花生球蛋白和伴球蛋白的功能特性及构象研究

刘岩[1]，赵冠里[2]，苏新国[1]

（1. 广东食品药品职业学院，广东广州 510520）（2. 中国农业科学院农产品加工研究所，北京 100193）

摘要：本文对花生球蛋白与伴球蛋白的结构和功能特性进行了分析和比较。结果表明，花生球蛋白在等电点附近（pH 4.5~6.0）比伴球蛋白具有更高的溶解性，而在偏离等电点时其溶解性低于伴球蛋白，伴球蛋白的乳化活性指数（70~180 m^2/g）和起泡能力（36~57%）显著高于花生球蛋白的乳化活性指数（60~130 m^2/g）和起泡能力（19~33%）（P<0.05），伴球蛋白所形成热凝胶的弹性模量值(G')约为花生球蛋白的 5 倍。花生球蛋白的变性温度 T_d（104.84 ℃）及焓变值 ΔH（13.78 J/g）显著高于伴球蛋白的变性温度（89.47 ℃）与焓变值（8.11 J/g）（P<0.05）；花生球蛋白分子表面的巯基（SH）较少，大部分巯基包裹于球蛋白分子内部，而伴球蛋白中大部分巯基暴露于分子的表面。荧光光谱分析表明，伴球蛋白比花生球蛋白具有更疏松的三级结构和更高的界面活性。

关键词：花生球蛋白；伴球蛋白；结构特性；功能特性

文章篇号：1673-9078(2013)9-2095-2101

Functional and Conformational Properties of Arachin and Conarachin

LIU Yan[1], ZHAO Guan-li[2], SU Xin-guo[1]

(1.College of Food, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

(2.Institute of Agro-food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: A comparative study was made on functional and conformational properties of arachin and conarachin isolated by ammonium sulfate. Conarachin had the higher solubility than arachin except at near pI (pH 4.5~6.0). And conarachin had better emulision ability index (70~180 m^2/g) and foam capacity (36~57%) than arachin (60~130 m^2/g and 19~33%). The G' of conarachin was 5 times higher than that of arachin. Arachin had higher denaturation temperature (104.84 ℃and ΔH value 13.78 J/g) than conarachin (89.47 ℃ and 8.11 J/g) (P<0.05). Most of free SH of arachin was buried in the interior, but located at the surface of conarachin.. Compared with conarachin, arachin had more compacted tertiary conformation and lower surface hydrophobicity.

Key words: arachin; conarachin; conformational properties; functional properties

花生是主要的油料作物之一。脱脂花生粉中含有 47~55%的优质花生蛋白，花生蛋白中主要的蛋白质组分为花生球蛋白和伴球蛋白，约占花生总蛋白含量的 75%[1]。花生球蛋白和伴球蛋白的提取分离通常是先采用 pH 7.9 的磷酸缓冲液将花生蛋白从脱脂花生粉中提取出来，再利用两种组分在不同饱和度的硫酸铵溶液中的溶解度不同进行分步沉淀分离[1]。前人对这两种组分在植物学领域已经做了许多深入的研究，尤其在分离鉴定花生球蛋白及其亚基的组成和数目方面做了大量的工作，众多研究者已经通过不同的方法，例如 Native/SDS 凝胶电泳、等电聚焦电泳或高效液相色谱等手段，表征了花生伴球/球蛋白的亚基组成及其数量、等电点和分子量分布等[2]。但目前对花生蛋白亚基数目与构成方面仍然存在许多争论。如：在已有的文献资料中，报道的球蛋白亚基的数目仍然不统一，其次球蛋白单聚体与二聚体间的交联-解聚现象是否存在并且是否可逆等等[2]。蛋白质在加工时的工艺性质如溶解性、起泡性、凝胶性、热凝聚性、乳化性与植物蛋白的分子量分布、亚基的大小/组成、亚基的解离/聚合性质、二硫键多寡及其热稳定性、亲水/疏水性有密切的关系。花生球蛋白与伴球蛋白具有不同的亚基组成和结构，在宏观上表现为具有不同的物化特性，针对这两种组分的构效关系研究对花生蛋白的分子修饰及其功能特性的改良具有十分重要的指导意义。在本文中，将采用相对简单易于操作的饱和硫酸铵分级沉淀的方法，将花生球蛋白与伴球蛋白尽可能地分离纯化出来，并对其结构与功能特性进行研究。

1 材料与方法

收稿日期：2013-04-05

基金项目：国家自然科学基金资助项目（31201458）；中国博士后科学基金（2012M510624）

作者简介：刘岩（1980-），男，博士，讲师，从事蛋白质化学工程的研究

通讯作者：赵冠里（1980-），男，博士后，从事蛋白质化学工程的研究

1.1 原料

花生，购于山东鲁花集团；花生脱红衣后用正己烷脱脂，使脂肪含量少于 1%，脱脂后至于通风处使溶剂挥发完全。把脱脂花生粉碎至 150 μm，从而得到脱脂花生粉。牛血清白蛋白（BSA），Folin&Ciocalteu`s Phenol Reagent（F-9252），1-苯胺基-8-萘磺酸（ANS），5-5'-二硫代-2-硝基苯甲酸（DTNB），乙二胺四乙酸（EDTA）等购于 Sigma Chemical Co. Ltd(StLouis, MO, USA)，其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

荧光分光谱仪，冷冻干燥机，精密 pH 计，差示扫描量热仪，高速冷冻离心机，紫外-可见分光光度计等。

1.3 实验方法

1.3.1 花生球蛋白与伴球蛋白的制备

花生脱壳，晾晒，脱红衣后粉碎，油脂用正己烷常温提取 5 次（油脂含量<1%），残留溶剂在空气中挥干，制得花生脱脂粉。制备花生球蛋白和伴球蛋白采用 Chiou[1]等报道的提取方法。脱脂花生粉按 1:20 的比例加入含 0.5 mol/L NaCl，pH 7.9 的磷酸盐缓冲溶液中，在室温下搅拌 2 h 后，于 3500×g，4 ℃下离心 30 min。上清液加入硫酸铵使溶液饱和度达到 40%，在 4 ℃下搅拌 1 h 后，再于 3500×g，4 ℃下离心 30 min，沉淀用上述磷酸盐缓冲液按 1:5 的比例复溶，透析 48 h 并冷冻干燥后得到花生球蛋白。离心后的上清液加入硫酸铵使其饱和度达到 60%，在 4 ℃下搅拌 1 h 后，于 3500×g，4 ℃下离心 30 min。所得上清液继续加入硫酸铵使溶液饱和度达到 85%，在 4 ℃下搅拌 1 h 后，于 3500×g，4 ℃下离心 30 min，所得沉淀用磷酸盐缓冲液按 1:5 的比例复溶，透析 48 h 并冷冻干燥后得到花生伴球蛋白。

1.3.2 SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 根据 Laemmli (1970)[3]报道的方法，分离胶浓度为 12%，浓缩胶浓度为 4%。样品制备：蛋白样品溶于 SDS-PAGE 样品缓冲液（0.125 mol/L Tris-HCl 缓冲液，含 1%（*m/V*）SDS、2%(*V/V*)巯基乙醇、5%（*V/V*）甘油和 0.025%(*m/V*)溴酚蓝，电泳前煮沸 5 min。上样量为 10 μL，凝胶电泳于恒流模式下进行，在浓缩胶中电流 40 mA，进入分离胶后增至 80 mA。凝胶染色液采用 0.25%考马斯亮蓝（R-250）溶液，采用高甲醇的醋酸溶液脱色，甲醇/冰乙酸/去离子水按 227:37:236（*V/V/V*）。

1.3.3 热学特性分析

参照 Meng 等人[4]的方法，采用差示扫描量热法（Differential Scanning Calorimetry，DSC）分析蛋白热特性。10%的球蛋白或伴球蛋白分散液在室温下放置 1 h 后，吸取 10 μL 蛋白分散液至铝盒，压盘，以空盘为对照。温度扫描范围：0~120 ℃；升温速率：10 ℃/min；保护气氮气流速：50 mL/min。采用 the universal analyzer 2000 软件计算蛋白质的变性温度(T_d)、半峰宽($\Delta T_{1/2}$)和焓变值(ΔH)。所有的实验结果为三次测定值的平均值。

1.3.4 巯基含量测定

巯基含量测定采用经 Beveridge 改进后的 Elman 法[5]。主要是试剂配置及测试方法如下：

A：Tris-Gly 缓冲液（pH 8.0）：精确称取 10.418 g Tris，6.756 g 甘氨酸，1.489 g EDTA 二钠，加去离子水定容至 1000 mL。

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

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

总巯基和暴露巯基含量测定：添加 15 mg 花生球蛋白或伴球蛋白至 5.0 mL 测试液中（A 用作暴露巯基含量的测试液，B 用作总巯基含量的测试液），添加 50 μL C 溶液，在 25 ℃保温 1 h 后，于 25 ℃离心（13600×g，10 min），上清液在 412 nm 比色。巯基含量的计算公式如下：

$$SH(\mu mol/g)=73.53\times A_{412}\times D/C \quad (1\text{-}1)$$

注：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。

1.3.5 二硫键含量

NTSB的合成根据Tannhauser报道的方法[6]。0.1 g DTNB分散于10 mL 1 mol/L Na_2SO_3溶液中，调节反应液pH值至7.5，添加50 μL 0.1 mol/L $CuSO_4$的氨溶液，反应在38 ℃进行。通过412 nm吸光度值来监控反应液中残余的 2-nitro-5-thiobenzoate(NTB-)量的变化，当超过99%的DTNB转化成NTSB后，终止反应。NTSB储液在-20 ℃保存备用。

NTSB测试液的制备：将NTSB储液用新配置的0.2 M Tris-base缓冲液（含0.1 mol/L Na_2SO_3，10 mmol/L EDTA和3 mol/L异硫酸胍）按1:100（*V/V*）稀释，而后调节pH值至9.5得到NTSB测试液。

二硫键的测定根据经 Petruccelli[7]等改进后的 Thannhauser 的方法，50 mg 蛋白质分散于 100 μL Tris-base 缓冲液中，取 100 μL 蛋白溶液至 3 mL 新配

的 NTSB 测试液中。在 25 ℃保温 1 h 后，于 25 ℃离心(13600×g，10 min)，以 NTSB 测试液为参比，上清液在 412 nm 比色。

1.3.6 荧光光谱分析

采用 RF-5301 PC 荧光分光光度计测定花生球蛋白或伴球蛋白的荧光光谱。蛋白分散于 10 mmol/L 磷酸缓冲液（pH 7.0）中，蛋白浓度为 0.15 mg/mL。荧光发散光谱分析以蛋白质分子内部的荧光基团为探针，为了降低酪氨酸的贡献，荧光光谱在 290 nm 激发，扫描发散光谱为 300~400 nm，激发和发射狭缝宽均为 5 nm。

1.3.7 溶解度测定

蛋白质的溶解度测定根据 Petrucelli&Anon（1994）报道的方法[8]。称取 100 mg 蛋白样品分散于 10 mL 的去离子水中，室温下磁力搅拌 30 min，然后用 1 mol/L NaOH 或 HCl 溶液调节溶液的 pH 值到 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后，采用福林酚法测定蛋白质含量，以牛血清白蛋白（BSA）为标准物做标准曲线。蛋白质的溶解度表示为上清液蛋白浓度占总蛋白浓度的百分比。每个样品测定三次。

1.3.8 乳化特性测定

乳化特性的测定采用 Wang 等人的方法[9]。在测试管中分别加入 15 mL 0.1%（*m/V*）蛋白质溶液（pH 值分别为：3.0、5.0、7.0 和 9.0）和 5 mL 玉米油，乳液经高速均质机（24000 r/min）处理 1 min 后，从测试管底部取出 50 μL 乳液，用 0.1%（*m/V*）的 SDS 稀释 100 倍后，于 500 nm 比色。乳化活性指数（EAI，m^2/g）和乳化稳定性指数（ESI，min）的计算公式如下：

$$EAI(\mathrm{m}^2/g)=\frac{2\times 2.303\times A_0\times DF}{C\times\phi\times\theta\times 10,000} \quad (1\text{-}2)$$

$$ESI(\mathrm{min})=\frac{A_0}{A_0-A_{10}}\times 10 \quad (1\text{-}3)$$

注：DF 为稀释因子，DF=100；ρ 为蛋白浓度，g/mL；φ 为光程，φ=0.01 m；θ 为油相所占分数，θ=0.25；A_0、A_{10} 分别为 0 min 和 10 min 时的吸光度。

1.3.9 起泡特性测定

起泡能力（FC）按照 Fernandez 等（1997）[10]的方法测定。10 mL 1%的花生球蛋白或伴球蛋白悬浮液分别调节 pH 值至 3.0、5.0、7.0 和 9.0，在常温下搅拌 1 h 后倒进 25 mL 的量筒中，在 10000 r/min 的均质速度下均质 3 min。蛋白质的起泡能力表示搅拌过程中蛋白质悬浮液增加的体积百分比。

1.3.10 小振幅动态振荡测量

参照 Zhu 等的实验方法[11]。动态粘弹流变实验于哈克 RS600 流变仪中进行，所采用的平行板直径为 27.83 mm。样品分散液置于平行板之间，其间隙设置为 1 mm。除去过量的样品，在样品裸露部位添加一薄层硅化油，以防止水份的蒸发。在不同时间及动态振荡频率，记录弹性模量(G′)、损耗模量(G″)、相角(δ)。为了确保所有测量是在线性粘弹范围内进行的，首先要在剪切振荡频率(f)为 0.5 Hz 时进行第一次剪切应力范围扫描。为了促使形成热凝胶，花生球蛋白或伴球蛋白的分散液从 25 ℃被连续地加热至 95 ℃(升温速率为 2 ℃/min)，在 90 ℃保持 20 min，后以 2 ℃/min 的降温速率冷却至 25 ℃。加热及冷却过程中，都记录下 G′、G″及其它参数数值的变化。形成凝胶之后（完成加热-保温-冷却循环后），于 25 ℃下对凝胶进行频率扫描（0.1~10.0 Hz）。所采用的频率及应变分别为 1 Hz 和 1%。

1.3.11 统计分析

实验中所有数据都是三次测定的平均值，利用一维方差分析的 LSD 或 Tamhane 比较样品平均值之间的差异显著性。

2 结果与讨论

2.1 SDS-PAGE 电泳分析

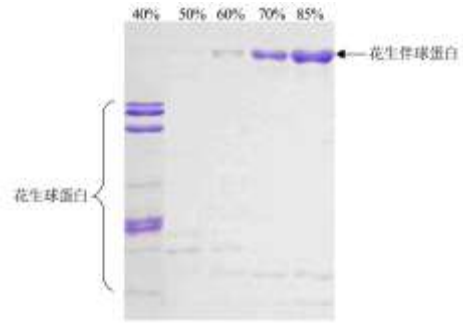


图 1 不同饱和度的硫酸铵溶液对花生蛋白组分分级提取物的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE of arachin and conarachin isolated by ammonium sulfate

图 1 为在分级沉淀的过程中，硫酸铵的饱和度每次只增加 10%的梯度所获得分离蛋白组分的 SDS-PAGE 图谱。由图 1 可知，以 40%的硫酸铵浓度沉淀，可以获得相对较纯的花生球蛋白组分，弃去硫酸铵浓度在 40%至 70%之间提取分离的球蛋白与伴球蛋白混合共存的部分，硫酸铵浓度在 70%至 85%分离提取的组分可被认为是相对较纯的花生伴球蛋白组分。

2.2 热差示扫描分析（DSC）

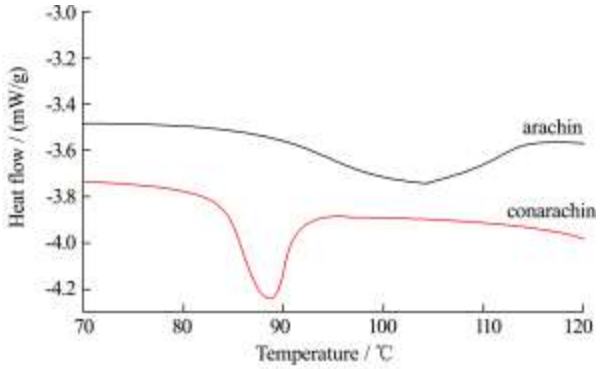


图 2 花生球蛋白与伴球蛋白的 DSC 图谱

Fig.2 DSC of arachin and conarachin

表 1 花生球蛋白和伴球蛋白的热学特性

Table 1 Thermal transition characteristics of arachin and conarachin

	Td/℃	ΔH/(J/gprotein)	ΔTd/℃
arachin	104.84±0.16[a]	13.78±0.57[a]	16.54±0.57[a]
conarachin	89.47±0.23[b]	8.11±0.31[b]	5.06±0.12[b]

注：不同的上标表示同一列不同处理方式样品差异显著性（$p<0.05$）。

图 2 为花生球蛋白与伴球蛋白的热差示扫描（DSC）图谱，详细的热学参数见表 1。如图 2 所示，在伴球蛋白与花生球蛋白样品的热差示扫描（DSC）图谱分别仅呈现一个吸热峰，它们分别位于 89.47 ℃和 104.84 ℃。表明花生球蛋白相对伴球蛋白具有更高的热稳定性。由表 1 可知，花生球蛋白的变性焓为 13.78 J/g，高于伴球蛋白的焓变值 8.11 J/g，表明在相同质量的情况下，花生球蛋白比伴球蛋白具有更多有序的空间构象以及维持空间构象所需要的疏水键、二硫键和离子键等功能性官能团。此外，半峰宽主要反映蛋白在热变性过程中的协同性[12]，表 1 中球蛋白与伴球蛋白的半峰宽分别为 16.54 ℃和 5.06 ℃，说明花生伴球蛋白在较窄的温度范围内即可达到完全的变性，即具有较好的变性协同性，而花生球蛋白则具有较高的变性焓值和较差的变性协同性。

2.3 巯基/二硫键的含量与分布

巯基和二硫键是蛋白质分子中稳定蛋白质构象的重要的化学键。蛋白分子中具有较高的巯基/二硫键含量，可通过巯基氧化或巯基/二硫键的交换反应诱导蛋白质之间的相互交联/聚集。花生球蛋白和伴球蛋白的巯基和二硫键含量如图 3 所示，图中 Exposed SH、Total SH 和 SH-SH 分别代表暴露巯基、总巯基和二硫键，其中总巯基包含暴露在分子表面和包埋在分子内部的巯基。如图 3 所示，花生球蛋白中暴露巯基、游离巯基和二硫键含量分别为 3.46、19.34 和 7.94 μmol/g，而伴球蛋白中暴露巯基、游离巯基和二硫键含量分别为 8.07、13.01 和 2.47 μmol/g。球蛋白中暴露巯基的含量仅约为伴球蛋白中暴露巯基含量的一半，而花生球蛋白中总巯基和二硫键的含量则显著高于伴球蛋白中总巯基与二硫键的含量，这一结果表明分布于花生球蛋白分子表面的巯基较少，大部分巯基包裹于球蛋白分子内部，而伴球蛋白分子中大部分巯基暴露于伴球蛋白分子的表面。球蛋白与伴球蛋白这一结构特性的差异，将有可能影响到两种蛋白组分的热特性和凝胶特性。

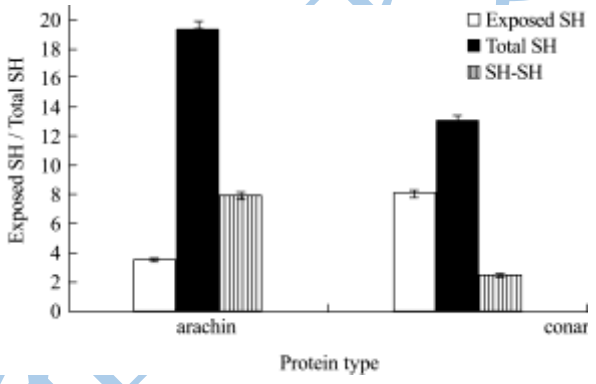


图 3 花生球蛋白与伴球蛋白的暴露巯基、总巯基和二硫键含量

Fig.3 Free sulfhydryl contents (total and exposed), disulfide bond contents of arachin and conarachin

2.4 荧光光谱分析

如图 4A，ANS 与花生球蛋白和伴球蛋白的复合物的荧光峰分别在 471 nm 和 463 nm 处，而 ANS 在水溶液中的荧光峰在 509 nm 处。荧光峰蓝移，表明 ANS 与蛋白结合后其微环境的非极性(疏水性)增加。花生伴球蛋白蓝移更为明显（从 509 nm 蓝移至 463 nm），表明伴球蛋白表面具有更强的疏水性。ANS 与伴球蛋白复合物具有更强荧光强度也表明伴球蛋白的表面疏水性比花生球蛋白的表面疏水性更强。

用 290 nm 作为激发波长，所得到的主要是色氨酸为发射基团的荧光光谱，反映色氨酸微环境极性的变化，是一种比较灵敏的反映三级结构变化的技术手段。图 4 B 为花生球蛋白与伴球蛋白的荧光光谱皆是典型的色氨酸荧光光谱。荧光峰分别在 318.6 nm 和 343.4 nm 处，表明色氨酸残基位于花生球蛋白或伴球蛋白的疏水性区域，如蛋白分子内部[13]。相对与伴球蛋白，花生球蛋白的荧光峰发生了蓝移，表明花生球蛋白内部色氨酸残基位于更加疏水的微环境中，球蛋白内部包裹了更加丰富的疏水性基团，与伴球蛋白相比具有更加紧凑的三级结构。

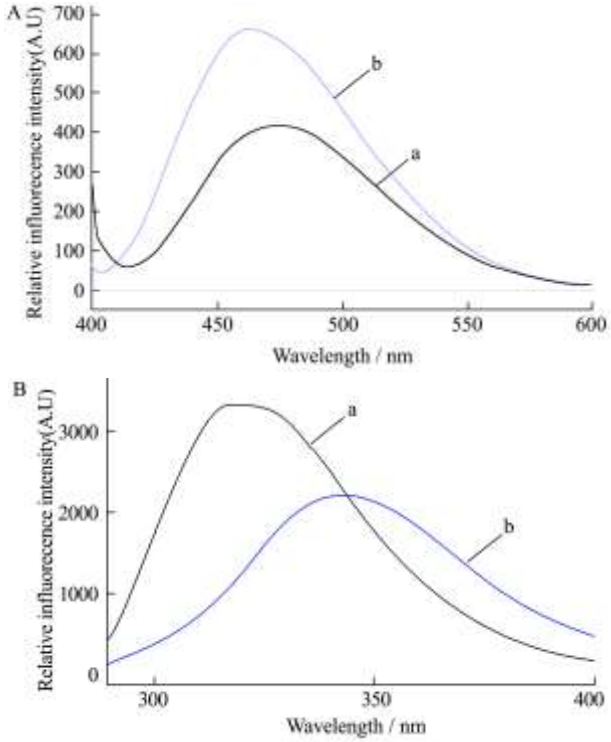


图 4 花生球蛋白及伴球蛋白的（A）外部荧光发射光谱；（B）内部荧光发射光谱

Fig.4 (A) The extrinsic emission fluorescence spectra of ANS in the presence of tested samples (B) The intrinsic emission fluorescence spectra of the proteins in tested samples

注：a：花生球蛋白（arachin）；b：伴球蛋白（conarachin）。

2.5 溶解性

蛋白的功能特对蛋白资源利用至关重要，而蛋白质的多数功能特性在一定程度上取决于其溶解度。本研究分析了花生蛋白中球蛋白与伴球蛋白的溶解特性，结果如图 5 所示。其溶解性-pH 是一条 U 形曲线，最低溶解度出现在蛋白质的等电点附近。花生伴球蛋白在 pH 2~4 和 pH 7~10 两个区域的溶解度比花生球蛋白高，花生球蛋白在接近等电点的 pH 4.5~6 的区域溶解性相对比伴球蛋白更好。蛋白质分子的结构与组成决定其功能特性，因此两种蛋白质组分溶解性的差异可以根据它们结构特性的差异来解释。由两种蛋白组分的暴露巯基与分子内巯基含量分布数据可知（图 3），暴露在球蛋白分子表面的巯基含量相比伴球蛋白低，而与此同时伴球蛋白表面疏水性值显著高于球蛋白的表面疏水性值。当蛋白质溶液 pH 值在等电点附近时，由于分子表面电荷被中和，其分子之间的斥力减弱而相互作用增强，同时，伴球蛋白表面具有更强的疏水性相互作用，巯基的氧化反应和巯基/二硫键的交换反应形成的分子间二硫键也可诱导蛋白聚集，这是伴球蛋白在等电点附近具有相对较低溶解度的原因。而当 pH 值远离等电点时，蛋白质分子在酸性或者碱性的条件下，表面的正电荷或者负电荷堆积诱导蛋白构象伸展和疏水性基团的暴露，由于花生球蛋白分子内包裹了更加丰富的疏水性氨基酸和未交联的游离巯基，所以增加了球蛋白分子间相互作用而发生聚集的几率，宏观上表现为溶解性的降低。

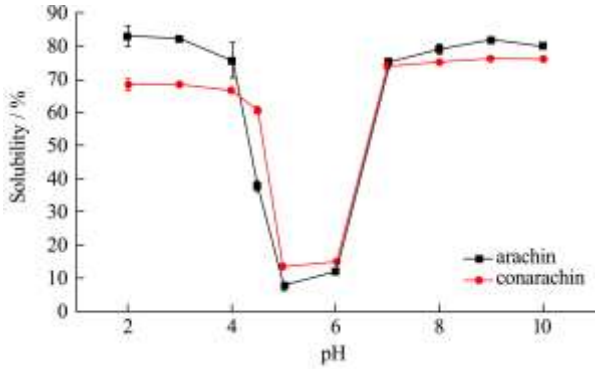


图 5 花生球蛋白与伴球蛋白的溶解性-pH 值曲线

Fig.5 Protein solubility of arachin and conarachin as a function of pH

2.6 乳化特性

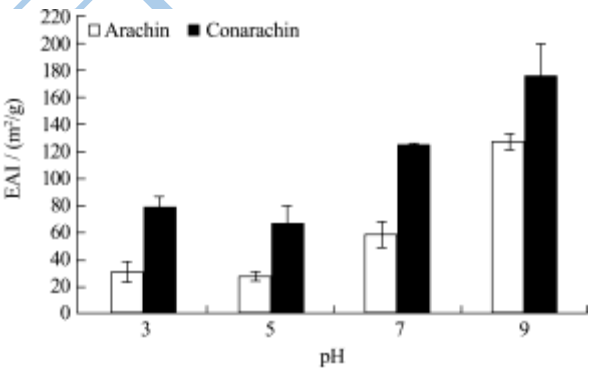


图 6 花生球蛋白与伴球蛋白的乳化活性指数-pH 值曲线

Fig.6 EAI of arachin and conarachin as a function of pH

花生球蛋白（arachin）和伴球蛋白（conarachin）乳化活性指数与 pH 的关系如图 6 所示。在测定的 pH 范围内，花生球蛋白与伴球蛋白的乳化活性指数具有 pH 依赖性。在 pH 5.0（等电点附近），乳化活性指数最低，而偏离等电点区域乳化活性指数迅速增加，在中性和碱性条件下花生球蛋白的乳化活性指数达到 60~130 m^2/g。伴球蛋白乳化活性指数呈现出相似的变化趋势，在检测范围内的 pH 条件下，伴球蛋白的乳化活性指数显著高于花生球蛋白，其乳化活性指数在 70~180 m^2/g。溶解度和表面疏水性是决定蛋白乳化特性的两个主要因素。在蛋白质溶解度较低的情况下，溶解度是决定蛋白质乳化特性的主要因素；而在蛋白质溶解度较高的情况下，表面疏水性是决定蛋白质乳化性的主要因素。本实验中，在蛋白质溶解度较高的

情况下（70~85%），伴球蛋白的表面疏水性高于花生球蛋白（如图 4A），且伴球蛋白的乳化活性指数也高于花生球蛋白。此外，在本实验条件下，花生球蛋白和伴球蛋白的乳化活性指数与蛋白质溶解度具有正相关性（见图 5、6）。McWaters 和 Holemes 研究大豆蛋白报道了相似的结果[14]。

2.7 起泡特性

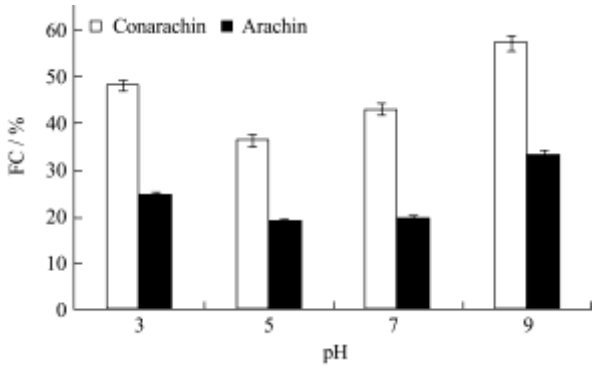


图 7 花生球蛋白与伴球蛋白的起泡能力-pH 值曲线

Fig.7 FC of arachin and conarachin as a function of pH

如图 7 所示，花生球蛋白与伴球蛋白的起泡能力-pH 曲线与它们的溶解度-pH 曲线轮廓相似，在接近等电点（pH 5.0）处起泡能力较低，在偏离等电点处则达到最高值。表明花生球蛋白与伴球蛋白的起泡能力与溶解性具有一定的相关性。伴球蛋白的起泡能力在 36~57%之间，而球蛋白的起泡能力在 19~33%之间。伴球蛋白的起泡能力显著高于球蛋白在相应 pH 下的起泡能力。蛋白质的起泡能力与蛋白质分子中暴露在外面的疏水性氨基酸数量有关。在一定的条件下，蛋白质分子的柔性越好，结构越疏松，起泡性就越好；相反，蛋白质分子结构越紧密，刚性越好，越难变性，则蛋白质的起泡性越低。由内/外部荧光光谱分析（如图 4A、4B）可知，与伴球蛋白相比花生球蛋白具有较高的表面疏水性和较好的分子柔性，而球蛋白具有较紧凑的三级结构，刚性更强，且由 DSC（图 2，表 1）分析可知，花生球蛋白相比不易变性，限制了分子肽链的展开并提供能多的疏水性基团。此外，伴球蛋白的分子表面相比具有更多的游离巯基（如图 3），当蛋白吸附于界面时，分子间大量的游离巯基相互作用更易于形成稳定的具有良好强度和粘弹性的网状蛋白质膜，从而增强其起泡能力。

2.8 凝胶特性

采用小振幅流变仪研究花生球蛋白和伴球蛋白的凝胶特性。图 8 所示为花生球蛋白和伴球蛋白的凝胶曲线。机械模量包括贮存模量（G′）和损失模量（G″）用来评价凝胶网络结构的形成，以及凝胶形成之后凝胶流变学性在保温和降温过程的变化。在加热至约 89 ℃时（接近伴球蛋白的变性温度），G′和 G″开始出现明显的增加；在接下来的升温和之后的保温阶段，G′和 G″仍然迅速增加，在随后的降温缓慢增加或者不变。而花生球蛋白的 G′和 G″在整个升温、保温和降温过程中，一直处于缓慢升高的趋势。最终伴球蛋白的弹性模量值（G′）约为花生球蛋白的 5 倍，表明伴球蛋白具有较强的凝胶形成能力。凝胶性与蛋白构型变化有密切关系，如二硫键、氢键和疏水键等。相对花生球蛋白，伴球蛋白中含有较高的巯基和二硫键含量，而巯基和二硫键含量对植物蛋白凝胶性有着关键性的影响，此外，伴球蛋白具有较高的表面疏水性，在一定的加热条件下疏水性相互作用会趋于增强。而花生球蛋白的变性温度较高，且热变性的协同性较差，在同样加热强度下不易迅速变性，从而影响了球蛋白空间结构的伸展，不能即时暴露出大量的疏水键和游离巯基。另外，球蛋白在结构比较紧凑的情况下，分子表面可用于形成二硫键的暴露巯基和疏水性基团的含量相对较低，不易令整个体系形成具有一定强度的凝胶网络。

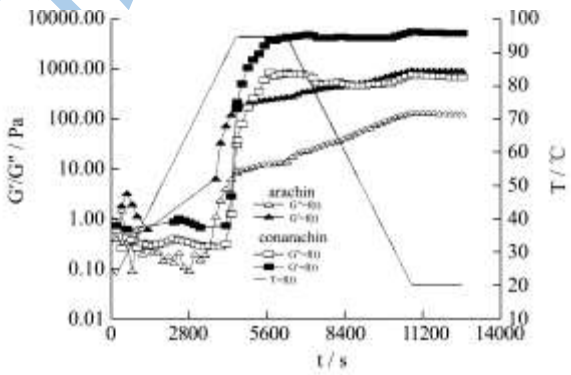


图 8 花生球蛋白和伴球蛋白的凝胶性曲线（pH 7.0）[蛋白质浓度约为 10%（*m*/*V*）]

Fig.8 Heat-induced gelation profiles of arachin and conarachin samples (pH 7.0). The protein concentration of the dispersions was about 10% (*m*/*V*)

3 结论

本文采用饱和硫酸铵分级沉淀的方法分离纯化得到花生球蛋白和伴球蛋白，采用SDS-PAGE和DSC两种手段鉴定了所制备样品的纯度，并检测了两种蛋白组分的结构及功能特性，并阐述了两者之间的构效关系。花生球蛋白比伴球蛋白具有更高的热稳定性、更复杂的空间构象和更差的变性协同性。分布于花生球蛋白分子表面的巯基较少，大部分巯基包裹于球蛋白分子

内部，相反伴球蛋白分子中大部分巯基暴露于伴球蛋白分子的表面。球蛋白内部包裹了更多的疏水性基团，与伴球蛋白相比具有更加紧凑的三级结构。伴球蛋白具有良好的溶解性和表面疏水性，其乳化活性、起泡能力和热凝胶特性皆优于花生球蛋白相应的功能特性。

参考文献

[1] Chiou Y Y. Effects of heat treatment on peanut arachin and conarachin [J]. Journal of Food Biochemistry, 1990, 14: 219-232

[2] Govindaraju K, Srinivas H. Studies on the effects of enzymatic hydrolysis on functional and physico-chemical properties of arachin [J]. LWT-Food Science and Technology, 2006, 39: 54-62

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

[4] Meng G T, Ma C Y. Thermal properties of Phaseolus angularis (red bean) globulin. [J]. Food Chemistry, 2001, 23: 453-460

[5] Ellman G D. Tissue sulfhydryl groups [J]. Arch. Biochem. Biophys, 1959, 82: 70-72

[6] Thannhauser, T W, Konishi Y, Scheraga H A. Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins [J]. Analytical Chemistry, 1984, 138, 181-188

[7] Petruccelli S, Añón M C. Partial reduction of soy protein isolate disulfide bonds. [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43: 2001-2006

[8] Petrucelli S, Anon M C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42: 2161-2169

[9] Wang J S, Zhao M M, Jiang Y M. Effects of wheat gluten hydrolysate and its ultrafiltration fractions on dough properties and bread quality [J]. Food Technology and Biotechnology, 2007, 45: 410-414

[10] Fernandez Q A, Macarulla M T. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 1997, 51: 331-34

[11] Jian-Hua Zhu, Xiao-Quan Yang, Ijaz Ahmad, et al. Rheological properties of κ-carrageenan and soybean glycinin mixed gels [J]. Food Research International, 2008, 41: 219-228

[12] Yin S W, Tang C H, Cao J S, et al. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (Cannabis sativa L.) protein isolate [J]. Food chemistry, 2008, 106: 1004-1013

[13] Lakemond C M M, Jongh H H J, Hessing M, et al. Soy Glycinin: Influence of pH and Ionic Strength on Solubility and Molecular Structure at Ambient Temperatures [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000, 48(6): 1985-1990

[14] McWaters A, Holemes M. Influence of moist heat on solubility and emulsification properties of soy and peanut fours [J]. Journal of Food Science, 1979, 44: 774-776