

脂质自由基 AAPH 体外氧化对富硒大豆分离蛋白性质和结构的影响

范婷, 赵强, 赵小莉, 雷莉, 熊华

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

摘要: 本文采用 2,2'-偶氮二(2-脒基丙烷)二盐酸(AAPH)在有氧条件下热分解制备过氧自由基, 代表脂肪氧合酶诱导多不饱和脂肪酸脂质过氧化反应产生脂质自由基, 研究 AAPH 体外氧化对富硒大豆分离蛋白性质和结构的影响。随着 AAPH 添加浓度的增加, FT-IR 结果表明大豆分离蛋白(SPI)的 α -螺旋、 β -转角和无规卷曲结构增加, β -折叠结构相对减少; SDS-PAGE 结果表明 SPI 的亚基在浓缩胶顶端逐步聚集; 蛋白溶解性、游离巯基含量下降; 表面疏水性、乳化性、乳化稳定性呈现先上升后下降趋势; 内源荧光峰位(λ_{max})表现为逐渐蓝移, 且荧光强度先增加后减少。富硒大豆分离蛋白(SSPI)在结构、亚基分布、性质等多项测试指标方面均优于普通大豆分离蛋白(OSPI), 可能与 SSPI 中含有较高的硒含量, 因而表现出更强的抗氧化性有关。

关键词: 富硒大豆; 大豆分离蛋白; 过氧自由基; 性质; 二级结构

文章编号: 1673-9078(2016)2-100-106

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.016

Effects of Peroxyl Radical Produced by *in vitro* Oxidation by Lipid Radical AAPH on Properties and Structure of Selenium-enriched SPI

FAN Ting, ZHAO Qiang, ZHAO Xiao-li, LEI Li, XIONG Hua

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Peroxyl radicals were generated by the thermal decomposition of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) under aerobic conditions in this study and served as a representative free radical derived from lipoxygenase-induced lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids. The effects of the peroxyl radical on the properties and secondary structure of selenium-enriched soy isolate protein (SPI) were investigated. With increasing concentrations of AAPH, the results of Fourier transform infrared spectroscopy showed that the α -helix, β -turn, and random coil content increased, while the β -sheet content decreased. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) patterns indicated that the subunits of SPI accumulated at the top of the stacking gel; protein solubility and the free sulfhydryl content of SPI decreased. Surface hydrophobicity, emulsifying activity, and emulsifying stability of SPI increased initially, but later decreased; the wavelength of the maximum emission (λ_{max}) in the intrinsic fluorescence spectrum was gradually blue-shifted, and fluorescence intensity first increased then decreased. The selenium-enriched soy isolate protein was superior to ordinary soy isolate protein in terms of structure, distribution of subunits, properties, and other test indicators, which may be related to the high selenium content in selenium-enriched soy isolate protein, indicating its stronger antioxidant activity.

Key words: selenium-enriched soy; soy protein isolate; peroxyl radical; properties; secondary structure

硒是谷胱甘肽过氧化物酶中的重要成分, 它催化过氧化物还原, 其生物化学作用主要是抗氧化^[1]。研究表明, 硒元素可以显著地提高富硒植物蛋白质组分的抗氧化活性, 如富硒绿茶^[2]、富硒大米^[3]、富硒大蒜

收稿日期: 2015-05-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301436); 国家“十二五”农村领域科技计划项目(2013AA102203-05)

作者简介: 范婷(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品蛋白质化学

通讯作者: 赵强(1981-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为植物蛋白质化学与营养、食品资源开发与综合利用、乳液及微胶囊等

^[4]等。虽然富硒植物蛋白抗氧化的机制暂时还不清楚, 但其活性与硒密切相关, 甚至呈现很好的量效关系^[2,5]。江西丰城被誉为“中国生态硒谷”, 土壤中硒元素平均含量为 0.28 $\mu\text{g/g}$, 为天然富硒蛋白的研究提供了基础条件。本课题组以江西丰城的天然富硒农产品为研究对象, 通过上千次不同植物品种的硒含量测试, 发现植物体蛋白质含量高确实更容易转化和存储硒。从测试数据中可以发现, 大豆可以大量富集硒, 一些样品中硒含量可达 0.13 $\mu\text{g/g}$, 是普通大豆的 10 多倍。大豆是世界上最重要的食品原料之一, 蛋白含量可达

35~40%，有研究表明大豆富集的硒 80% 与蛋白结合，并且大豆硒蛋白的生物利用度可达 86~96%^[6]，大豆具有作为新型富硒产品的天然优势。

大豆富含脂肪氧合酶和多不饱和脂肪酸，在制备蛋白过程中，随大豆组织结构被破坏，多不饱和脂肪酸在脂肪氧合酶催化下发生脂质过氧化反应，产生大量活性氧化产物，使大豆蛋白结构发生共价修饰，导致大豆蛋白氧化^[7]。前期研究表明，脂质过氧化体系可通过脂质自由基^[8]和活性次生氧化产物^[9]两种途径诱导大豆蛋白氧化，脂质自由基诱导大豆分离蛋白(SPI)氧化可使 SPI 发生聚集和肽链断裂反应，还可提高其乳化特性^[10]和体外消化率^[11]，然而，蛋白质氧化对富硒大豆分离蛋白的性质和结构的影响则鲜有报道。

因此，本实验采用 2,2'-偶氮二(2-脒基丙烷)二盐酸(AAPH)在有氧条件下热分解产生的过氧自由基代表脂质自由基，以普通大豆分离蛋白作为对照，研究氧化对富硒大豆分离蛋白的溶解性、乳化性、表面疏水性等性质和二级结构的影响，以及硒在氧化过程中的作用，以期合理认识外环境活性氧的存在对硒蛋白结构稳定性的影响奠定基础，为天然富硒农产品开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

富硒大豆(平均硒含量 $\approx 0.128 \mu\text{g/g}$)，江西丰城富硒基地；普通大豆(平均硒含量 $\approx 0.017 \mu\text{g/g}$)，市售；Folin-酚试剂、三羟甲基胺基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸(EDTA)、丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)等，国药集团上海化学试剂有限公司；2,2'-盐酸脒基丙烷(AAPH)、5,5'-二硫代二硝基苯甲酸盐(DNTB)、1-苯氨基萘-8-磺酸(ANS)、过硫酸铵、 β -巯基乙醇，美国 Sigma 公司；石油醚(沸程 60-90 °C)等化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器及设备

RH-basic 1 磁力搅拌器，德国 IKA 公司；LXJ-IIB 离心机，海安亭科学仪器厂；Mini PROTEAN[®]电泳仪，美国伯乐公司；FreeZone 12-Plus 冷冻干燥机，美国 Labconco 公司；新世纪 T6 紫外分光光度计，北京普析通用仪器有限公司；Nicolet 5700 傅里叶变换红外光谱仪，美国 Thermo Nicolet 公司；F-4500 荧光分光光度计，日本日立公司

1.3 实验方法

1.3.1 原料的预处理

新鲜粉碎好的富硒和普通大豆中分别加入 5 倍体积的石油醚，室温下搅拌脱脂 4 h，重复 5 次，静置沉淀，上清液回收，沉淀物置于通风橱中风干。收集过 80 目筛的干燥脱脂大豆粉于 4 °C 冰箱备用。

1.3.2 大豆分离蛋白(SPI)的制备

大豆分离蛋白的制备采用袁等人^[10]的碱提酸沉法并稍作改动，具体过程为：脱脂大豆粉按 1:10(m/V) 加入去离子水并搅拌，用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 8.0，室温下低速搅拌 2 h，离心(8000 g, 20 min, 4 °C)，残渣重复提取，合并上清液用 1 mol/L HCl 调 pH 至 4.5，静置 0.5 h 后再次离心分离(5000 g, 20 min, 4 °C)，弃上清液，收集沉淀水洗两次，加入适量水溶解，1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0，之后在 4 °C 下透析 24 h，每 6 h 换水一次，SPI 经冷冻干燥后 4 °C 保存备用。

1.3.3 SPI 中硒含量的测定

SPI 中硒含量的测定采用原子荧光光谱法(AFS)，每组实验做 3 次平行，得到富硒大豆分离蛋白(SSPI)中硒含量为 0.339 $\mu\text{g/g}$ ，普通大豆分离蛋白(OSPI)中硒含量为 0.033 $\mu\text{g/g}$ 。

1.3.4 过氧自由基氧化 SPI 制备

制备方法^[8]如下：将制得的 SPI 溶于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)中，蛋白浓度为 10 mg/mL，加入一定量的 NaN_3 使其达到 0.5 mg/mL。再将一定质量 AAPH 溶解于大豆蛋白溶液，使 AAPH 终浓度分别为 0、0.04、0.2、1、5、25 及 125 mmol/L，在 37 °C 避光条件下将混合液在恒温振荡水浴器中振荡反应 24 h。反应结束后，将反应液置于冰浴中使之迅速降温至 4 °C 以下，随后将反应液在 4 °C 条件下 15900 g 离心 1 h，移除少量冷却过程中出现的不溶物质(非蛋白质沉淀)。然后，将反应液在 4 °C 去离子水中透析 72 h 以除去残余未反应 AAPH，透析过程中每隔 6 h 更换一次去离子水。最后冷冻干燥得到过氧自由基氧化大豆分离蛋白，并置于 4 °C 条件下贮存备用。

1.3.5 傅里叶红外光谱(FT-IR)分析

将过氧自由基氧化处理的蛋白样品与 KBr 经干燥处理后，取少量样品粉末与 KBr 混合，研磨均匀，然后压片，测定 FTIR。扫描范围 4000~400 cm^{-1} ，分辨率 4 cm^{-1} ，扫描次数 32 次。谱图分析采用 Omnic 8.0 software 软件和 Peakfit 4.12 软件进行分析。首先 Omnic 8.0 software 对谱图进行坐标转换，再用 Peakfit 4.12 在酰胺 I 带 1600~1700 cm^{-1} 范围内进行两点基线校正，平滑处理，去卷积，做二阶导数谱同时采用 Gaussian 法进行多次曲线拟合，使残差 r^2 最小；最后对 FSD 谱进行峰归属，从而计算各子峰面积的相对百分含量。

1.3.6 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

SDS-PAGE 分析参考 Zhao 等人^[12]使用的方法, 采用 5% 的浓缩胶和 12.5% 的分离胶。蛋白样品溶解于 SDS-PAGE 缓冲液中(pH 8.6, 0.125 mol/L Tris-HCl 缓冲液中含有 1.0% (m/V) SDS, 0.05% (m/V) 溴酚蓝, 30% (V/V) 蔗糖以及 5% (V/V) 2-β-巯基乙醇)。沸水加热 10 min, 离心(10000 g, 10 min), 上样量 10 μL, 进行恒流凝胶电泳, 跑两块胶时浓缩胶中电流 15 mA, 分离胶 25 mA, 直到染料的前沿迁移至凝胶的底部结束电泳。凝胶染色采用 0.25% 考马斯亮蓝(R-250), 脱色采用含甲醇和醋酸的去离子水溶液。

1.3.7 内源荧光

将 SPI 分散于 0.01 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液中, 磁力搅拌 2 h 后在 4 °C 条件下 10000 g 离心 30 min; 以牛血清白蛋白(BCA)为标准蛋白, 采用福林酚法测定上清液中蛋白浓度, 通过稀释使得上清液中蛋白质浓度达到 0.1 mg/mL。采用 F4500 型荧光分光光度计在激发波长 295 nm 条件下得到 300~400 nm 之间的发射光谱, 以 pH 7.0, 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液为空白。

1.3.8 游离巯基含量的测定

游离巯基含量的测定参考 Zhao 等人^[13]使用的方法, 精确称取 30 mg 样品, 加入 10 mL pH 8.0 的缓冲液(每升溶液含 1.2 g EDTA, 6.9 g 甘氨酸, 10.4 g Tris), 振荡溶解, 再加入 0.1 mL Elman 试剂(0.1 g DTNB 试剂溶于 25 mL 缓冲液中), 25 °C 下避光振荡 1 h, 离心(5000 g, 10 min), 测定上清液在 412 nm 处的吸光度。游离巯基(-SH)含量的计算公式如下:

$$\text{游离巯基含量}(\mu\text{mol/g}) = 73.53 \times A_{412} \times D / C$$

注: A_{412} 为吸光值; D 为稀释倍数, 1.01; C 为蛋白浓度 (mg/mL); $73.53 = 10^6 / (1.36 \times 10^4)$, 1.36×10^4 为 TNBA(Elman 试剂与巯基反应所生成的 5-硫代-2-硝基苯甲酸(盐)阴离子)的摩尔消光系数, 单位为 L/mol 系数。

1.3.9 表面疏水性

表面疏水性的测定采用 ANS 荧光探针法^[14]。用蒸馏水配制 0.05% (m/V) 的蛋白质溶液, 高速分散机 (12000 r/min) 均质 1 min 后, 逐步稀释至浓度为 0.005% - 0.025%, 取不同浓度的样品溶液 2 mL, 测定各浓度蛋白质的荧光强度(FI_0), 再分别加入 8 mmol/L 的 ANS 溶液 20 μL, 涡旋振荡 5 s, 避光静置 10 min, 然后测定添加 ANS 溶液样品的荧光强度(FI_1)。激发波长 $\lambda_{ex} = 390$ nm, 发射波长 $\lambda_{em} = 470$ nm。 FI_1 与 FI_0 的差值记为 FI, 以荧光强度 FI 对蛋白质浓度作直线, 不同斜率即为不同处理的蛋白分子的表面疏水性指数

(H_0)。

1.3.10 溶解性

蛋白质溶解性的测定根据 Zhao 等人^[12]报道的方法, 稍作改动。称取 0.25 g 样品溶于 25 mL 去离子水中, 搅拌 30 min, 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调节 pH 值 7.0, 再搅拌 30 min, 常温下离心(5000 g, 15 min)。取适量上清液稀释后, 福林酚法测定上清液中的蛋白质含量, 以 BCA 为标准蛋白。

$$\text{溶解度} = \frac{\text{上清液中蛋白质量}}{\text{样品中蛋白质量}} \times 100\%$$

1.3.11 乳化活性和乳化稳定性的测定

乳化活性及乳化稳定性采用比浊法测定^[12]。乳化活力指数(EAI)是指单位质量的蛋白质所产生的界面面积, 可根据乳状液的浊度(T)与界面面积(S)的关系($S=2T$), 测得吸光度, 计算 T 值^[15]($T=2.303A$, 其中 I_0 为入射光强度, I 为透射光强度, A 为吸光度), 从而得出 EAI 值。测定方法: 在圆底离心管中加入 16 mL 0.1% (m/V) 的样品溶液和 4 mL 大豆油, 用匀浆机以 12000 rpm 高速剪切 1 min, 立即从底部 0.5 cm 处移取乳状液 50 μL, 加入 5 mL 0.1% SDS (m/V) 溶液稀释, 涡旋振荡混匀, 在 500 nm 处测吸光值 A_0 , 10 min 后再次移取 50 μL 乳状液, 用 SDS 溶液稀释后测定其吸光值 A_{10} 。

$$EAI(m^2/g) = \frac{2 \times 2.303}{C \times (1 - \varphi) \times 10^4} \times A_0 \times D$$

$$ESI(\%) = \frac{A_{10}}{A_0} \times 100$$

注: C: 样品溶液浓度(g/mL); 0.001 g/mL; φ : 油相所占体积分数(L/L)为 0.20; D: 稀释倍数, 100; $2.303 = \ln 10$ 。

1.3.12 数据分析

采用 origin 9.1 软件对实验数据进行统计分析, 结果多表示为平均值 ± 方差的形式, 未作特殊说明差异显著性分析限定为 $p < 0.05$, 利用 ANOVA 分析的 Tukey test 检验。实验设计都是三次平行两个重复。

2 结果与分析

2.1 红外光谱分析

如图 1 为 SPI 的 FTIR 酰胺 I 带(1600~1700 cm^{-1}) 的去卷积图, 由图可知, 经过不同浓度 AAPH 热降解形成过氧自由基氧化修饰, SPI 的蛋白构象发生了不同程度的变化, 如 OSPI 与 SSPI 的 FTIR 结果在最大吸收峰及部分样品的峰形方面明显不同。参照文献^[16]可知 1646~1664 cm^{-1} 归属为 α -螺旋, 1664~1681 cm^{-1} 归属为 β -转角, 1615~1637 cm^{-1} 和 1682~1700 cm^{-1} 归

属为 β -折叠, 1637~1645 cm^{-1} 归属为无规卷曲。表 1 为 SPI 二级结构组成变化的分析结果。从表中可知, 随着过氧自由基浓度的增加, OSPI 或是 SSPI 中 α -螺旋、 β -转角和无规卷曲结构都有不同程度的增加, β -折叠结构相对减少, 由此看来, 过氧自由基氧化修饰使 SPI 的二级结构组成发生了改变。 β -折叠结构组成变化是蛋白质二级结构变化的一个主要特征^[17], 与 OSPI(β -折叠由 38.98%减少为 35.91%)相比, SSPI(β -折叠由 38.25%减少为 36.83%)的 β -折叠减少幅度小, 这表明 SPI 经氧化处理后, SSPI 构象稳定性比 OSPI 稳定性好, 这可能与富硒大豆中硒元素具有抗氧化作用有关。

2.2 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 可分析蛋白质氧化对大豆蛋白亚基组成及共价交联的影响, 结果见图 2。由图可知, SPI 的 2S、7S、11S 蛋白的各亚基条带均清晰可见, 而 SSPI 较 OSPI 则条带丰度更高; 随着 AAPH 浓度的增加, 浓缩胶顶端开始出现聚集条带, 此聚集条带颜色随着 AAPH 浓度的增加而加深; 而且当 AAPH 浓度为 5 mmol/L 时, 亚基条带开始出现明显的消退现象, 聚集条带进一步的形成, 即 SPI 随着氧化程度的增加共价交联度越高, 这一结果与 Wu 等人^[8]的发现一致。同时不难发现, 当 AAPH 浓度从 0.2 mmol/L 到 5 mmol/L, 图 2 样品 OSPI 中聚集条带(>70 ku)条带的灰度值明显较 SSPI 中高; 当 AAPH 浓度为 25 mmol/L 时, 即图 2 泳道 13 中 SSPI 仅较少条带颜色减淡, 同时伴随着大量的聚集条带生成, 而对应泳道 6 中 OSPI 所有

亚基条带几乎消退殆尽, 随着 AAPH 浓度增大到 125 mmol/L 时, SSPI 较 OSPI 仍保留少量聚集条带(≥ 130 ku)。综上说明相比 SSPI 亚基, OSPI 亚基更易于被过氧自由基氧化。

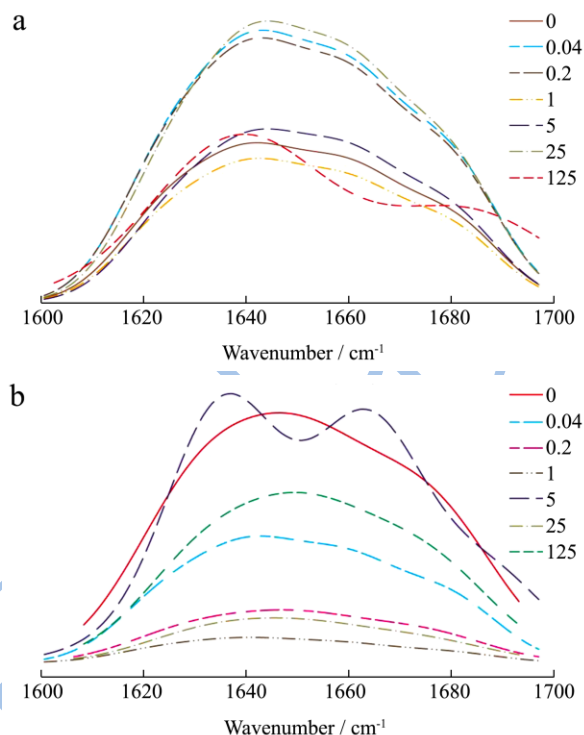


图1 过氧自由基氧化修饰SPI的红外光谱酰胺I带(1600~1700 cm^{-1})的去卷积图

Fig.1 Deconvoluted FT-IR spectra in the amide I region of SPIs modified by peroxyl radical

注: a:OSPI, b:SSPI。

表 1 红外光谱估算分析 SPI 的二级结构组成

Table 1 Estimation of the secondary structural compositions of SPIs by FT-IR

AAPH /(mmol/L)	OSPI				SSPI			
	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
0	21.56	38.98	16.03	23.43	21.40	38.25	15.99	23.36
0.04	21.82	37.97	16.33	23.88	21.57	38.14	16.15	23.74
0.2	21.72	38.29	16.27	23.72	21.75	37.75	16.28	24.22
1	21.58	38.56	16.11	23.80	21.85	37.87	16.17	24.21
5	22.42	36.74	16.72	24.12	21.9	37.58	16.62	23.90
25	22.44	36.33	16.76	24.27	22.09	37.29	16.67	24.14
125	22.66	35.91	17.3	24.43	22.18	36.83	16.67	23.94

由于本实验中是采用还原性 SDS-PAGE 分析蛋白样品, β -巯基乙醇已经完全切断 SPI 的二硫键, 聚集条带的存在说明过氧自由基氧化使得 SPI 形成非二硫键的共价交联物, 它可能是通过夺氢反应将蛋白质分子转化成为蛋白质碳中心自由基, 两个蛋白质碳

中心自由基结合可形成碳碳共价交联, Chao 等人^[18]认为碳碳共价交联是 ROO 造成蛋白质形成共价交联物的主要原因; SSPI 亚基不易于被过氧自由基氧化这个现象与 Liu 等^[3]研究富硒大米发现一致, 说明硒元素可以提高富硒植物蛋白组分的抗氧化活性。

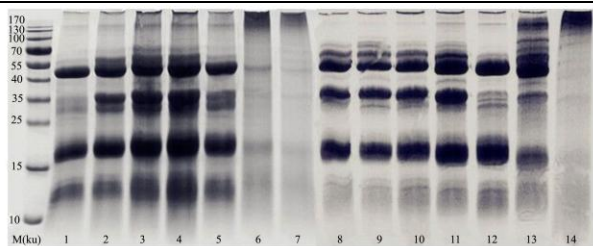


图2 过氧自由基氧化修饰 SPI 的 SDS-PAGE 图

Fig.2 SDS-PAGE patterns of SPIs modified by peroxy radical

注：泳道 1-7 及 8-14 分别对应 0、0.04、0.2、1、5、25、125 mmol/L AAPH 处理 OSPI/SSPI。

2.3 过氧自由基氧化对 SPI 内源荧光光谱的影响

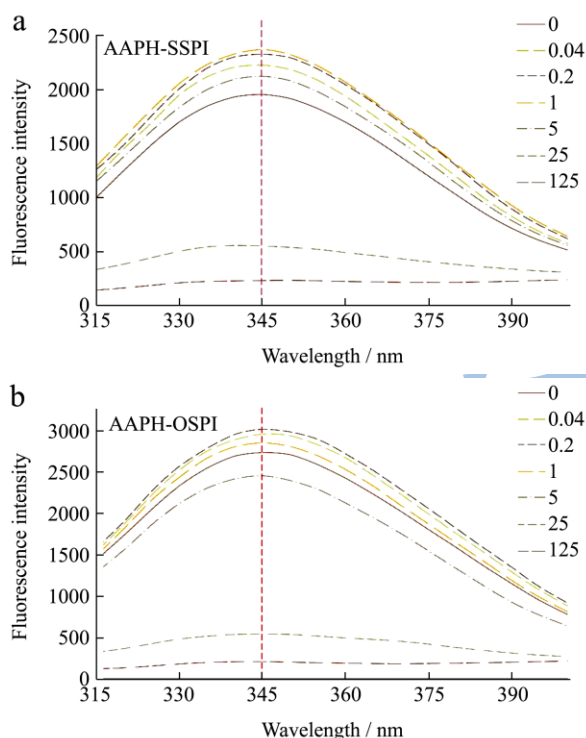


图3 过氧自由基氧化修饰 SPI 的内源荧光图谱

Fig.3 Intrinsic fluorescence spectra of SPIs modified by the peroxy radical

注：A:SSPI, B:OSPI。

内源荧光能够反映蛋白质色氨酸残基的氧化程度及其微环境的变化，进而表征氧化对蛋白质三级结构的影响，SPI 内源荧光光谱见图 3。随着蛋白质氧化程度的增大，SPI 的 λ_{max} 逐渐蓝移，且荧光强度呈现先升后降的趋势。当 AAPH 添加浓度为 5 mmol/L 时，SSPI 的荧光强度开始下降，而 OSPI 在 AAPH 浓度为 1 mmol/L 时荧光强度即开始下降；当 AAPH 添加浓度为由 0 mmol/L 增加到 125 mmol/L 时，SSPI 的 λ_{max} 从 345 nm 蓝移到 340 nm， λ_{max} 处荧光强度降为初始

蛋白的 12%(图 3A)，而 OSPI 的 λ_{max} 从 345 nm 蓝移到 305 nm， λ_{max} 处荧光强度仅为初始蛋白的 5%(图 3B)。由此可见，AAPH 氧化对 OSPI 的 λ_{max} 蓝移和荧光强度的影响更为显著，对 SSPI 结构的影响相对较弱。

过氧自由基氧化导致 SPI 的 λ_{max} 蓝移表明氧化使 SPI 发生聚集，分子中的色氨酸残基暴露程度降低，原先位于分子外部处于极性环境中的色氨酸残基被转移到内部非极性环境中^[19]；内源荧光强度下降，是由于夺氢反应将色氨酸残基转化为亚稳态的色氨酸自由基，进一步与分子氧接合形成色氨酸过氧自由基，继而转化成为犬尿氨酸^[20]。氧化对 SSPI 的内源荧光特性影响较小，可能是由于硒元素降低了氧化对 SPI 的影响程度，其荧光图谱分析结果与红外、电泳分析结果相一致，进一步表明硒元素具有抗氧化作用。

2.4 过氧自由基氧化对 SPI 游离巯基含量的影响

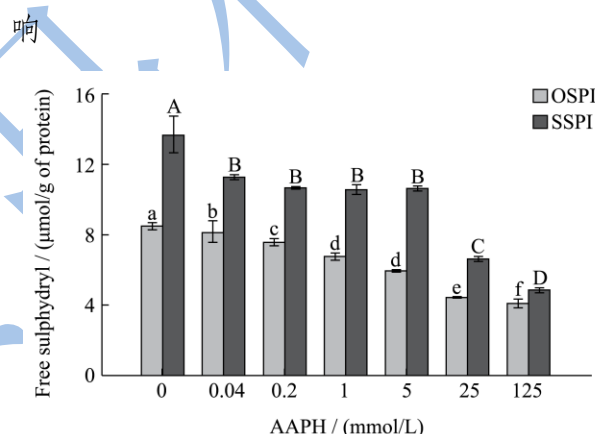


图4 过氧自由基氧化修饰对 SPI 游离巯基含量的影响

Fig.4 Effect of oxidative modification by the peroxy radical on the content of free sulfhydryl group of SPIs

巯基和二硫键是稳定蛋白质分子构象的重要化学键，对蛋白质的功能特性起着重要的决定作用。在不同的氧化环境中，蛋白质中游离巯基既可能被氧化成可逆的二硫键或次磺酸，也可形成不可逆的磺酸^[21]，从而导致蛋白结构中巯基含量下降以及改变蛋白质分子中巯基和二硫键的含量和分布。如图 4 所示，随着 AAPH 浓度的增加，SPI 的游离巯基含量不断减少，SSPI 从 13.61 $\mu\text{mol/g}$ 下降到 4.83 $\mu\text{mol/g}$ ，OSPI 从 8.45 $\mu\text{mol/g}$ 下降至 4.08 $\mu\text{mol/g}$ ，表明过氧自由基氧化使得 SPI 的结构均发生了变化，此即与 FTIR 结果一致。随着自由基氧化程度的加深，OSPI 中游离巯基的含量显著降低($p < 0.05$)，而对于 SSPI 当 AAPH 浓度从 0.04 mmol/L 到 5 mmol/L，游离巯基的含量几乎不变；另一方面，相同浓度 AAPH 氧化修饰的 SPI，SSPI

的游离巯基含量均高于 OSPI, 由此可知, SSPI 中的硒元素可能具有一定的抗氧化活性, 抑制游离巯基的氧化。

2.5 过氧自由基氧化对 SPI 表面疏水性的影响

表面疏水性可以反映蛋白质表面疏水性基团的数量, 它决定蛋白质分子间相互作用的能力, 对蛋白质结构的稳定性、功能性质、及构象具有重要的作用。如图 5 所示, SPI 的 H_0 随着 AAPH 浓度的增加呈现先升高后降低的趋势(SSPI 的 H_0 先升至初始蛋白的 173%, 后降至 86%; 而 OSPI 的 H_0 先升至初始蛋白的 141%, 后降至 42%), 这可能是由于 SPI 的结构随着氧化程度的增加逐渐展开, 分子内部的疏水性基团逐渐暴露, 从而导致其 H_0 的增加; 当氧化程度进一步加大时(超过 0.04 mmol/L), 展开的蛋白质分子又在疏水作用和二硫键的作用下重新聚集^[22], 使 SPI 表面疏水性降低, 该结果表明氧化改变了 SPI 的分子构象。当 AAPH 添加浓度为 0.04 mmol/L 时, SSPI 的 H_0 增加幅度大于 OSPI, 说明低浓度过氧自由基促进了 SPI 结构的展开, 疏水性基团的暴露, 且 SSPI 较 OSPI 疏水性基团展开更多; 当 AAPH 添加浓度为 125 mmol/L 时, SSPI 的 H_0 减少幅度远小于 OSPI, 可能是由于 SSPI 中较高含量硒元素的存在, 起到了一定的抗氧化作用, 抑制了部分二硫键的生成, 此结果与游离巯基含量变化的结果一致。

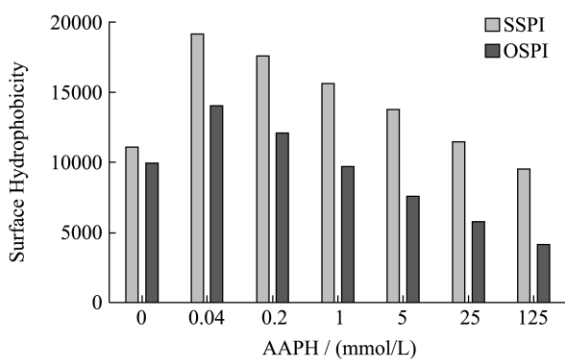


图 5 过氧自由基氧化修饰对 SPI 表面疏水性的影响

Fig.5 Effect of oxidative modification by the peroxy radical on the surface hydrophobicity of SPIs

2.6 过氧自由基氧化对 SPI 溶解性的影响

蛋白质的溶解性是蛋白质其它功能特性的基础, 也可用来表征自由基氧化 SPI 的聚集和变性程度, 如图 6 所示。由图可知, SPI 的溶解度随 AAPH 浓度的增大而逐渐降低, 先慢后快。这可能主要是由于低浓度 AAPH 氧化使 SPI 形成可溶性蛋白聚集体; 但随蛋白质氧化程度增大, 共价交联使可溶性蛋白聚集体进

一步发生聚集, 最终形成不可溶聚集体, 导致氧化 SPI 溶解性下降^[8-9]。氧化过程中, 相同浓度 AAPH 处理时 SSPI 的溶解度始终高于 OSPI, 再次说明可能是硒元素的抗氧化活性为 SPI 起到了一定的保护作用。

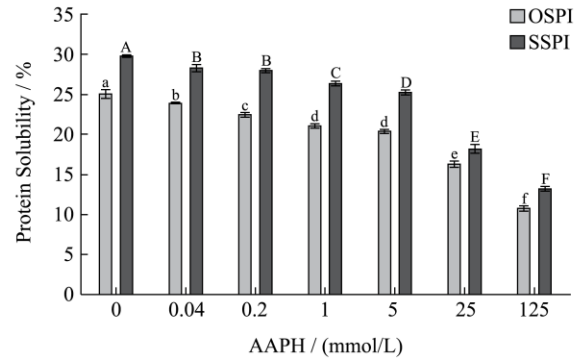


图 6 过氧自由基氧化修饰对 SPI 溶解性的影响

Fig.6 Effect of oxidative modification by the peroxy radical on the solubility of SPIs

2.7 过氧自由基氧化对 SPI 乳化活性和乳化稳定性的影响

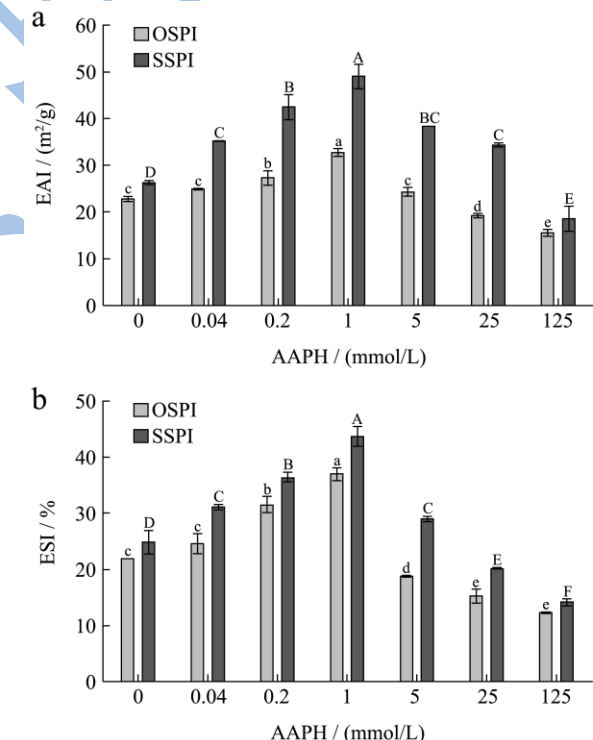


图 7 过氧自由基氧化修饰对 SPI 乳化性和乳化稳定性的影响

Fig.7 Effect of oxidative modification by the peroxy radical on the EAI and ESI of SPIs

影响蛋白质乳化性的因素很多, 如蛋白质分子量分布、蛋白浓度、蛋白质结构、表面疏水性、pH 值、温度、油相体积等。采用不同浓度过氧自由基氧化修饰的 SPI 的乳化活性(EAI)及乳化稳定性(ESI)的变化

如图7所示。由图可知,随着AAPH浓度增大,SSPI和OSPI的EAI和ESI均呈现先增加、后下降的趋势,这与表面疏水性的结果比较一致,这可能是由于SPI通过巯基氧化使维持蛋白空间结构的非共价键(疏水相互作用、静电相互作用)被破坏,SPI分子部分展开,分子柔性提高,更多蛋白分子结合到油-水界面;同时,低浓度AAPH氧化时,蛋白分子内部疏水残基暴露在蛋白表面,蛋白表面疏水性增强,故蛋白乳化性和乳化稳定性增强;伴随着SPI氧化程度加深,巯基逐渐氧化形成二硫键而发生交联,形成不可溶SPI聚集体^[8,9],分子柔性降低、表面疏水性减弱、蛋白表面积缩小,故乳化性及乳化稳定性呈下降趋势。SSPI的EAI/ESI值均高于OSPI,表明SSPI的抗氧化能力高于OSPI,这与Molan等^[2]研究发现含硒绿茶氧化活性强于普通绿茶结果一致。

3 结论

以实验室自制低氧化程度SSPI为原料,采用不同浓度AAPH热降解形成的过氧自由基氧化修饰得到不同氧化程度的SSPI,同时采用OSPI为对照,研究AAPH体外氧化修饰对富硒大豆蛋白性质和结构的影响。研究表明,FT-IR和SDS-PAGE电泳结果表明SPI二级结构发生了改变,随着AAPH添加浓度的升高,SPI溶解性、游离巯基含量下降;表面疏水性、乳化性、乳化稳定性呈现先上升、后下降趋势;内源荧光光谱中荧光峰位(λ_{max})表现为逐步红移,荧光强度先增加后减少。同时,以上各项测试指标SSPI均优于OSPI,表现出具有较好的抗氧化性,这可能与SSPI中硒元素的抗氧化活性有关,具体作用机理还有待进一步的实验探究。

参考文献

[1] 黄开勋,刘琼,徐辉碧.硒蛋白的抗氧化性研究与第21个氨基酸的发现[J].无机化学学报,2008,24(8):1213-1218
HUANG Kai-xun, LIU Qiong, XU Hui-bi. Antioxidation of selenoproteins and discovery of 21st natural amino acid [J]. Chinese Journal of Inorganic Chemistry, 2008, 24(8): 1213-1218

[2] Molan A, J Flanagan, W Wei, et al. Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea [J]. Food Chemistry, 2009, 114(3): 829-835

[3] Liu K, Y Zhao, F Chen, et al. Purification, identification, and in vitro antioxidant activities of selenium-containing proteins from selenium-enriched brown rice [J]. European Food Research and Technology, 2012, 234: 61-68

[4] 岳晶念,戚向阳,谢笔钧,等.富硒大蒜中不同含硒蛋白抗氧化活性的研究[J].中国食品学报,2010,10(5):60-67
YUE Jing-nian, QI Xiang-yang, XIE Bi-jun, et al. Studies on antioxidation activities of different Se-proteins from Se-enriched garlic [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 10(5): 60-67

[5] Zhao L, G Zhao, B Hui, et al. Effect of selenium on increasing the antioxidant activity of protein extracts from a selenium-enriched mushroom species of the *Ganoderma* genus [J]. Journal of Food Science, 2004, 69(3): 184-188

[6] Sathe S K, A C Mason, R Rodibaugh, et al. Chemical form of selenium in soybean (*Glycine max* L.) lectin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(11): 2084-2091

[7] Huang Y, Y Hua, A Qiu. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation [J]. Food Research International, 2006, 39(2): 240-249

[8] Wu W, C Zhang, X Kong, et al. Oxidative modification of soy protein by peroxy radicals [J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 295-301

[9] Wu W, C Zhang, Y Hua. Structural modification of soy protein by the lipid peroxidation product malondialdehyde [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009, 89(8): 1416-1423

[10] Chen N, M Zhao, W Sun, et al. Effect of oxidation on the emulsifying properties of soy protein isolate [J]. Food Research International, 2013, 52(1): 26-32

[11] Chen N, M Zhao, W Sun. Effect of protein oxidation on the in vitro digestibility of soy protein isolate [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 3224-9.

[12] Zhao Q, C Selomulya, H. Xiong, et al. Comparison of functional and structural properties of native and industrial process-modified proteins from long-grain indica rice [J]. Journal of Cereal Science, 2012, 56(3): 568-575

[13] Zhao Q, H Xiong, C Selomulya, et al. Effects of spray drying and freeze drying on the properties of protein isolate from rice dreg protein [J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 6(7): 1759-1769

[14] Kato A, S Nakai. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1980, 624(1): 13-20

[15] Castanho M AR B, N C Santos, LM S Loura. Separating the turbidity spectra of vesicles from the absorption spectra of membrane probes and other chromophores [J]. European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 1997, 26(3):

- 253-259
- [16] 刘燕燕,曾新安,陈晓东.FTIR 分析脉冲电场和热处理后的大豆分离蛋白结构变化[J].光谱学与光谱分析.2010,30(9): 2340-2344
- LIU Yan-yan, ZENG Xin-an, CHEN Xiao-dong. Effects of pulsed electric fields and heat treatments on SPI structure analyzed by FT-IR [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2010, 30(9): 2340-2344
- [17] 孙冰玉,刘琳琳,张光,等.高温高湿对大豆分离蛋白二级结构及乳化性的影响[J].大豆科技.2014,4:26-31
- SUN Bing-yu, LIU Lin-lin, ZHANG Guang, et al. Effect of high temperature and humidity on the secondary structure and emulsibility of soybean protein isolate [J]. Soybean Science & Technology, 2014, 4: 26-31
- [18] Chao C C, Ma Y S, Standman E R. Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(7): 2969-2974
- [19] Vivian J T, Callis P R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins [J]. Biophysical Journal, 2001, 80(5): 2093-2109
- [20] Simat T J, Steinhart H. Oxidation of free tryptophan and tryptophan residues in peptides and proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(2): 490-498
- [21] Eaton P. Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2006, 40: 1889-1899