

大豆球蛋白的纤维聚集体行为及其稳定性研究

王金梅, 王梦萍, 韦翠兰, 杨晓泉, 齐军茹

(华南理工大学食品科学与工程学院食物蛋白工程研究中心, 广东广州 510640)

摘要: 为了明确蛋白质的纤维聚集行为, 本研究以大豆球蛋白(soy globulin, 11S)为原料, 从亚基层面对酸性条件下热诱导的11S纤维聚集过程进行跟踪, 监测蛋白及其亚基的水解过程、结构变化及其稳定性。结果表明, 11S的纤维化是一个多步骤的过程, 包括多肽链的水解、自组装成淀粉样纤维聚集结构及逐渐生长成宏观可见的具有扭曲螺旋结构的纤维聚集体。与11S纤维化过程的单指数增长相比, 酸性亚基的纤维化过程存在迟滞期。酸性亚基在纤维化聚集的初期主要贡献于纤维聚集的成核过程, 碱性亚基的加入改变其纤维聚集进程。蛋白质的纤维化过程会增加11S在等电点处的溶解度, 降低中性和酸性pH下的溶解度。此外, 碱性环境(pH值10.0)会导致11S纤维聚集体全部溶解、宏观纤维长度变小、结构发生改变。以上研究结果旨在为合理利用蛋白纤维化聚集体作为新的功能性食品配料提供理论依据。

关键词: 大豆球蛋白; 聚集行为; 酸性亚基; 碱性亚基; 溶解度

文章编号: 1673-9078(2017)11-42-48

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.007

Fibrillar Aggregation Behavior and Stability of Soy Globulin

WANG Jin-mei, WANG Meng-ping, WEI Cui-lan, YANG Xiao-quan, QI Jun-ru

(Research and Development Center of Food Proteins, School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to better define fibrillar aggregation behavior of protein, the heat-induced soy globulin (11S) fiber aggregation process under acidic conditions was investigated in the subunit level to monitor the hydrolysis process, structural change and stability of the protein and its subunits by using 11S as raw material. The hydrolysis kinetics results showed that the fibrillar aggregation process of 11S was a multistep process, including the hydrolysis of polypeptide chains, self-assembly into amyloid fibrils aggregates and the gradual accumulation of macroscopically visible fibrous aggregates with twisted helical structures. Compared with the single exponential growth of the 11S fibrosis process, the fibrosis process of the acidic subunits was delayed. The acidic subunits mainly contributed to the nucleation process of fibril aggregation in the early stage, while the addition of basic subunits could change the process of fibril aggregation. The fibril aggregates of protein could increase the solubility of 11S at isoelectric point and decrease the solubility at neutral acidic pH. In addition, the alkaline environment (pH 10.0) would cause 11S fiber aggregates to dissolve completely, and the macroscopic fiber length becomes shorter and the structure changes. The results might provide a theoretical basis for the rational use of soy protein fibril aggregates as a novel functional food ingredient.

Key words: soy globulin; aggregation behavior; acidic subunit; basic subunit; solubility

蛋白质纤维聚集体因具有良好的功能性质, 被用于食品的增稠剂和填充成分^[1]、医药微胶囊的制备和活性物质的控制释放等领域^[2,3], 受到学者们的广泛关注^[4]。研究认为球蛋白的纤维化过程较易在促进蛋白去折叠的环境下被触发, 特别是在酸性条件下对蛋白质进行高于其变性温度的热处理^[5]。此外, 环境因素对热处理的球蛋白纤维聚集体形成的影响也已被详细研究, 包括蛋白浓度^[6], 离子强度^[7]和剪切处理^[8]。近期, 蛋白纤维聚集的研究逐

渐由聚集行为^[9,10]转向明确蛋白纤维的构筑单元(肽链的氨基酸组成、序列)和蛋白水解如何影响纤维聚集化的进程等方面^[11-15]。

与乳蛋白纤维聚集体不同, 大豆蛋白结构复杂、各亚基氨基酸组成和序列不同, 进而对其纤维聚集过程有所影响。大豆分离蛋白及其球蛋白在pH 2.0时经85℃加热后, 可转化成为长约1 μm的蛋白纤维聚集体^[16,17], 且11S纤维聚集体表现出优异的流动性质^[18]。Tang等^[19,20]报道, 大豆7S球蛋白的纤维聚集能力高于11S球蛋白。有研究认为, 7S球蛋白的加入抑制了11S球蛋白不溶性聚集体的形成, 两类蛋白的亚基间发生了相互作用, 主要是11S球蛋白的碱性亚基与解离后的7S球蛋白亚基形成了复合物^[21]。此外, Utsumi

收稿日期: 2017-04-25

基金项目: 中央高校基本科研业务费项目(SCUT2015ZZ115)

作者简介: 王金梅(1982-), 女, 博士, 讲师, 从事粮食、油脂与植物蛋白工程研究工作

等^[22]发现亚基相互作用主要是发生在 11S 球蛋白的碱性亚基和 7S 球蛋白的 β 亚基以及少量的 α, α' 亚基之间。 β 亚基与碱性亚基之间较强的静电相互作用和碱性亚基之间存在的二硫键作用是聚集体形成的主要作用力^[23]。此外, 7S 球蛋白的 α, α' 和 β 亚基存在不同的纤维聚集动力学可能与其氨基酸序列和组成不同有关^[24]。

基于本课题组已经成功建立了 7S 和 11S 球蛋白亚基的分离方法^[25], 本研究试图从亚基层面上对酸性条件下热诱导的大豆球蛋白纤维化聚集过程进行跟踪, 采用动态光散射, 圆二色谱分析、 β -折叠结构的染料结合(硫磺素 T 和刚果红)和原子力显微镜观察来表征蛋白及其亚基的水解过程、结构变化和纤维聚集体的生长, 更清楚地阐述大豆蛋白纤维聚集的生长动力学及机制, 并对大豆蛋白纤维的 pH 结构稳定性进行研究, 旨在为合理利用纤维化聚集体作为新的功能性食品配料提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

实验材料: 低温脱脂豆粕: 山东禹王公司, Dumas 法测定其蛋白含量为 47.47±2.10% (N×5.71, 湿基); 树脂(DEAE-sepharose fast flow 和 Immobilized metal affinity column)购于美国 GE 公司; 丙稀酰胺、N,N'-甲叉双丙稀酰胺、Tris (三羟甲基氨基甲烷)、SDS (十二烷基硫酸钠)、TEMED (四甲基乙二胺)、 β -巯基乙醇(2-ME)电泳级、考马斯亮蓝 R250 和过硫酸铵均来自 Geneview 进口分装; 低分子量标准蛋白购于上海升正公司; 伴清蛋白(75 ku)、兔肌动蛋白(158 ku)、甲状腺球蛋白(669 ku)购于 GE Healthcare 公司; 硫磺素 T (Thioflavin-T, Th T)和刚果红(Congo red, CR)、牛血清白蛋白(BSA)、尿素生化试剂、5,5-二巯基-双(2-硝基苯甲酸, DTNB)、1-苯氨基-8-萘磺酸(ANS)、尼罗红和尼罗蓝购于 Sigma-Aldrich 公司。

主要仪器: Brion 3 STAR 精密 pH 计, 美国 Thermo 公司; Big-squid 磁力搅拌器, 德国 IKA 公司; CR22 冷冻离心机, 日本 Hitachi 公司; DELTA 冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; KDN-102C 凯式定氮仪, 上海纤检仪器有限公司; M-110EH-30 高压微射流纳米均质机, 美国 MFIC 公司; Mastersize2000 粒度分布仪, 英国 Malvern 公司; Nanosizer 纳米粒度仪, 英国 Malvern 公司; TW 12 恒温水浴锅, 德国 Julabo 公司; Leica TCS-SP2 激光共聚焦显微镜, 德国 Leica 公司; Model Parr 5500 高压反应釜, 美国 Parr Instrument 公司;

MOS-450 圆二色光谱仪, 法国 Bio-Logic 公司; AKTA 蛋白质纯化仪, 美国 GE 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆球蛋白(11S)碱性亚基的分离

根据 Nagano 的方法^[26]提取 11S, Dumas 法测得 11S 蛋白含量为 94.8±0.36% (N×5.71, 湿基)。考虑到 11S 蛋白亚基的组成复杂性, 本研究只对酸性和碱性亚基进行初步分离, 参考 Mo 等^[27]提供的方法。将 11S 溶于包含 15 mmol/L 2-ME 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 30 mmol/L), 制备浓度为 5 mg/mL 的蛋白溶液。蛋白溶液经 90 °C 水浴加热 30 min 后, 于 4 °C 条件下离心 (10000 g×20 min)。离心后的沉淀经 30 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液冲洗两次之后被重新分散于去离子水, 冻干收集碱性亚基。离心的上清液则为酸性亚基, 经过浓缩、冻干后, 备用。

1.2.2 酸性条件下(pH 2.0)热诱导 11S 纤维聚集体的形成

将 11S 和亚基分别溶解于去离子水中制备蛋白浓度为 20 mg/mL 的蛋白溶液, 室温搅拌 2 h 后, 调节 pH 2.0, 之后 4 °C 水化过夜。蛋白溶液经离心 (10000 g×20 min) 后, 采用 Lowry 法^[28]测定上清液的蛋白含量, BSA 为标准蛋白。用去离子水 (pH 2.0) 稀释蛋白溶液的最终浓度为 10 mg/mL, 置于带有密封盖的小瓶中, 于 85 °C 水浴加热 20 h, 定期取样, 立即冷却到室温以终止蛋白纤维化, 即为热处理蛋白溶液。(注: 由于 11S 球蛋白的碱性亚基的溶解性较差, 故不进行离心处理, 直接分散于去离子水中制备蛋白浓度为 10 mg/mL 的样品液。)

1.2.3 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

按照 Laemmli 的方法^[29]对蛋白成分进行分析。分别向 100 μ L 不同时间热处理的 11S 溶液及其酸、碱性亚基溶液(1 mg/mL)中加入 40 μ L 样品缓冲液[0.125 mol/L Tris-HCl 缓冲液, 包含 1% SDS (*m/V*), 2% 2-巯基乙醇(2-ME, *V/V*), 5% 甘油(*V/V*)和 0.025% 溴酚蓝 (*m/V*)], 95 °C 加热 3 min, 制备上样缓冲液。非还原样品缓冲液中只是未添加变性剂 2-ME, 其它步骤与上述一致。分离胶浓度为 12.5%, 浓缩胶浓度为 5%, 上样量为 5 μ L, 于恒流下进行电泳, 样品在浓缩胶中电流为 40 mA, 进入分离胶后电流调为 80 mA。采用考马斯亮蓝法对胶片进行染色 20 min, 染色液为考马斯亮蓝 R250 (0.25%, *m/V*), 之后使用脱色液(甲醇: 乙酸: 水=100:100:800, *V/V*)对胶片脱色。

1.2.4 动态光散射分析 (DLS)

测试前使用去离子水(pH 2.0)稀释样品液至蛋白浓度为 1 mg/mL 用于测定。通过检测光散射强度随时间变化计算自相关函数,使用 V4.20 Dispersion Technology 软件(DTS)根据斯托克斯-爱因斯坦方程计算出蛋白溶液的水力学半径和体积分布^[30]。加热初期(2 min)的 11S 球蛋白碱性亚基仍存在少量不溶性颗粒,这可能对动态光散射分析有所干扰,因此,不对 11S 球蛋白碱性亚基进行 DLS 分析。

1.2.5 圆二色光谱分析

使用去离子水(pH 2.0)稀释样品液至蛋白浓度为 0.1 mg/mL,采用圆二色光谱仪收集信号。扫描参数:样品池光程为 2 mm,扫描波长为 190~250 nm。实验温度为 25 °C,分辨率为 0.5 nm,灵敏度为 100 mdeg/cm,扫描速度为 100 nm/min,实验值为 4 次扫描均值。

1.2.6 硫磺素 T (Th T) 荧光分析

参考 Nilsson^[31]方法,将 8 mg Th T 溶于 10 mL 含 150 mmol/L NaCl 的磷酸缓冲液(10 mmol/L, pH 7.0),充分溶解后用 0.22 μm 的滤膜过滤,即为 Th T 母液。实验前,将母液稀释 50 倍后制得 Th T 工作液(50 μmol/L)。将 40 μL 待测样与 4 mL Th T 工作液混合均匀,反应 2 min 后使用 F7000 荧光光度计测定荧光强度。测量参数:激发波长 440 nm,发射波长 482 nm,激发和发射狭缝 5 nm,电压 700 mV。

1.2.7 刚果红(CR)分析

将 7 mg CR 溶于 10 mL 含 150 mmol/L NaCl 的磷酸缓冲液(10 mmol/L, pH 7.0),充分溶解后用 0.22 μm 的滤膜过滤,即为 CR 母液。实验前,将母液稀释浓度为 50 μM 的 CR 工作液。将 30 μL 待测样品与 4 mL CR 工作液混合均匀,室温反应 30 min 后,使用 UV2300 紫外分光光度计进行波长扫描,扫描范围为 400~600 nm,未加蛋白样品的 CR 工作液作为空白。

1.2.8 原子力显微镜(AFM)

用去离子水(pH 2.0)稀释样品至蛋白浓度为 10 μg/mL,取 2 μL 稀释液置于新鲜剥离的云母片上,室温干燥 10 min 后使用 a MultiMode SPM 显微镜(Digital Instruments, Veeco, Santa Barbara, CA)进行观察。操作条件:频率为 320 kHz;扫描速度 1.0 Hz;silicon tips 的长度为 125 μm,曲率半径为 42 N/m (PointProbe NCHR, 瑞士 NanoWorld 公司);共振频率为 290 kHz,测试采用轻敲模式。新鲜剥离的云母片作为空白样品以排除底片污染。使用 Digital Nanoscope 软件(version 5.30r3, Digital Instruments, Veeco)分析 AFM 图片。

1.2.9 纤维聚集体结构的 pH 稳定性

使用蛋白浓度为 20 mg/mL 的样品在酸性条件下进行热处理,制备不同 pH 条件下的纤维聚集体用于研究 pH 对纤维聚集体结构的影响,分别测定其溶解度、结构和形貌。

天然和热处理蛋白溶液经过室温 10000 g 离心 20 min 后,采用 Lowry 法测定上清液的蛋白含量,以 BSA 为标准蛋白制作标准曲线。

$$\text{溶解度}(\%) = \frac{\text{上清液的蛋白质质量}}{\text{样品蛋白质质量}} \times 100\% \quad (1)$$

Th T 分析详见 1.2.6; CR 分析详见 1.2.7; 形貌学分析详见 1.2.8。

1.3 数据处理

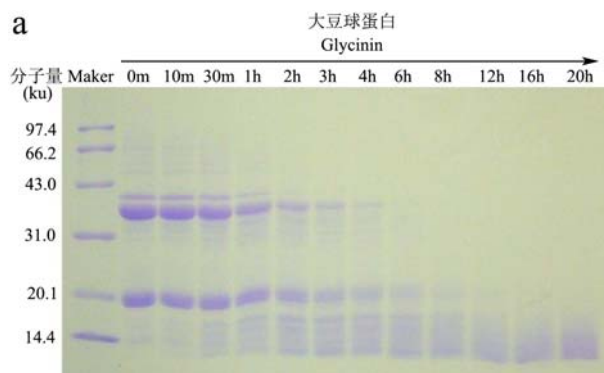
试验数据为三次平行测量的平均值,用平均值±标准差 (Mean±SD) 表示。以 Microsoft 公司的 Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件对试验数据进行整理与统计分析,并采用 Origin 8.5 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 大豆 11S 球蛋白及其亚基的水解动力学

考虑到大豆 11S 球蛋白亚基的组成复杂性,只对其酸性和碱性亚基进行初步分离,研究亚基的纤维聚集过程。

图 1 为 SDS-PAGE 技术跟踪的 11S 球蛋白及其亚基纤维聚集过程的水解动力学。随着加热时间的延长,11S 及其亚基的特征条带逐渐被水解,并伴随着小分子条带的出现。整体来看,11S 球蛋白的水解动力学与纯化的酸、碱性亚基的水解动力学相似,说明亚基的分离并未对蛋白的水解过程产生影响。另外,由图 1b 和 1c 可知,酸性亚基经 85 °C 加热 3 h 后特征条带完全消失,而碱性亚基完全降解需要 12 h,表明 11S 球蛋白的酸性亚基比碱性亚基更易水解。这可能是由于酸性亚基带有较多的酸性氨基酸,较易发生肽链的水解^[32]。



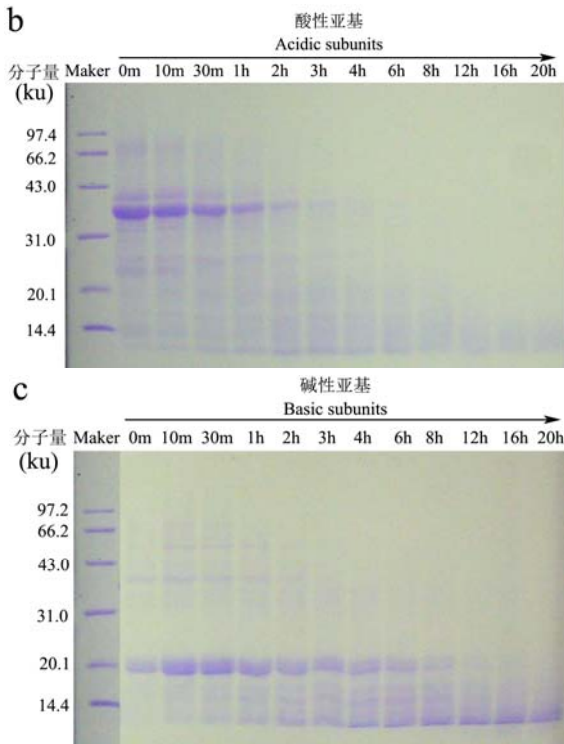


图1 大豆 11S 球蛋白及其亚基纤维聚集过程的水解动力学
Fig.1 Hydrolysis kinetics of soybean 11S globulin and its subunit during the fibril formation

注: a 11S 球蛋白, b 酸性亚基, c 碱性亚基。标准分子量蛋白标注于图片左边。

2.2 大豆 11S 球蛋白及其亚基纤维聚集体的形成及生长

由于碱性亚基疏水性较强, 经过分离的碱性亚基溶解度很差, 难以排除不溶解颗粒对动态光散射测定的干扰。因此, 本实验只对 11S 球蛋白和酸性亚基进行水力学半径测试, 以判断蛋白经过加热后是否存在聚集现象, 见图 2。在加热前期(0-8 h), 11S 球蛋白的散射光强(SI)和水力学半径(SI)没有出现明显变化, 随着加热时间的延长, SI 和 Rh 值逐渐升高, 且经过 20 h 的加热后仍未出现平衡状态。以上结果表明加热处理可以诱导 11S 形成具有更大分子量的聚集体, 与 Peng W^[33]的报道一致。其中, 在 12 h 的加热过程中 11S 的聚集行为始终在进行, 这可能与 11S 球蛋白的聚集能力较弱有关^[32]。

与 11S 相比, 其酸性亚基的散射光强随着加热时间的增加呈现先减小后增加的趋势, 直至基本保持稳定。Wang 等^[24]报道的 β -伴大豆球蛋白在纤维聚集过程中也表现出了类似的趋势。从蛋白氨基酸组成的角

度考虑, 酸性亚基与 7S 球蛋白都含有较多带电氨基酸(Asp), 在加热初期, 肽链较易水解, 引起散射光强的减小, 随着加热时间延长, 酸性亚基发生了蛋白聚集, 导致散射光强迅速增加, 加热 8 h 后, 酸性亚基的聚集基本完成, 因此散射光强增长的速度有所下降(图 1)。

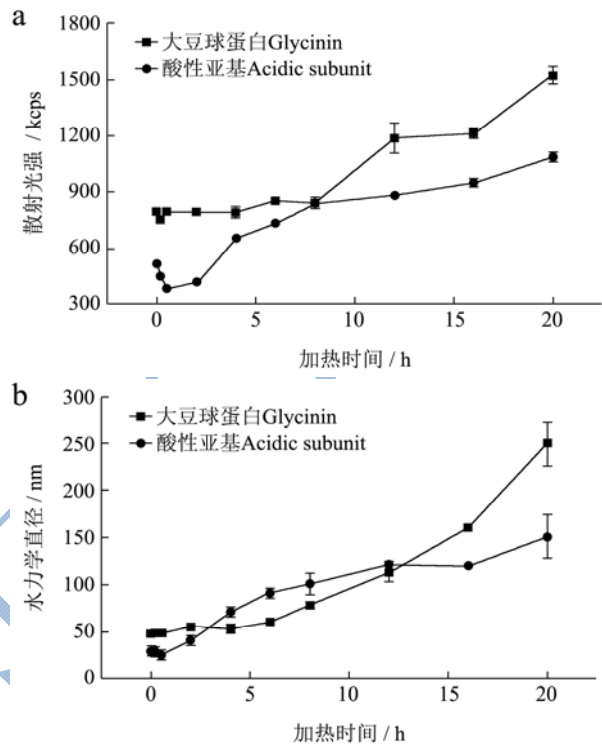
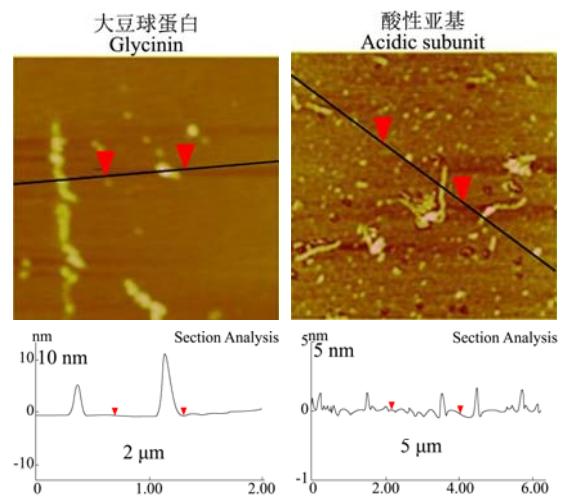


图2 大豆 11S 球蛋白及其亚基纤维聚集过程的散射光强 a 和水力学直径 b 变化

Fig.2 Changes of of the scattered light intensity a and hydrodynamic diameter b of soybean 11S globulin and its subunit during the fibril formation

原子力显微镜观察法被用于判断 11S 及其亚基是否发生纤维聚集, 如图 3。



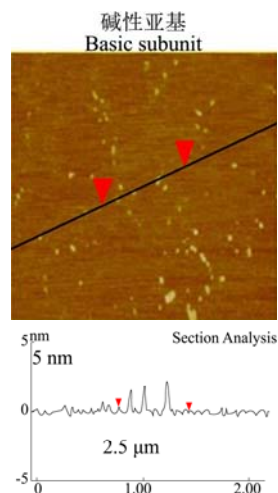


图3 大豆 11S 球蛋白及其亚基纤维聚集过程的 AFM 高度图

Fig.3 Tapping mode AFM height images of soybean 11S globulin and its subunit during the fibril formation

注：图片上红线的高度曲线置于 AFM 图片下方。

11S 经过 20 h 加热后，形成了长约 700 nm，高约 5 nm 的纤维聚集体，呈现较为刚性的结构特征，此结果与前人研究一致^[19,20]。相同浓度的酸性亚基和碱性亚基经过热处理后，呈现了完全不同的形态。AFM 图片显示，11S 酸性亚基的纤维聚集体长度约为 1 μm，高度约为 1.5 nm，呈现刚性形态，并且纤维聚集体和颗粒状聚集体共存；而碱性亚基未能形成纤维聚集体，在图片中只看到高度 1.7 nm 左右的颗粒。与 Wang 等^[24]报道的 7S 相比，大豆 11S 球蛋白碱性亚基富含疏水氨基酸，但表现了较弱的纤维聚集能力，间接表明了氨基酸序列在蛋白纤维化过程具有重要作用。

2.3 大豆 11S 球蛋白及其亚基纤维聚集过程的结构转变

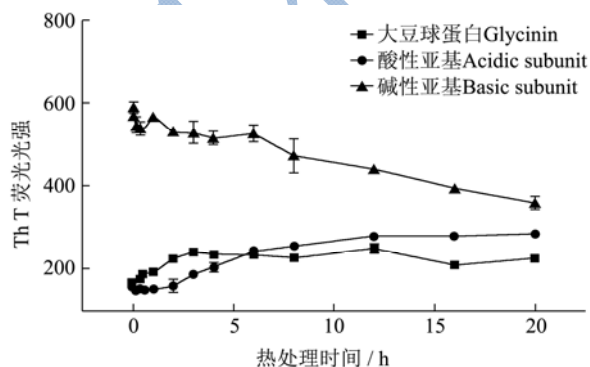


图4 大豆 11S 球蛋白及其亚基纤维聚集过程的 Th T 荧光光强

Fig.4 Th T fluorescence intensity of soybean 11S globulin and its subunit during the fibril formation

图4 为大豆 11S 球蛋白及其亚基在纤维聚集过程中的 Th T 变化情况。11S 的荧光强度在加热初期迅速

增加，没有出现迟滞期，随着加热时间延长到 3 h，荧光强度不再上升。

与 11S 相比，其酸、碱性亚基的 Th T 变化截然不同。酸性亚基的荧光强度在加热初期没有增加，表明其经历了纤维聚集形成的迟滞期；加热时间延长至 2 h 后，荧光强度迅速增加；加热 10 h 后，其荧光强度达到平衡，且平衡时的荧光强度高于 11S 球蛋白。与 11S 及其酸性亚基相比，碱性亚基自加热初始就具有较高的 Th T 荧光强度，随着加热时间的延长，其荧光强度呈现逐渐减小的趋势。结合 AFM 结果推测，碱性亚基在加热初始的高荧光强度可能并非来自蛋白纤维化过程中形成的 β -sheet 结构。上述结果表明酸性和碱性亚基在 11S 球蛋白纤维聚集过程中存在较强的协同作用，且各亚基在蛋白纤维化过程中起到了不同的作用。结合图 3 推测酸性亚基在纤维化聚集的初期主要贡献于纤维聚集的成核过程，碱性亚基的加入改变其纤维聚集进程。

2.4 大豆球蛋白纤维聚集体的 pH 稳定

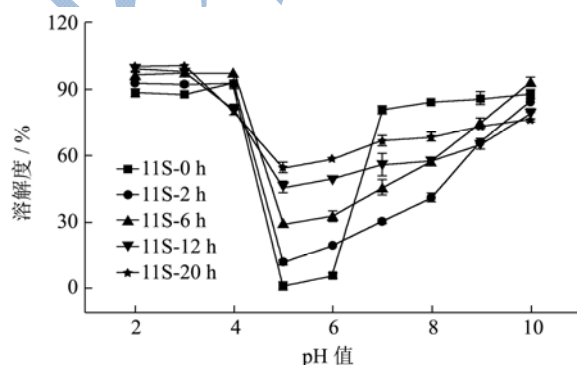


图5 大豆 11S 球蛋白纤维化过程中溶解度的变化

Fig.5 Changes of solubility in soy 11S glycinin fibrils

注：11S-0 h 为天然大豆球蛋白，11S-2 h、6h、12h、20h 分别为经 2 h、6h、12h、20h 加热处理的大豆球蛋白。

为了明确 11S 及其亚基纤维聚集体的 pH 稳定性，对蛋白纤维聚集体的溶解度进行了测定，如图 5。天然 11S 的溶解度曲线呈现明显的 U 型趋势，其等电点附近 (pH 4-6) 的溶解度达到最低值。不同加热时间的热处理蛋白呈现不同趋势的溶解度曲线。在酸性条件下 (pH < 7)，蛋白的溶解度随加热时间的增加而增大；中性条件下 (pH 7.0 附近)，长时间热处理比短时间热处理更能增加 11S 的溶解度；pH ≥ 9 时，热处理蛋白的溶解度随加热时间的增加而减小。这可能是由于热诱导 11S 发生水解，产生的多肽部分发生聚集、部分以多肽形式存在，导致蛋白在等电点处溶解度增加，且随着热处理时间的延长、蛋白水解加剧，溶解度逐渐上升，而纤维聚集体的形成则使溶解度降低^[24]。可

以理解为, 11S 球蛋白的纤维化增加了其在等电点附近的溶解度, 但降低了其中性条件的溶解度。

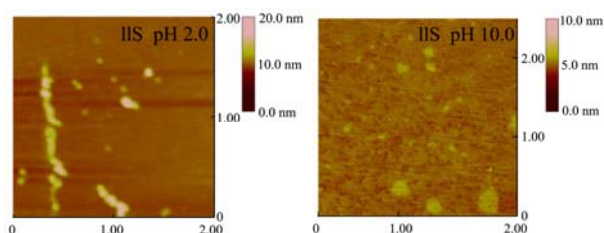


图 6 pH 对大豆蛋白纤维聚集体形貌的影响

Fig.6 Effects of pH on the morphological details of soy proteins amyloid-like fibrils

为了探究碱性条件下 11S 球蛋白聚集体的纤维结构是否发生破坏, 本研究对 pH 10.0 条件下蛋白纤维聚集体的形貌进行了观察。热处理 11S 球蛋白的 pH 值由酸性(pH 2.0)调节至碱性(pH 10.0)后, 其宏观的蛋白纤维被明显破坏, 且 AFM 图中未观察到纤维聚集体的存在。表较强的碱性对 11S 球蛋白纤维聚集体的形貌有所破坏, 但其对蛋白纤维的二级结构是否有破坏作用有待进一步证实。

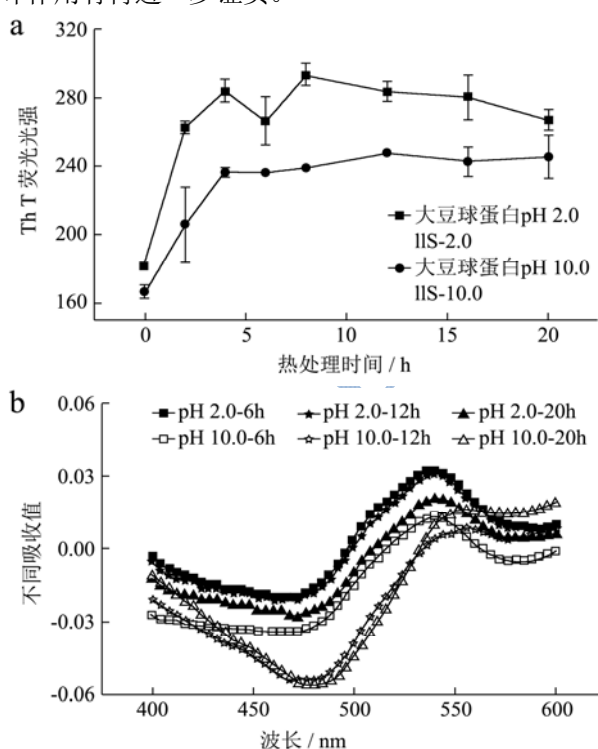


图 7 pH 对大豆蛋白纤维聚集体 Th T 荧光强度和 CR 光谱的影响

Fig. 7 Effects of pH on the Th T fluorescence intensity and Congo red spectroscopic profiles of soy proteins amyloid-like fibrils

注: a 表示 Th T 荧光; b 表示 CR 光谱。

图 7 为不同 pH 条件下大豆蛋白纤维聚集体的 Th T 荧光强度和 CR 光谱变化。如图 7a, 与 pH 2.0 相比, pH 10 的 11S 纤维聚集体的 Th T 荧光强度都明显减

小, 证实了碱性条件对纤维结构有所破坏(图 6)。此外, 随着加热时间的延长, pH 10.0 时 11S 球蛋白纤维聚集体的荧光强度并未随之发生明显变化, 表明其纤维结构的稳定性不受加热时间的影响, 聚集体基本构筑单元的结构不随着蛋白进一步水解而发生破坏。

CR 光谱用于辅助证明碱性 pH 对大豆蛋白纤维聚集体结构的破坏作用。图 7b 显示, 随着 pH 由酸性调节至碱性后, 11S 纤维聚集体在 520~540 nm 处的吸收峰显著下降, 与 Th T 荧光结果一致(图 7A), 表明碱性条件能够对 11S 球蛋白纤维聚集体的结构产生明显的破坏作用。

3 结论

11S 的纤维化过程是一个多步骤的过程, 包括多肽链的水解, 自组装成淀粉样纤维聚集结构以及逐渐生长成宏观可见的具有扭曲螺旋结构的纤维聚集体。其中, 11S 的纤维化过程呈现单指数增长趋势, 而酸性亚基在纤维化初期存在迟滞期, 表明酸性和碱性亚基在纤维化过程中作用不同, 且可能存在协同作用。11S 的酸性亚基卷入到蛋白质纤维化过程中, 其在纤维化聚集的初期主要贡献于纤维聚集的成核过程, 而碱性亚基的加入能够改变蛋白的纤维聚集进程。此外, 蛋白质的纤维化过程会增加 11S 在等电点处的溶解度, 降低中性和酸性 pH 下的溶解度。碱性环境对蛋白纤维聚集体有较大的影响, pH 10.0 时蛋白纤维聚集体全部溶解, 其宏观的纤维长度变小、结构发生改变。

参考文献

- [1] Linden E V D, Venema P. Self-assembly and aggregation of proteins [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2007, 12(4-5): 158-165
- [2] Humblet-Hua K N P, Scheltens G, Linden E V D, et al. Encapsulation systems basic on ovalbumin fibrils and high methoxyl pectin [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(4): 569-576
- [3] Rossiermiranda F J, Schroën K, Boom R. Mechanical characterization and ph response of fibril-reinforced microcapsules prepared by layer-by-layer adsorption [J]. Langmuir the Acs Journal of Surfaces & Colloids, 2010, 26(24): 19106
- [4] 陈震东,陈嘉琦,王金梅,等.热诱导大豆蛋白纤维聚集体的分离及性质研究[J].现代食品科技,2015,6:172-177

CHEN Zhen-dong, CHEN Jia-qi, WANG Jin-mei, et al. Isolation and characterization of heat induced aggregation of soybean protein fiber [J]. Modern Food Science and

- Technology, 2015, 6: 172-177
- [5] And M P, Dobson C M. Formation of mixed fibrils demonstrates the generic nature and potential utility of amyloid nanostructures [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122(51): 12707-12713
- [6] Kroesnijboer A, Venema P, Bouman J, et al. The critical aggregation concentration of β -lactoglobulin-basic fibril formation [J]. *Food Biophysics*, 2009, 4(2): 59-63
- [7] And L N A, Vries R D. Strong impact of ionic strength on the kinetics of fibrillar aggregation of bovine β -Lactoglobulin [J]. *Biomacromolecules*, 2007, 7(12): 3490-3498
- [8] Akkermans C, Goot A J V D, Venema P, et al. Formation of fibrillar whey protein aggregates: Influence of heat and shear treatment, and resulting rheology [J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22(7): 1315-1325
- [9] Giurleo J T, He X, Talaga D S. Beta-lactoglobulin assembles into amyloid through sequential aggregated intermediates [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 381(5): 1332-1348
- [10] Leonil J, Henry G, Jouanneau D, et al. Kinetics of fibril formation of bovine κ -casein indicate a conformational rearrangement as a critical step in the process [C]// *International Conference on Information Management, Innovation Management and Industrial Engineering. IEEE*, 2008: 107-112
- [11] Akkermans C, Venema P, Goot A J V D, et al. Peptides are building blocks of heat induced fibrillar protein aggregates of β -lactoglobulin formed at pH 2 [J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9(5): 1474
- [12] Oboroceanu D, Wang L, Brodkorb A. Characterization of β -Lactoglobulin Fibrillar assembly using atomic force microscopy, polyacrylamide gel electrophoresis, and in situ fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(6): 3667-3673
- [13] Bateman L, Ye A Q, Singh H. In vitro digestion of beta-lactoglobulin fibrils formed by heat treatment at low pH [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(58): 9800-9808
- [14] Lara C, Adamcik J, Jordens S, et al. General self-assembly mechanism converting hydrolyzed globular proteins into giant multistranded amyloid ribbons [J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(5): 1868-75
- [15] Kroesnijboer A, Venema P, Bouman J, et al. Influence of Protein Hydrolysis on the Growth Kinetics of β -lg Fibrils [J]. *Langmuir the Acs Journal of Surfaces & Colloids*, 2011, 27(10): 5753-61
- [16] 王梦萍,陈燕琼,王金梅,等.糖接枝处理改善大豆蛋白纤维聚集体泡沫稳定性[J].*农业工程学报*,2016,32(4):249-255
WANG Meng-ping, CHEN Yan-qiong, WANG Jin-mei, et al. The improvement of foam stability of soybean protein fiber aggregate by sugar grafting treatment [J]. *Journal of Agricultural Engineering*, 2016, 32(4): 249-255
- [17] Zou Y, Chen Y, Wang M, et al. Effect of dextran glycation on nanofibril assembly of soya β -conglycinin at pH 2.0 and the pH stability of nanofibrils [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2016, 51(10): 2260-2269
- [18] Akkermans C, Goot A J V D, Venema P, et al. Micrometer-sized fibrillar protein aggregates from soy glycinin and soy protein isolate [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2007, 55(24): 9877-9882
- [19] Tang C H, Wang C S. Formation and characterization of amyloid-like fibrils from Soy β -Conglycinin and glycinin [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(20): 11058-11066
- [20] Tang C H, Wang S S, Huang Q. Improvement of heat-induced fibril assembly of soy β -conglycinin (7S Globulins) at pH 2.0 through electrostatic screening [J]. *Food Research International*, 2012, 46(1): 229-236
- [21] Utsumi S, Damodaran S, Kinsella J E. Heat-induced interactions between soybean proteins: preferential association of 11S basic subunits and β subunits of 7S=Interactions induites par la chaleur, entre protéines de soja: association préférentielle de sous-unités 11 S à fonction bas [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1984, 32(6): 1406-1412
- [22] Utsumi S, Kinsella J E. Structure-function relationships in food proteins: subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S, and soy isolate proteins [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1985, 33(2): 297-303
- [23] Yamagishi T, Miyakawa A, Noda N, et al. Isolation and Electrophoretic Analysis of Heat-induced Products of Mixed Soybean 7S and 11S Globulins [J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1983, 47(6): 1229-1237
- [24] Wang J M, Yang X Q, Yin S W, et al. Growth Kinetics of Amyloid-like Fibrils Derived from Individual Subunits of Soy β -Conglycinin [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2011, 59(20): 11270-11277
- [25] Yuan D B, Min W, Yang X Q, et al. An improved isolation method of soy β -Conglycinin subunits and their characterization [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2010, 87(9): 997-1004

- [26] Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1992, 40(6): 941-944
- [27] Mo X Q, Zhong Z K, Wang D H, et al. Soybean glycinin subunits: characterization of physicochemical and adhesion properties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(20): 7589-7593
- [28] Lowry O H, Rosenbrough H J, Lewis A, et al. Protein measurement with the Folinphenol reagent [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193: 265-275
- [29] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685
- [30] Stepanek P. Data analysis in dynamic light scattering. In *Dynamic Light Scattering, The Methods and Some Applications*; Brown, W., Eds.; Oxford University Press: Oxford, 1993; pp 177-241
- [31] Nilsson M R. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro [J]. *Methods (San Diego, Calif.)*, 2004, 34(1): 151-151
- [32] Tang C H, Wang C S. Formation and Characterization of Amyloid-Like Fibrils from Soy β -Conglycinin and Glycinin [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(20): 11058-11066
- [33] Peng W, Kong X, Chen Y, et al. Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52: 301-310