

花生球蛋白和伴花生球蛋白在酸性条件下 亚基结构的变化规律

赵谋明, 辛佩贤, 陈楠楠, 郑淋

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640; 广东省食品绿色加工与营养调控工程研究技术中心, 广东广州 511458)

摘要: 本文通过 Zeta 电位、内源荧光光谱、粒度、SDS-PAGE 凝胶电泳及溶解性, 探讨花生球蛋白和伴花生球蛋白在酸性条件下亚基结构的变化规律。电泳分析表明, 花生球蛋白 40.5、37.5、35.5 和 27 ku 亚基在常温 pH 2.0~3.0 的条件下被酸解, 产生 32.86 ± 0.10 ku 的新亚基, 同时 22 和 15 ku 这两条亚基增多; 当 $\text{pH} < 2.0$ 时, 花生球蛋白的亚基酸解受静电屏蔽抑制。当 pH 为 1.0~3.0, 伴花生球蛋白 II 61 ku 亚基被酸解产生 36.95 ± 0.50 、 25.14 ± 1.86 、 18.98 ± 0.78 和 17.37 ± 1.17 ku 这四个条带。进一步研究表明, 花生球蛋白和伴花生球蛋白在酸性条件下结构伸展, 粒径增大, 在 pH 2.0-3.0 时的 Zeta 电位及溶解度较高。在 pH 2.0-3.0 内, 花生球蛋白荧光扫描最大发射波长相对中性条件下发生红移, 红移幅度大于伴球蛋白, 说明伴球蛋白展开程度较球蛋白小。伴花生球蛋白的酸解及结构变化程度都小于球蛋白, 说明伴花生球蛋白亚基对酸的敏感性低于球蛋白。

关键字: 花生球蛋白; 伴花生球蛋白; 酸解; SDS-PAGE; Zeta 电位

文章编号: 1673-9078(2016)3-30-35

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.006

Structural Variations in the Subunits of Arachin and Conarachin under Acidic Conditions

ZHAO Mou-ming, XIN Pei-xian, CHEN Nan-nan, ZHENG Lin

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China; Guangdong Food Green Processing and Nutrition Regulation Technologies Research Centre, Guangzhou 511458, China)

Abstract: The structural variations in the subunits of arachin and conarachin under acidic conditions were investigated by zeta potential, intrinsic fluorescence spectroscopy, average hydrodynamic diameter analyses, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and solubility. According to the electrophoretic analysis, the 40.5 ku, 37.5 ku, 35.5 ku, and 27 ku subunits of arachin were acid-hydrolyzed into a new 32.86 ± 0.10 ku band; while the levels of the 22 ku and 15 ku bands increased. When the pH was < 2.0 , the acid hydrolysis of arachin was totally inhibited by the electrostatic shielding that occurs at extreme pH. In the pH range of 1.0~3.0, the 61 ku subunit of conarachin was acid-hydrolyzed into 36.95 ± 0.50 , 25.14 ± 1.86 , 18.98 ± 0.78 , and 17.37 ± 1.17 ku bands. Further studies indicated that both arachin and conarachin unfolded under acidic conditions, and the particle size increased; when the pH values were in the range of 2.0~3.0, the zeta potential and solubility were relatively higher than that in other pH ranges. In the pH 2.0~3.0 range, the maximum emission wavelength in the fluorescence spectra of arachin was red-shifted as compared to that under neutral conditions; and the amplitude of this redshift was greater than that of conarachin, indicating that the degree of conarachin unfolding was lesser than that of arachin. In sum, the degrees of hydrolysis and structural changes of conarachin were lesser than those of arachin, indicating that conarachin is less acid-sensitive than arachin.

Key words: arachin; conarachin; acid hydrolysis; sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE); zeta potential

花生蛋白由 90% 的盐溶性蛋白和 10% 的水溶性蛋白组成, 而盐溶蛋白中则含有 73% 的花生球蛋白、

收稿日期: 2015-06-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171783); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 课题 (2013AA102201)

作者简介: 赵谋明 (1964-), 男, 教授, 博导, 主要从事蛋白质化学与工程、食品生物技术方面的研究

6% 的伴花生球蛋白 I 和 21% 的伴花生球蛋白 II。花生球蛋白和伴花生球蛋白作为花生中含量最多且最重要的两种成分, 他们的性质对花生蛋白的各种功能特性起重要作用^[1]。球蛋白主要由 40.5、37.5、35.5 和 23.5 ku 4 个亚基组成, 伴花生球蛋白 I 则由 18、17 及 15.5 ku 3 个亚基组成而伴花生球蛋白 II 仅含有一个 61 ku 的亚基^[2]。伴花生球蛋白中的甲硫氨酸、赖氨酸和半

胱氨酸分别是球蛋白的3倍、2倍、2倍^[3]。

目前对花生蛋白组分的物理改性研究主要集中在热处理和高压处理改性花生球蛋白。Chiou^[3]发现花生球蛋白的热稳定性比伴花生球蛋白高,且热处理并不会改变花生蛋白组分的亚基组成。Neucere^[4]加热处理花生球蛋白,破坏了花生球蛋白的三四级结构。高温使花生球蛋白发生聚合和解离的现象。Navin^[5]在pH 3.6酸性条件下对花生球蛋白加热处理,发现其变性程度显著增强,蛋白质间相互交联,球蛋白凝胶性增强。涂宗财^[6]发现高压微射流处理会引起花生球蛋白二三级结构局部变化,提高了表面疏水性,但对花生球蛋白亚基及分子量的影响不大。

热处理和高压处理等物理手段都不能引起花生蛋白的一级结构变化,但本课题组^[7]发现酸处理不仅能使花生分离蛋白亚基解离,还能使其酸解出新的亚基条带,改变其一级结构。本文将对此现象进一步深入研究,揭示新亚基条带的组分来源,并对比酸性条件下花生球蛋白和伴花生球蛋白的亚基结构变化规律及酸敏感性强弱,旨在通过探究花生球蛋白和伴花生球蛋白在酸性条件下的亚基结构变化,为花生蛋白的改性及应用提供理论及方法指导。

1 材料与方法

1.1 主要原料

低温脱脂花生粉,山东禹王实业有限公司生产;硫酸铵,广州化学试剂厂;十二水合磷酸二氢钠,国药集团化学试剂有限公司;十二合磷酸氢二钠,广州化学试剂厂;氯化钠,天津市致远化学试剂有限公司;牛血清蛋白(BSA),北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司生产;BCA试剂盒,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司生产;其它试剂为分析纯。

1.2 仪器和设备

多功能全波段扫描仪,Thermo scientific 生产;pHS-25 数显 pH 计,瑞士梅特勒-托利多公司生产;电泳槽,美国 Bio-Rad 生产;Sorvall legend micro 17R 离心机,Thermo scientific 生产;高速冷冻离心机 CR22N,日本 HITACHI 公司生产;Lumina 荧光分光光度计,Thermo scientific 生产;Azure C300 化学发光成像系统,Azure Biosystems 生产;Nano-ZS&MPT-2Zeta 电位及纳米粒度分布仪,英国 Malvern 公司生产。

1.3 方法

1.3.1 花生蛋白组分的制备

取一定量花生粉与含 NaCl 0.5 mol/L, pH 7.9 的 10 mmol/L 磷酸缓冲溶液,料液比 1:14 混合搅拌,常温搅拌 2 h, 8000 r/min 离心 30 min。上清液添加硫酸铵使溶液中硫酸铵的饱和度至 40%,低温搅拌 30 min。溶液于 4 °C 下静置 2 h 后,离心(4 °C, 8000 r/min, 30 min),沉淀以 1:5 的比例复溶于上述缓冲液,透析 48 h 后冻干即为花生球蛋白。离心后的上清液添加硫酸铵至饱和度 65%,低温搅拌 30 min。溶液在 4 °C 下静置 2 h 后,离心(4 °C, 8000 r/min, 30 min)。所得沉淀以 1:5 的比例复溶在上述缓冲液,透析 48 h 后冻干即为花生伴球蛋白。

1.3.2 酸处理

取一定量冻干后的花生球蛋白和伴花生球蛋白溶解于去离子水中配制成质量分数为 2% 的蛋白溶液,搅拌 2 h 后,用 2 mol/L HCl 分别调节 pH 至 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、7.0,搅拌 2 h 后分别取样进行溶解度分析,上述样品稀释至 0.1% 进行 Zeta 电位、内源性荧光及粒径测定;用 2 mol/L 的 NaOH 将不同 pH 处理 2 h 后的花生球蛋白和伴花生球蛋白溶液调回中性,取样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。

1.3.3 花生球蛋白、伴花生球蛋白组分纯度测定

用化学发光成像系统扫描电泳凝胶,分析花生蛋白的组分纯度。各组分纯度由该组分对应条带灰度总和除以全部条带灰度的总和。特定蛋白占总蛋白含量的相对比值,即为样品组分的纯度。

1.3.4 酸性条件下花生球蛋白、伴花生球蛋白溶液的 Zeta 电位变化

利用马尔文纳米粒度分布仪测定浓度为 0.1% pH 1.0 至 7.0 花生球蛋白和伴花生球蛋白的 Zeta 电位。测定条件:比色池规格为 1 cm 聚苯乙烯池,采用一对 0.45 cm² 铂电极,间距为 0.4 cm。测定温度为 25 °C,温度平衡时间为 2 min。

1.3.5 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

根据 Laemmli^[8]的方法进行 SDS-PAGE 电泳分析,分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%。将花生球蛋白和伴花生球蛋白分别溶于 SDS-PAGE 样品缓冲液,样品浓度为 2%,电泳前煮沸 6 min 后离心。取上清液上样,上样量为 10 μL,凝胶电泳于恒流模式下进行。恒定电流为 20 mA。凝胶染色液为 0.25% 考马斯亮蓝(R-250)溶液,染色后采用甲醇醋酸溶液脱色,甲醇/醋酸/水按 1:1:8 (V/V/V)。

1.3.6 溶解度测定

取不同 pH 条件下的花生球蛋白及伴花生球蛋白

白, 10000r/min 离心 20 min 后, 用 BCA 法测定上清液的蛋白质溶解度。混合 BCA 试剂 A 溶液和 B 溶液 (50:1, V/V), 充分混匀备用。向 96 孔平板加入 10 μ L 稀释至一定浓度的样品和 200 μ L BCA 工作液。将平板放入酶标仪中。酶标仪程序设定为轻微震荡, 混匀于 37 $^{\circ}$ C 中孵育 30 min 后, 于 562 nm 处测定吸光值。以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准物做标准曲线 (BSA 的浓度分别为: 0 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL)。按照标准曲线计算蛋白质含量。

1.3.7 内源性荧光光谱分析

采用 Lumina 荧光分光光度计测定不同 pH 值下浓度为 0.1% 的花生球蛋白和伴花生球蛋白溶液的内源性荧光光谱。荧光发散光谱分析以蛋白质分子内部的荧光基团色氨酸为探针, 激发波长为 290 nm, 扫描波长为 300~400 nm, 激发和发射狭缝宽均为 5 nm, 电压为 500 mV。

1.3.8 粒度测定

调节浓度为 0.1% 的花生球蛋白和伴花生球蛋白 pH 值至 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、7.0, 室温下搅拌并稳定 1 h, 10000 r/min 离心 15 min, 利用纳米粒度测定仪测定其上清液粒度。

1.3.9 数据分析

数据平行测定 3 次取平均值, 并用 Origin75 作图。

2 结果与讨论

2.1 花生球蛋白及伴花生球蛋白在酸性条件下的 Zeta 电位变化

酸性条件下花生球蛋白和伴花生球蛋白的 Zeta 电位如图 1 所示。由图 1 可见, 在 pH 从 7.0 下降至 1.0 的过程中, 花生球蛋白和伴花生球蛋白的 Zeta 电位由负值逐渐增加为正值。这是由于在 pH 高于等电点的条件下, 蛋白表面的羧基发生解离, 使蛋白质表面带上负电荷而产生负静电斥力。当 pH 下降到低于等电点时, 低 pH 限制了羧基的解离, 氨基发生质子化而使蛋白表面带上正电荷^[9]。

当 pH 为 5.33 时, 花生球蛋白的 Zeta 电位值为 0, 说明花生球蛋白的等电点为 5.33。伴花生球蛋白在 pH 5.0 时 Zeta 电位值为 0, 即伴花生球蛋白的等电点为 5.0。本实验结果与杨晓泉^[10]等通过 2D-PAGE 探索得到花生球蛋白和伴花生球蛋白各亚基的等电点差异较大。2D-PAGE 结果显示花生球蛋白的两个酸性亚基 40.5 ku 和 37.5 ku 的等电点分别是 5.5 和 5.0。三个碱

性亚基的等电点分别是 6.3、7.0、8.2, 伴花生球蛋白 61 ku 亚基的等电点为 7.0, 而 2S 蛋白的 6 个组分共用两个等电点 5.0 与 5.5。本实验结果与 2D-PAGE 所得的花生球蛋白和伴花生球蛋白等电点的差异可能与原料与实验手段的不同有关。在 pH 2.5~3.5 时, 花生球蛋白的 Zeta 电位达到最大值, 为 32.92 ± 3.18 mV, 表明此时球蛋白的氨基质子化程度最大, 静电斥力最强。当 pH 达到 2.5~3.0 时, 伴花生球蛋白的 Zeta 电位达到最大值 23.57 ± 6.05 mV。pH < 2.0 时, 花生球蛋白和伴花生球蛋白的 Zeta 电位下降, 这是因为在极端酸性的溶液中含有大量的盐离子, 具有静电屏蔽作用, 使 Zeta 电位下降。对比花生球蛋白和伴花生球蛋白的 Zeta 电位值, 发现伴花生球蛋白的 Zeta 电位值在不同的 pH 条件下均低于球蛋白, 可能是由于伴花生球蛋白表面所带的电荷较少所致。

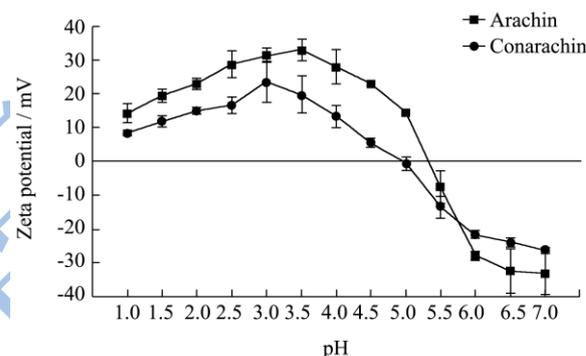


图 1 花生球蛋白及伴花生球蛋白在酸性条件下的 Zeta 电位
Fig.1 Zeta potentials of arachin and conarachin under acidic conditions

2.2 花生球蛋白及伴球蛋白在酸性条件下的粒度分析

花生球蛋白和伴花生球蛋白在酸性条件下的平均粒径如图 2 所示。由图 2 可见, 在 pH 1.0~3.0 下, 球蛋白的平均粒径均大于伴花生球蛋白的粒径。球蛋白和伴花生球蛋白的粒径在 pH 1.0~3.5 的条件下均随着 pH 的增大而增大。当 pH 为 2.0~3.0 时, 球蛋白和伴花生球蛋白的粒径均有所增加。已有研究发现在温和处理的条件下, 蛋白结构松散, 三级结构被大幅破坏, 内部疏水集团暴露^[11]。结合荧光分析可推测, 球蛋白和伴花生球蛋白并非聚集成聚集体而使粒径增大, 而是球蛋白和伴花生球蛋白的结构适度展开, 使粒径增大。蛋白肽链上对酸敏感的基团可能因此暴露, 在酸的作用下裂解出新的亚基条带。当 pH < 2.0 时, 由于盐离子浓度过高引起的静电屏蔽使花生球蛋白和伴花生球蛋白分子聚集成不溶性沉淀, 经离心后除

去, 故上清液中仅存粒径较小的颗粒, 其粒径甚至小于 pH 7.0 时的粒径 (本实验测得 pH 7.0 时花生球蛋白粒径为 51.98 nm, 伴花生球蛋白粒径为 35.84 nm)。当 pH > 3.5 时, 由于较接近等电点, 蛋白分子表面电荷被中和, 分子间相互吸引聚集成较大粒径, 产生沉淀, 此时粒径无法表示蛋白分子的分子粒径, 故在本文中 pH 4.0~7.0 条件下的粒径结果并未检测。

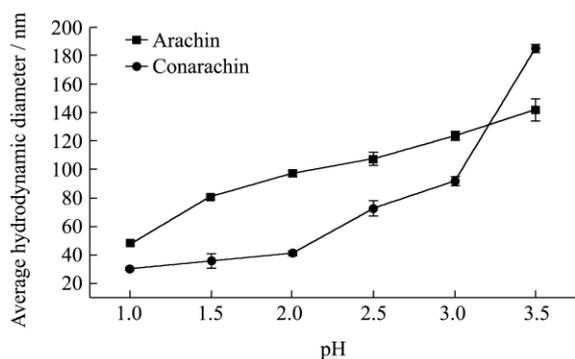


图 2 花生球蛋白和伴花生球蛋白在 pH 1.0~3.5 条件下平均粒径

Fig.2 Average hydrodynamic diameters of arachin and conarachin in pH range of 1.0~3.5

2.3 花生球蛋白及伴花生球蛋白在酸性条件下的荧光分析

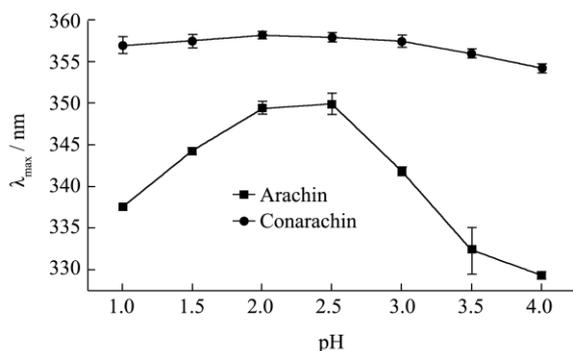


图 3 花生球蛋白和伴花生球蛋白在 pH 1.0~4.0 下内源性荧光扫描的最大发射波长

Fig.3 Maximum emission wavelengths in the fluorescence spectra of arachin and conarachin in pH range of 1.0~4.0

内源性荧光光谱是指在 290 nm 的激发波长下, 蛋白质中色氨酸残基的发射光谱。其荧光强度及最大发射波长 λ_{max} 的变化反映蛋白中色氨酸残基所处的微环境及其暴露程度的改变。本实验测得中性条件 (pH 7.0) 下, 花生球蛋白的内源性荧光扫描最大吸收波长 λ_{max} 为 332.53 ± 0.058 nm, 伴球蛋白为 353.15 ± 0.5 nm。酸性条件下花生球蛋白和伴花生球蛋白的内源性荧光扫描的 λ_{max} 如图 3 所示。由图 3 可知, 在 pH 1.0~3.0

时, 花生球蛋白的 λ_{max} 明显高于 pH 7.0, 说明内源性荧光扫描的 λ_{max} 向长波长方向移动 (红移)。 λ_{max} 红移说明在酸性环境中, 花生球蛋白的亚基结构适度展开, 色氨酸的微环境改变, 疏水基团暴露。当 pH 为 2.0~2.5, 花生球蛋白的 λ_{max} 达 349.4 ± 0.82 nm~ 349.9 ± 1.29 nm, 比中性时的 λ_{max} 红移了 17.37 nm, 说明在此 pH 范围中, 花生球蛋白结构展开程度最大, 其内部色氨酸暴露程度最高。当 pH 为 1.0~1.5 时, 由于 pH 过低, 盐离子浓度过大, 产生了静电屏蔽, 分子间因静电斥力减小而趋向形成聚合物, 色氨酸被紧密的结构包埋, 所以 λ_{max} 相对 pH 2.0 - 2.5 时蓝移。当 pH 为 3.5 - 4.0 时, 蛋白分子间开始聚集, 因此球蛋白的 λ_{max} 开始蓝移。

在不同的酸性 pH 条件下, 伴花生球蛋白的 λ_{max} 均高于球蛋白, 说明伴花生球蛋白的色氨酸暴露程度明显高于球蛋白。伴花生球蛋白在酸性环境下 λ_{max} 的变化规律与花生球蛋白 λ_{max} 的变化规律相似。伴花生球蛋白在酸性环境下 λ_{max} 也发生红移, 但伴球蛋白的最大幅度仅为 5 nm。伴花生球蛋白的红移幅度明显较花生球蛋白的小, 说明伴花生球蛋白在酸性条件下结构展开程度不如花生球蛋白的大。

刘岩^[12]等在中性条件利用内源性荧光, 根据色氨酸微环境极性改变分析球蛋白和伴花生球蛋白的三级结构, 同样发现花生球蛋白的荧光峰相对于伴球蛋白发生了蓝移, 说明花生球蛋白相对于伴球蛋白具有更加紧密的三级结构, 其内部包埋着更加丰富的疏水基团, 内部的色氨酸位于更加疏水的微环境。疏水性基团位于球蛋白和伴花生球蛋白的位置差异, 可能导致了酸处理对花生球蛋白和伴球蛋白结构伸展影响的差异, 使酸处理对花生球蛋白亚基结构的改变程度大于对伴花生球蛋白的改变程度。

2.4 花生球蛋白及伴球蛋白在酸性条件下的电泳分析

硫酸铵分级沉淀后所获得的及经过酸处理后的花生球蛋白和伴花生球蛋白的 SDS-PAGE 图谱如图 4、图 5 所示。通过对图 4、图 5 电泳图中泳道 9 (pH 7.0) 下的花生球蛋白和伴球蛋白条带进行光密度分析, 可知球蛋白的纯度为 73.90%, 伴球蛋白的纯度为 71.93%。由图 4 可见, 在 pH 1.5~3.0 的条件下, 球蛋白亚基 (40.5、37.5、35.5、27 ku) 条带灰度明显减弱, 在花生球蛋白天然亚基 35.5 ku 条带下方出现了一条新的亚基条带。经过化学发光系统对电泳凝胶分析可知, 花生球蛋白 40.5、37.5、35.5、27 ku 条带的灰度

值较泳道 9 (pH 7.0) 的球蛋白对应亚基条带的灰度值低。根据条带的分子迁移率可计算出新条带的分子量为 32.86 ± 0.10 ku, 而伴花生球蛋白区域中的 18.43 ± 0.23 ku 和 14.75 ku 附近的条带灰度值明显提高, 说明球蛋白中 40.5 、 37.5 、 35.5 ku 和 27 ku 亚基条带被酸解, 产生了 32.86 ± 0.10 ku 的新亚基、 18.43 ± 0.23 ku 和 14.75 ku 左右的亚基。在 pH 1.0~1.5 的条件下, 球蛋白并没有酸解出 32.86 ± 0.10 ku 的新条带。结合 Zeta 电位及粒度的结果推断, 可能是极端酸性的条件下大量盐离子产生的静电屏蔽作用使蛋白结构变得更加紧密, 对酸敏感的肽链部位被包埋在蛋白的内部, 因此抑制了球蛋白的酸解。

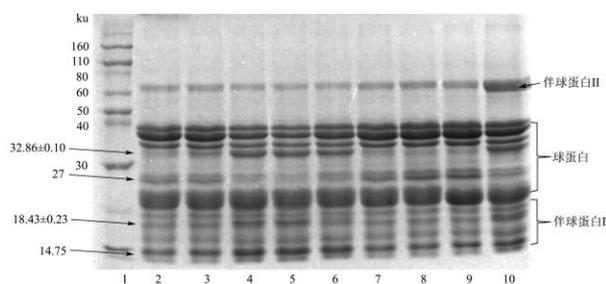


图 4 花生球蛋白在酸性条件 pH 1.0~4.0 下的 SDS-PAGE 图谱
Fig4 SDS-PAGE patterns of arachin in pH range of 1.0~4.0

注: 1.标准蛋白质; 2~9.分别代表pH值1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、7.0的花生球蛋白; 10.代表pH 2.0的花生分离蛋白溶液

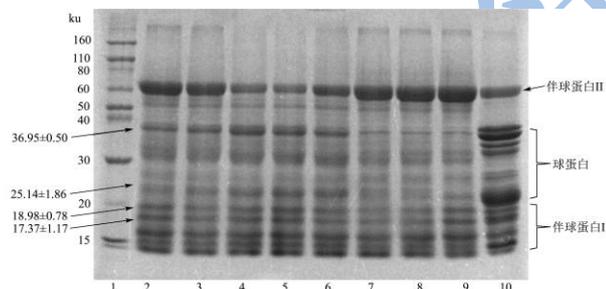


图 5 伴花生球蛋白在酸性条件 pH 1.0~4.0 下的 SDS-PAGE 图谱
Fig5 SDS-PAGE patterns of conarachin in pH range of 1.0-4.0

注: 1.标准蛋白质; 2~9.分别代表pH值1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、7.0的伴花生球蛋白; 10.代表pH 2.0的花生分离蛋白溶液。

由图 5 可见, 在 pH 1.0~3.0 的条件下, 伴花生球蛋白 II 61 ku 条带灰度下降, 而球蛋白区域 37 ku 附近产生了新的条带, 24 ku、20 ku、19 ku 条带的灰度也有所提高。经过化学发光系统对此电泳凝胶分析后, 发现伴花生球蛋白 II 61 ku 酸解产生了 36.95 ± 0.50 ku、 25.14 ± 1.86 ku、 18.98 ± 0.78 ku 和 17.37 ± 1.17 ku 条带。当 pH 为 2.0~3.0 时, 伴花生球蛋白 II 61 ku 的条带灰度下降更加明显, 证明在此 pH 范围下, 伴花生球蛋白 II 的酸解程度最大。在 pH 1.0~1.5 的条件下,

伴花生球蛋白并没有受高盐离子浓度影响, 同样酸解出上述新条带。

结合 Zeta 电位和内源性荧光结果可推断, 在 pH 2.0~3.0 的条件下, 花生球蛋白和伴花生球蛋白表面所带电荷最多, 蛋白结构展开程度最大, 暴露出了更多的酸敏感基团, 因此酸解现象更加明显。酸性条件对伴花生球蛋白的结构伸展、内部疏水基团暴露程度的影响较小, 在高盐离子浓度的条件下, 伴花生球蛋白的疏水基团依然在分子表面, 并没有被包埋在分子内部, 因此极端酸性的条件下, 伴花生球蛋白仍能发生酸解。进一步推断, 花生球蛋白和伴花生球蛋白肽链上的酸解部位可能跟疏水基团有关。肽链上的天冬氨酸对酸水解十分敏感, 花生蛋白酸解肽键的断裂位置可能在肽链上天冬氨酸残基的前后^[13]。Naotoshi^[14]在 95 °C 加热大豆蛋白 30 min 后发现大豆蛋白部分天冬氨酸残基前后的肽键断裂和谷氨酸脱氨作用。花生球蛋白和伴花生球蛋白中都含有较多的天冬氨酸, 每 1 g 花生球蛋白中含有 114.65 mg 天冬氨酸, 而每 1 g 伴花生球蛋白中含有 101.15 mg 天冬氨酸^[2]。对比图 4、图 5 可得, 酸解花生分离蛋白明显产生非天然 33 ku 条带仅由花生球蛋白酸解得到, 可能是酸处理后花生球蛋白结构适度展开, 某部位的酸敏感基团暴露, 此部位肽键断裂后产生了 33 ku 的亚基条带和一些分子量较小的亚基条带, 而伴花生球蛋白的一级结构并不具备这种序列。

2.5 花生球蛋白及伴花生球蛋白在酸性条件下的溶解度分析

酸性条件下的花生球蛋白和伴花生球蛋白溶液经过高速离心 (10000 r/min) 后的上清液蛋白溶解性如图 6 所示。由图 6 可知, 花生球蛋白和伴花生球蛋白经过酸处理后溶解度与中性条件的差异不大。花生球蛋白和伴花生球蛋白酸处理后仍能保持良好的溶解性, 有利于其他功能特性的发挥。在不同 pH 的条件下, 伴花生球蛋白的溶解度均略高于球蛋白的溶解度。伴花生球蛋白的溶解度随 pH 改变的变化幅度小于球蛋白的变化幅度, 说明酸对伴花生球蛋白溶解度的影响较少。当 pH < 2.0 时, 由于极端酸性条件下盐离子的静电屏蔽作用, 蛋白分子之间容易形成不溶性聚集体, 经离心之后沉淀下来, 故球蛋白在 pH 1.0~1.5 的溶解度均低于在 pH 2.0~3.0 的溶解度。球蛋白在 pH 2.0~3.0 的条件下解离程度较大, 溶解度较高。当 pH 接近 4.0 时, 由于接近球蛋白和伴花生球蛋白的等电点, 二者均形成了不溶性聚集体, 经离心后被沉淀下

来,所以上清液中的蛋白含量下降。

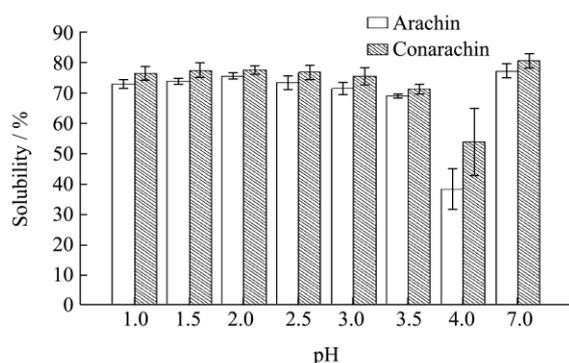


图6 花生球蛋白和伴花生球蛋白在酸性条件 pH 1.0~4.0 下的溶解度对比

Fig.6 Solubilities of arachin and conarachin in pH range of 1.0~4.0

刘岩^[12]等的实验中同样得到伴花生球蛋白在酸性条件下的溶解度高于球蛋白的结论,其原因主要是伴花生球蛋白的含硫氨基酸含量高于球蛋白的氨基酸含量,表面疏水性值显著高于球蛋白的表面疏水性值,同时暴露在伴花生球蛋白表面的巯基含量比球蛋白高。蛋白分子在酸性条件下,表面正电荷堆积使蛋白亚基解离,诱导蛋白构象伸展和疏水基团暴露。由于花生球蛋白中包埋了更多疏水性氨基酸及未交联的游离巯基,酸性条件使球蛋白中的疏水基团暴露,增加了球蛋白分子间相互作用而发生聚集的几率,所以伴花生球蛋白的溶解度高于球蛋白的溶解度。

3 结论

3.1 常温下,在 pH 2.0~3.0 的条件下,花生球蛋白亚基 40.5、37.5、35.5 及 27 ku 亚基的条带被酸解产生了 32.86 ± 0.10 ku 的新条带及 22 ku、15ku 左右的亚基; pH < 2.0 时,花生球蛋白酸解受盐离子静电屏蔽作用抑制,不能酸解出小分子量的亚基条带。

3.2 常温下,在 pH 1.0~3.0 的条件下,伴花生球蛋白 II 61 ku 被酸解产生了 36.95 ± 0.50 ku、 25.14 ± 1.86 ku、 18.98 ± 0.78 ku 和 17.37 ± 1.17 ku 条带,酸解不受静电屏蔽作用影响。

3.3 在 pH 2.0~2.5 时,花生球蛋白的酸解离作用最强,荧光扫描最大发射波长比中性条件红移约 17.37 nm; 伴花生球蛋白在酸性条件下解离作用较弱,荧光扫描的最大发射波长比中性时仅红移了 5.0 nm,明显低于球蛋白,证明伴花生球蛋白结构展开程度较小。

3.4 在不同的 pH 条件下,伴花生蛋白的 Zeta 电位值均小于球蛋白,说明伴花生球蛋白表面所带的电荷较少。伴花生球蛋白的溶解性高于球蛋白。

3.5 酸处理对花生球蛋白亚基结构的影响大于对伴

花生球蛋白,即花生球蛋白的酸解敏感性高于伴花生球蛋白。

参考文献

- [1] 黎鹏.动态超高压微射流技术对花生球蛋白功能性质的影响及其机理研究[D].南昌:南昌大学,2008
LI Peng. Influence of high pressure microfluidization on the functional properties of arachin and its mechanism study [D]. Nanchang: Nanchang University, 2008
- [2] 杜寅.花生蛋白主要组分的制备及凝胶特性研究[D].中国农业科学院,2012
DU Yin. Study on the preparation and gel properties of the peanut protein fractions [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences
- [3] Chiou R Y Y. Effects of heat treatments on peanut arachin and conarachin [J]. Journal of Food Biochemistry. 1990, 14(3): 219-232
- [4] Neucere N J, Ory R L, Carney W B. Effect of roasting on the stability of peanut proteins [Z]. 1969: 17, 25-28
- [5] Kella N K D. Heat-induced conformational changes in arachin at low pH: mechanism of gel formation [J]. Food Hydrocolloids. 1987, 1(3): 181-190
- [6] 涂宗财,姜颖,陈钢,等.动态超高压微射流对花生球蛋白结构和功能性质的影响[Z].200973-75
- [7] 赵谋明,辛佩贤,赵强忠,等.酸性条件下花生分离蛋白亚基结构的变化规律[J].现代食品科技,2014, 12:37-42
ZHAO Mou-ming, XIN Pei-xian, ZHAO Qiang-zhong, et al. Structural variations in the subunits of peanut protein isolates under acidic conditions [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 12: 37-42
- [8] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685
- [9] Catsimpoalas N, Campbell T G, Meyer E W. Association-dissociation phenomena in glycinin [J]. Archives of biochemistry and biophysics. 1969, 131(2): 577-586
- [10] 杨晓泉,陈中,赵谋民.花生蛋白的分离及部分性质研究[J].中国粮油学报,2001,5:25-28
YANG Xiao-quan, CHEN Zhong, ZHAO Mou-ming. Separation and characterization of peanut protein [J]. Journal of Chinese cereals and oils association, 2001, 5: 25-28
- [11] Peng I C, Dayton W R, Quass D W, et al. Studies on the subunits involved in the interaction of soybean 11S protein and myosin [J]. Journal of Food Science, 1982, 47(6): 1984-1990

- [12] 刘岩,赵冠里,苏新国.花生球蛋白和伴球蛋白的功能特性及构象研究[J].现代食品科技,2013,9:2095-2101
LIU Yan, ZHAO Guan-li, SU Xin-guo. Functional and conformational properties of arachin and conarachin [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 9: 2095-2101
- [13] Schultz J, Allison H, Grice M. Specificity of the Cleavage of Proteins by Dilute Acid. I. Release of Aspartic Acid from Insulin, Ribonuclease, and Glucagon [J]. Biochemistry. 1962, 1(4): 694-698
- [14] Matsudomi N, Sasaki T, Kato A, et al. Conformational changes and functional properties of acid-modified soy protein [J]. Agricultural and Biological Chemistry. 1985, 49(5): 1251-1256

现代食品科技