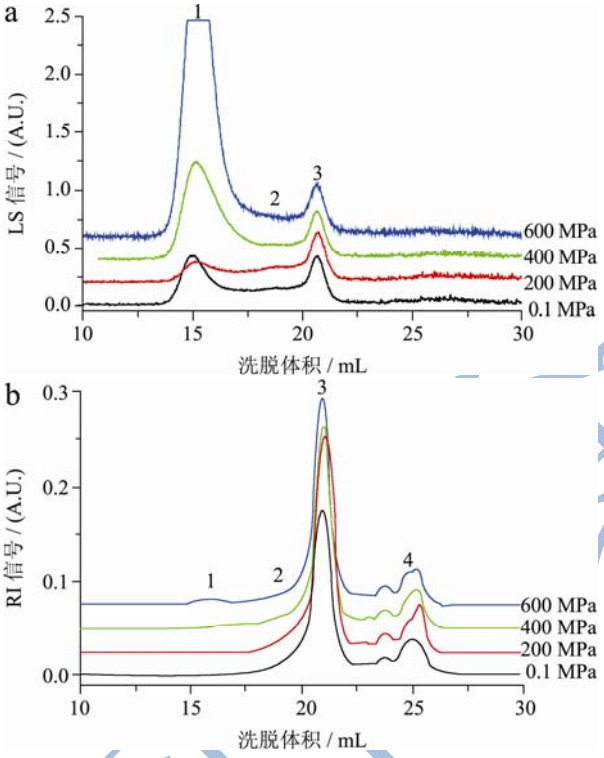


图 2 对照样品和高压处理芸豆分离蛋白(KPI)的 SEC-MALLS-RI 图谱

Fig.2 SEC-MALLS-RI diagrams of the kidney beanprotein isolate with or without high pressure (HP) treatment

注：a-多角度激光光散射(90°)作为检查器；b-折光检测器(RI detection)。

图2a和2b分别是以多角度激光光散射（MALLS）和折光（RI）作为检测器的高效排阻色谱图。在对照样品的折光（RI）图中，主要的洗脱峰出现在洗脱体积为20.6 mL处，其前后出几个弱的洗脱峰（图2b）。在相应的MALLS图中，在洗脱体积为15.0 mL存在一个明显的洗脱峰（Peak 1）。此外。在Peak 1和Peak 3之间存在一个弱的肩峰（Peak 2）（图2a），表明在对照芸豆分离蛋白中存在少量的蛋白聚集物，Peak 2的RI信号非常弱，几乎看不见。根据Debye plot方法，结合LS和RI信号（见图3），计算得到主要洗脱峰（Peak 3）分子量为161 kDa，这与通常而言的球蛋白(vicilin)分子量相一致的（三聚体形式），计算得到肩峰（Peak 2）的分子量大概为6.2×10^5 Da（标准偏差为4%），表明主要是芸豆球蛋白（Phaseolin）的三聚体。从RI图中可以看出，芸豆球蛋白（包括Peak 3和Peak 2），占总芸豆分离蛋白约78%。这一结果表明芸豆蛋白中富含vicilin组分，此外Peak 4可归属于芸豆蛋白中的清蛋白或其它低分子量组分。

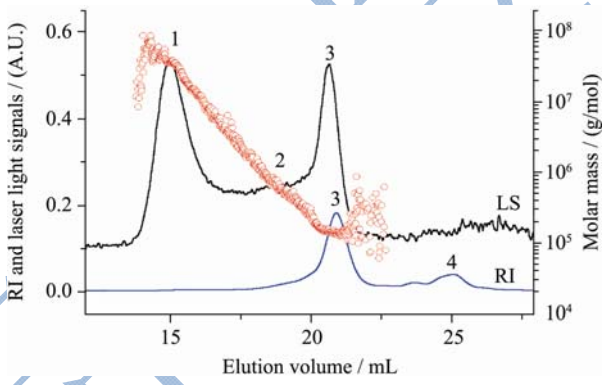


图 3 芸豆分离蛋白(KPI)的 SEC-MALLS (at 90°)-RI 信号和分子量分布图

Fig.3 The molecular weight distribution of the kidney beanprotein isolate with or without high pressure (HP) treatment

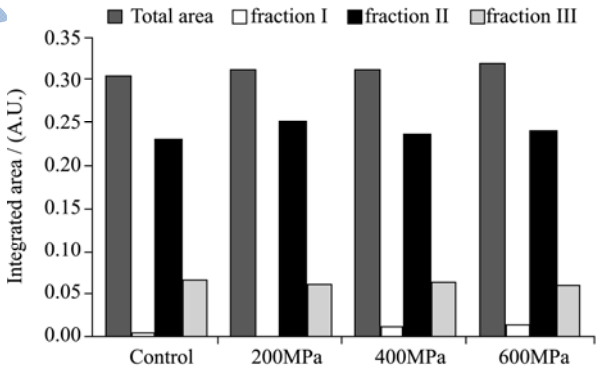


图4 对照样品和高压处理芸豆分离蛋白(KPI)的排阻色谱峰面积分布图

Fig.4 High-performance size-exclusion chromatogram of the kidney beanprotein isolate with or without high pressure (HP) treatment

注：Fraction I：洗脱体积小于 17.5 mL 的洗脱峰面积(peak 1)；Fraction II：洗脱体积 17.5-23.0 mL (peaks 2 and 3)的峰的积分面积；Fraction III：洗脱体积大于 23.0 mL (peak 4 and others)的洗脱峰积分面积。

高静压处理（200~600 MPa）对芸豆分离蛋白分子量分布（LS和RI作为检测器）的影响如图3所示。以RI

作为检测器的洗脱峰积分面积图，见图4。200 MPa高静压处理不影响芸豆分离蛋白的总洗脱峰积分面积，400和600 MPa高静压处理导致芸豆分离蛋白的总洗脱峰积分面积增加。这与溶解度分析结果是相一致的，表明高静压处理（400和600 MPa）改善芸豆分离蛋白质的溶解度（pH 7.4）。随着压力增加，洗脱峰积分面积呈现不同的变化趋势。200 MPa高静压处理降低空体积处的聚集物峰（Fraction I）的积分面积，增加Fraction II的积分面积，表明200 MPa高静压处理诱导聚Peak 1转化成为Peak 2或3（见图3），200 MPa高压处理相应地降低Peak 1的LS信号（见图2a），表明200 MPa高压处理导致可溶性聚集体解离，而不影响高分量的不溶性聚集体。400和600 MPa高静压处理诱导Peak 1（空体积出）的LS和RI信号增强（图2a和2b），但几乎不影响Peak 2、3和4的积分面积（见图4）压力高于200 Mpa主要造成不溶性聚集体解离，造成可溶性聚集峰信号和积分面积增加。因此，400和600 MPa高静压处理诱导的总积分面积的增加，改善芸豆分离蛋白的溶解度，主要源于高静压诱导不溶性聚合物向可溶性聚集物转化。

3 结论

采用排阻色谱-多角度激光光散射-折光联用技术（SEC-MALLS-RI）研究高静压处理（HP）对芸豆分离蛋白分子量分布的影响规律，揭示HP导致KPI聚集-解离行为。根据Debye plot方法，计算出芸豆球蛋白的绝对分子量为161 kDa，200 MPa HP处理解离KPI的可溶性聚集物，而400和600 MPa HP处理诱导不溶性聚集物向可溶性聚集物转化，改善KPI的溶解度（PS）。

参考文献

[1] Sathe S K. Dry bean protein functionality [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2002, 22: 175-223

[2] 李家燕,唐传核,曹劲松,等.糖苷化对芸豆分离蛋白功能性质的影响[J].现代食品科技,2009,25(6):584-591

[3] Yin S W, Tang C H, Wen Q B, et al. Functional and conformational properties of phaseolin (*Phaseolus vulgris* L.) and kidney bean protein isolate. A comparative study. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90: 599- 607

[4] 陈玲,唐传核.热致芸豆 7S 球蛋白透明凝胶性能研究[J].现代食品科技,2010,26(5):433-436

[5] 尹寿伟,唐传核,温其标,等.微射流处理对芸豆蛋白构象和功能特性的影响[J].华南理工大学学报(自然科学版). 2009, 37(10): 112-115, 123.

[6] Yin S W, Tang C H, Wen Q B, et al. Effect of micro-fluidization treatment on conformational and functional properties of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates [J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2009, 37(10): 112-115, 123

[7] Wang X S, Tang C H, Li B S, et al. Effects of high pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates [J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22: 560 -567

[8] Puppo C, Chapleau N, Speroni F, et al. Physicochemical modification of high pressure-treated soybean protein isolates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 1564-1571

[9] Balny C, Masson P. Effects of high pressure on proteins [J]. Food Review International, 1993, 9: 611- 628

[10] Silva J L, Weber G. Pressure stability of proteins [J]. Annual Review in Physics and Chemistry, 1993, 44: 89- 11

[11] Lowry O H, Rosembroug H J, Lewis A, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 19: 265- 275

[12] Zhao Y, Mine Y, Ma C Y. Study of thermal aggregation of oat globulin by laser light scattering [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52:3089-3096

[13] Di Lollo A, Alli I, Biliarderis C, et al. Thermal and surface active properties of citric acid-extracted and alkali-extracted proteins from Phaseolus Beans [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41: 24- 29

[14] Puppo M C, Speroni F, Chapleau N, et al. Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins [J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19: 289- 296

[15] Chapleau N, De Lamballerie-Anton M. Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation [J]. Food Hydrocolloids, 2003, 17: 273 - 280