

# 琥珀酰化处理对芸豆蛋白乳化性和体外消化性的影响

范静美, 魏子昊, 徐航, 尹寿伟, 唐传核, 杨晓泉, 刘国琴

(华南理工大学轻工与食品学院, 广州广东 510640)

**摘要:** 本文研究了琥珀酰化对芸豆分离蛋白(KPI)乳化性和体外消化性的影响。KPI酰化包括两个主要的阶段, 酸酐-蛋白比为0~0.2, 为 $\epsilon$ -氨基(Lys)酰化阶段(N-酰化); 再增加酸酐与蛋白比,  $\epsilon$ -氨基酰化基本完成, 反应进入羟基(Thr, Ser)酰化阶段(O-酰化)。在低离子强度下, 蛋白的EAI和ESI随N-酰化度增加急剧增加, 而O-酰化基本不影响蛋白的EAI和ESI; 对照和酰化KPI的EAI和ESI均随溶剂体系离子强度增加而降低。酰化改善KPI的体外消化性能。

**关键词:** 芸豆分离蛋白; 琥珀酰化; 乳化性; 体外消化性

文章编号: 1673-9078(2012)10-1277-1280

## Effects of Succinylation on Emulsifying Properties and *in vitro* Trypsin Digestibility of Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Protein Isolate

FAN Jing-mei, WEI Zi-hao, XU Hang, YIN Shou-wei, TANG Chuan-he, YANG Xiao-quan, LIU Guo-qin

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The effects of succinylation on emulsifying property and the *in vitro* trypsin digestibility of kidney bean protein isolate (KPI) were investigated. The succinylation of KPI included two stages: one is the succinylation of  $\zeta$ -amino groups (N-succinylation) and the other is the succinylation of hydroxyl groups (O-succinylation). The degree of the N-succinylation sharply increased to about 93~94% with the anhydride levels increasing from 0 to 0.2. The O-acylation (Thr, Ser) distinctly occurred only when the N-acylation was nearly complete. The O-acylation occurred only after extensive blocks of  $\zeta$ -amino groups. At low ionized strength, the EAI and EAS increased as the degree of N-succinylation, while the EAI and EAS of succinylated KPI were nearly unaffected in N-succinylation. The EAI and ESI of untreated or succinylated KPI decreased as the ionized strength of the tested solution increased. Additionally, the *in vitro* trypsin digestibility was improved by the succinylation in a dose-dependent manner. The present data indicated that the succinylation could be used to modulate the emulsifying and *in vitro* digestibility of kidney bean protein isolate (KPI).

**Key words:** emulsifying properties; kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein; succinylation; *in vitro* digestibility

*Phaseolus*属豆类是一类丰富而优质的植物蛋白资源, 具有相对均一的蛋白组成, 日益引起国内外食品工作者的关注。芸豆是*Phaseolus*属豆类中最具代表性的蛋白资源, 产量仅次于大豆。芸豆籽粒含丰富的蛋白质(20~30%干基), 氨基酸组成相对较均衡<sup>[1]</sup>。目前, 芸豆的蛋白利用率相对较低, 是一种潜在的豆类蛋白资源。

Phaseolin(芸豆球蛋白)具有良好的功能特性, 如良好的水溶性和乳化性, 但是分离蛋白(KPI)的功能特性较差, 主要源于蛋白制备过程中的酸碱处理造成诱导

收稿日期: 2012-05-25

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(10451064101005149); 华南理工大学中央高校基本科研业务费重点项目(2012zz0082)

作者简介: 范静美(1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事活性包装材料研究  
通讯作者: 尹寿伟(1980-), 男, 博士, 讲师, 主要从事活性食品包装材料研究

的蛋白构象改变<sup>[2]</sup>。分离蛋白是豆类蛋白资源(如大豆)的主要利用形式, 功能特性较差在一定程度上限制这类蛋白资源在食品加工中的应用。因而对芸豆分离蛋白改性修饰可增进该蛋白资源的利用。本研究组研究了高压微射流和高静压处理对芸豆分离蛋白物化和功能特性的影响, 结果表明芸豆蛋白具有紧凑的空间构象和较高的热稳定性, 高压微射流处理可破坏维系蛋白聚合物之间的次级相互作用力, 诱导不溶性蛋白聚合物解聚, 改善蛋白质的溶解度和乳化活性指数; 但不影响维系蛋白二级、三级构象的次级相互作用力<sup>[3]</sup>; 高静压处理可诱导芸豆蛋白分子伸展和疏水性基团的暴露, 但对芸豆分离蛋白构象的影响是有限的。400 MPa和600 MPa高静压处理改善芸豆分离蛋白的溶解度和乳化特性, 但改善程度是非常有限的<sup>[4]</sup>。本研究采用更为剧烈的化学修饰技术诱导芸豆蛋白构象的改变, 来改善芸豆蛋白的功能特性, 以拓展其用途。

化学改性,如琥珀酰化,具有反应简单、应用广泛和效果显著等特点,该类反应主要是对蛋白质残基的侧链基团,如氨基、羟基、巯基及羧基进行修饰改性,通过改变蛋白质的结构、净电荷、疏水基团而引起改变其功能特性的目的。本研究主要探讨琥珀酰化对芸豆分离乳化性和体外消化性的影响,并研究酰化芸豆蛋白对离子强度的敏感性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料和仪器

材料:芸豆分离蛋白(自制);大豆色拉油(食品级,市售);琥珀酸酐和 Trypsin powder 购自 Sigma 公司;其他化学试剂均为分析纯。

仪器:2501PC紫外-可见分光光度计(日本岛津);CR22G高速冷冻离心机(日本日立);Alpha-4冷冻干燥机(德国Christ公司);ULTRA-TURRAX® T25数显均质机(德国IKA-Werke GmbH & Co.,)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 芸豆分离蛋白制备工艺流程

称取100 g脱脂芸豆粉分散于2 L去离子水(1:20,  $m/V$ ),用2 mol/L NaOH溶液调分散液的pH值至8.0,分散液在室温下搅拌2 h,间歇添加NaOH溶液以维持溶液的pH值,后于20 °C离心(12000  $\times g$ , 30 min),弃其沉淀物,调节上清液的pH值为4.5,后于20 °C离心(6000  $\times g$ , 20 min)。弃其上清液,所得沉淀物经两次水洗后(pH 4.5),分散于适量的去离子水中,用2 mol/L的NaOH溶液将pH值调到7.0,离心弃其沉淀物,上清液在0~4 °C透析48 h,冷冻干燥后于-20 °C贮存备用。蛋白质含量采用微量凯氏定氮法测定,蛋白质转换系数:6.25。

#### 1.2.2 酰化处理

琥珀酰化根据Franzen等报道的方法<sup>[5]</sup>,稍加改动。称取2 g芸豆分离蛋白分散在80 mL去离子水中(蛋白浓度为2.5%,  $m/V$ )。在室温下磁力搅拌1 h后,用2 mol/L NaOH溶液调节溶液pH值至8.0。向溶液逐渐添加的琥珀酸酐,维持蛋白溶液的pH值在7.5~8.5的范围。待溶液pH值稳定在8.0后,再继续反应1 h,使酰化反应完全。然后用1 mol/L HCl溶液将溶液pH值调至7.0,以终止反应。蛋白溶液在4 °C透析48 h以除去残余的琥珀酸酐,之后冷冻干燥得到琥珀酰化芸豆蛋白。对照样品的制备过程中不添加试剂,其余操作程序与琥珀酰化蛋白的制备是一样的。

#### 1.2.3 酰化度的测定

酰化度的测定根据Habeeb报道的方法<sup>[6]</sup>,稍作改动。首先,蛋白样品溶于50 mmol/L磷酸缓冲液(含50

mmol/L NaCl, pH 8.5)中,蛋白浓度为1% ( $m/V$ )。1 mL 0.1%的TNBS溶液添加到等体积的蛋白溶液中,在60 °C保温2 h后,反应液快速冷却至室温。顺序添加1 mL 10% SDS和0.5 mL 1 mol/L HCl终止反应。在335 nm下比色,对照样品的吸光度值设为100%,用酰化样品的吸光度值降低程度来表征蛋白质的酰化程度。

#### 1.2.4 乳化活性分析

乳化活性的测定采用经典的比浊法。在测试管中分别加入15 mL 1 mg/mL蛋白质溶液(pH=7.0)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  $\mu L$ 乳液,用1 mg/mL SDS溶液稀释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:

$$EAI = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times DF}{\rho \phi (1 - \theta) \times 10000} \quad (1)$$

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

DF为稀释因子 $DF=100$ ,  $c$ 为蛋白浓度 $g/mL$ ,  $\phi$ 为光程 $\phi=0.01$  m,  $\theta$ 为油相所占分数 $\theta=0.25$ ,  $A_0$ 、 $A_{10}$ 分别为0 min和10 min时的吸光度。

#### 1.2.5 体外胰蛋白酶消化

胰蛋白酶消化采用TCA-NSI法。具体操作步骤如下:待测蛋白样品分散于5 mL 10 mM磷酸缓冲液(pH 8.0)中,添加1 mg胰蛋白酶,反应液在37 °C保温30或120 min。向反应液中添加等体积的20% ( $m/V$ )三氯乙酸溶液终止酶解反应,而后混合液于25 °C离心(10000  $\times g$ , 20 min)。采用微量凯氏定氮法测定上清液中的TCA-可溶氮含量(蛋白质转化系数为6.25)。消化过程中释放出的TCA-可溶氮计算公式如下:

$$N \text{ release}(\%) = (N_S - N_0) \times 100 / N_{tot} \quad (3)$$

注: $N_S(mg)$ 为上清液中的TCA-可溶性氮, $N_0(mg)$ 为消化前蛋白中的TCA-可溶性氮, $N_{tot}(mg)$ 为总的蛋白质含量。

#### 1.2.6 SDS-PAGE

SDS-PAGE根据Laemmli报道的方法<sup>[7]</sup>,分离胶浓度为12%,浓缩胶浓度为4%。样品制备:蛋白样品溶于SDS-PAGE样品缓冲液(0.125 mol/L Tris-HCl缓冲液,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),电泳前煮沸5 min。上样量为10  $\mu L$ ,凝胶电泳于恒流模式下进行,在浓缩胶中电流40 mA,进入分离胶后增至80 mA。凝胶染色液采用0.25%考马斯亮蓝(R-250)溶液,脱色采用高甲醇的醋酸溶液,甲醇/冰乙酸/去离子水按227:37:236 ( $V/V/V$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酰化度

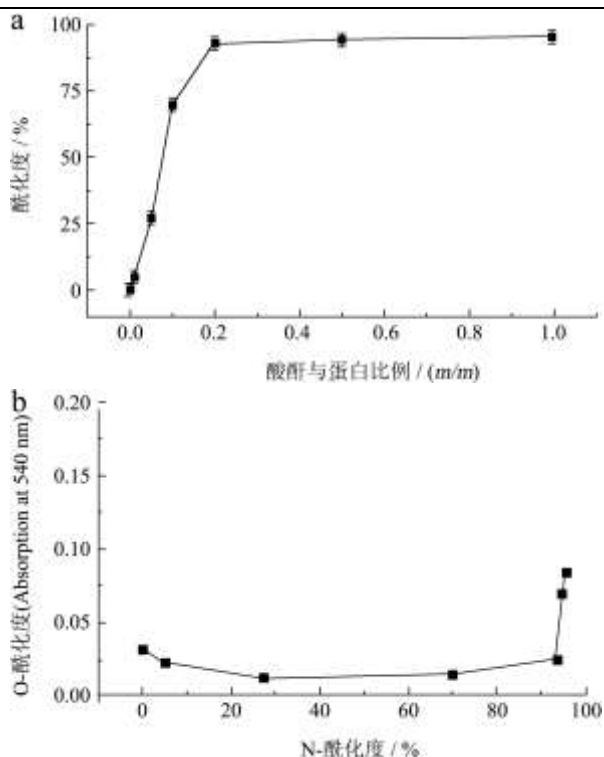


图1 酸酐与蛋白比例对芸豆分离蛋白酰化度的影响 (a) ; N-酰化度与 O-酰化度之间的关系 (b)

Fig.1 Effect of anhydride-to-protein ratio on N-succinylation degree of succinylated KPI samples (a); the relationship between N-succinylation and O-succinylation (b)

蛋白的酰化反应主要是蛋白分子中的亲核基团攻击酸酐羰基碳原子所诱发的一类亲核取代反应。蛋白质分子中的  $\epsilon$ -氨基(赖氨酸残基), 具有较强的亲核能力、较低的 pK 值和较弱的空间位阻, 因而具有较强的酰化反应活性<sup>[8]</sup>。本文以  $\epsilon$ -氨基含量的下降程度来反映蛋白的酰化度。图 1a 给出了酸酐与蛋白比和酰化度之间的关系图。在琥珀酸酐与蛋白比低于 0.2 时, N-酰化度随酸酐与蛋白比增加迅速增加, 酸酐与蛋白为 0.2 时酰化度达到 93~94%, 再继续增加酸酐与蛋白比, 酰化度仅增加 2~3%。Yin 等<sup>[9]</sup>研究酰化对大麻分离蛋白的影响, 指出酸酐与蛋白为 1.0 时, 蛋白的酰化度仅达到 60~70%。芸豆分离蛋白比较容易达到较高的酰化度, 推测认为这主要是因为芸豆分离蛋白中赖氨酸主要分布于蛋白质分子的表面, 比较容易攻击酸酐的羰基碳原子。

$\epsilon$ -氨基与羟基(丝氨酸和苏氨酸残基)具有一定的竞争性,  $\epsilon$ -氨基具有更强的参与酰化反应的活性。在 N-乙酰化度低于 93~94% 时, 即酸酐与蛋白比低于 0.2 时, 参与酰化反应的基团主要是赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基, 反应产物主要是 N-酰化产物; 而当赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基的 N-酰化度达到 93~94%, 再继续增加酸酐与蛋白比例, N-酰化度仅增加 2~3%, 羟基开始参与酰化反应, 反

应进入羟基酰化阶段(见图 1b)。

## 2.2 酰化对芸豆蛋白乳化活性的影响

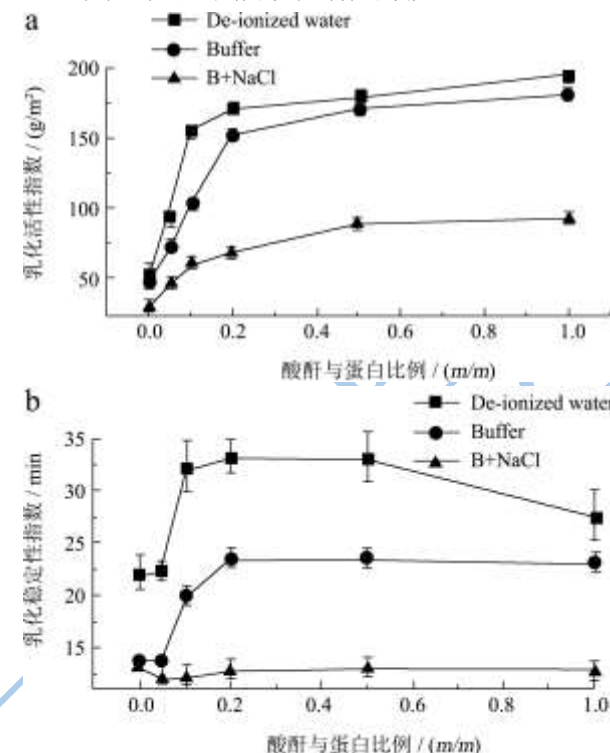


表2 离子强度对琥珀酰化芸豆分离蛋白乳化活性指数 (a) 和乳化稳定性指数 (b) 的影响

Fig.2 Effect of ion strength on emulsifying activity index (EAI) (a) and emulsifying stability index (ESI) (b) of untreated and succinylated KPI

蛋白质的乳化性可通过乳化活性指数和乳化稳定性指数来表征, 蛋白质的乳化性与蛋白质溶解度、表面疏水性和表面电荷分布相关, 溶解性和表面疏水性是决定蛋白乳化性的两个主要因素。在蛋白质溶解度较低的情况下, 溶解性是决定蛋白质乳化性的主要因素; 而在蛋白质溶解度较高的情况下, 表面疏水性是决定蛋白质乳化性的主要因素<sup>[10]</sup>。图 2 结果为酰化蛋白 EAI 和 ESI 随体系离子强度的变化规律。对照和酰化芸豆蛋白的乳化活性指数对溶剂体系离子强度非常敏感, 溶剂体系由去离子水换为 10 mmol/L 磷酸缓冲液, 蛋白质乳化活性指数明显下降, 酰化芸豆蛋白对离子强度增加更为敏感。随着溶剂体系离子强度进一步增加(添加 0.5 mol/L NaCl), 对照和酰化芸豆蛋白溶解度进一步下降(见图 2a)。酰化蛋白的 EAI 随酸酐-蛋白增加呈现先急剧增加, 后缓慢增加趋势。尤其是在较低离子强度下, 在 N-酰化阶段(酸酐-蛋白比 0-0.2)EAI 急剧增加, 而 O-酰化阶段(酸酐-蛋白比 0-0.2) EAI 缓慢增加。Wanasundara 等报道离子强度增加弱化酰化亚麻分离蛋白乳化活性<sup>[11]</sup>。

蛋白乳化稳定性指数是反映蛋白乳化活性的另一

个重要参数, 相关的离子强度对芸豆蛋白乳化稳定性指数(ESI)的影响, 见图 2b。与乳化性指数的情况相似, 酰化蛋白乳化稳定性依赖于溶剂体系。离子强度增加导致对照和酰化芸豆蛋白乳化稳定性指数下降。在低离子强度下, 如去离子水和缓冲液中, 琥珀酰化蛋白改善蛋白的 ESI, 而在较高的离子强度下, 对照和酰化蛋白的乳化稳定较差(图 2b)。

### 2.3 酰化对芸豆蛋白体外消化性的影响

芸豆蛋白较高构象稳定性直接导致其对消化酶水解的抑制, 从而降低这类蛋白消化性能, 限制其在食品加工中应用。采用高压处理(200~600 MPa)不能有效改善芸豆蛋白的体外消化性能, 而本研究采用化学酰化技术手段来改善芸豆分离蛋白消化性能, 用消化过程中所释放的 TCA-可溶性氮含量来表征蛋白的消化性能, 并采用 SDS-PAGE 研究消化过程中芸豆分离蛋白亚基的降解情况, 结果见图 3。所有的蛋白样品有相似的消化曲线。在消化的最初 15 min 内, TCA-可溶性氮迅速增加, 随后的消化过程中 TCA-可溶性氮缓慢增加。对照芸豆蛋白的胰蛋白酶消化性能较差, 这与文献报道是相一致的。芸豆球蛋白(phaseolin) (一种典型的 Vicilin), 是芸豆分离蛋白的主要组分, 具有结构特异性<sup>[12,13]</sup>。Yeboah 等报道在芸豆蛋白消化产物中含有富含  $\beta$ -类结构( $\beta$ -structured structures)的肽段, 这类肽段具有抗消化性<sup>[13]</sup>。

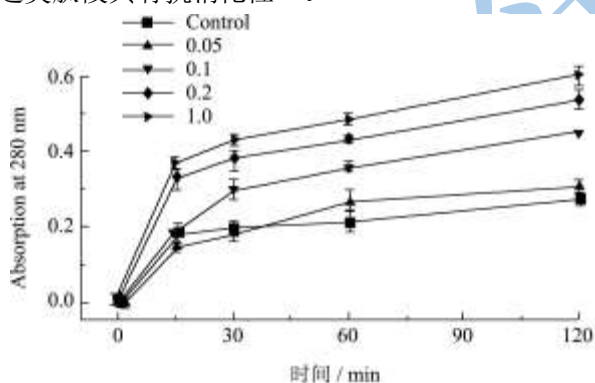


图 3 琥珀酰化对芸豆蛋白体外消化特性

Fig.3 The *in vitro* trypsin digestibility of untreated (control) and succinylated KPI samples

由图 3 可知, 在酸酐与蛋白比为 0.05 时, 琥珀酰化基本上不影响蛋白的消化性能; 随着酸酐与蛋白比增加, 琥珀酰化显著改善芸豆分离的胰蛋白消化能, SDS-PAGE 结果也表明了这一点(见图 4)。El-Adawy 研究酰化对绿豆分离蛋白的影响, 报道了相似的现象<sup>[14]</sup>。酰化对芸豆分离蛋白体外消化性能的改善机制可归结为酰化诱导蛋白溶解度改善和蛋白分子伸展, 从而暴露出更多的酶作用位点。

### 2.4 SDS-PAGE分析

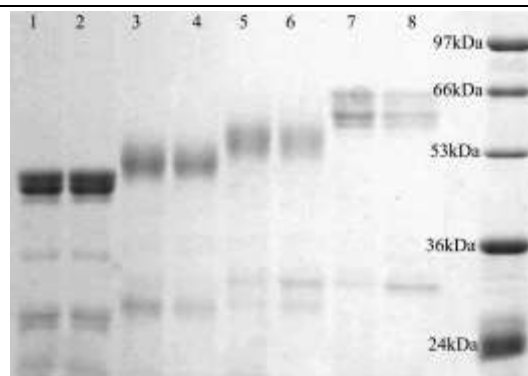


图4 对照和酰化芸豆分离蛋白水解物的电泳图

Fig.4 SDS-PAGE patterns of untreated (control), succinylated KPI samples, and their tryptic hydrolysates

注: 1: KPI; 2: KPI水解物; 3, 5, 7: S-KPI; 4, 6, 8: S-KPI水解物, 酸酐与蛋白比分别为 0.05, 0.1, 0.2。

在酰化芸豆分离蛋白胰蛋白酶消化过程中 TCA-可溶氮分析的基础上, 采用 SDS-PAGE 研究琥珀酰化芸豆蛋白亚基在胰蛋白酶消化过程中的降解情况, 实验结果见图 4。琥珀酰化亚基谱带分布相对较为松散, 这一现象的潜在机制尚不清楚, 需进一步研究, 推测主要和电泳样品制备过程有关。胰蛋白酶消化过程的酰化芸豆分离蛋白样品, 是预先分散在 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 8.0)的, 弱碱性诱导蛋白构象的改变从而在一定程度上影响的酰化芸豆分离蛋白在 SDS-PAGE 上的迁移率。与消化过程中 TCA-可溶性氮释放量变化趋势相一致, SDS-PAGE 上主要谱带的强度随着酸酐与蛋白比增加而减弱, 在低分子量处出现一条明显的谱带。

### 3 结论

3.1 酸酐与蛋白比为0.2时, N-酰化度达到93~94%, 再增加酸酐与蛋白比, N-酰化度仅增加2~3%, N-酰化基本完成后, 羟基氨基酸开始参与酰化反应, O-酰化度逐渐增加;

3.2 琥珀酰化提高芸豆分离蛋白的乳化性能, 但是蛋白的乳化活性和乳化稳定性均随溶液离子强度增加而降低;

3.3 琥珀酰化改善芸豆蛋白的体外胰蛋白酶消化性能。

### 参考文献

[1] Sathe S K. Dry bean protein functionality [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2002, 22: 175-223  
 [2] Yin S W, Tang C H, Wen Q B, et al. Functional and conformational properties of phaseolin (*Phaseolus vulgaris* L.) and kidney bean protein isolate. A comparative study. Journal

- of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90: 599-607
- [3] 尹寿伟,唐传核,温其标,等.微射流处理对芸豆蛋白构象和功能特性的影响[J].华南理工大学学报(自然科学版),2009, 37(10):112-115,123
- [4] 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
- [5] Franzen K L, Kinsella J E. Functional properties of acetylated and succinylated soy protein [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1976,24: 788-795
- [6] Habeeb A F S A. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulphonic acid [J]. Analytical Biochemistry, 1966, 14:328-336
- [7] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685
- [8] Howell R W. Chemical and enzymatic modifications. In Food Proteins: Properties and Characterization [M]; Nakai, S., Modler, H. W., Eds.; VCH Publishers: New York, 1996; 260-310
- [9] Yin S W, Tang C H, Wen Q B, et al. Functional and Structural Properties and in vitro Digestibility of Acylated Hemp (*Cannabis sativa* L.) Protein Isolates [J]. International Journal of Food Science and Technology (accepted)
- [10] Li-Chan E, Nakai S, Wood D F. Hydrophobicity and solubility of meat protein and their relationship to emulsifying properties [J]. Journal of Food Science, 1984, 49: 345-350
- [11] Wanasundara P K J P D, Shahidi F. Functional properties of acylated flax protein isolates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 2431-2441
- [12] Di Lollo A, Alli I, Biliaderis C, et al. Thermal and surface active properties of citric acid-extracted and alkali-extracted proteins from *Phaseolus* Beans [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41: 24-29
- [13] Yeboah F K, Alli I, Simpson B K, et al. Tryptic fragments of phaseolin from protein isolates of *Phaseolus* beans [J]. Food Chemistry, 1999, 67: 105-112
- [14] El-Adawy T A. Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate [J]. Food Chemistry, 2000, 70: 83-91