

7S 伴大豆球蛋白及其糖基化产物对大豆 11S 球蛋白热聚集的影响

孙炜炜, 于淑娟*

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘 要: 研究 7S 伴大豆球蛋白(β -伴大豆球蛋白)及其糖基化产物对大豆 11S 球蛋白热聚集的影响。从浊度、 ξ -电位、粒度、SDS-PAGE 测定得出在 30mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液中(含 β -巯基乙醇), 7S 球蛋白及其糖基化产物能够抑制 11S 球蛋白的热聚集, 并且糖基化产物的抑制效果比未糖基化的 7S 球蛋白明显; 7S 球蛋白及其糖基化产物抑制 11S 球蛋白热聚集的机理不同, 7S 球蛋白糖基化产物对 11S 球蛋白热聚集的抑制不是由于电荷的作用。

关键词: 7S 伴大豆球蛋白; 大豆 11S 球蛋白; 糖基化; 热聚集

Effects of β -Conglycinin and Glycated β -Conglycinin on the Thermal Aggregation of Glycinin

SUN Wei-wei, YU Shu-juan*

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

Abstract: The effects of β -conglycinin and glycated β -conglycinin on the thermal aggregation of glycinin was studied. Evidence was presented to suggest that β -conglycinin and glycated β -conglycinin could both prevent thermal aggregation of glycinin in 30 mmol/L Tris-HCl buffer solution (β -Me existed). Further, addition of glycated β -conglycinin prevented thermal aggregation of glycinin more obviously than β -conglycinin. The results also indicated that the inhibitory mechanism of glycated β -conglycinin on glycinin aggregation was not as same as that of β -conglycinin due to charge-charge interactions.

Key words: β -conglycinin; glycinin; glycosylation; thermal aggregation

中图分类号: TS214.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)15-0159-04

热处理是大豆加工过程中常用的方法之一, 大豆蛋白在热诱导过程中会不可避免的产生宏观聚集体^[1]。7S 伴大豆球蛋白(β -伴大豆球蛋白)和大豆 11S 球蛋白是大豆蛋白的主要储藏蛋白, 分别占大豆蛋白总含量的 37% 和 31%^[2]。大豆 11S 球蛋白在有还原剂的溶液中会产生明显的热聚集现象, 添加 7S 伴大豆球蛋白可以通过电荷的作用抑制 11S 球蛋白的热聚集^[3]。

食品中蛋白质的糖基化是指通过蛋白质的 ϵ -氨基基团与多糖的还原性羰基末端反应得到共价复合物^[4]。糖基化产物对于环境条件具有较高的适应性, 与以次级力结合的蛋白质-多糖体系相比, 其结合不受热或 pH 值的影响^[5]。糖基化对蛋白质的表面荷电量、热稳定性、表面疏水性等均有影响, 而这些性质往往是影响蛋白质热聚集的重要因素^[6-7]。由于接入糖链的不同, 糖基化对蛋白质热聚集的影响并非完全一样^[8]。对 7S 球蛋白抑制

11S 球蛋白热聚集的性质, 许多学者已经做过研究, 但尚未见学者研究过糖基化的 7S 球蛋白对 11S 球蛋白热聚集的影响。

本实验主要从浊度、 ξ -电位、粒度、SDS-PAGE 电泳方面研究 7S 球蛋白及其不同分子质量的糖基化产物(G67、G150、G500)在有还原剂存在的 Tris-HCl 缓冲溶液中对 11S 球蛋白热聚集的抑制作用, 为进一步开展通过糖基化抑制大豆蛋白热聚集的研究提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

低温脱脂豆粕(氮可溶性指数>80) 山东新嘉华公司; 葡聚糖(67、150、500kD) Sigma 公司。

所有化学试剂均为分析纯; 实验用水为去离子水。

1.2 仪器与设备

收稿日期: 2010-03-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(20776050); 广东省自然科学基金项目(7006508)

作者简介: 孙炜炜(1988—), 男, 硕士研究生, 主要从事大豆蛋白与多糖的糖基化反应研究。E-mail: sunweiwei409@yahoo.com.cn

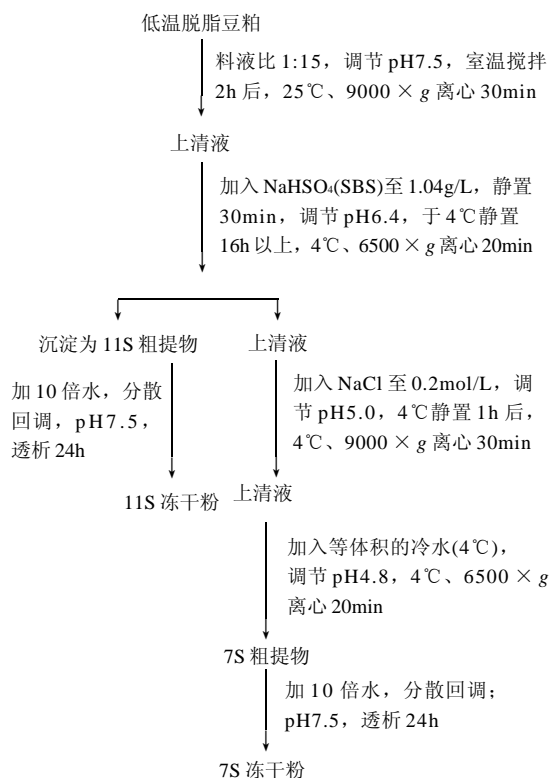
* 通信作者: 于淑娟(1955—), 女, 教授, 博士, 主要从事制糖工程、碳水化合物分子修饰研究。E-mail: lfshjyu@scut.edu.cn

CR22G II 高速冷冻离心机 Hitachi Koki 公司; UV-2300 分光光度计 上海天美科学仪器有限公司; ECP3000 SDS-PAGE 三恒电泳仪 北京市六一仪器厂; DNP-9082 电热恒温培养箱 上海精宏试验设备有限公司; NaNo-Zs 马尔文纳米粒度分布仪 英国 Marlvern 公司。

1.3 方法

1.3.1 7S 球蛋白和 11S 球蛋白的分离纯化

7S 球蛋白依照 Nagano 等^[9]的方法制备, 制备流程如下:



1.3.2 7S 球蛋白糖基化产物的制备

将 7S 蛋白粉与葡聚糖以质量比 1:1 混合后, 用水溶解调至 6g/100mL 后冷冻干燥。干燥后的粉状物过 120 目筛后放置于干燥器内于 60℃ 条件下干热反应, 保持相对湿度 79%, 并在容器底部放置饱和的 KBr 溶液, 反应一周后即得糖基化产物^[10]。7S 球蛋白与分子质量为 67、150、500kD 的葡聚糖反应的糖基化产物分别记为 G67、G150、G500。

1.3.3 热聚集实验

不同 pH 值的热聚集实验: 11S 球蛋白分别与等量的 7S 球蛋白及其糖基化产物(以 7S 球蛋白计)混合均匀后溶于不同 pH 值的 30mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液(含 10 mmol/L β -巯基乙醇)于 80℃ 水浴 30min^[11], 冷却至室温测定浊度和 ξ -电位。

不同离子强度的热聚集实验: 11S 球蛋白分别与等量的 7S 球蛋白及其糖基化产物(以 7S 球蛋白计)混合均匀

后溶于不同离子强度(以 NaCl 调节)Tris-HCl 缓冲溶液(含 10 mmol/L β -巯基乙醇)于 80℃ 水浴 30min, 冷却至室温测定浊度和 ξ -电位。

1.3.4 浊度测定

根据 Damodaran 等^[13]的方法, 分别取 1.3.3 节热聚集实验中的样品液于波长 540nm 处测定浊度。

1.3.5 ξ -电位测定

采用马尔文纳米粒度分布仪测定添加 7S 球蛋白及其糖基化产物的 11S 球蛋白溶液热聚集后的 ξ -电位。波长和散射角度分别固定在 632nm 和 90°, 操作温度为室温(25℃)。

1.3.6 粒度测定

采用马尔文纳米粒度分布仪测定添加 7S 球蛋白及其糖基化产物的 11S 球蛋白溶液热聚集前后的粒径分布。波长和散射角度分别固定在 632nm 和 90°, 操作温度为室温(25℃)。

1.3.7 SDS-PAGE 电泳

按照 Laemmli^[14]的方法在不连续的缓冲体系中进行, 使用 12% 分离胶和 4% 浓缩胶。样品以相同比例溶于还原性的缓冲液(10% SDS, 2.5% β -巯基乙醇)中, 然后在沸水中加热 5min, 于 6000 \times g 离心 3min, 以一定比例上样。电泳过程恒流, 浓缩胶电流 40mA, 分离胶电流调至 80mA, 溴酚蓝前沿至封口胶时关闭电源。电泳结束后将凝胶进行考马斯亮蓝染色 40min, 使用脱色液(甲醇、冰乙酸、水体积比为 1:1:8)脱色至透明, 于凝胶成像系统进行成像处理。

2 结果与分析

2.1 浊度测定

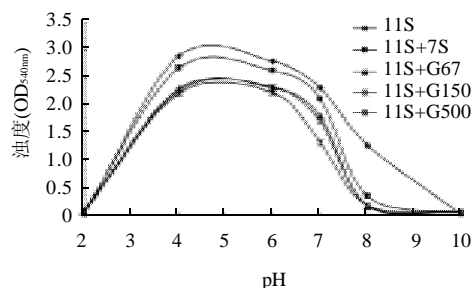


图1 不同 pH 值缓冲溶液中 7S 球蛋白及其糖基化产物对 11S 球蛋白热聚集的影响

Fig.1 Effects of β -conglycinin and glycosylated β -conglycinin on the thermal aggregation of glycinin under different pH conditions

由图 1 可见, 在还原剂存在下, 11S 球蛋白的宏观聚集主要是由碱性亚基发生聚集^[4]。各组分的浊度都是随着 pH 值的增大, 先升高后降低, 在 pH4.8 附近浊度

最大, 偏酸或偏碱均不利于热聚集。加入 7S 球蛋白及其糖基化产物后的 11S 球蛋白溶液的浊度低于 11S, 且加入 7S 球蛋白的浊度高于加入其糖基化产物。相比较而言, G500 的浊度低于 G67 和 G150(二者浊度曲线相近)。此结果表明 7S 球蛋白具有抑制 11S 球蛋白热聚集的性质, 由于大分子糖链的接入, 导致 7S 球蛋白空间位阻增大, 使得热聚集程度变得更小, 难以形成可溶性的宏观聚集体, 溶液浊度降低。接入到 7S 球蛋白肽链上的葡聚糖分子质量越大, 空间位阻越大, 因此 G500 比其他两种糖基化产物的浊度低。这说明糖基化有利于增强 7S 球蛋白对 11S 球蛋白热聚集的抑制作用。

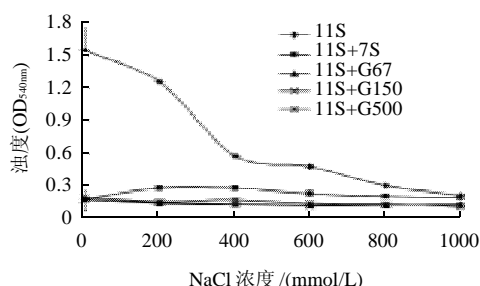


图2 不同离子强度(NaCl)的缓冲溶液中 7S 球蛋白及其糖基化产物对 11S 球蛋白热聚集的影响

Fig.2 Effects of β -conglycinin and glyated β -conglycinin on the thermal aggregation of glycinin under different ionic strength conditions

由图 2 可知, 11S 球蛋白溶液浊度随着 NaCl 离子强度的增加而降低, 盐离子浓度的增加有利于抑制 11S 球蛋白热聚集^[4], 其余组分浊度受离子强度影响不是很大。加入 7S 球蛋白及其糖基化产物溶液的浊度低于 11S 球蛋白溶液, 并且加入 7S 球蛋白的浊度高于加入其糖基化产物浊度, 3 种糖基化产物的浊度曲线相近。此结果表明, 7S 球蛋白及其糖基化产物能够抑制 11S 球蛋白的热聚集, 但离子强度不是影响其抑制效果的主要因素, 糖基化产物的抑制效果比 7S 球蛋白好, 其原因与 2.1 节中的原因相似。这同样说明糖基化有利于增强 7S 球蛋白对 11S 球蛋白热聚集的抑制作用。

2.2 ξ -电位测定

表 1 不同 pH 值溶液中添加 7S 球蛋白及其糖基化产物的 11S 球蛋白溶液加热后 ξ -电位的变化

Table 1 Changes in z-potential of glycinin in the presence of β -conglycinin or its glyated counter part under different pH conditions after heating at 80 °C for 30 min

pH	ξ -电位/mV				
	11S	11S+7S	11S+G67	11S+G150	11S+G500
2	16.80	24.10	11.35	11.00	8.55
4	-12.81	-15.55	-4.82	-3.81	-1.67
6	-17.15	-18.80	-5.14	-3.77	-1.74
7	-18.60	-20.00	-7.95	-7.09	-4.92
8	-21.05	-23.10	-12.00	-10.60	-8.30
10	-24.70	-25.00	-19.40	-18.30	-16.40

表 2 不同离子强度溶液中添加 7S 球蛋白及其糖基化产物的 11S 球蛋白溶液加热后 ξ -电位的变化

Table 2 Changes in z-potential of glycinin in the presence of β -conglycinin or its glyated counter part under different ionic strength conditions after heating at 80 °C for 30 min

离子强度/(mmol/L)	ξ -电位/mV				
	11S	11S+7S	11S+G67	11S+G150	11S+G500
200	-22.00	-22.50	-11.60	-10.30	-8.66
400	-9.07	-10.6	-5.12	-4.55	-4.32
600	-7.93	-8.99	-4.32	-3.01	-4.01
700	-7.17	-7.87	-3.24	-2.22	-3.33
800	-6.56	-6.90	-2.31	-2.01	-2.98
1000	-4.91	-7.17	-2.01	-1.93	-2.26

从表 1、2 可以看出, 加入 7S 球蛋白的 11S 球蛋白溶液的 ξ -电位比未加入 7S 球蛋白的偏低, 7S 球蛋白对 11S 球蛋白热聚集的抑制作用主要是由于电荷的作用^[3], 7S 球蛋白的加入增加了体系中的负电荷量, ξ -电位的绝对值越大, 说明溶液体系越稳定^[12]。加入 7S 球蛋白糖基化产物的 11S 球蛋白溶液的 ξ -电位绝对值始终低于加入 11S 球蛋白溶液的 ξ -电位, 然而由 2.1 节得出的结论是加入 7S 球蛋白糖基化产物的溶液体系比加入 7S 球蛋白的溶液稳定。这说明电荷不是决定其体系稳定性的主要因素, 可能是由于接入长的糖链, 使得体系空间位阻增大而抑制了 11S 球蛋白的热聚集; 中性葡聚糖的接入屏蔽掉了 7S 球蛋白表面的部分电荷, 使得其 ξ -电位升高, 表面疏水性降低。7S 球蛋白糖基化产物抑制 11S 球蛋白热聚集的机理与 7S 球蛋白的抑制聚集机理存在一定差异。

2.3 粒度测定

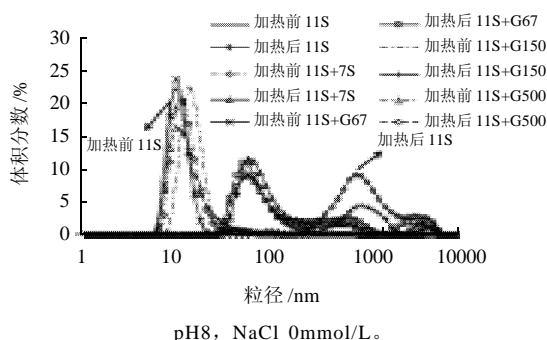


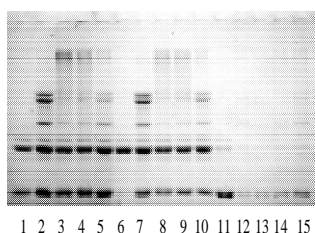
图 3 添加 7S 及其糖基化产物的 11S 溶液加热后的粒度变化
Fig.3 Changes in particle size of soybean glycinin solution in the presence of β -conglycinin or its glyated counter part after heating 30 min

由图 3 可见, 11S 球蛋白溶液加热后, 粒径明显增加至 1000nm 左右, 加入 7S 球蛋白及其糖基化产物的 11S 球蛋白溶液加热前的粒径和未加入的相差不大, 但加热后的粒径仅增大至 60nm 左右, 并且加入 7S 球蛋白糖基

化产物的粒径略小于加入 7S 球蛋白, 这说明加入 7S 球蛋白抑制了 11S 球蛋白的热聚集, 糖链的接入进一步抑制了体系中宏观聚集体的生成, 这也印证了 2.1 节浊度测定的结果。

2.4 SDS-PAGE电泳

取 pH8、离子强度为 0mmol/L(NaCl)的 Tris-HCl 缓冲溶液溶解大豆球蛋白^[13], 各溶液加热前、后上清液和沉淀的 SDS-PAGE 图谱见图 3。



加热前上清液: 1. 11S, 2. 11S+7S, 3. 11S+G67, 4. 11S+G150, 5. 11S+G500; 加热后上清: 6. 11S, 7. 11S+7S, 8. 11S+G67, 9. 11S+G150, 10. 11S+G500; 加热后沉淀: 11. 11S, 12. 11S+7S, 13. 11S+G67, 14. 11S+G150, 15. 11S+G500。

图 4 加热前、后大豆球蛋白溶液的电泳图谱

Fig.4 SDS-PAGE of soybean glycinin solution before and after thermal treatment at 80 °C for 30 min

图 3 显示, 11S 球蛋白溶液加热后, 上清液中的碱性亚基消失而出现在沉淀的图谱中, 11S 球蛋白加热后产生的宏观聚集体主要由 11S 球蛋白的碱性亚基组成^[14]。碱性亚基并未出现在加热后的沉淀中, 7S 球蛋白抑制了 11S 球蛋白碱性亚基的聚集, 这与资料报道一致^[15]。条带 3、8、13 显示了 G67 和 7S 球蛋白一样能够抑制 11S 的热聚集。同样, 其他条带显示了 G150 和 G500 对 11S 的热聚集也具有抑制作用。

3 结 论

7S 球蛋白及其糖基化产物都具有抑制 11S 球蛋白热聚集的性质, 并且糖基化产物的抑制效果优于未糖基化的 7S 球蛋白; 二者抑制 11S 球蛋白热聚集的机理不同,

糖基化的 7S 球蛋白对 11S 球蛋白热聚集的抑制机理还有待于进一步研究。7S 球蛋白糖基化可以作为一种抑制大豆蛋白热聚集的新方法, 对于我国丰富的大豆资源来说, 无疑是一种很好的拓宽其应用范围的途径。

参考文献:

- [1] 周瑞宝, 周兵. 大豆 7S 和 11S 球蛋白的结构和功能性质[J]. 中国粮油学报, 1998, 6(13): 39-42.
- [2] 李向红, 刘展, 李伟, 等. 干燥方法对大豆分离蛋白热诱导聚集体的影响[J]. 农业工程学报, 2008, 24(10): 258-261.
- [3] DAMODARAN S, KINESELLA J E. Effect of conglycinin on the thermal aggregation of glycinin[J]. Food Chemistry, 1982, 30: 812-817.
- [4] 莫重文. 蛋白质化学与工艺学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 179-183.
- [5] 齐军茹, 杨晓泉, 廖劲松, 等. 大豆蛋白与多糖的干热反应研究[J]. 食品科学, 2005, 26(12): 45-47.
- [6] KATO Y, AOKI T, KATO N, et al. Improvement of protein heat stability and emulsifying activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43: 301-305.
- [7] AOKI T, HIIDOME Y, KITAHATA K, et al. Improvement of heat stability and emulsifying activity of ovalbumin by conjugation with glucuronic acid through the Maillard reaction[J]. Food Research International, 1999, 32: 129-133.
- [8] LI Xianghong, CHENG Yunhui, YI Cuiping, et al. Effect of ionic strength on the heat-induced soy protein aggregation and the phase separation of soy protein aggregate/dextran mixtures[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(3): 1015-1023.
- [9] NAGANO T, HIROTSUKA M, MORI H, et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans[J]. Agric Food Chem, 1992, 40: 941-944.
- [10] 齐军茹, 杨晓泉, 廖劲松, 等. 大豆球蛋白与葡聚糖的干热反应特性[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(6): 79-82.
- [11] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [12] 章莉娟. 胶体与界面化学[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2006: 97-100.
- [13] 李云, 华欲飞, 李向红. 大豆蛋白预先热聚集对其凝胶性质的影响[J]. 食品科技, 2007(2): 29-32.
- [14] 杨晓泉. 大豆蛋白的改性技术研究进展[J]. 广州城市职业学院学报, 2008, 2(3): 37-44.
- [15] 朱建华, 杨晓泉, 陈刚. 大豆 7S 球蛋白和 11S 球蛋白的研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2003(8): 37-39.