

多糖接枝对花生球蛋白功能特性的影响

刘岩^{1, 2}, 赵冠里², 赵谋明², 苏新国¹

(1. 广东食品药品职业学院, 广东广州 510520) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文研究了花生球蛋白与葡聚糖能够在一定控温控湿的条件下进行干热反应, 生成美拉德反应的多糖接枝产物。通过荧光光谱、圆二色谱、差示扫描量热法和紫外分光光度法等先进的检测分析手段对美拉德反应对接枝产物结构特性的影响进行表征, 同时也阐述了接枝产物的结构变化与其功能特性改变之间的构效机理。研究结果表明花生球蛋白酸性亚基比碱性亚基更易与葡聚糖发生接枝反应。对花生球蛋白的预加热处理不能提高其与葡聚糖的反应速度。花生球蛋白与热处理花生球蛋白在与多糖接枝反应过程中, 其三级结构皆变得更加紧凑, 限制了蛋白与多糖的接枝反应速度与反应程度。未经热预处理的花生球蛋白与多糖的接枝产物具有很高的溶解性和乳化活性, 在干热反应第 14d 其溶解性和乳化活性指数达到实验条件下的最高值, 分别为 95% 和 149 m²/g。

关键词: 花生球蛋白; 美拉德反应; 接枝产物; 功能特性

文章编号: 1673-9078(2014)7-87-91

Effect of Dextran Conjugation on the Conformational and Functional Properties of Arachin

LIU Yan^{1,2}, ZHAO Guan-li², ZHAO Mou-ming², SU Xin-guo¹

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

(2. School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Arachin can react with dextran to form conjugation products with high molecular weight. It was found that the acid subunits of arachin were easier to glycosylate with dextran than basic subunits. The heat-pretreatment of arachin could not increase the speed of Maillard reaction with dextran. Proteins in mixtures/conjugates might have a more compacted tertiary conformation than that in arachin, which might limit the extent of glycosylation. The conjugation with dextran could improve the solubility and emulsifying properties of arachin, while it was hard to improve the functional properties of arachin when pretreated by heat. Non-heat pretreatment arachin conjugated with polysaccharide had high solubility and emulsifying activity, and they could reach the highest values of 95% and 149 m²/g after dry heat of 14 days.

Key words: arachin; maillard reaction; conjugation; functional properties

植物蛋白是人类膳食中重要的蛋白资源, 主要来源于谷物、油料作物与豆类。世界各国对植物蛋白研究开发主要受其产量、营养效价、功能特性、消费嗜好和科研能力等因素影响和制约。目前, 各国食品领域研究者都在根据本国国情, 采用物理、化学或生物技术等手段重点研究本国优势蛋白资源的深度开发利用。花生是全球最重要的四大油料作物之一, 由于我国农业发展秉承的固有传统思想, 一直认为花生属于油料作物, 或者只是对整体花生籽粒的加工。虽然我国的花生产量和出口量都居世界之首, 但是花生的深加工技术一直处于粗加工阶段, 与发达国家存在着很大差距, 所以花生蛋白的

研究对于提高我国植物蛋白的研究水平具有战略意义。

蛋白质与多糖之间的美拉德反应能够改善其功能特性, 尤其是改善溶解性和界面特性^[1-3]。多糖与蛋白质的接枝产物具有亲水/疏水的两性特质, 其能在保持界面稳定的情况下能以较低的浓度吸附于两相界面上, 并且使界面层在加热、低 pH 值或者高离子强度等相对恶劣的环境下仍然保持相对稳定, 阻止或减缓相分离现象的发生^[4]。不同来源的蛋白质具有不同的氨基酸组成及构象特性, 则它们与多糖发生美拉德反应的效率和程度亦有所不同^[5]。花生球蛋白与伴花生球蛋白是花生中两种主要的蛋白组分, 它们具有不同的亚基组成和空间构象, 之前的研究推断花生球蛋白与伴花生球蛋白组分与多糖的接枝反应, 在相同的条件下可能会呈现不同的反应规律^[4]。本文中重点研究分离提纯后的花生球蛋白与多糖的接枝反应对其结

收稿日期: 2014-01-06

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

构和功能特性的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

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。葡萄聚糖 (分子量为 35000~45000 Da), 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

圆二色光谱仪, 荧光分光光谱仪, 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 (Arachin) 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。制备花生球蛋白采用 Chiou^[5] 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 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 30 min。上清液加入硫酸铵使溶液饱和度达到 40%, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 1 h 后, 再于 3500 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 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。

1.3.2 花生球蛋白与葡聚糖接枝物的制备

花生球蛋白与多糖 (1:1) 的混合水溶液冻干后, 置于含饱和 KBr 的反应器中 (相对湿度为 79%), 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下反应。每隔相应时间取一定量样品。最终产物再次冻干并保存于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 下备用^[6]。

1.3.3 接枝产物 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 根据 Laemmli (1970) 报道的方法^[7]。

多糖染色采用高碘酸-醋酸溶液^[8], 染色液与脱色液配制方法如下:

PAS 染色方法: 0.5% 高碘酸 (3% 冰乙酸) 室温浸泡 1 h, 氧化后再用重蒸水浸泡 1 h, 用 Schiff 试剂染色 1 h, 将凝胶转移到 1% 亚硫酸氢钠水溶液中, 直至凝

胶背景退为无色。

1.3.4 热学特性分析

参照 Meng 等人^[9]的方法, 采用差示扫描量热法 (Differential Scanning Calorimetry, DSC) 分析蛋白热特性。10% 的球蛋白及其多糖接枝产物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: 0~200 $^{\circ}\text{C}$; 升温速率: 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 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 (Td) 和焓变值 (ΔH)。所有的实验结果为三次测定值的平均值。

1.3.5 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及其多糖接枝产物的荧光光谱。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。荧光发射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, 扫描发射光谱为 300~400 nm, 激发和发射狭缝宽均为 5 nm。

1.3.6 溶解度测定

蛋白质的溶解度测定根据 Petrucelli & Anon (1994) 报道的方法^[10]。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 $^{\circ}\text{C}$ 离心 (12000 \times 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。

1.3.7 乳化特性测定

乳化特性的测定采用 Wang 等人的方法^[11]。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:

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

$$ESI (\text{min}) = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times 10 \quad (2)$$

1.3.8 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 结果与分析

2.1 电泳分析

如图 1 为花生球蛋白及其糖接枝产物的 SDS-PAGE 图谱。由图 1(1 和 1')可知, 与葡聚糖混合的花生球蛋白(1)与花生球蛋白(1')的电泳条带的亚基组成相似, 无明显差别, 说明与多糖的混合并不能使花生蛋白的亚基组成发生改变。

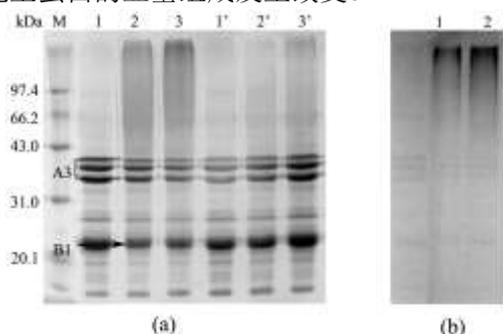


图 1 花生球蛋白与葡聚糖反应 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE patterns of non-incubated arachin+dextran and dry-heated arachin+dextran mixtures (weight ratio 1:1) for various times

注: M: 蛋白标样; 1: 花生球蛋白与多糖混合 (未热处理); 2: 花生球蛋白-多糖混合物 60 °C 热处理 7 d; 3: 花生球蛋白-多糖混合物 60 °C 热处理 14 d; 1': 花生球蛋白; 2': 花生球蛋白干热处理 7 d; 3': 花生球蛋白干热处理 14 d。

随着接枝反应的进行, 花生球蛋白主要的亚基条带浓度皆逐渐减少, 尤其是花生球蛋白酸性亚基所在的 3 条主要电泳条带(A₃)和碱性亚基所在的一条主要电泳条带(B₁)浓度显著降低, 此外, 随着反应时间从 7 d 增至 14 d, 在凝胶电泳胶片上端浓缩胶与分离胶交界处出现了一条较宽且逐渐加深的电泳条带 (图 1a, 样品 2 和 3)。这一现象也同样在糖染色的电泳胶片中被发现 (图 1b, 2 和 3), 随着蛋白质-葡聚糖混合物热处理时间的增加, 同样在相同的浓缩胶与分离胶交界的区域, 表征还原性多糖被染色的粉色特征条带的范围和浓度也随之增加。而作为空白对照的球蛋白经历了 7 d 至 14 d 的干热处理后, 并未发现生成大分子蛋白多糖接枝的条带。结果表明了多糖已经与花生分离蛋白通过交联反应生成了高分子的蛋白质与多糖复合物^[6]。如图可以看出花生球蛋白的酸性亚基条带浓度从条带 1 至 3 逐渐降低, 碱性亚基条带从条带 1 至 2 降低, 而条带 2 至 3 无明显变化, 说明花生球蛋白酸性亚基相对于碱性亚基更易与葡聚糖发生接枝反应。

2.2 热特性分析

表 1 不同干热反应时间花生球蛋白-葡聚糖接枝产物的热特性

Table 1 DSC characteristics of arachin-dextran reaction products dry-heated for different times

样品	$\Delta H/(J/g)$	Td/°C
花生球蛋白	13.59±0.49 ^b	104.61±3.13 ^b
球蛋白 7 d	12.22±0.45 ^c	104.22±3.12 ^b
球蛋白 14 d	11.69±0.44 ^c	104.25±3.12 ^b
球蛋白+糖	16.2±0.72 ^a	106.02±3.18 ^a
球蛋白+糖 7 d	13.93±0.51 ^b	106.22±3.18 ^a
球蛋白+糖 14 d	11.91±0.44 ^c	106.76±3.21 ^a

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)。

表 1 为花生球蛋白与葡聚糖混合并经历了不同热处理时间的热特性变化数据。如表 1 所示, 花生球蛋白的变性温度为 104.61 °C, 随着球蛋白对照样品干热处理至 14 d, 其变性温度 T_d 并未发现显著改变, 焓变值 ΔH 则逐渐降低。与多糖的混合使花生球蛋白的变性温度从 104.61 °C 增至 106.2 °C, 也即增加了蛋白质的热稳定性^[12], 与多糖的混合过程也使花生球蛋白的焓变值从 13.59 J/g 增至 16.2 J/g, 这是由于葡聚糖大分子增加了蛋白质分子之间的空间位阻, 进而减少了因花生球蛋白分子表面疏水性基团或者巯基的交互作用而发生聚集的几率^[12]。

2.3 荧光光谱分析

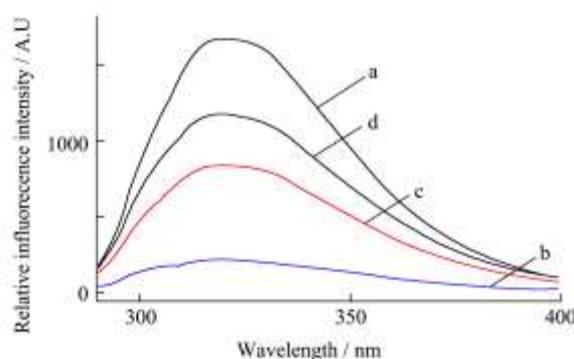


图 2 花生球蛋白与葡聚糖混合或接枝产物的内部荧光光谱。

Fig.2 The intrinsic emission fluorescence spectra of arachin-dextran reaction products for different times

注: a: 花生球蛋白; b: 花生球蛋白与葡聚糖混合; c: 干热处理 7 d; d: 干热处理 14 d。

如图 2 为花生球蛋白及其葡聚糖混合或接枝产物的内部荧光光谱。当激发光波长为 280 nm 时, 花生球蛋白的荧光峰在 321 nm 处被发现。球蛋白-多糖混合物的荧光峰波长 (318.4 nm) 低于花生球蛋白的波

长,发生了显著的蓝移。随着对蛋白质-多糖混合物样品热处理时间的延长,其最大荧光峰波长(λ_{max})均低于 321 nm 并在 319 nm 附近有微小的波动。结果表明,相对于花生球蛋白对照样,葡聚糖与花生球蛋白的混合或接枝反应会使蛋白质内部的色氨酸残基所处的微环境变得更加疏水,这意味着葡聚糖与花生蛋白在本实验条件下的混合或者接枝反应会诱导蛋白质进一步折叠卷曲,使其三级结构变得更加紧凑^[13]。紧凑的构象不利于花生球蛋白与多糖进一步的反应。

2.4 花生球蛋白及其葡聚糖混合或接枝产物的溶解性

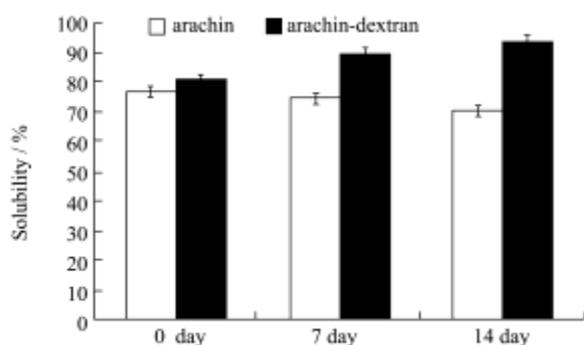


图3 花生球蛋白及其糖接枝产物的溶解性 (pH 7.0)

Fig.3 Solubility of arachin modified by conjugation with dextran for different days under dry-heated conditions

如图3所示,作为空白对照的花生球蛋白在经历了干热处理后,其溶解性随着热处理时间的增加逐渐降低。由电泳分析(参考图1,2'和3'样品)可知,花生球蛋白在加热至7d或14d后,电泳胶片的上端有大分子的蛋白聚集物生成,这可能是由于花生球蛋白在干热条件下发生聚集从而导致溶解性降低^[13]。花生球蛋白与葡聚糖的混合过程会提高蛋白质在 pH 7.0 处的溶解性,这可能是由于多糖的混合使花生蛋白间的相互作用减弱,从而变性程度降低,溶解度增加。花生球蛋白与葡聚糖的接枝产物随热处理时间的延长,其溶解性逐渐升高。这是因为多糖中含有更多亲水性的羟基,蛋白质与亲水性多糖的交联反应会使蛋白质与水分子的亲和力增加。

2.5 花生球蛋白及其葡聚糖混合或接枝产物的乳化特性

图4为花生球蛋白与葡聚糖的混合物经历了不同热处理时间的乳化活性指数(EAI)。花生球蛋白对照样在干热处理至14d,其乳化活性指数从58 m²/g降至45

m²/g左右。而球蛋白与多糖的混合物乳化活性指数为103 m²/g,较原始球蛋白增加了77.6%。随着干热反应进行至7d,球蛋白-葡聚糖接枝产物乳化活性指数增加至149 m²/g,较球蛋白对照增加了157%,继续增加反应时间乳化活性无显著改善。这一结果表明球蛋白与多糖的混合或者接枝反应能够显著改善其乳化活性,但干热处理7d后,接枝反应程度与乳化活性指数并无正相关性。

此外,与 Liu et al (2012)^[14]报道的花生分离蛋白与葡聚糖干热反应第7d的乳化活性指数(120 m²/g)相比,球蛋白与多糖的接枝产物具有更高的乳化活性。这一结果验证了花生分离蛋白中球蛋白组分若同伴球蛋白组分一样参与了糖接枝反应,则花生分离蛋白的乳化特性具有更高的改善空间的推测。

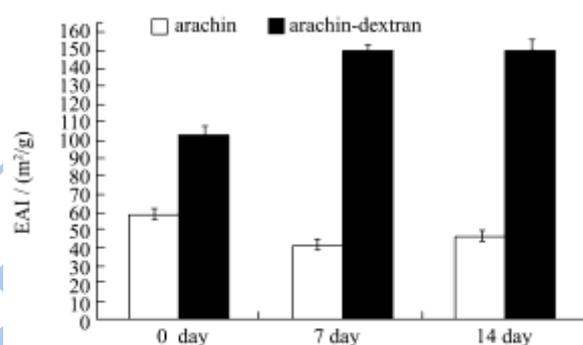


图4 花生球蛋白及其糖接枝产物乳化特性 (pH 7.0)

Fig.4 Emulsifying of arachin-dextran reaction products dry-heated for different times (pH 7.0)

3 结论

本文中,花生球蛋白与葡聚糖混合,在60 °C湿度79%的干热条件下反应7至14d,运用DSC与荧光光谱等手段表征了花生分离蛋白与多糖的接枝反应产物结构与功能特性的变化。SDS-PAGE分析表明花生球蛋白已经在干热条件下与葡聚糖发生交联反应生成大分子的接枝产物。花生球蛋白酸性亚基更易与多糖反应。与葡聚糖的混合或者接枝反应显著地改善了花生球蛋白的热稳定性。与葡聚糖的混合或者接枝反应使花生球蛋白的空间构象变得更加紧凑。花生球蛋白与葡聚糖的接枝反应能有效地改善其溶解性和乳化特性。

参考文献

[1] Dickinson E. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions [J]. *Soft Matter*, 2008,4: 932-942

[2] Oliver C M, Melton L D, Stanley R A. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review [J].

- Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2006, 46: 337-350
- [3] Wooster T J, Augustin M A. β -Lactoglobulin-dextran Maillard conjugates: Their effect on interfacial thickness and emulsion stability [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2006, 303: 564-572
- [4] Dickinson E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23: 1473-1482
- [5] Chiou Y Y. Effects of heat treatment on peanut arachin and conarachin [J]. Journal of Food Biochemistry, 1990, 14: 219-232
- [6] Diftis N, Kiosseoglou V. Physicochemical properties of dry-heated soy protein isolate-dextran mixtures [J]. Food Chemistry, 2006, 96: 228-233
- [7] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685
- [8] Zacharius R M, Zell T E, Morrison J H, et al. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gel [J]. Analytical Biochemistry, 1969, 30(1): 148-152
- [9] Meng G T, Ma C Y. Thermal properties of Phaseolus angularis (red bean) globulin [J]. Food Chemistry, 2001, 23: 453-460
- [10] Petrucci S, Anon M C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates structural and hydration properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42: 2161-2169
- [11] 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
- [12] Ibanoglu E. Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins [J]. Food Chemistry, 2005, 90: 621-626
- [13] Jiménez-Castaño L, López-Fandiño R, Olano A, et al. Study on β -lactoglobulin glycosylation with dextran: Effect on solubility and heat stability [J]. Food Chemistry, 2005, 93: 689-695
- [14] Liu Y, Zhao G L, Zhao M M, et al. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction [J]. Food chemistry, 2012, 131: 901-906