

基于非共价键作用的山梨酸钾对植物蛋白 荧光淬灭性能研究

蔡春生, 胡勇, 高永清, 张杰良, 侯方丽

(广东药学院食品科学学院, 广东中山 528458)

摘要: 利用荧光光谱研究了在不同温度下, 山梨酸钾 (PSS) 分别与大豆分离蛋白 (SPI) 和小麦面筋蛋白 (WG) 在溶液中的相互作用特性, 探讨了山梨酸钾对这两种植物蛋白的荧光淬灭机理, 测定了它们之间反应的表现结合常数及结合位点数。结果表明, 山梨酸钾与两种植物蛋白之间分别生成了新的复合物, 属于静态荧光淬灭。其中, 山梨酸钾与 SPI 之间的相互作用在 281 K、291 K 和 303 K 时的表现结合常数分别为 1.58×10^4 L/mol、 1.49×10^3 L/mol 和 1.11×10^2 L/mol, 其对应的结合位点数分别为 1.25、0.96 和 0.78, 而山梨酸钾与 WG 之间的相互作用在 281 K、291 K 和 303 K 时的表现结合常数分别为 2.90×10^4 L/mol、 2.53×10^4 L/mol 和 5.50×10^4 L/mol, 其对应的结合位点数分别为 1.04、1.06 和 1.15。热力学数据分析表明山梨酸钾与 SPI 反应作用力主要是范德华力和氢键作用, 而与 WG 反应作用力主要是疏水作用力和电子作用力。

关键词: 山梨酸钾; 植物蛋白; 相互作用; 荧光光谱

文章编号: 1673-9078(2013)10-2420-2424

Fluorescence Quenching Properties of Vegetable Protein Caused by Potassium Sorbate with Non-covalent Bonding Interactions

CAI Chun-sheng, HU Yong, GAO Yong-qing, ZHANG Jie-liang, HOU Fang-li

(School of Food Science, Guang Dong College of Pharmacy, Zhongshan 528458, China)

Abstract: The interaction between potassium sorbate (PSS) and soy protein isolate (SPI) or wheat gluten (WG) under different temperatures in solution was investigated by fluorescence spectroscopy. The quenching mechanism was analyzed referring to PSS against the fluorescence of the vegetable protein. The apparent binding constants and the binding sites were also determined simultaneously based on the fluorescence. The experimental results clearly indicated that static quenching occurred in these systems because of the formation of new complexes among vegetable proteins and potassium sorbate. The apparent binding constants (K_A) between PSS and SPI were 1.58×10^4 L/mol (281 K), 1.49×10^3 L/mol (291 K), and 1.11×10^2 L/mol (303 K), respectively. The corresponding binding sites values (n) were 1.25, 0.96 and 0.78, respectively. The apparent binding constants between PSS and WG were 2.90×10^4 L/mol, 2.53×10^4 L/mol and 5.50×10^4 L/mol at 281 K, 291 K and 303 K, respectively. And the, corresponding binding sites values (n) were 1.04, 1.06 and 1.15, respectively. The changes of entropy and enthalpy indicated that the interaction of PSS and SPI was driven mainly by Vander waals force and hydrogen bonding, while the interaction of PSS and WG was chiefly driven by hydrophobic interaction and electronic force.

Key words: potassium sorbate; vegetable protein; interaction; fluorescence spectra

植物蛋白是蛋白质的一种, 其不仅营养丰富, 在人们的膳食中有很大的比重, 而且也是制备可食用涂膜包装的理想材料。目前, 随着人们环保意识和食品安全意识的日益增强, 植物蛋白涂膜包装材料在食品的防腐抗菌、延长货架期等应用中越来越广泛。比如大豆蛋白膜具有营养价值高、来源丰富、阻氧性强等优点, 而用小麦面筋蛋白制成的可食膜也是一种良好

收稿日期: 2013-06-28

通讯作者: 胡勇 (1977-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为生物活性物质与功能性食品

的成膜材料^[1-3]。山梨酸钾 (potassium sorbate, PSS) 是一种不饱和脂肪酸盐, 可以被人体的代谢系统吸收而迅速分解为二氧化碳和水, 在体内无残留。作为一种优良的食品防腐剂, PSS 不仅允许在多种食品加工过程中使用, 而且在抗菌活性包装材料中应用也日益增多^[4-5]。由此可见, 基于山梨酸钾和植物蛋白制备抗菌活性涂膜材料具有一定的理论和实际意义。但是, 制备植物蛋白抗菌活性涂膜材料, 一方面要考虑植物蛋白本身的理化性质, 同时也要考虑山梨酸钾在抗菌活性材料中的添加量和热稳定性。因此, 研究

山梨酸钾与植物蛋白之间的相互作用对于制备相应的植物蛋白抗菌活性涂膜材料显得很有必要。

目前,关于山梨酸钾与植物蛋白之间相互作用的研究几乎未见相关报道。本文利用荧光光谱对山梨酸钾与大豆分离蛋白(SPI)和小麦面筋蛋白(WG)在溶液中的相互作用进行了对比研究,分别探讨了山梨酸钾对SPI、WG的荧光猝灭机理,得到了一些关于山梨酸钾与SPI、WG相互作用之间表观结合常数、结合位点数、热力学参数、作用力等重要信息。这对于了解山梨酸钾与植物蛋白的结合方式,明确山梨酸钾在复合型植物蛋白抗菌活性涂膜材料中的迁移溶出过程,进而提高其抗菌保鲜效果具有一定的指导意义。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

RF-5301PC型荧光分光光度计(日本岛津公司); PHS-10A型精密pH计(上海雷磁仪器厂); FC-204电子分析天平(上海天平仪器厂); 电磁搅拌器; 高速离心机; 恒温水浴锅。

称取0.02 g山梨酸钾于烧杯中加少量水搅拌、溶解、定容,制成0.02% (m/V)山梨酸钾预备液; 分别称取30.00 g大豆分离蛋白和小麦面筋蛋白,分别加水200 mL放于磁力搅拌器上搅拌,调节pH至8.0,在离心机中以3500 r/min离心悬浊液5 min,收集上清液,用水清洗沉淀物并收集滤液,合并上清液得大豆分离蛋白预备液和小麦面筋蛋白预备液。所有预备液都要置于冰箱中保存。准确称取若干磷酸氢二钾,溶解、定容,配成0.20 mol/L的溶液,使用时与不同体积的0.10 mol/L柠檬酸溶液混合,制备一系列pH值不同的磷酸盐缓冲溶液。

所有的化学试剂最低都是化学纯级别,并且在使用前没有进一步纯化。所有的实验用水为去离子水,经检验无荧光杂质。

1.2 试验方法

在一系列10 mL容量瓶中依次加入溶液2.00 mL磷酸盐缓冲溶液、一定量的山梨酸钾储备液,然后加入2.00 mL植物蛋白储备液,然后用去离子水定容为10.00 mL,搅拌至混合均匀再用超声超声5 min。待放置一段时间后用于测试。选择激发波长为285 nm,用激发和发射通带均为1.5 nm的RF-5301PC荧光分光光度计测定一定室内温度(281 K、291 K、303 K)时两种植物蛋白在PSA作用下的荧光光谱。

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

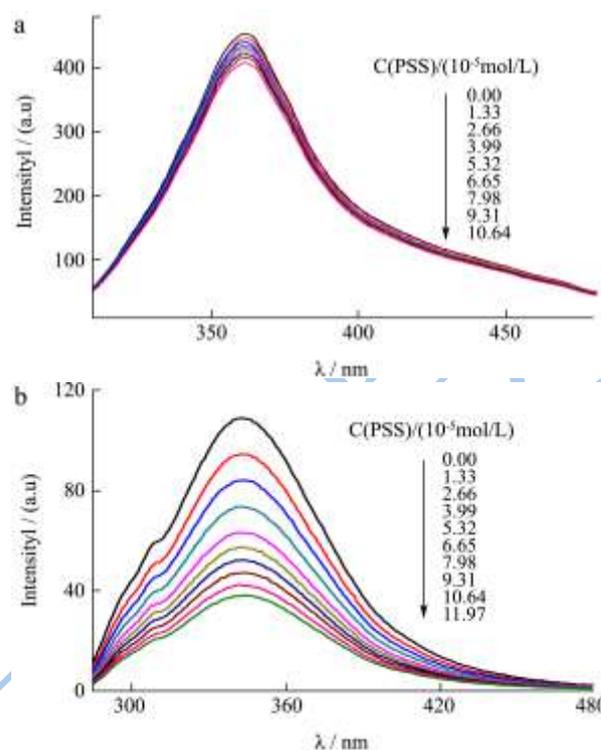


图1 PSS对SPI (a)和WG (b) 荧光光谱的影响

Fig.1 Effect of PSS on the fluorescence of SPI (a) and WG (b)

图1为SPI和WG在其相应的激发波长下测得含不同浓度的PSS时体系的荧光光谱图。由图1可以看出,固定两种植物蛋白溶液浓度,随着PSS浓度的增加,SPI和WG的荧光强度分别逐渐减小。这说明PSS与SPI和WG彼此间发生了相互作用,且这种作用可能引起SPI和WG的荧光发色团的微环境及其分子构象的变化^[9]。此外,PSS在水中电离后产生的羧基,属于吸电子基团,会妨碍分子的电子共轭性,可能也会影响SPI和WG的荧光发射强度。

通过对比图1a和图1b可知,SPI的荧光强度比WG要大的多,但PSS对WG的荧光猝灭效果较好,荧光幅度变化大而稳定,对大豆分离蛋白的荧光猝灭效果却较差,荧光幅度变化小而有部分重叠。这显示出两种植物蛋白在荧光生色团结构上存着明显的区别。

2.2 荧光猝灭机理

荧光猝灭可以有多种作用机理,通常可分为动态猝灭和静态猝灭。动态猝灭主要是由于荧光物质与猝灭剂分子碰撞损失能量,或荧光物质自身浓度过高使其自身分子间碰撞概率增加损失能量而造成;而静态猝灭则主要是荧光分子和猝灭剂分子作用,形成本身不发光的复合物。动态和静态猝灭可以由他们对体系温度的变化趋势以及荧光寿命来判断。高温可以引起

扩散的增大从而更多的碰撞使得动态猝灭常数增大。对于静态猝灭,高温将会导致复合物的分解从而降低静态猝灭常数。对于动态猝灭,其作用机理可以用Stern-Volmer方程来表达^[7]。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 C_q = 1 + K_{SV} C_q \quad (1)$$

对于静态猝灭,其作用机理可用Lineweaver-Burk方程来表达。

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_{LB}^{-1} F_0^{-1} C_q^{-1} \quad (2)$$

上述两式中, F_0 和 F 分别为无和有猝灭剂(山梨酸钾)存在时的荧光强度; K_q 为猝灭剂对生物大分子的荧光猝灭常数; K_{SV} 为动态猝灭常数, K_{LB} 为静态猝灭常数; τ_0 为无猝灭剂时荧光基团的荧光寿命, C_q 为猝灭剂的浓度; 对于生物大分子, τ_0 的平均值为 10^{-8} 秒左右。 F_0 和 F 可通过荧光光谱数据得知, C_q 和 τ_0 同样已知, 则可以求出 K_{LB} 和 K_{SV} , 进而求得 K_q 。

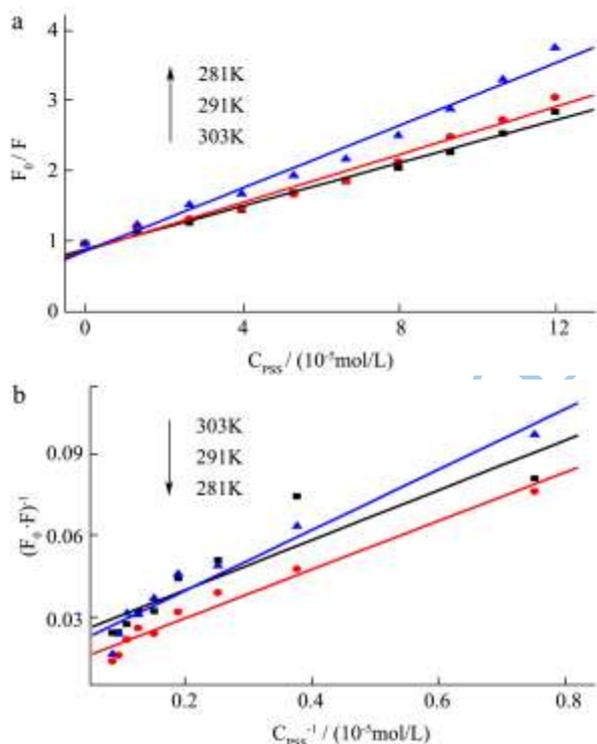


图2 基于荧光猝灭的PSS对SPI的Stern-Volmer曲线(a)和Lineweaver-Burk 双倒数曲线(b)

Fig.2 The Stern-Volmer curves (a) and Lineweaver -Burk curves (b) of the reaction between PSS and SPI based on the fluorescence quenching

根据Stern-Volmer方程,以 C_q 自变量, F_0/F 为因变量,通过线性拟合得图2。根据Lineweaver-Burk方程,以 C_q^{-1} 为自变量,以 $(F_0-F)^{-1}$ 为因变量通过线性拟合得双倒数曲线图3。

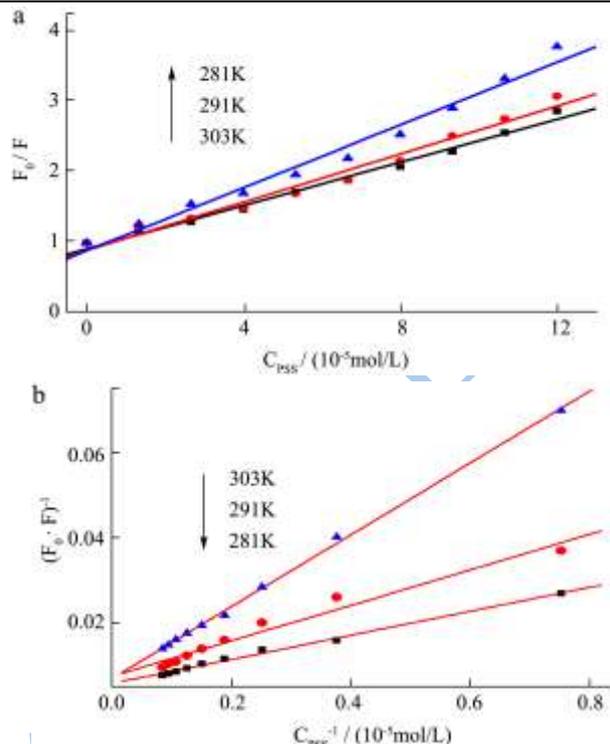


图3 基于荧光猝灭的PSS对WG的Stern-Volmer曲线(a)和Lineweaver-Burk 双倒数曲线(b)

Fig.3 The Stern-Volmer curves (a) and Lineweaver -Burk curves (b) of the reaction between PSS and WG based on the fluorescence quenching

由图2至图3中直线的斜率和 τ_0 的值,可算出在各温度下SPI和小WG的动态猝灭常数 K_{SV} ,静态猝灭结合常数 K_{LB} 和双分子猝灭常数 K_q ,见表1和表2。

表1 基于荧光猝灭所计算PSS对SPI的猝灭常数

Table 1 The quenching constants of the reaction between PSS and SPI from the data of Fig.2

T/K	KSV/(L/mol)	Kq/[L/(mol·s)]	KLB/(L/mol)
281	1.88×10^3	1.88×10^{11}	1.57×10^4
291	1.69×10^3	1.69×10^{11}	1.31×10^4
303	0.95×10^3	0.95×10^{11}	2.36×10^4

表2 基于荧光猝灭计算PSS对WG的猝灭常数

Table 2 The quenching constants of the reaction between PSS and WG from the data of Fig.3

T/K	KSV/(L/mol)	Kq/[L/(mol·s)]	KLB/(L/mol)
281	2.52×10^4	2.52×10^{12}	0.85×10^4
291	1.92×10^4	1.92×10^{12}	1.83×10^4
303	1.68×10^4	1.68×10^{12}	2.11×10^4

结果表明, PSS对SPI和WG的Stern-Volmer曲线均呈现良好的线性关系,但随着温度升高,两种植物蛋白的Stern-Volmer曲线斜率都有不同程度的减小,即其静态猝灭常数下降^[8]。这说明了PSS无论是对SPI,还是对WG的荧光猝灭效应都应归于静态猝灭机制。在动态

猝灭中, 各类猝灭剂对生物大分子荧光寿命衰减速率的最大值为 $2.0 \times 10^{10} \text{L}(\text{mol}\cdot\text{s})$, 而两种植物蛋白计算所得的 K_q 均远要大于这个数值。这进一步说明它们的猝灭过程都不属于由分子扩散和碰撞而引起的动态猝灭, 而是分子之间结合形成化合物所引起的静态猝灭。此外, 基于SPI荧光淬灭的Lineweaver-Burk方程于281 K、291 K和303 K的线性相关系数R依次为0.974、0.982、0.917; 而基于WG荧光淬灭的Lineweaver-Burk方程于281 K、291 K和303 K的线性相关系数R依次为0.999、0.984、0.997。由此可见两个植物蛋白体系的双倒数方程亦呈现良好的线性关系, 即可再次确定为静态猝灭。

2.3 结合常数和位点数的计算

蛋白质结合位点, 也称活性位点, 是指蛋白质的一些基团在空间结构上彼此靠近, 组成具有特定空间结构的区域, 它能与其他物质相结合并起着重要的作用。小分子与蛋白质之间的相互作用一般采用位点结合模型来描述荧光强度 F 、猝灭剂浓度 C_q 与表观结合常数 K_A 及结合位点数 n 之间的关系^[9]。

$$\lg \frac{(F_0 - F)}{F} = \lg K_A + n \lg c(\text{PSS}) \quad (3)$$

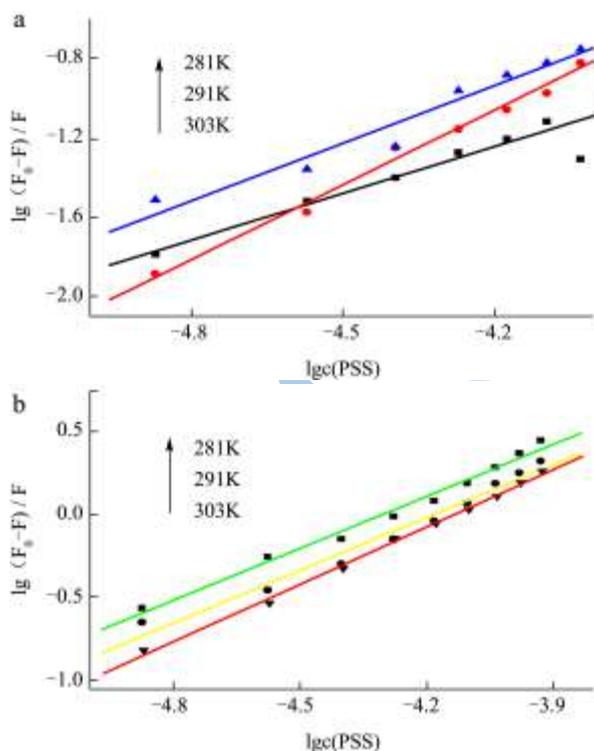


图4 基于PSS对SPI荧光猝灭(a)和WG淬灭(b)的双对数曲线图
Fig.4 The double-logarithm relation of $\lg(F_0 - F)/F$ vs $\lg C_{\text{PSS}}$ based on the reaction between PSS and SPI(a) or WG (b)

以 $\lg (F_0 - F) / F$ 对 $\lg c$ 作图, 由图4(a)中的直线斜率及截距可分别计算出在281 K、291 K、303 K时, PSS与SPI的表观结合常数依次为 $1.58 \times 10^4 \text{ L/mol}$ 、 1.49×10^3

L/mol 和 $1.11 \times 10^2 \text{ L/mol}$, 其相对应的结合位点数分别为1.25、0.96和0.78 (见表3)。从表3可知, 在281 K时, PSS与SPI之间存在强烈的相互作用, 随着温度升高, 大豆分离蛋白的表观结合常数出现较大幅度的变化, 说明PSS与SPI之间的相互作用减弱且不稳定, 这可能是温度的升高导致了体系分子扩散程度的增加, 从而降低其复合物的稳定性。同样, 由图4(b)可计算出分别在281 K、291 K、303 K时, PSS与WG的表观结合常数依次为 $2.90 \times 10^4 \text{ L/mol}$ 、 $2.53 \times 10^4 \text{ L/mol}$ 和 $5.50 \times 10^4 \text{ L/mol}$, 其相对应的结合位点数分别为1.04、1.06和1.15 (见表4)。从表4可看出, PSS与WG在上述三个温度点都存在着强烈的相互作用, 与其作用时均具有1个独立的结合部位, 且随温度变化不明显。

表3 大豆分离蛋白与PSS的表观结合常数、结合位点数及线性相关系数

Table 3 The apparent binding constants, binding sites numbers and correlation coefficients of SPI and PSS

T/K	$K_A/(\text{L/mol})$	n	r
281K	1.58×10^4	1.25	0.982
291K	1.49×10^3	0.96	0.994
303K	1.11×10^2	0.78	0.977

表4 小麦面筋蛋白与PSS的表观结合常数、结合位点数及线性相关系数

Table 4 The apparent binding constants, binding sites numbers and correlation coefficients of WG and PSS

T/K	$K_A/(\text{L/mol})$	n	r
281K	2.90×10^4	1.04	0.993
291K	2.53×10^4	1.06	0.988
303K	5.50×10^4	1.15	0.999

2.4 热力学分析和作用力分析

猝灭体和生物大分子的相互作用力主要有氢键, 范德华力, 静电引力和疏水力几种类型^[10]: $\Delta H > 0$ 和 $\Delta S > 0$, 主要是疏水作用; $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$, 主要是范德华力和氢键作用; $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S > 0$, 则是电子作用力。当温度相差不大时, 焓变可视之为常数, 故由不同温度下的结合常数 K_A , 根据下列方程即可计算出反应过程中的自由能、反应焓变和熵变。

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4)$$

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H}{R} (1/T_1 - 1/T_2) \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

R为气体状态常数, T是实验温度, K_1 和 K_2 是在不同温度下的结合常数。由上式所计算出来的热力学参数见表5和表6。从表5中可以看出, 体系的 $\Delta G < 0$, $\Delta S < 0$,

$\Delta H < 0$, 说明反应过程是自发进行的, 作用力主要是范德华力和氢键作用。从表6可以看出, 体系的 $\Delta G < 0$, $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, 则表明他们之间的结合力主要是疏水力作用。

表5 大豆分离蛋白与PSS结合的相关热力学参数

Table 5 The corresponding thermodynamic parameters in interaction between PSS and SPI

T/K	ΔH /(kJ/mol)	ΔS /(J/K)	ΔG /(kJ/mol)
281	-160.53	-562.1	-22.58
291	-160.53	-490.89	-17.68
303	-160.53	-490.73	-11.84

表6 小麦面筋蛋白与PSS结合的相关热力学参数

Table 6 The corresponding thermodynamic parameters in interaction between PSS and WG

T/K	ΔH /(kJ/mol)	ΔS /(J/K)	ΔG /(kJ/mol)
281	19.58	155.09	-24.00
291	19.58	151.58	-24.53
303	19.58	155.38	-27.50

3 结论

通过荧光光谱, 探讨了山梨酸钾对大豆分离蛋白和小麦面筋蛋白的荧光猝灭机理。结果表明, 山梨酸钾与大豆分离蛋白以及小麦面筋蛋白之间的相互作用均属于静态猝灭。山梨酸钾主要以范德华力和氢键作用力与大豆分离蛋白相结合, 而山梨酸钾与小麦面筋蛋白相结合时则以疏水作用力为主。山梨酸钾与这两种蛋白的结合均服从位点结合模型。山梨酸钾与小麦面筋蛋白在281 K、291 K和303 K时均近似形成一个结合位点, 而与大豆分离蛋白则仅在291 K时近似形成一个结合位点。

参考文献

- [1] Vasconez M B, Flores SK, Campos C A, et al. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings [J]. Food Research International, 2009, 42(7): 762-769
- [2] 张平, 王东辉. 大豆蛋白膜保鲜香菇效果的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2002, 14(2): 87-90.
ZHANG Ping, WANG Dong-hui. Study on The Effect of Fresh-Keeping with Soyprotein Film in Lentinus Edodes [J]. J. Hei Long Jiang August First Land Reclamation University, 2002, 14(2): 87-90
- [3] 敖利刚, 吴磊燕, 赖富饶. 植物蛋白膜的应用及研究进展[J]. 现代食品科技, 2007, 23(8): 86-89
AO Li-gang, WU, Lei-yan, LAI Fu-rao. Research Progress of Plant Protein Films [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(8): 86-89
- [4] 卢鹏, 王志耕, 梅林, 等. 壳聚糖抗菌膜中山梨酸钾迁移的数学模型及实验分析[J]. 食品工业科技, 2012, 33(2): 112-114
LU Peng, WANG Zhi-geng, MEI Lin, et al. Analysis and Modeling of Potassium Sorbate Diffusion through Chitosan Films [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(2): 112-114
- [5] Weng Y M, Chen M J, Chen W. Antimicrobial food packaging materials from poly (ethylene-comethacrylic acid) [J]. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 1999, 32(4): 191-195
- [6] 胡勇, 扶雄, 陈旭东, 等. 山梨酸钾与蛋白质相互作用的荧光和共振光散射光谱研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2009, 48(6): 73-78
HU Yong, FU Xiong, CHEN, Xu-dong, et al. Interaction between Potassium Sorbate and Bovine Serum Albumin Revealed by Fluorescence and Resonance Light Scattering Spectra [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2009, 48(6): 73-78
- [7] Pastukhov A V, Levchenko L A, Sadkov A P. Spectroscopic study on binding of rutin to human serum albumin [J]. J Molecular Structure, 2007, 842: 60-66
- [8] Zhang Y Z, Dai J, Zhang X P, et al. Studies of the Interaction between sudan I and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Methods [J]. J Molecular Structure, 2008, 888: 152-159
- [9] Hu Y J, Liu Y, Xiao X H. Investigation of the Interaction between Berberine and Human Serum Albumin [J]. Biomacromolecules, 2009, 10: 517-521
- [10] Ross D P, Subramanian S. Thermodynamics of Protein Association Reaction: Forces Contributing to Stability [J]. Biochemistry, 1981, 20: 3096-3099