玉米醇溶蛋白的磷酸化修饰及结构研究

罗晶，涂瑾，黄婷玉，吴磊燕，杨武英
（江西农业大学食品科学与工程学院，江西南昌 330045）

摘要：玉米醇溶蛋白广泛应用于食品、医药、生物材料、纺织工业等领域，但蛋白不溶于水的性质限制了其应用范围。为改善其性质，本文用磷酸化修饰玉米醇溶蛋白，测定磷酸化修饰前后玉米醇溶蛋白的黏度、等电点、酸、碱稳定性等物理性质；用圆二色谱研究磷酸化修饰前后蛋白的二级结构和三级结构变化，用示差扫描量热法（DSC）测定蛋白的热稳定性。结果表明：Zein 蛋白在 80%乙醇溶液中的等电点（PdI）为 pH 5.97，粒径为 1436 nm。经磷酸化修饰后，蛋白与磷酸盐以 O-磷酸键和 N-磷酸键结合，酸性条件（pH 5.0）主要以 O-磷酸键结合为主，中性及碱性（pH 7.0 和 9.0）条件下主要以 N-磷酸键结合。同时，蛋白的黏度增加，等电点酸性漂移，α-螺旋结构含量降低，玻璃态转化温度升高。

关键词：玉米醇溶蛋白；磷酸化；黏度；结构

文章篇号：1673-9078(2015)8-88-94 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.016

Phosphorylation of Zein and Its Structure

LUO Jing, TU Jin, HUANG Ting-yu, WU Lei-yan, YANG Wu-ying
(College of Food Sciences and Engineering, JiangXi Agricultural University, Nanchang 330045, China**)**

Abstract: Zein has widespread applications in food, medicine, biological materials, and the textile industry, but its use is limited to some degree due to the insolubility in water. To overcome this drawback, zein was phosphorylated by $POCl_3$ and its physical properties of modified zein, such as viscosity, isoelectric point, as well as stability in acid and alkali were determined. Secondary and tertiary structures of zein before and after phosphorylation were measured by circular dichroism (CD), while thermal stability was determined using differential scanning calorimetry (DSC). The results showed that in 80% ethanol solution, the isoelectric point (PdI) of zein was at pH 5.97 and particle size was 1436 nm. Post modification, phosphate was combined with zein by O- and N- phosphate bonds, which mainly formed O-phosphate bonds under acidic conditions (pH 5.0) and N-phosphate bonds under neutral and alkaline conditions (pH 7.0 and 9.0). In addition, the viscosity of modified zein increased, the isoelectric point showed acidic shift, α-helix structure content reduced, and glass transition temperature increased.

Key words: zein; phosphorylation; viscosity; structure

玉米醇溶蛋白(zein)是玉米淀粉副产物玉米蛋白粉(CGM)中的主要成分，其特点是非极性氨基酸含量高，不溶于水，缺乏色氨酸和赖氨酸，营养价值低，很难被生物体利用，但其具有良好的成膜性，所成膜有一定韧性，并有光滑、耐水、耐油、防腐等特性，在特殊食品、医药、生物降解材料、纺织工业等领域有着良好的应用前景，具有重大商业价值。

收稿日期：2014-09-12

项目基金：国家自然科学基金（31260367）；江西省自然科学基金（20114BAB204026）；广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室开放基金（201302）

作者简介：罗晶（1993-），女，在读硕士研究生，植物蛋白质工程

通讯作者：吴磊燕（1973-），男，博士，副教授，研究方向：植物蛋白质工程；杨武英（1973-），女，博士，副教授，研究方向：食品质量与安全

由于玉米醇溶蛋白最显著特征是不溶于水，除非水中含乙醇、高浓度的尿素、碱（pH 11 或以上）或阴离子活性剂[1]，限制了其在工业上的应用。磷酸化修饰可改变蛋白的溶解性等性质，可导致蛋白交联作用，磷酸盐有选择地利用蛋白质侧链的活性基团，如丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)的-OH 及赖氨酸(Lys)的 ε-NH_2，增加蛋白质的黏度和凝胶性质，用于改善蛋白的成膜性[2]。目前国内外有许多学者在研究磷酸化改性蛋白，如 Li 等人用干热法磷酸化反应改善卵清蛋白的疏水性、凝胶性和热稳定性[3]。张坤生[4]等人用聚磷酸钠、三氯氧磷对大豆分离蛋白磷酸化改性，使大豆分离蛋白的溶解性、乳化性以及粘度都有不同程度的改善。潘秋琴等人用 $POCl_3$ 为花生蛋白进行了磷酸化试验[5]，发现磷酸化后蛋白的等电点降低，溶解度、乳化能力和乳化稳定性提高。可见，磷酸化修饰技术早已广泛应用于

改变蛋白质的性质，但该技术用于玉米醇溶蛋白的改性还是鲜见报道。

本文通过测定磷酸化修饰前后玉米醇溶蛋白的黏度、等电点、酸、碱稳定性等物理性质；并用圆二色谱研究磷酸化修饰前后蛋白的二级结构和三级结构变化，用示差扫描量热法(DSC)测定蛋白的热稳定性，研究三氯氧磷对玉米醇溶蛋白磷酸化修饰前后的结构性质，为扩大其应用范围及用途提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

玉米蛋白粉（corn gluten meal, CGM）：广东顺德德峰淀粉厂，蛋白质含量为 57.30%（质量分数，下同），水分为 3.85%，蛋白粉粉碎后过 100 目筛备用。无水乙醇，A.R.，广州化学试剂厂；三氯氧磷（$POCl_3$），A.R.，广州化学试剂厂；β-巯基乙醇，A.R.上海伯奥生物科技有限公司。

1.2 主要仪器与设备

酸度计，pHS-3C，上海雷磁仪器厂；黏度仪，HAAKE RS600，德国；Malvern Zetasizer 3000HS 电位仪，Nano ZS,英国 Malvern 公司；DSC100，Q100,美国 TA 公司；圆二色谱仪，MOS450，法国 Biologic 公司

1.3 实验方法

1.3.1 玉米醇溶蛋白的提取与成分分析

以玉米蛋白粉（CGM）为原料，用 80%（*V/V*）乙醇溶液在 50 ℃时从 CGM 中提取 zein，乙醇溶液:CGM＝6:1（*V/m*），用 1 N 的 NaOH 调整提取液 pH 值至 8.0，恒温搅拌 2 h 后，于 3000 r/min 转速下离心 10 min，收集上清液，置于-20 ℃冷冻 24 h，沉淀为 zein 蛋白，冷冻干燥得到淡黄色 zein 粉末。测定提取 Zein 蛋白的成分，含 90.30%的蛋白质，4.24%水分，1.07%的粗脂肪，1.91%灰分、0.80%的磷和其它 1.68%。电泳显示分子量约在 22KDa，属于 α-醇溶蛋白。

1.3.2 Zata 电位测定

将 zein 溶于 80%的乙醇-水溶剂中，配成 1 mg/mL 蛋白溶液，用带有 MPT-1 滴定仪(Malvern，英国)的 Malvern Zetasizer 3000HS 电位仪测定 25 ℃时该溶液在 pH 2~12 范围内 zein 蛋白的 zata 电位 ξ 和粒径分布，每个样品平行测定三次。

1.3.3 Zein 的磷酸化修饰及含磷量测定

1.3.3.1 Zein 蛋白磷酸化修饰

将 zein 溶于 80%的乙醇-水溶剂中，配制成 2% zein 溶液，根据 Mathesis[6]方法并稍作改动对 zein 溶液磷酸化修饰，具体过程为：将溶液调配 pH 值至 pH 5.0、7.0 和 9.0，边搅拌边用滴管逐滴加入 $POCl_3$ 于 zein 溶液中，加入量为 0.1 mL $POCl_3$/g zein（干重），并用 5 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 保持溶液在 pH±0.5 范围内，加完 $POCl_3$ 后，搅拌混合液让其反应直至溶液 pH 值稳定不变，时间约为 1~1.5 h。为保持反应体系温度不变，整个反应在 3~20 ℃水/冰浴中进行，反应液用去离子水透析 24 h，冷冻、干燥沉淀后得磷酸化修饰 zein 蛋白粉末。

1.3.3.2 蛋白中磷含量测定

钼酸比色法/GB12393-90；无机磷的测定：将磷酸化玉米醇溶蛋白完全溶解于 80%乙醇溶液，然后加入 10%的三氯乙酸(TCA)沉淀蛋白，室温下 12000 r/min 10 min，用钼蓝比色法测定上清液中的磷含量为蛋白无机磷含量。

磷酸化玉米醇溶蛋白中磷增加量=总磷含量-无机磷含量-蛋白原有磷含量

1.3.4 Zein 蛋白黏度测定

用 80%（*V/V*）乙醇溶剂溶解 zein，配制成 1%的蛋白溶液。用带圆锥平板的压力控制粘度仪（HAAKE RS600，德国）在(25±0.1)℃测定 zein 蛋白溶液的粘度性质，锥形平板的直径和角度分别为 1 mm 和 0.04 rad，测定剪切速率的范围为 0~1000 s^{-1}，1 mL 样品放在平等的二个板之间，并用硅油密封防止水分损失，测定剪切速率上升时 zein 蛋白溶液粘度和剪切速率的关系。用软件 RheoWin3 处理数据，所有样本重复测定 3 次。

1.3.5 磷酸化玉米醇溶蛋白的水解

根据 Mathesis 方法等人[6]的方法检测磷酸化玉米醇溶蛋白的酸碱稳定性，具体操作过程为：用 0.5 mol/L 的 HCl 或 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液溶解 0.1~0.2%磷酸化蛋白或对照样蛋白，由于蛋白质不同，使溶液 pH 值为 0.80~0.11 或 12.20~13.20 范围之内，将溶液在 37 ℃水浴 24 h，水浴后，按 1.3.3 方法测溶液的总磷和无机磷含量，以同样条件下的蛋白质溶液的磷含量作为对照样，以其蛋白水解率为零，算出蛋白中磷的水解率。

1.3.6 Zein 蛋白圆二色谱（CD）测定

将 zein 溶于 80%乙醇-水溶剂配制成 1 mg/mL（近紫外用）和 0.1 mg/mL（远紫外用）的蛋白溶液，充分溶解后过 0.22 μm 的过滤膜，用圆二色谱

仪测定该蛋白滤液的圆二色性，测定的光程：近紫外为 10 mm，远紫外为 2 mm，测定波长范围：近紫外 250~320 nm，远紫外 190~250 nm，幅度为 0.5 nm。用 Dicroprot 2000 软件分析结果，利用软件中的自洽方法（Self Consistent Method）中的 SELCON 拟合程序等方法，对比数据库的蛋白结构，算出玉米醇溶蛋白中的 α-螺旋、β-折叠、转角、PPⅡ和无序结构。

1.3.7 差异扫描量热法（DSC）分析磷酸化 zein 蛋白

根据 David 等人[7]使用方法，用示差扫描量热法（DSC）测定磷酸化 zein 蛋白的玻璃态转化温度。精确称量 3~8 mg 的样品放入直径为 4 mm 铝盘中，用铝盖盖好，使样品与铝盘保持良好传热接触，将装有样品的铝盘小心放入 DSC SP 仪的加热炉内，同样的带盖铝盘作为参照放入加热炉的另一个加热端，氮气作保护气体，升温速率为 10 K/min，温度范围为 20~250 ℃，磷酸化 zein 的玻璃态转化温度 T_g 取吸热峰的起始温度 T_i 和结束温度 T_f 的几何中点值，用设备自带软件 Universal Analysis 2000 分析。

1.3.8 数据处理

所有数据平行测定三次，用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 Zein 溶液的 zeta 电位和粒子分布

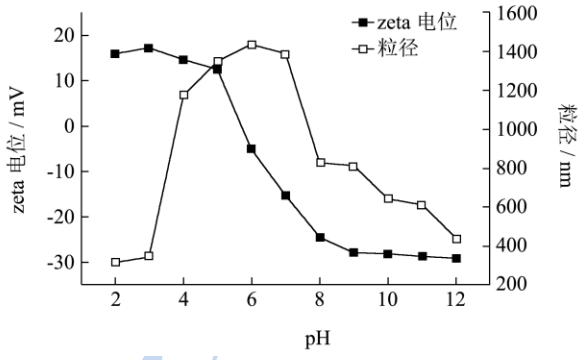


图 1 Zein 蛋白在 80%乙醇溶液的 Zeta 电位和粒径分布

Fig.1 Zeta potential and particle size distribution of zein in the 80% ethanol solution

图 1 是 zein 在 80%乙醇溶液中的 Zeta 电位和粒径分布，左边 y 轴对应 zeta 电位，右边 y 轴对应蛋白粒径。由图可看出，随着溶液 pH 值的升高，zeta 电位 ξ 由 pH 2.0 时的+15.9 mV 变化到 pH 12.0 时的-29.1 mV，整个过程中，zein 蛋白粒子由带正电荷向带负电荷转变。在 pH 5.97 时，zein 蛋白粒子的净电荷为零，该 pH 值为 zein 蛋白的等电点。对应该 pH 值的 zein 蛋白最大粒径为 1436 nm（见图 1），此时蛋白最不稳定，易凝聚沉淀。降低或升高溶液的 pH 值，粒径逐渐减小，pH 2.0 时为 318 nm，pH 12.0 时为 451 nm，蛋白溶液体系趋于稳定。蛋白质高分子在溶液体系的稳定性与分子大小和表面带电荷有很大关系[8]。蛋白 zeta 电位 ξ 越高，粒径就越小，反之亦然，当蛋白粒子之间的吸附力大于排斥力时，就会导致蛋白凝聚成大分子，体系就越不稳定[9]。

2.2 玉米醇溶蛋白的磷酸化

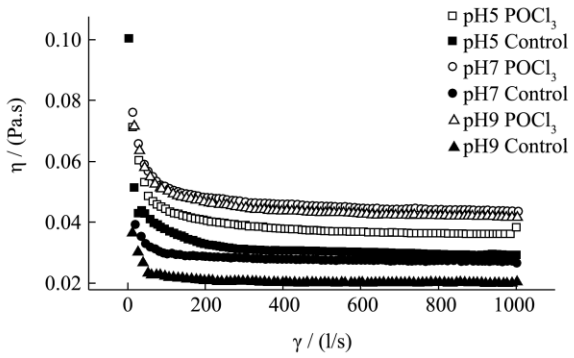


图 2 不同 pH 值时磷酸化玉米醇溶蛋白的黏度随剪切速率变化图

Fig.2 Viscosity versus shear rate of zein phosphorylated at different pH values

图 2 为不同 pH 值时磷酸化玉米醇溶蛋白的黏度随剪切速率变化图，由图可知，在剪切速率大于每条曲线大致分为两个部分：剪切速率在 0~200 s^{-1} 范围，黏度值快速下降，此时，n 小于 1，流体特性为剪切变稀。这是因为 zein 溶液不稳定，易自发聚集形成凝胶，剪切速率在 0~200 s^{-1} 范围，溶液从静止态到随着 HAAKE 测定仪的两薄片一起转动过程中，粘度急剧下降，呈剪切变稀溶液。剪切速率在 200~1000 s^{-1} 范围内，粘度变化很小，n 近似等于 1，流体视为牛顿型流体。这与 Weller 等人（1999 年）的研究结果相符，据报道，在一定温度、zein 浓度和乙醇浓度条件下，zein 溶液为牛顿型液体，其粘度不随剪切速率变化而变化[1]。但 Selling G W 等人在研究来源不同的 zein 溶于 N,N-二甲基酰胺（DMF）时，zein 溶液呈非牛顿流体性质，且不同种之间的 zein 溶液粘度差别在二倍以上[2]，说明 zein 溶液的黏度性质跟溶解的溶剂有关。

从图2还可知，zein溶液的黏度随溶液pH值增加而降低，该趋势与Torres-Giner等人[10]研究结果相同。

他们研究发现，随着pH值的增加，蛋白中谷氨酸转变成谷氨酸盐，溶液中的zein聚集体逐渐解开，形成自然状态，黏度下降。加入$POCl_3$后，各溶液的黏度急剧增加，这是因为$POCl_3$试剂在水溶液中形成磷酸，可与蛋白质的-OH或ε-NH_2基团反应，磷酸基团引入zein蛋白，增加蛋白的负电荷，由于电荷间的排斥作用，使磷酸化蛋白结构变得松散，蛋白粒径变大，溶液粘度增加。

蛋白质酯化的位点常发生在带-OH 基的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸以及碱性的赖氨酸残基上[6]。pH 值为酸性条件时，磷酸趋于与蛋白质上带-OH 基团的氨基酸反应，在中性和碱性条件下，酯化反应不仅发生在-OH 基团的氨基酸上，而且能与其它氨基酸作用[6]，因此，在中性和碱性条件下，蛋白质的磷酸化程度要高。这也是 pH 7.0 和 9.0 时用 $POCl_3$ 对 zein 蛋白进行磷酸化反应后，引起蛋白溶液黏度增加的原因（见图 2）。

除此之外，引入磷酸基团的 zein 蛋白在电负性排斥作用下，螺旋状的 zein 蛋白结构逐渐松散，包裹在中心的疏水基团暴露，zein 蛋白分子间可通过疏水键聚集，引起蛋白质凝聚，分子量增大，蛋白溶液黏度增加。

因此，$POCl_3$ 加入到 zein 蛋白溶液中引起黏度急剧变化可能是以下原因：一是 $POCl_3$ 磷酸化作用使蛋白交联，引起 zein 蛋白分子量增加而使溶液黏度增加；二是磷酸基团引入到 zein 蛋白分子上，电负性排斥力使蛋白分子解螺旋，分子伸展，有效体积增大，增加蛋白溶液黏度；三是展开后的 zein 蛋白通过疏水键作用聚集形成更大的蛋白分子聚集体，溶液黏度进一步增加。

2.3 磷酸化 zein 在酸、碱溶液的稳定性

表 1 pH 值对磷酸化程度的影响

Table 1 Influence of pH on the degree of phosphorylation

		pH		
		5	7	9
磷酸化程度/(mol P/mol zein)		3.31±0.28[a]	6.68±0.37[b]	5.85±0.71[b]
水解率/%	酸性	36.71±0.16[a]	45.11±0.13[b]	51.32±0.58[c]
	碱性	42.80±0.22[a]	32.20±0.40[b]	33.91±0.37[c]
等电点		4.79±0.41[a]	4.35±0.39[a]	4.18±0.51[a]

注：不同字母表示差异性显著（P＜5%）

从表 1 中可看出，无论在酸性或碱性条件下，磷酸化 zein 蛋白中的磷都有水解现象，并且随着磷酸化时的 pH 值越高，其产物在酸性环境下越不稳定，在碱性环境下却相反，水解率仅 1/3 左右。根据前面学者研究结果[6]，N-磷酸酯键在酸性条件下非常不稳定，甚至 pH 为中性，含 N-磷酸酯键的蛋白溶液在 2~37 ℃时也会水解失去部分磷酸基团[11]，当蛋白溶液为碱性时，N-磷酸酯键相对稳定。而 O-磷酸酯键则相反，在酸性条件下稳定，碱性条件下不稳定。从表 1 可看出，不同 pH 条件下磷酸化的 zein 蛋白在酸碱液中水解率不一样，由此可以推断，$POCl_3$ 与 zein 在不同 pH 时磷酸化反应，磷酸基团与蛋白的结合位点也不相同。

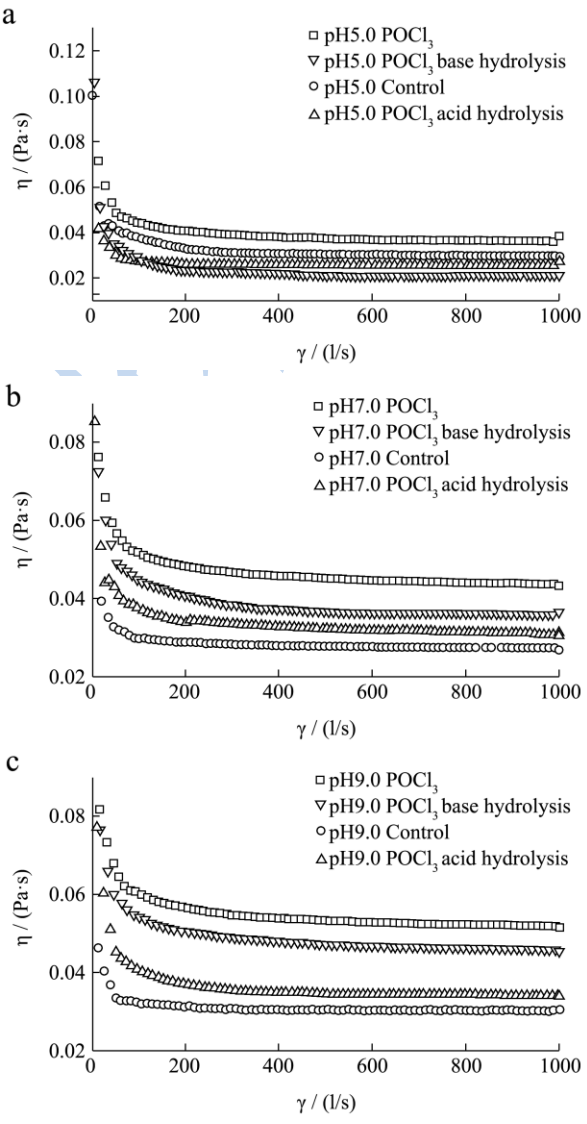


图 3 不同 pH 值磷酸化 zein 蛋白在酸、碱溶液中水解产物黏度变化图

Fig.3 Viscosity changes in zein hydrolysis solutions phosphorylated at different pH

注：a：pH 5.0 磷酸化 zein 蛋白水解溶液黏度变化图，b：pH 7.0 磷酸化 zein 蛋白水解溶液黏度变化图，c：pH 9.0 磷酸化 zein 蛋白水解溶液黏度变化图。

从水解溶液的黏度变化也证实了这个结论，图

3 是磷酸化 zein 蛋白在酸、碱溶液中水解后蛋白溶液黏度变化图。从图中可以看出，磷酸化 zein 蛋白在酸、碱溶液中水解后，蛋白溶液的黏度发生了变化。pH 5.0 时磷酸化 zein 蛋白的酸性水解溶液比碱性水解溶液的黏度高，说明在 pH 5.0 条件下磷酸化 zein 蛋白在碱溶液中不稳定，容易水解，zein 蛋白分子降低，引起溶液黏度下降。pH 7.0 和 9.0 时磷酸化 zein 蛋白水解溶液的黏度却相反，碱性水解溶液的黏度大于酸性水解溶液的黏度，说明此条件下磷酸化 zein 蛋白在酸性溶液中不稳定。根据 N-磷酸键和 O-磷酸键的特性，可以推断在 pH 5.0 时，磷酸与 zein 蛋白主要以 O-磷酸键结合，而在 pH 7.0 和 9.0 时，zein 与磷酸主要 N-磷酸键结合。

用 $POCl_3$ 对蛋白进行磷酸化改性，蛋白质种类不同，磷酸化程度也不相同。有些蛋白磷酸化后引入磷的含量达到 50 mol P/mol 蛋白[6]。不仅如此，蛋白与磷酸结合位点也千差万别，有些蛋白，如酪蛋白、血清球蛋白和鲱精蛋白，磷酸基团全部接在-OH 基团上，形成 O-磷酸酯键；而对于 β-乳球蛋白、清蛋白和血红蛋白，磷酸基团却全部接在-NH_2 基团上，形成 N-磷酸酯键；还有一些蛋白，如卵清蛋白则二种类型的键都存在，目前不清楚导致 $POCl_3$ 与蛋白反应形成不同的共价连接键的机理[12]。从 zein 蛋白水解率及水解产物黏度图可推断，zein 与 $POCl_3$ 反应属于第三种情况，即 O-磷酸键和 N-磷酸键都存在，而且，pH 5.0 时反应，$POCl_3$ 主要与-OH 基团反应，在中性和碱性时，主要与-NH_2 反应。由于 zein 蛋白结构非常紧凑，磷酸化 zein 蛋白中引入 P 的含量只有 3.31~6.68 mol P/mol zein，达不到 50 mol P/mol zein（见表 1）。

磷酸化改性会降低蛋白质的等电点(PdI)[13]，姚玉静等人用三聚磷酸钠对大豆分离蛋白磷酸化反应，结果显示磷酸化大豆分离等电点由 pH 4.4 漂移至 pH 3.86[14]。利用 zeta 电位测定了在 pH 5.0、7.0 和 9.0 时磷酸化 zein 蛋白的等电点分别为 pH 4.79、pH4.35 和 pH 4.18（见表 1），说明磷酸化使 zein 蛋白的等电点发生漂移，原因是磷酸基团的引入，降低蛋白的电负性[15]。

2.4 磷酸化 zein 近紫外和远紫外圆二色谱图

图 4 是磷酸化 zein 和对照样 zein 的近紫外 CD 光谱图。由图可看到各溶液在 290~320 nm 没有峰值，可能是 zein 分子中色氨酸含量很低（占总氨基酸的 0.16%）的原故。在 260 nm 和 270 nm 附近的峰是苯丙氨酸（占总氨基酸的 7.30%）的贡献，酪氨酸（占总氨基酸的的 5.25%）峰值在 275 nm 左右。

在对照样 zein 近紫外 CD 光谱图中（图 4 a）可看到，pH 5.0、pH 7.0 及 pH 9.0 三条谱线各不相同，pH 5.0 那条谱线在 260 nm 后基本没有峰值，pH 7.0 和 pH 9.0 的峰形差不多，但峰值大小不一样，表明 zein 蛋白在这三种溶液中具有不同的三级结构。但经 $POCl_3$ 磷酸化处理后，不同 pH 值磷酸化 zein 蛋白的近紫外 CD 光谱却几乎重叠在一起，说明三种溶液中的 zein 蛋白三级结构相似，证实了磷酸化会改变蛋白质的三级结构的说法[13]。

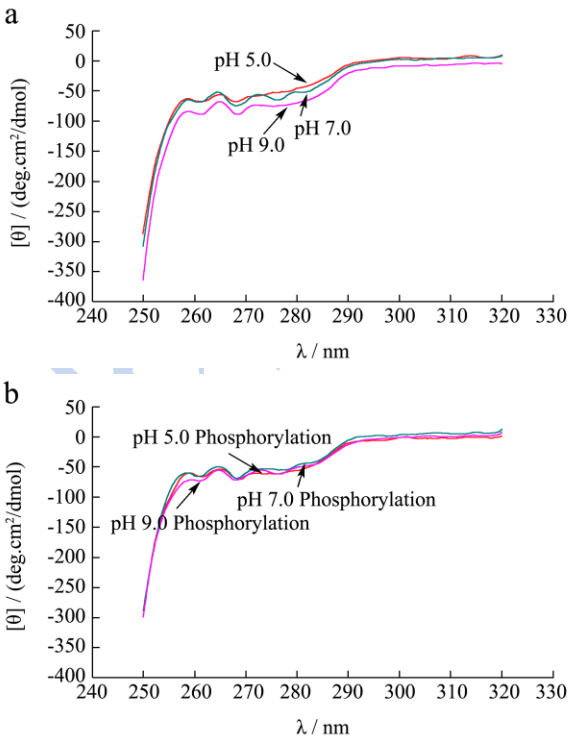


图 4 磷酸化 zein 和对照样 zein 近紫外 CD 光谱

Fig.4 Near-UV CD spectra of phosphorylated zein and control

注：a：对照样 zein，b：磷酸化 zein。

图 5 显示 zein 蛋白溶于 80%乙醇-水溶剂中的远紫外圆二色谱图。从图中可看出，在 210 nm 附近有一较强的负峰，在 223 nm 有一很强的负峰，在 190~195 nm 之间有一弱正峰，在 198 nm 有一正峰。表 2 是根据 Dicroprot 2000 软件分析结果，从表中知道，未处理的 zein 的 α-螺旋最高，达 36.71%，在 pH 5.0、7.0 和 9.0 的 zein 蛋白溶液中，zein 蛋白的 α-螺旋结构都有不同程度的减少（各 pH 值对照样），经过 $POCl_3$ 磷酸化处理后，zein 蛋白的 α-螺旋结构进一步降低，其中 pH 7.0 时磷酸化 zein 蛋白的 α-螺旋结构最低，为 28.21%，pH 5.0 和 pH 9.0 的磷酸化 zein 蛋白的 α-螺旋结构分别 29.43%和 28.32%。

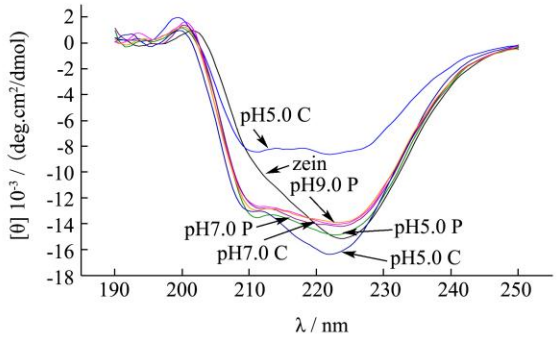


图 5 磷酸化 zein 和对照样 zein 的远紫外 CD 光谱图

Fig.5 Far-UV CD spectra of phosphorylated zein and control

表 2 磷酸化 zein 和对照样 zein 的二级结构组成

Table 2 Secondary structure composition of phosphorylated zein and control

	HELIX	BETA	TURN	PP2	OTHERS
pH 5.0 Control	30.61	20.01	9.92	5.59	34.03
pH 5.0 $POCl_3$	29.43	19.16	10.37	7.04	34.21
pH 7.0 Control	33.80	18.33	10.28	7.13	30.68
pH 7.0 $POCl_3$	28.21	19.56	11.41	7.18	33.85
pH 9.0 Control	31.52	16.81	10.16	8.21	33.49
pH 9.0 $POCl_3$	28.32	20.12	11.20	7.27	33.25
Zein (未处理)	36.71	12.92	13.94	9.81	26.73

Argos 等人[16]在研究 zein 结构时，提出 zein 蛋白是由九个重复螺旋单元结构反平行排列成不对称的蛋白分子，他们用 CD 测定 zein 在 50~80%乙醇溶液中的二级结构，发现 α-螺旋结构的含量在 33~60%之间，且 α-螺旋和 β-折叠含量接近[16]。

Zein 中 L-苯丙氨酸、L-缬氨酸和 L-丙氨酸含量很高，可能是 zein 具有较高 α-螺旋含量原因之一。从 zein 蛋白磷酸化后 α-螺旋结构的变化可知，磷酸化使 zein 蛋白 α-螺旋结构含量降低，蛋白结构松散，从而引起蛋白溶液黏度增加等性质变化。

2.5 zein 的热稳定性质（DSC 测定）

由表 3 可以看出，各磷酸化修饰 zein 蛋白玻璃态转化温度 T_g 都比改性前 zein 蛋白的玻璃态转化温度 T_g 高，而且不同 pH 值磷酸化 zein 的 T_g 相互也有差别，pH 5.0 磷酸化蛋白的 T_g 为 169.71 ℃，pH 7.0 和 pH 9.0 时的磷酸化 zein 蛋白的 T_g 差别不大，分别是 175.49 ℃和 174.55 ℃，但都比 pH 5.0 磷酸化蛋白高。

表 3 不同 pH 值磷酸化 zein 的玻璃态转化温度（T_g℃）

Table 3 Glass transition temperature Tg of phosphorylated zein at different pH

样品名称	Tg/℃	Ti/℃	Tf/℃
pH 5.0 $POCl_3$	169.71±1.21^{ab}	165.62±1.43	170.03±0.96
pH 5.0 Control	164.73±0.95^{a}	153.36±1.52	158.03±0.89
pH 7.0 $POCl_3$	175.49±1.25^{b}	172.69±0.93	174.11±1.27
pH 7.0 Control	153.34±1.13^{c}	151.37±0.83	155.84±1.43
pH 9.0 $POCl_3$	174.55±0.87^{b}	170.28±1.33	179.16±1.24
pH 9.0 Control	155.46±1.18^{c}	153.22±1.23	157.98±1.01
Zein (未处理)	165.42±1.03^{a}	158.39±1.57	177.09±1.28

注：不同字母表示差异性显著（P＜5%）。

不少学者报道用不同方法测定 zein 的 T_g 差异很大，Torres-Giner 等人报道[10]zein 的 T_g 为 163.30 ℃，Mangale Tillekeratne 等人[17]测定为 162 ℃，Wang Ying 等人[18]测定为 164 ℃，这几位得到 zein 蛋白的 T_g 跟本实验测定得到的 zein 蛋白的 T_g（165.42 ℃）接近。由前面分析知道，磷酸化使 zein 蛋白发生交联作用，增加蛋白的疏水性，蛋白聚集程度增强，分子量增大，因此，磷酸化 zein 蛋白的玻璃态转化温度 T_g 都比未处理的 zein 蛋白 T_g 高，并且，磷酸化程度不一样，T_g 变化大小也不相同。而各磷酸化 zein 蛋白的对照样 zein 蛋白聚集作用弱，也不会蛋白交联，只是在不同 pH 值结构发生变化，因此，T_g 与未处理 zein 不同。由表 3 可知，各对照样蛋白 T_g 都比未处理 zein 蛋白 T_g 小。

3 结论

3.1 Zein 蛋白在 80%乙醇溶液中等电点(PdI)为 pH 5.97，对应的蛋白粒径最大，为 1436 nm。经磷酸化修饰后，不同 pH 值下磷酸化 zein 蛋白的黏度增加，等电点出现酸性漂移；酸碱稳定性实验表明：磷酸化修饰 zein 蛋白中 O-磷酸键和 N-磷酸键都存在；pH 5.0 时，磷酸与 zein 蛋白主要以 O-磷酸键结

合，pH 7.0 和 9.0 时，磷酸与 zein 蛋白主要以 N-磷酸键结合。

3.2 磷酸化修饰后 zein 蛋白的二级结构和三级结构都发生改变，α-螺旋结构含量由 36.71%分别降至 29.43%（pH 5.0）、28.21%（pH 7.0）和 28.32%（pH 9.0）。同时，蛋白的玻璃态转化温度 T_g 从 165.42 ℃上升至 169.71%（pH 5.0）、175.49 ℃（pH 7.0）和 174.55 ℃（pH 9.0）。

参考文献

[1] Weller. Rheology of zein solutions in aqueous ethanol [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 2103-2108

[2] Gordon W S, Scott Bean, Christopher Dunlap, et al. Rheological studies utilizing various lots of zein in N,N-dimethylformamide solutions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 9050-9055

[3] Can-Peng LI, Hiroshi Shinohara, Hisham R I, et al. Phosphorylation of ovalbumin by dry-heating in the presence of pyrophosphate: effect on protein structure and some properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(12): 4962-4967

[4] 张坤生,李阳阳.食品蛋白质的磷酸化及功能性研究[J].食品研究与开发,2005,26(3):95-98.
ZHEN Kun-sheng, LI Yang-yang. Study on phosphorylation and function of food protein [J]. Research and Development of Food, 2005, 26(3): 95-98

[5] 潘秋琴,沈蓓英,程霜.花生蛋白质的磷酸化改性[J].中国油脂,1997,22(1):25-27
PANG Qiu-qing, Shen Pei-ying, CHEN Shuang. Study on phosphorylation of peanut protein [J]. China Oil, 1997, 22(1): 25-27

[6] Gunter Mathesis. Chemical phosphorylation of food proteins: an overview and a prospectus [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1984, 32: 699-705

[7] David J Sessa, Jeffrey Byars, Selling G W. Properties of films from corn zein reacted with glutaraldehyde [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2007, 105: 2877-2883

[8] Guo H X, Heinamaki J, Yliruusi J. Stable aqueous film coating dispersion of zein [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2008, 322(2): 478-484

[9] Sakuno M M, Matsumoto S, Kawai S, et al. Adsorption and structural change of beta-lactoglobulin at the diacylglycerol-water interface [J]. Langmuir, 2008, 24(20): 11483-11488

[10] Torres-Giner, Lagarona. characterization of the morphology and thermal properties of zein prolamine nanostructures obtained by electrospinning [J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22: 601-614

[11] Medina D M, Tainturier G, Lorient D. Chemical phosporylation of bovine casein: realtionships between the reacting mixture and the binding sites of the phosphoryl moiety [J]. Food Chemistry, 1996, 57(2): 261-265

[12] Susan L Woo. Functional properties of phosphorylated β-lactoglobulin [J]. Journal of Dairy Science, 1983, 66: 984-987

[13] 李灿鹏,陈德义,赵逸云,等.食品蛋白质磷酸化改性的研究进展[J].食品科学,2009,30(11):252-255
LI Can-peng, CHEN De-yi, ZHAO Yi-yun, et al. Research progress on phosphorylation modification of food protein [J]. Food Science,2009, 30(11): 252-255

[14] 姚玉静,崔春,邱礼平,等.食品蛋白质的化学改性研究进展[J].粮食与食品工业,2006,13(4):21-24
YAO Yu-jing, CUI Chun, QIU Li-ping, et al. Development of investigation on chemical modif ication of food proteins [J]. Cereal and Food Industry, 2006, 13(4): 21-24

[15] 王丽娟,胡二坤,尹寿伟,等.水溶性的抗菌小麦醇溶蛋白纳米粒子构建及性能研究[J].现代食品科技,2014,30(5):1-5
WANG Li-juan, HU Er-kun, YIN Shou-wei, et al. Fabrication and characterization of water-soluble antimicrobial gliadin [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 1-5

[16] Frank, Momany David, Sessa J, et al. Structural characterization of r-zein [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54: 543-547

[17] Easteal M T. Modification of zein films by incorporation of poly(ethylene glycol)s [J]. Polymer International, 2000, 49: 127-134

[18] Ying Wang, Graciela W Padua. Thermal behavior of zein-based biodegradable films [J]. Starch, 2003, 55: 25-29