

高压处理对花生分离蛋白凝胶特性和分子结构的影响

何轩辉, 刘红芝, 刘丽, 胡晖, 王强

(农业部农产品加工与质量控制重点开放实验, 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193)

摘要: 本文研究了质量浓度为 5% 的花生分离蛋白 (PPI) 在 50~200MPa 压力范围处理 5 min 后的热凝胶硬度、弹性和粘结力的变化情况, 并对处理前后的 PPI 进行了 SDS-PAGE、圆二色谱 (CD)、质谱和分子结构模拟分析。SDS-PAGE 电泳结果表明, PPI 中分子量为 61.0 ku 的亚基对压力最敏感, 对此亚基进行质谱分析, 结果表明压力处理后, 此亚基的氨基酸序列未发生变化, 含 580 个氨基酸, 实际分子量为 66.5 ku, 为伴花生球蛋白 II 的电泳条带, 在此基础上进行分子模拟, 发现其空间构象在 100MPa 处理后发生了显著变化。CD 结果表明, 高压处理后, PPI 的二级构象发生了显著变化。PPI 热凝性结果表明, 100MPa 处理后其形成的热凝胶硬度最大, 为 172 g, 比未处理提高了 49.6%, 弹性和粘结力与未处理相当。以上结果说明压力处理使得 PPI 热凝胶特性得到了改善。

关键词: 花生分离蛋白; 高压影响; 分子结构; 凝胶

文章编号: 1673-9078(2013)8-1810-1815

Effects of High Pressure on the Gelatin Properties and Molecular Structure of Peanut Protein Isolates

HE Xuan-hui, LIU Hong-zhi, LIU Li, HU Hui, WANG Qiang

(Key Laboratory of Agricultural Product Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture; Institute of Agro-food Science & Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The change of heat-induced gelatin hardness, springiness and cohesiveness of PPI (5%) treated under pressure 50~200 MPa for 5 min were investigated and compared with the untreated PPI by various methods including SDS-PAGE, circular dichroism spectra, mass spectrometry and estimation analysis of molecular structure. SDS-PAGE analysis indicated a subunit known as conarachin II with molecular weight 61.0 ku was more sensitive to pressure, and mass spectrometry analysis shown this subunit contained 580 amino acids whose sequence was not changed after pressure treatment and its actual molecular weight was 66.5 ku. Estimation analysis of molecular structure of this unit showed its steric conformation was significantly changed after pressure 100 MPa treatment. Results from CD showed a secondary structure of PPI also greatly changed under high pressure treatment. PPI treated under 100 MPa resulted in the largest value for heat-induced gelatin hardness, increased by 49.6% compared with untreated PPI and reached 172 g, while springiness and cohesiveness remained equal to that of untreated. All the findings above indicated pressure treatment can improve heat-induced gelatin properties of PPI.

Key words: Peanut protein isolates(PPI); high pressure effects; molecular structure; gelatin

凝胶性作为蛋白质功能特性研究的热点, 因其网状结构可吸附水分、脂肪、风味物质、糖及其它食品成分, 广泛应用于食品加工的各个领域, 研究并开发出一种凝胶性能好的蛋白质产品对食品加工的发展具

收稿日期: 2013-04-24

基金项目: 2009 公益性行业科研专项 (200903043-3-1); 中国农业科学院作物科学研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (zwjj2012yyjg);

国际科技合作项目: 植物蛋白加工与利用技术 (2010DFA32690)

作者简介: 何轩辉 (1984-), 女, 博士, 研究方向为功能食品与活性物质

通讯作者: 王强 (1965-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为粮油加工与功能食品

有重要意义。花生蛋白是一种营养价值较高的植物蛋白, 其营养价值与动物蛋白相近, 且不含胆固醇, 花生蛋白含有大量易被人体吸收利用的必需氨基酸, 同时还具有诱人香味、色洁白, 较大豆蛋白有更多的优越性, 因此作为一种植物蛋白资源可被广泛应用于食品工业中。为了使花生蛋白更好的应用于食品加工领域, 许多学者对花生蛋白进行改性, 以改变花生蛋白的某些功能性质。食品高压技术是一项具有美好前景的高新技术, 已被广泛应用于食品蛋白质的改性。目前已有大量学者用高压技术对食品蛋白质进行了改性研究, 研究结果表明高压可以使大豆蛋白、大豆蛋白

组分、乳清蛋白等乳化性、乳化活性、溶解性、凝胶性等功能特性得到改变^[1-5]。

从近年来的研究结果中可以看出,高压不仅可以改变食品蛋白质的功能特性,同时也会改变其分子构象。Puppo等^[4]表明在200~600 MPa范围内,pH为3和8条件下,大豆分离蛋白的溶解性,表面疏水性,自由巯基含量以及二级结构会发生改变。Sekai等^[6]研究发现,高压处理蛋清蛋白和乳清蛋白混合物所形成的凝胶,经拉曼光谱扫描看出,酰胺III区(980~990 cm^{-1} 处) β -折叠结构发生变化,其含量明显降低,与未处理前结构相比,在疏水区域、酪氨酸(1207 cm^{-1} 处)、色氨酸(880 cm^{-1} 处)和 CH_2 弯曲振动处发生了显著变化。胡飞华等^[7]研究结果中表明,肌原纤维蛋白随着压力的增大 α -螺旋和 β -折叠含量逐渐下降, β -转角和无规卷曲含量则逐渐上升,同一压力下随着时间的延长, α -螺旋含量逐渐减少,而 β -折叠和无规则卷曲含量则先增加后减少, β -转角含量逐渐增加,500 MPa压力处理15 min对肌原纤维蛋白二级结构的影响尤为显著, α -螺旋和 β -折叠含量分别下降到21.57%和31.81%, β -转角和无规卷曲含量则上升到39.49%和7.13%。本研究目的是探明高压对花生分离蛋白热凝胶特性的影响,进一步研究高压处理后花生分离蛋白分子结构的变化情况。为花生分离蛋白在肉制品的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料

脱脂花生粕,山东高唐蓝山有限公司提供。

1.2 主要仪器设备

J-810 圆二色光谱仪,日本 JASCO 公司;UHPL-0.6,天津华泰森森有限公司;LTQ Orbitrap Velos 质谱仪,美国 Thermo 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 花生分离蛋白制备

将脱脂花生粕粉按1:10添加去离子水,用NaOH溶液调pH值为9.0,在室温下搅拌提取2 h,4200 r/min,离心10 min,上清液用HCl溶液调pH值到4.5左右,再次离心,去掉上清液,沉淀加水搅拌均匀后,冷冻干燥后备用,用凯氏定氮法测得蛋白质含量为86.46 \pm 0.09%,同时测得灰分为3.35 \pm 0.25%,水分含量为4.12 \pm 0.13%,粗脂肪含量为0.60 \pm 0.08%,总糖含量为5.47 \pm 0.10%。

1.3.2 高压处理

将蛋白样品配制成质量浓度为5% (m/V) 搅匀之后(尽量避免起泡),装入聚丙烯真空袋中,赶出气泡,避免在高压处理过程中产生袋子破裂,进行真空热封包装。检查高压设备的密封状况。将装有样品的真空袋放入高压设备的样品容器中,从电脑上设置好压力,分别进行50、80、100、150、200 MPa,各保压5 min(压力波动范围 \pm 10 MPa)后取出冷冻干燥后备用。

1.3.3 花生分离蛋白热凝胶的制备及测定

将高压处理后的花生分离蛋白用去离子水配成质量浓度为14%的溶液,于95 $^{\circ}\text{C}$ 下加热1 h,取出后迅速冷却,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置24 h后进行凝胶硬度和弹性的测定^[8]。采用Pinterits A等^[9]的方法略做修改,运用TA-TX2i质构仪(探头直径12 mm)进行测定。运行模式:TPA;测前速度:2.0 mm/s;测试速度0.8 mm/s;下压距离50%,测后速度:0.8 mm/s;数据采集速率:200 个/秒。凝胶硬度(g)=第一次压缩过程中的峰值力(Force 2);弹性=第二次开始压缩到压缩结束所用的时间与第一次开始压缩到压缩结束所用的时间的比值(Time diff 4:5/Time diff 1:2),粘结力=第二次压缩与第一次压缩的正峰下的面积的比值。

1.3.4 SDS-PAGE

参考王延华等^[10]报道的方法。分离胶浓度为13%,浓缩胶浓度为5%。样品制备:将0.1000 g的蛋白样品溶解于20 mL 0.01 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 7.2)中,漩涡震荡10 min使其充分溶解,10000 r/min高速离心10 min,吸取10 μL 上清液,添加10 μL 样品缓冲液(0.08 mol/L Tris-HCl缓冲液,pH 6.8),含1% (m/V) SDS、2% (V/V) 巯基乙醇、5% (V/V) 甘油和0.025% (m/V) 溴酚蓝混匀,上样前沸水浴5 min后冷却,上样量为8 μL ,凝胶电泳于恒流模式下进行,在浓缩胶中电流80 mA,进入分离胶后增至110 mA。凝胶染色液采用0.25%考马斯亮蓝(R-250)溶液,采用高甲醇的醋酸溶液脱色,甲醇/冰乙酸/去离子水按227:37:236 ($V/V/V$)。蛋白质电泳图谱采用AlphaEase FC凝胶成像系统进行拍照,并用其自带的AlphaEase FC分析软件进行分析。

1.3.5 圆二色谱

将蛋白质浓度1 mg/mL的待测样品置于光径为0.02 cm的石英池中,于圆二色光谱仪(J-810,日本JASCO公司)上于室温下于远紫外区185 nm~245 nm测其圆二色性光谱。所得数据以平均残基摩尔椭圆率表示。每个样品重复测定十次,数据经计算机处理并用仪器提供的Reed'S程序参照CD光谱估算蛋白二级结构中 α 螺旋, β 折叠, β 转角和无规卷曲所占的

比率。

1.3.6 质谱分析

参照王丽娜等^[1]方法有所改动,首先对PPI、100 MPa、200 MPa PPI样品中的伴花生球蛋白II进行酶解,具体操作为:目标蛋白切胶回收,纯化水洗胶三次,加入70 μL 脱色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min,然后用100% 乙腈脱水处理。加入还原剂DTT,于55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴1 h,随后加入同体积的烷基化试剂(IAA),室温避光放置30 min,经乙腈脱水至胶块完全变白后于每管中加入浓度为12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰蛋白酶溶液,27 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴12~16 h,再加1 μL 10% TFA,终止反应,吸取上清保存胶粒,用50%乙腈含0.1% TFA溶液萃取两次,合并上清,浓缩,用0.1% TFA溶液复溶。

取复溶后上清液20 μL 进行质谱分析。样品经C18反相柱(100 mm \times 75 μm , 3 μm)分离后,直接用LTQ Orbitrap Velos仪器,美国Thermo公司;检测。肽段在反相柱上的洗脱梯度是8~95%乙腈(含0.1%甲酸)洗脱60 min,流速为250 nL/min。质谱主要参数设置如下:离子传输管温度为200 $^{\circ}\text{C}$;电喷雾电压是1.85 kV。一级质谱在Orbitrap里扫描,扫描范围是400~1500 m/z,二级质谱在LTQ里用CID碰撞模式完成,标准化碰撞能量为35%,活化时间为10 ms。所以信息用proteome Discoverer 1.2软件进行数据库检索,得到最合适的鉴定结果。

1.3.7 蛋白质结构模拟

分子动力学模拟以及模拟前的能量最小化都是使用Discovery studio3.0模拟软件包。各样品的力场参数使用的是parm99力场,初始坐标提取自PDB晶体结构,H原子通过Discovery studio3.0的LEAP模块加入。使用SHAKE算法进行键约束计算(包括H原子)。采用Discovery studio3.0的PMEMD模块,以最陡下降法对体系进行1000步的能量最小化。分别将体系在292.15 K温度,标准大气压下和292.15 K温度,1973.85大气压进行10 ns的分子动力学模型。在分子动力学模拟中,长程静电相互作用采用Particle Mesh Ewald(PME)算法。

1.3.8 数据分析

本实验中所有数据为三次测定的平均数,利用SPSS.18一维方差分析中LSD比较样品平均值之间的差异显著性。

2 结果与讨论

2.1 SDS-PAGE 电泳分析

高压处理前后花生分离蛋白的SDS-PAGE电泳图

谱如图1所示,图中1-7分别为标品、未高压PPI、50 MPa、80 MPa、100 MPa、150 MPa和200 MPa样品的电泳条带。从图中可以很清晰看出花生分离蛋白各亚基的条带,各亚基条带对应的分子量分别为:61.0 ku、40.5 ku、37.5 ku、35.5 ku、23.5 ku、18.0 ku、17.0 ku和15.5 ku,其中61.0 ku归属伴花生球蛋白II,40.5 ku、37.5 ku、35.5 ku、23.5 ku归属为花生球蛋白,18.0 ku、17.0 ku和15.5 ku归属为伴花生球蛋白I。进一步分析可知,随着压力的增大,61.0 ku的亚基条带颜色呈现先加深后减淡的趋势,表明超高压处理后使花生分离蛋白发生先聚集后展开。而伴花生球蛋白I的亚基条带无显著差异,表明超高压处理对伴花生球蛋白I基本无影响,而花生球蛋白在不同压力处理后,其亚基条带都有明显的加深,表明超高压使得花生分离蛋白中球蛋白出现了聚集体,由于SDS-PAGE电泳中采用 β -巯基乙醇打断花生分离蛋白的二硫键,聚集体条带的存在说明压力使得花生分离蛋白中形成了非二硫键的共价交联物。以上结果总体表明了相对于花生球蛋白和伴花生球蛋白I而言,伴花生球蛋白II对压力最为敏感。

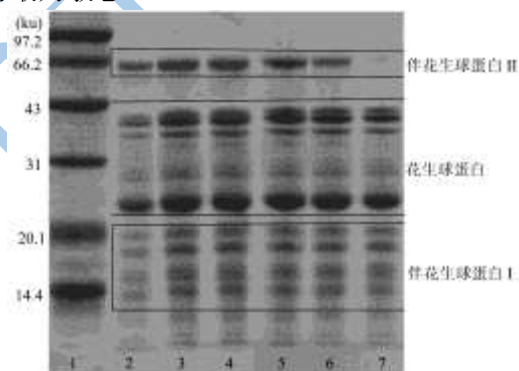


图1 不同压力样品的SDS-PAGE图谱

Fig.1 SDS-PAGE of the samples treated under different pressures

2.2 圆二色谱分析

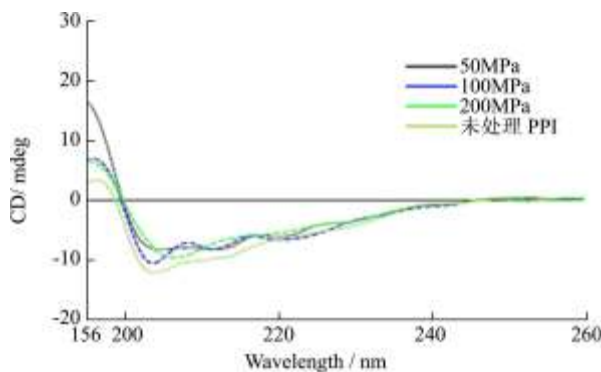


图2 不同压力的花生分离蛋白CD光谱

Fig.2 CD spectra of PPI after high-pressure treatment

根据电子跃迁的能级能量大小,蛋白质的 CD 光谱可分为三个波长范围:250 nm 以下的远紫外光谱区,其圆二色性主要由肽键的 $n \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁引起;250~300 nm 的近紫外光谱区,主要由侧链芳香基团肽键的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁引起;300~700 nm 的紫外-可见光光谱图,主要由蛋白质辅基等外在生色基团引起^[12]。远紫外 CD 可用来表征高压对花生分离蛋白二级结构的影响,不同压力处理样品的远紫外 CD 光谱见图 2。根据测得 CD 谱线经计算机 Reed's 模拟得到的未处理和经高压处理花生分离蛋白二级结构的变化情况如表 1 所示。在蛋白质或多肽的规则二级结构中,肽键是高度有规律排列的,排列的方向性决定了肽键能级跃迁的分裂情况。因此,具有不同二级结构的蛋白质或多肽所产生的 CD 谱带的位置、吸收的强弱都不相同如图 2 所示。 α -螺旋结构在靠近 192 nm 有一正的谱带,在 222 和 208 nm 处表现出两个负的特征肩峰谱带; β -折叠的 CD 谱在 216 nm 有一负谱带,在 185~200 nm 有一正谱带; β -转角在 206 nm 附近有一正 CD 谱带。因此,根据所测得蛋白质或多肽的远紫外 CD 谱,能反映出蛋白质或多肽链二级结构的信息。

表 1 不同压力的花生分离蛋白二级结构变化

Table 1 The change of second structure of PPI after high-pressure treatment

样品	Reed's/%			
	α 螺旋	β 折叠	β 转角	无规卷曲
PPI	9.60±0.09	32.10±0.05	10.60±0.04	47.70±0.05
50 M	35.00±0.03	0	29.50±0.04	35.50±0.09
100 M	41.40±0.03	3.20±0.03	15.50±0.06	39.90±0.07
200 M	25.20±0.06	15.00±0.02	17.90±0.02	41.90±0.04

从表 1 中可以看出,天然花生分离蛋白构象中含有 9.6% α -螺旋、32.1% β -折叠,10.6%转角和 47.7%无规则卷曲,主要以 β 折叠和无规则卷曲构象为主。经过不同压力处理后,花生分离蛋白的二级构象发生了显著的变化,50 MPa、100 MPa 和 200 MPa 压力处理后,花生分离蛋白由原来 β 折叠和无规则卷曲构象为主转变为以 α 螺旋构象和 β 转角构象为主,其 α 螺旋构象和 β 转角构象较未处理 PPI 有显著增加, α 螺旋构象分别增加了 25.4%、31.8%、15.6%, β 转角构象分别增加了 18.9%、4.9%、7.3%。而 β 折叠构象和无规则卷曲显著降低,在 50 MPa 时,花生分离蛋白无 β 折叠构象。随着压力的增加,PPI 中 α 螺旋构象先增加后降低, β 折叠构象降低至 0 后随压力增加而增加。无规则卷曲含量有不同程度的减少,在低压处理下,达到最小,随压力的增加而增加。表明了压力处理过程中,蛋白质间的氢键作用降低。转角构象较天然花生分离蛋白都有增加,随着压力增加,其含量先增加后减少,在 100 MPa 时,达到最小。 β -转角大多位于蛋白质分子的表面,它可以改变多肽链的方向,使多肽链弯曲、回折和重新定向。 β -转角结构含量的改变说明花生分离蛋白分子的形状可能发生了变化,蛋白质分子伸展,不对称程度增高。说明在低压下,花生分离蛋白中几乎没有偶极子转换产生的弱氢键作用。随着压力的增加,PPI 中有序结构先增加后减少,表明在压力处理过程中,蛋白质先展开,由于展开的 PPI 构象不稳定,又发生了重组。

2.3 花生分离蛋白中伴花生球蛋白 II 氨基酸

序列测定结果

表 2 伴花生球蛋白 II 的肽段鉴定

Table 2 Peptide identification with conarachin II

样品	Description	Score	Coverage	Proteins	Unique Peptides	Peptides	PSMs	AAs	M _w /ku	calc. pI
对照	Conarachin [Arachis hypogaea]	2067.11	55.17	3	3	39	680	580	66.5	7.17
100 MPa	Conarachin [Arachis hypogaea]	2033.85	58.97	3	3	46	668	580	66.5	7.17
200 MPa	Conarachin [Arachis hypogaea]	1335.18	55.52	4	12	38	466	580	66.5	7.17

未超高压和分别经 100 MPa、200 MPa 处理后花生分离蛋白中伴花生球蛋白 II 经 LTQ Orbitrap Velos 液-质联用分析结果如表 2 所示,表中可以看出,所测样品分子质量均为 66.5 ku,与 SDS-PAGE 中测得其分子质量为 61.0 ku 有较大不同,由于 LTQ Orbitrap Velos 液-质联用分析后的结果是从蛋白质库进行比对过的结果,

因此认为伴花生球蛋白 II 的分子质量为 66.5 ku,其等电点为 7.17,含有 580 个氨基酸,氨基酸序列如表 6-2 所示,其中有 196 个疏水性氨基酸,189 个极性氨基酸,103 个碱性氨基酸,92 个酸性氨基酸,同时也表明了超高压前后伴花生球蛋白 II 的氨基酸序列未发生变化。氨基酸序列为: MRGRVSPLMLLLGILVLASVS ATQ

AKSPYRK TENPCAQRCLQSCQ QEPDDLKQKACES
 RCTKLEYDPRCVYDTGATNQRHPPGERTRGRQPG
 DYDDDRRQPRREEGGRWGPAEPREEREREEDWRQ
 PREDWRRP SHQQRKIRPEGREGEQE WGTGSEV
 REETSRRNNPFYFPSRRFSTRYGNQNGRIRVLQRFD
 QRSKQFQNLQNHRI VQIEARPNTLVLPKHAuDNIL
 VIQQGQATVTVANGNNRKSFNLDDEGHALRIPSGFI
 SYILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASS
 RDQSSYLQGF SRNTLEAAFN AEFNEIRRVLLEENA
 GGEQEERGQRRRSTRSSDNEG VIVKVS KEHVQEL
 TKHAKS VS KKGSEEEEDITNPINLRDGE PDLSNNFG
 RLFEV KPDKKNPQLQDLDMMLTCVEIKEG ALMLP
 HFNSKAMVIVVVNKG TGNLEL VAVRKEQQQRGR
 REQEWE EEEDEEEEGSNRE VRR YTARLKEGD VF
 IMPAAHPVAINASSELHLLGFGINAENHRIFLAG
 DKDNVIDQIEKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKQRES
 HFVSA

2.4 分子模拟结果

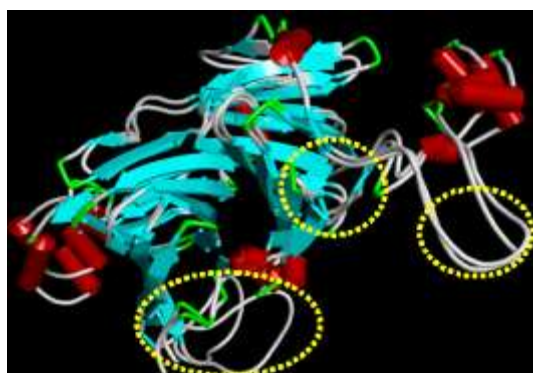


图3 未处理和 100MPa 处理伴花生球蛋白 II 空间结构叠合

Fig.3 The spatial structure superimposed with conarachin II of high pressure treatment (untreated and 100MPa)

在 2.1 和 2.3 结果的基础上，将未经过超高压和 100 MPa 处理后的花生分离蛋白中伴花生球蛋白 II 的空间构象叠合，结果如图 3 所示。从图中可以看出，经过 100 MPa 后花生分离蛋白中伴花生球蛋白 II 的结构发生了显著的变化，图中黄色虚线标出结构为两个空间结构叠合后的不同之处，其具体的不同如表 3 所示，从表 3 中可以看出，两种构象中有 48 个氨基酸的结构发生了变化，其中未处理花生蛋白中伴花生球蛋白 II 有 14 个氨基酸参与了 β -转角的构象，14 个氨基酸参与了无规则卷曲的构象，18 个氨基酸参与了 β -折叠的构象，2 个氨基酸参与了 α -螺旋的构象；100 MPa 处理后花生分离蛋白中伴花生球蛋白 II 有 7 个氨基酸参与了 β -转角的构象，25 个氨基酸参与了无规则卷曲的构象，8 个氨基酸参与了 β -折叠的构象，8 个

氨基酸参与了 α -螺旋的构象，表明了经过超高压处理后，伴花生球蛋白 II 大量的 β -转角和 β -折叠构象转变为无规则卷曲构象，表明了经超超高压处理，伴花生球蛋白 II 的结构变得更为疏松，进一步表明了超高压使花生分离蛋白结构变得更为松散。

表 3 二级结构比对结果

Table 3 Secondary structure of the PPI with or without high-pressure treatment

氨基酸编号	氨基酸名称	未处理 PPI	100MPa 处理 PPI
		二级结构	二级结构
PRO168	脯氨酸 (P)	Turn	Coil
PHE169	苯丙氨酸 (F)	Turn	Coil
PHE176	苯丙氨酸 (F)	Coil	Sheet
GLN183	谷氨酰胺 (Q)	Coil	Turn
ASN184	天冬酰胺 (N)	Coil	Turn
PHE193	亮氨酸 (L)	Coil	Helix
ASP194	天冬氨酸 (D)	Turn	Helix
GLN195	谷氨酰胺 (Q)	Turn	Helix
ARG196	精氨酸 (R)	Turn	Helix
GLN201	谷氨酰胺 (Q)	Turn	Coil
ARG207	精氨酸 (R)	Coil	Sheet
ILE208	异亮氨酸 (I)	Coil	Sheet
LEU220	亮氨酸 (L)	Sheet	Coil
PRO221	脯氨酸 (P)	Sheet	Coil
LYS222	赖氨酸 (K)	Sheet	Coil
VAL239	缬氨酸 (V)	Sheet	Coil
THR240	苏氨酸 (T)	Sheet	Coil
GLY244	甘氨酸 (G)	Coil	Turn
ASN245	天冬酰胺 (N)	Coil	Turn
ARG259	精氨酸 (R)	Sheet	Coil
ILE260	异亮氨酸 (I)	Sheet	Coil
SER266	丝氨酸 (S)	Sheet	Coil
TYR267	酪氨酸 (Y)	Sheet	Coil
ARG301	精氨酸 (R)	Turn	Coil
ASP302	天冬氨酸 (D)	Turn	Coil
GLY309	甘氨酸 (G)	Coil	Helix
THR370	苏氨酸 (T)	Helix	Turn
LYS374	赖氨酸 (L)	Sheet	Coil
SER375	丝氨酸 (S)	Sheet	Coil
LYS413	赖氨酸 (L)	Turn	Coil
LYS414	赖氨酸 (L)	Turn	Coil
MET423	蛋氨酸 (M)	Sheet	Coil
MET445	蛋氨酸 (M)	Sheet	Coil
ALA461	丙氨酸 (A)	Sheet	Coil

转下页

接上页

VAL462	缬氨酸 (V)	Sheet	Coil
VAL492	缬氨酸 (V)	Sheet	Coil
ARG493	精氨酸 (R)	Sheet	Coil
THR496	苏氨酸 (T)	Coil	Sheet
ALA497	丙氨酸 (A)	Coil	Sheet
ALA517	丙氨酸 (A)	Coil	Sheet
LEU521	亮氨酸 (L)	Coil	Sheet
ILE528	异亮氨酸 (I)	Sheet	Turn
ASN529	天冬酰胺 (N)	Coil	Turn
SER561	丝氨酸 (S)	Turn	Coil
GLY562	甘氨酸 (G)	Turn	Helix
GLU563	谷氨酸 (E)	Turn	Helix
GLN564	谷氨酰胺 (Q)	Turn	Helix
ASN571	天冬酰胺 (N)	Helix	Turn

质性质发生改变^[13]。另有研究表明随着压力的增大,蛋白质变性越充分,其所形成的凝胶网络结构越致密、精细,从而导致凝胶硬度增加;但当压力增加到一定程度后,蛋白质又发生了聚集,其凝胶性反而发生下降^[14]。在本研究中,高压处理后,蛋白质发生变性,结构伸展,二级构象发生改变,且随着压力的增大,蛋白质中伴花生球蛋白 II 变性程度逐渐增大,其所形成的凝胶硬度在 100 MPa 时达到最大,当压力超过 100 MPa 后,蛋白质聚集可能逐渐增大,导致所形成的热凝胶硬度大幅度降低。

3 结论

本研究表明50~200 MPa压力范围处理花生分离蛋白,其凝胶特性发生了显著性变化,在100 MPa时花生分离蛋白所形成热凝胶的硬度达到最高,为 172.52 ng,较未处理PPI而言,提高了49.6%,弹性和粘接力与未处理PPI相当。经压力处理后,PPI的二级构象发生显著性变化,由原来β折叠和无规则卷曲构象为主转变为以α螺旋构象和β转角构象为主,其α螺旋构象和β转角构象较未处理PPI有显著增加,蛋白质发生伸展和重组。同时在压力处理过程中,PPI中伴花生球蛋白 II 对压力最敏感,其一级序列在处理前后未发生变化,但分子构象在100 MPa处理后发生了显著的变化。表明在不同的压力水平下,PPI分子结构和空间构象发生了改变。

2.5 凝胶性

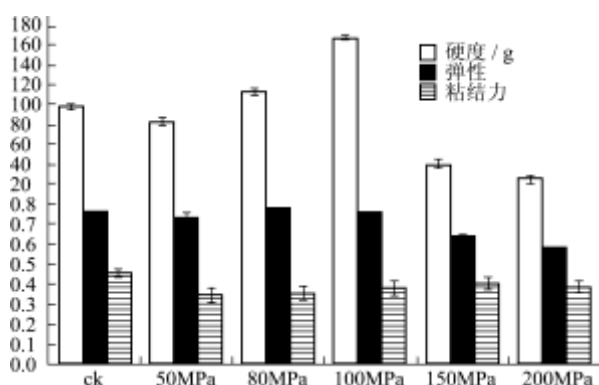


图4 高压对花生分离蛋白凝胶性的影响

Fig.4 The effect of high pressure on PPI gelatin

将未处理和经过不同压力处理后的花生分离蛋白热凝胶进行凝胶硬度、弹性和粘接力测定,结果如图4所示。从图中看出,随着压力的增加,花生分离蛋白形成热凝胶的硬度呈先增加后减小的趋势,当压力为100 MPa时花生分离蛋白形成凝胶的硬度最高为172.52 g,与其他压力水平和未处理PPI相比,有显著性差异 ($p < 0.05$),超过100 MPa时,硬度急剧降低;从不同压力对凝胶弹性的影响看出,在50~100 MPa范围内,凝胶弹性值较高,均大于0.7,与未处理相比,变化不显著 ($p > 0.05$),当超过100 MPa凝胶弹性有所降低。图中可以看出,随着压力的不断升高,粘接力呈现轻微的先增大后减少的趋势,其值在0.33~0.38范围内变化,变化不显著 ($p > 0.05$),且均低于未处理粘接力(0.43)。大部分蛋白质的天然结构一般由一些非共价键的相互作用来稳定,高压处理会破坏其非共价键平衡迫使蛋白质原始结构伸展,氢键结合、疏水结合、离子结合等非共价结合发生变化从而导致蛋白

参考文献

- [1] Yin S W, Tang C H, Wen Q B, et al. Functional properties and in vitro trypsin digestibility of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate: Effect of high-pressure treatment [J]. Food Chemistry, 2008, 110: 938-945
- [2] Patricia B P, Mario P W, Gipsy T M, et al. Effect of high pressure on the interactions of myofibrillar proteins from abalone (*Haliotis rufescens*) containing several food additives [J]. LWT-Food Science and Technology, 2012: 1-6
- [3] Pedro A A, Hosahalli S R, Ashraf A. Ismail. High pressure gelation of soy proteins: Effect of concentration, pH and additives [J]. Journal of Food Engineering, 2008, 88: 331-340
- [4] Puppo M C, Chapleau N, Speroni F, et al. Physicochemical modifications of high pressure-treated soybean protein isolates [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2004, 52: 1564-1571
- [5] Wang X S, Tang C H, Li B S, et al. Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates [J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22:

- 560-567
- [6] Sekai N, Alf A, Nazlin H. A comparative study of heat and high pressure induced gels of whey and egg albumen proteins and their binary mixtures [J]. *Food Hydrocolloids*, 2005, 19: 984 - 996
- [7] 胡飞华,陆海霞,陈青,等.超高压处理对梅鱼鱼糜凝胶特性的影响[J].*水产学报*,2010,34(3):329-335
- [8] Wu H W, Wang Q, Ma T Z, et al. Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein [J]. *Food Research International*, 2009,42: 343-348
- [9] Pinteris A, Amtfield S. D. Improvement of canola protein gelation properties through enzymatic modification with transglutaminase [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2008, 41(1): 128-138
- [10] 王延华,邹晓莉主编.蛋白质理论与技术[M].北京:科学出版社,2004
- Wang Y H, Zou X L. Protein theory and technology [M]. Beijing: Science Press, 2004
- [11] 王丽娜,徐明芳,成希飞,等.LTQ-Orbitrap 液-质联用技术对水牛奶酪蛋白的鉴定[J].*食品科学*,2012,98(33):99-102
- Wang L N, Xu M F, Cheng X F, et al. Identification of Water Buffalo Caseins by Liquid Chromatography and LTQ-Orbitrap Mass Spectroscopy [J]. *Food Science*, 2012, 98(33):99-102
- [12] Sreerama N, Woody R W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra [J]. *Methods Enzymo*, 2004, 383: 318-351
- [13] Angsupanich K, Edde M, Ledward D A. Effects of high pressure on the myofibrillar proteins of cod and turkey muscle [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1999, 47(1):92-99
- [14] 金安儿,张月萍,郭素娟.高压下大豆蛋白凝胶化反应之探讨[J].*中国农业化学会志*,1994,32(3):309-321
- Jin A E, Zhang Y P, Guo S J. Study of soybean protein gelation reaction under high pressure [J]. *Journal of Chinese Agriculture Chemistry Society* 1994, 32(3): 309-321