

大分子拥挤环境下多糖对蛋白肽的修饰研究

齐军茹, 翁静宜, 卓秀英, 康燕辉, 冯纪璐, 杨晓泉

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 采用胃蛋白酶适度水解大豆分离蛋白得到蛋白肽, 在大分子拥挤环境下通过 Maillard 反应制备蛋白肽-葡聚糖共价复合物 (Hydrolyzed Soy Protein Isolated-Dextran Conjugates, HDC), 采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 技术证实大豆 7S 球蛋白和葡聚糖发生了共价结合, 并通过乳化剪切机、荧光分光光度计、差示扫描量热仪和粒度分布仪等对其接枝度、溶解性、热稳定性、抗氧化性和乳化性能进行系统分析。结果表明: 大分子拥挤环境下大豆水解蛋白肽-葡聚糖 60 °C 反应 4 h 就可以形成较高接枝度的共价复合物, 溶解性较大豆分离蛋白 (Soybean protein isolated, SPI) 和大豆分离蛋白-葡聚糖 (Soybean Protein Isolated-Dextran Conjugates, SDC) 有所提高, 热稳定性好, HDC 的自由基清除率明显高于大豆水解蛋白和它与葡聚糖的混合物, 达到 66.39%, 且羟自由基清除率高于维生素 C, HDC 的乳液粒径最小并具有优越的乳化稳定性。

关键词: 大分子拥挤环境; 胃蛋白酶; 糖肽; 葡聚糖; Maillard 反应

文章编号: 1673-9078(2015)2-26-31

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.005

Properties of Protein Peptides Modified by Dextran in Macromolecular Crowding Condition

QI Jun-ru, WENG Jing-yi, ZHUO Xiu-ying, KANG Yan-hui, FENG Ji-lu, YANG Xiao-quan

(School of Light Industry and food sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China)

Abstract: In this work, properties of protein peptides modified by dextran in macromolecular crowding condition in liquid system were investigated. The result indicated that the conjugate prepared by protein peptides and dextran reacting at 60 °C for 4h had superior function on the grafted degree, thermal stability, oxidation resistance and emulsification. First, pepsin was introduced for enzymolysis of soybean protein isolated, preparing the glycopeptide. Glycopeptide-dextran covalent conjugate was prepared via Maillard reaction in macromolecular condition. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to confirm the formation of covalent conjugate of 7S-dextran. In macromolecular crowding conditions, the Maillard reaction and enzymatic were combined for the protein glycosylated reaction, the enzymatic can greatly shorten the chemical modification reaction time. The pepsin give a driving force to unfold the tertiary structure of protein, promoting the exposure of amino groups and covalent attachment to the dextran.

Key words: macromolecular crowding condition; pepsin; glycopeptide; dextran; Maillard reaction

糖基化是多糖对蛋白质的一种重要修饰方法, 食品中主要的蛋白质糖基化是基于 Maillard 反应机理的非酶糖基化, 蛋白质分子的 ϵ -氨基连接到多糖分子的还原端^[1], 它能够改善蛋白质的多种功能性质。共价键结合的蛋白质与多糖形成的大分子复合物, 既保留了蛋白质的表面活性又具有多糖的亲水性能。研究发现引入多糖形成共价复合物后, 蛋白质的溶解度、抗氧化性、抗菌性以及热稳定性等性能提高; 将酶法和化学法有效结合起来对蛋白质进行改性是目前蛋白质改性研究的热点。

收稿日期: 2014-06-11

基金项目: 国家自然科学基金青年面上连续资助项目 (31370036)

作者简介: 齐军茹 (1977-), 女, 副教授, 研究方向: 蛋白质化学与工程

大分子拥挤体系这一概念首次是由 DanZhu 等人^[2]于 2008 年引入到功能性食品体系中的。“大分子拥挤”是生命科学领域中的研究热点, 生命细胞内含有大量的大分子物质如多糖、蛋白质、核酸等, 大分子在细胞体系中浓度达到 7%~40% 时, 就会使细胞内环境变得异常拥挤^[2], 大多数的生化反应实际是在这种拥挤的环境体系中完成的。当体系中存在有高浓度的生物大分子时, 大分子之间的反应遵循分子排斥容积理论^[3], 促进反应向溶质总体积减小的方向, 即朝结合方向移动^[4]; 另外, 大分子拥挤环境下蛋白质分子构型趋于稳定, 蛋白质变性程度以及聚集程度将会减轻^[5-6]。因此, 近几年生命科学家强烈建议把“大分子拥挤”环境与 pH、离子强度和溶液组成等因素一样用

于研究生物大分子,加入拥挤物质逐渐成为一种研究大分子的途径,从而加深对分子间相互作用的了解。在食品工业中,高效率是一个重要的因素,缩短反应时间可以更好的促进反应的进行,提高生产效率。蛋白质分子中加入酶制剂可以打开肽链促进接枝反应的进行,从而大大缩短反应时间。采用蛋白酶水解蛋白,能够有效地打开蛋白大分子的三级空间结构,同时将蛋白的长肽链切断成中长链,使更多的 ϵ -氨基基团暴露出来,通过酶解蛋白再进行糖基化接枝,此时的产物是糖肽。相对于球蛋白来说,更多的肽链上 ϵ -氨基基团与多糖的还原性羰基末端结合,使蛋白与多糖的Maillard反应共价结合更为有效的进行,缩短了反应时间,所得糖肽功能性优越。

本研究利用蛋白适度酶解成多肽,再利用生命科学领域中高分子拥挤环境作为反应介质,添加拥挤试剂,使多肽和多糖发生Maillard反应,得到具有优越的功能性的糖肽共价结合物。分析了该糖肽的溶解性、热稳定性及抗氧化性等,证明其有优越的功能特性,对糖肽的进一步研究提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大豆粕购于山东禹王有限公司,杜马斯燃烧法测定其蛋白质含量为 $55.923\% \pm 0.158\%$;葡聚糖(67 kDa)购于Sigma-Aldrich公司;胃蛋白酶购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;其它化学试剂如无特殊注明均为国产分析纯。

1.2 实验仪器

乳化剪切机, T19, 德国 IKA 公司; 荧光分光光度计, F-7000, 日本 HITACHI 公司; 差示扫描量热仪, Q100, 美国 TA Instruments 公司; 粒度分布仪, Master2000, 英国 Malvern 公司; 高压微射流纳米均质机, M2110EH, 美国 Microfluidics 公司; 紫外分光光度计, UV2300, 上海天美科学仪器有限公司; 磁力加热恒温搅拌器, PCTbasic, IKA 公司; 垂直板电泳仪, PYCZ-30, 北京六一仪器厂; 高速冷冻离心机, CR22G, 日立(Hitachi)公司; 冷冻干燥机, Christ, 博励行仪器有限公司; 酸度计, pHs-3C, 上海雷磁仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆分离蛋白的制备

粉碎后的低温脱脂豆粕按 1:10 的料液比加入去

离子水进行搅拌,调节 pH 为 8.0,室温搅拌 2 h 后 10000 g 离心 30 min。调节上清液的 pH 为 4.5,在 4 °C 条件下静置 30 min 后 8000 g 离心 10 min 得到沉淀。多次漂洗沉淀后,以 1:10 的料液比加入去离子水,调节 pH 为 7.5,搅拌使其充分溶解,在 4 °C 下透析 48 h,冷冻干燥得到 SPI 样品。

1.3.2 胃蛋白酶水解大豆分离蛋白

称取 5.0 g 的大豆分离蛋白溶于 50 mL, pH 7.0, 0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液中,搅拌至大豆分离蛋白完全溶解,用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 2.0 在 37 °C 的条件下,加入 0.050 g 胃蛋白酶,酶活力为 1:3000,20 min 后调整 pH 为 7.0,终止酶解反应。冷冻干燥得到大豆水解蛋白样品。

1.3.3 糖肽产物制备

分别称取 1 g 的大豆水解蛋白和一定量的葡聚糖,加入 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液 10 mL,搅拌 2 h 至完全溶解,添加 0.2% NaN_3 数滴,置于 5 °C 过夜,之后保持恒温,搅拌加热一段时间后,4 °C 下透析 24 h,于 20 °C 在 10000 g 离心 30 min,取上清液,冷冻干燥。此为大豆水解蛋白-葡聚糖共价复合物。

1.3.4 接枝度的测定

采用邻苯二甲醛(OPA)法^[7]测定接枝度。称取 40 mg 的 OPA 溶解于 1 mL 的甲醇中,分别加入 200 g/L 的十二烷基磺酸钠(SDS)2.5 mL、0.1 mol/L 的硼砂 25 mL、100 μL β -巯基乙醇,最后用蒸馏水定容至 50 mL,此为 OPA 试剂。取 OPA 试剂 4 mL 于试管中,分别注入 200 μL 样品液,混匀后于 35 °C 反应 2 min,340 nm 下测其吸光值 D。在 340 nm 下测定其吸光值 A_{340} ,两者之差 ΔA_{340} 即为样品净吸光值,以 OPA 试剂为空白。

产物接枝度为反应体系中反应前后游离氨基含量的变化率(DG),计算公式如下:

$$\text{接枝度} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

注: A_0 为接枝反应前样品吸光值; A_1 为接枝反应后样品吸光值。

1.3.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

依据 Laemmli^[8]的方法进行 SDS-PAGE。分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%,电极缓冲液(含 SDS)为 Tris-甘氨酸缓冲液(pH 约为 8.3),上样量为 10 μL 。加样后电流设定为 40 mA,样品进入浓缩胶后,改为 80 mA,当电泳跑至距离电泳槽橡胶底边约 1.5 cm 时,关闭电源。分别用考马斯亮蓝 R-250 试剂和 PAS 染色法对凝胶胶片进行蛋白质及糖染色。

1.3.6 溶解性的测定

参考 Kato 等^[9]的方法。称取一定量的待测品溶于去离子水中,浓度为 1 mg/mL,调节溶液的 pH 值(2.0~10.0),室温下搅拌 30 min(搅拌过程中取样测定并保持 pH)后,4 °C 离心 15 min(10000 g),上清液中蛋白浓度以 280 nm 吸光值表示(A_{280})。蛋白质的溶解性表示为上清液蛋白浓度占相应的总蛋白浓度的百分比($A_{280}/A_{总} \times 100\%$)。上清液中蛋白质含量与原蛋白含量的比值即为溶解度指标,三次平行实验取平均值对已溶解样品的质量百分比与 pH 做曲线,分析待测样品的溶解性。

1.3.7 热稳定性的测定

样品溶于 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液中,蛋白浓度 5 mg/mL(m/V),以不同的温度(30~90 °C)水浴 1 h,然后迅速冷却至室温,离心 30 min(15000 g),离心前对离心管称重。除去上清液,离心管烘干后称其重量,对已溶解样品的质量百分比与 pH 做曲线,分析待测样品的热稳定性。

1.3.8 抗氧化性的测定

1.3.8.1 DPPH 自由基清除能力测定

DPPH 自由基清除能力测定参考 Yen 等方法,并加以改进。样品溶于蒸馏水中,蛋白浓度 1 mg/mL(反应液 20 倍稀释)。向 400 μ L 蒸馏水和样品溶液中分别加入 2 mL 0.12 mM DPPH 母液(溶于 95%乙醇中,4 °C 保存),完全混合后在 35 °C 条件下避光反应 30 min,测定反应液 517 nm 处吸光度 A,以蒸馏水为空白。

DPPH 自由基清除能力的计算:

$$\text{自由基清除能力}/\% = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

注: A_0 为蒸馏水反应液吸光度, A_1 为样品反应液吸光度。

1.3.8.2 还原力测定

参考 Song-Hwan Bae^[7]等人测定的方法。在 1.25 mL pH 6.6 磷酸盐缓冲溶液中加入样品液 1 mL 和 1.25 mL 1% 铁氰化钾,混匀,50 °C 恒温 20 min,迅速冷却后加入 1.25 mL 10% 三氯乙酸,混合后以 3000 r/min 离心 10 min,取上清液 2.5 mL,加 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 氯化铁溶液,混匀后静置 10 min,在 700 nm 处测定吸光值。

1.3.8.3 OH 自由基清除能力的测定

H_2O_2 和 Fe^{2+} 混合发生 Fenton 反应,生成具有很高反应活性的羟自由基,其能被邻二氮杂菲有效的捕捉,并生成有色物质,但若加入具有清除作用的物质,便会与邻二氮杂菲竞争,从而使有色产物生成量减少。用 50 mM 磷酸盐缓冲液配制含有 0.75 mmol/L 的邻二氮杂菲和 $FeSO_4$ 溶液(pH 7.4),用其配制不同浓度梯

度的样品浓度,往试管中分别加入 2 μ L H_2O_2 (30%, m/V),37 °C 水浴反应 60 min 后于 536 nm 处测定吸光值。三次平行实验取平均值对清除率和样品浓度做曲线以 Vc 做阳性对照。

$$\text{清除率}/\% = ((A_s - A_1)/A_0 - A_1) \times 100$$

注: A_0 为空白样; A_1 为对照样的吸光值。

1.3.9 乳化活性的测定

样品用去离子水配制成质量分数为 2% 的溶液,加入体积分数为 20% 的花生油,30 MPa 高压均质 2 次,再用去离子水按质量比为 1:1000 稀释,采用粒度分布仪测定乳状液中粒子大小及其分布^[10]。参数设置:颗粒折射率为 1.520,分散剂折射率为 1.330。

1.3.10 数据分析

数据平行测定 3 次取平均值,并用 OriginPro 8.0 作图。

2 结果与讨论

2.1 不同反应时间的接枝情况

图 1 为 SPI 经过胃蛋白酶酶解 20 min 后得到的蛋白肽在 pH 7.0 条件下不同反应时间的接枝度。胃蛋白酶属于内切酶,在短时间内可以有效地将大豆蛋白的空间结构打开,而且能有效地把大豆蛋白的长肽链切成中长链,加快后续的 Maillard 反应进程。

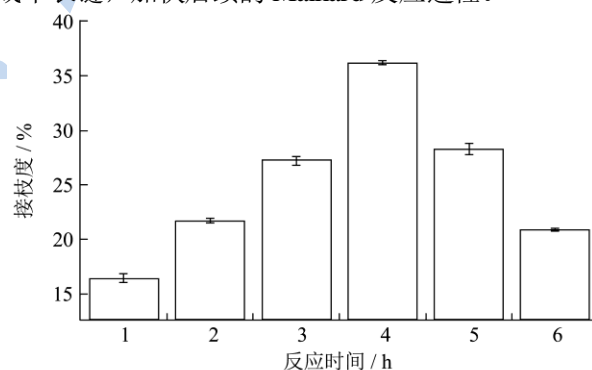


图 1 不同反应时间的接枝度

Fig.1 The degree of graft at different reaction time

如图所示,反应开始后, Maillard 反应开始缓慢进行,接枝度逐渐升高,速率较快,反应 3 h 之后, Maillard 反应较为充分,接枝度提高得非常明显,反应 4 h 之后,体系游离氨基数量减少, Maillard 反应速度减缓,而且体系内肽链在热作用下容易发生聚集,表现为接枝度降低。综合考虑,选取反应时间为 4 h。

2.2 SDS-PAGE 电泳图谱分析

电泳图谱用来鉴定蛋白-多糖共价复合物的形成^[11~13]。分离胶顶部多分散性条带的形成表明高分子量

物质的形成, 通过多分散性的蛋白条带与糖染色条带一致来说明蛋白与多糖之间发生了共价交联。

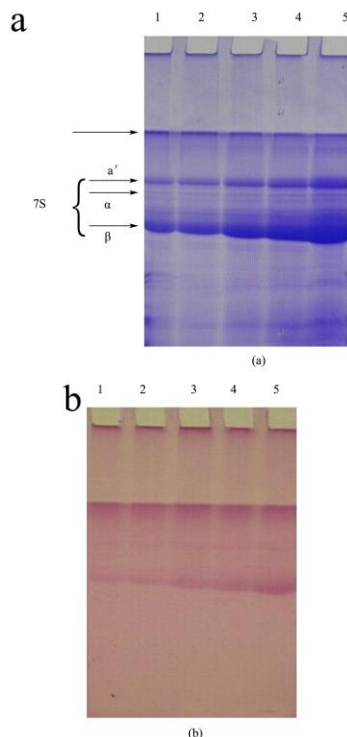


图 2 考马斯亮蓝染色和 PAS 染色的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE with coomassie brilliant blue staining and PAS staining

注: a 考马斯亮蓝染色图谱; b 为 PAS 染色图谱; 1-0 h,

2-1 h, 3-2 h, 4-3, 5-4 h.

图 2 为大豆水解蛋白与葡聚糖共价复合反应不同时间的 SDS-PAGE 图谱。由图所示, 随着反应时间的延长, 分离胶与浓缩胶界面下方有分子量较大且集中的物质生成, 而且反应时间越长, 该物质越多。对应考马斯亮蓝染色图, PAS 染色图谱中界面下方均有红色条带, 表明该物质为共价结合的糖类蛋白。从条带 1 到条带 5 可以看出, 随着反应时间的延长, 糖基化大豆水解蛋白的产物不断增多, 对应于 PAS 染色, 生成的 HDC 也越来越多。在条带 5 中, 反应 4 h 后, 糖基化产物达到最多, 这也印证了 2.1 中的接枝度的分析。

2.3 溶解性分析

图 3 为 HDC、大豆分离蛋白-葡聚糖共价复合物 (SDC) 和大豆水解蛋白的溶解性分析, 通过实验结果可以发现, 经过胃蛋白酶适度酶解再接枝后, HDC 的溶解性较大豆水解蛋白有所提高, 原因是带电的氨基酸残基的静电排斥和水合作用促进了蛋白质的溶解, 同时, 糖链也在一定程度上促进蛋白的溶解。但是, HDC 的溶解稳定性较 SDC 差, 容易受 pH 的影

响, 特别是在等电点附近。这可能是因为 SDC 的空间结构更加稳定, 不易受 pH 的影响, 而 HDC 是蛋白质经过酶解后的生成肽链与多糖的交联, 空间结构不稳定, 容易受 pH 的影响。

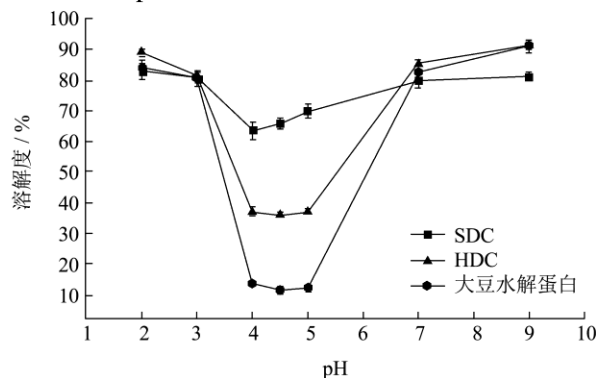


图 3 HDC、SDC 和大豆水解蛋白的溶解性分析

Fig.3 The solubility of HDC, SDC and Soy Hydrolyzed Protein

2.4 热稳定性分析

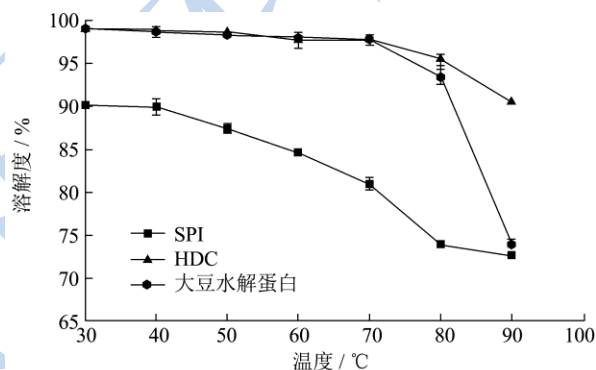


图 4 不同大豆水解蛋白最佳产物和 SPI 热稳定性比较

Fig.4 The thermal stability of HDC, SDC and Soy Hydrolyzed Protein

图 4 为 HDC、大豆水解蛋白和 SPI 热稳定性比较, 由图 4 可知, 经过 Maillard 反应的 HDC 在温度 30~80 °C 都能保持几乎完全溶解, 该复合物在温度 90 °C 时的溶解度仍能保持 90% 溶解性, 说明产物热稳定性很高; 对比大豆水解蛋白和 SPI, 可以明显地看到, 大豆水解蛋白在温度 80 °C 时, 溶解性开始下降, 当到 90 °C 时, 溶解性显著下降, 这说明: 酶解可以促进蛋白的溶解, 但热稳定性较差, 糖链可以提高肽链的热稳定性。

2.5 抗氧化性分析

图 5a 是 HDC 及其对照样的 DPPH 自由基清除情况分析, 如图所示, HDC 的清除率与大豆水解蛋白和它与葡聚糖的混合物相比明显升高, 达到了 66.39%。食物的抗氧化能力, 主要取决于食物中的抗氧化物含量, 可见, 通过糖基化, 产物中抗氧化物含量大大提

高,从而抗氧化能力得到加强。

图 5b 是 HDC 还原力的分析,如图所示, HDC 还原能力最强,这表明: HDC 可以作为氢供体与活性氧自由基反应使其转化为稳定产物,从而阻断自由基链式反应,起到抗氧化作用。

图 5c 是样品羟自由基清除情况分析。如图所示,随着样品浓度的升高,羟自由基清除率逐渐提高。与对照维生素 C 做对比, HDC 的羟自由基清除率一直高于维生素 C,当两者浓度达到 10 mg/mL 时, HDC 的羟自由基清除能力与其相当,这表明 HDC 有较强的抗氧化力。

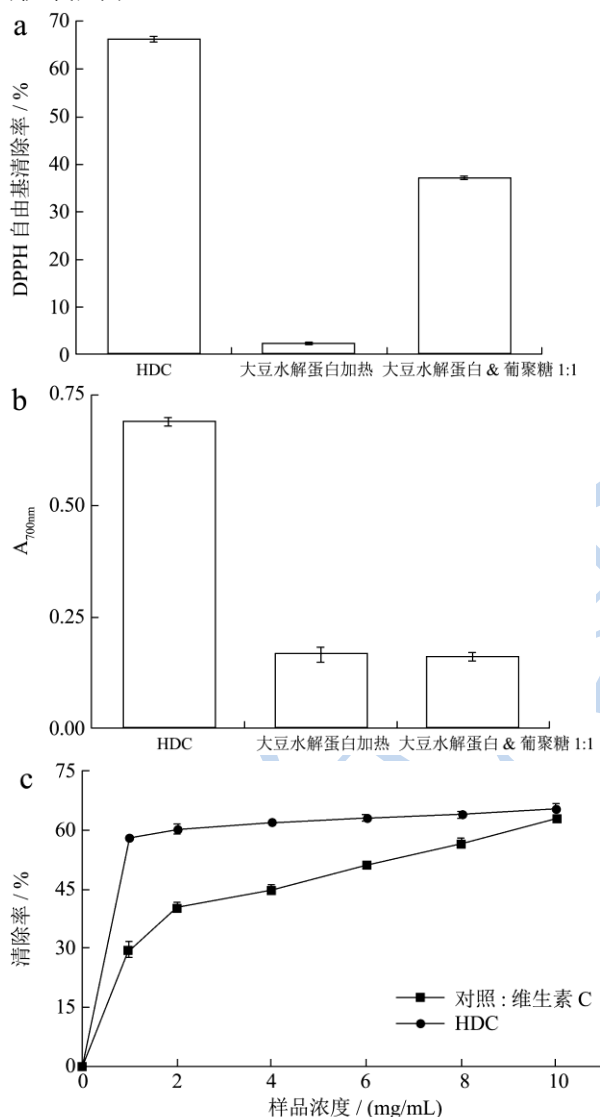


图 5 各样品的抗氧化性分析对比

Fig.5 Oxidation resistance analysis of HDC

2.6 乳化活性分析

图 6 为大豆水解蛋白、大豆水解蛋白-葡聚糖 1:1 混合物和 HDC 的乳化活性分析。粒径的大小关系到乳液乳化活性的高低,乳化活性与乳液液滴平均粒径

d_{43} 呈现相反的趋势,这主要是由于较小的乳液液滴使乳液的透光率下降,从而体现出较高的乳化活性。由图 6 可知,与大豆水解蛋白、大豆水解蛋白-葡聚糖 1:1 混合物相对比, HDC 的乳液粒径较小,而且长时间放置粒径变化不明显,说明其乳化稳定性较强,而大豆水解蛋白与葡聚糖的混合物稳定性较差,单独加热 4 h 后的大豆水解蛋白乳化性最差,较长时间放置后发生明显的分层。该现象证明了酶法和 Maillard 反应有机结合的可行性以及有效性。

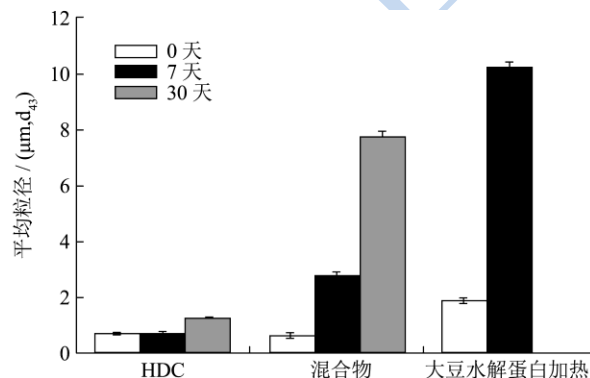


图 6 大豆水解蛋白、大豆水解蛋白/葡聚糖混合物和 HDC 的乳化活性分析

Fig.6 Comparison of emulsifying activity including Soy Hydrogent Protein, 1:1 mixture and HDC

3 结论

本文采用胃蛋白酶对大豆分离蛋白进行适度酶解得到蛋白肽,再在大分子拥挤体系下制备大豆水解蛋白-葡聚糖共价复合物,并对其性质进行了研究,结果表明:

3.1 大豆分离蛋白通过适度酶解得到蛋白肽有利于促进糖基化反应,缩短反应时间,在大分子拥挤环境下,大豆水解蛋白-葡聚糖比例为 1:1 反应 4 h 得到的最佳产物接枝度达 38.05%。

3.2 通过对共价复合物的理化性质进行分析,探讨了多糖的键入对水解蛋白溶解性、热稳定性、抗氧化性和乳化性的影响,其中抗氧化性和乳化性提高显著。

3.3 通过蛋白的适度酶解,有效地打开了蛋白大分子的三级空间结构,同时将蛋白的长肽链切断成中链,使更多的ε-氨基基团有机会与多糖的还原性羰基末端结合,从而进一步有效地进行蛋白与多糖的共价接枝反应,大大缩短了反应时间,并且得到的糖肽功能性优越性很明显。

参考文献

[1] Diftis N, Kiosseoglou V. Stability against heat-induced aggregation of emulsions prepared with a dry-heated soy

- protein isolate-dextran mixture [J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(6): 787-792
- [2] Zhu D, Damodaran S, Lucey J A. Formation of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates in aqueous solutions [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(16): 7113-7118
- [3] Rialdi G, Battistel E. Thermodynamics of proteins in unusual environments [J]. *Biophysical Chemistry*, 2007, 126(1): 65-79
- [4] Sasahara K, McPhie P, Minton A P. Effect of dextran on protein stability and conformation attributed to macromolecular crowding [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 326(4): 1227-1237
- [5] Eggers D K, Valentine J S. Molecular confinement influences protein structure and enhances thermal protein stability [J]. *Protein Science*, 2001, 10(2): 250-261
- [6] 张麟, 卢滇楠, 刘铮. 高分子抑制蛋白质聚集的动态 Monte Carlo 模拟[J]. *化工学报*, 2008, 59(1): 153-159
ZHANG Lin, LU Dian-nan, LIU Zheng. Dynamic monte carlo simulation of inhibiting protein aggregation by polymer [J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering China*, 2008, 59(1): 153
- [7] Bae S H, Suh H J. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2007, 40(6): 955-962
- [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] Kato A, Shimokawa K, Kobayashi K. Improvement of the functional properties of insoluble gluten by pronase digestion followed by dextran conjugation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, 39(6): 1053-1056
- [10] Bengoechea C, Romero A, Aguilar J M, et al. Temperature and pH as factors influencing droplet size distribution and linear viscoelasticity of O/W emulsions stabilised by soy and gluten proteins [J]. *Food hydrocolloids*, 2010, 24(8): 783-791
- [11] Kato A, Mifuru R, Matsudomi N, et al. Functional casein-polysaccharide conjugates prepared by controlled dry heating [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1992, 56(4): 567-571
- [12] Diftis N, Kiosseoglou V. Physicochemical properties of dry-heated soy protein isolate-dextran mixtures [J]. *Food Chemistry*, 2006, 96(2): 228-233
- [13] Xu K, Yao P. Stable oil-in-water emulsions prepared from soy protein-dextran conjugates [J]. *Langmuir*, 2009, 25(17): 9714-9720