

高压微射流处理对大豆分离蛋白构象及功能特性的影响

沈 兰, 王昌盛, 唐传核*

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 通过测定溶解度、乳化性、疏水性和运用差示扫描量热仪分析(DSC)和圆二色光谱(CD)分析探讨不同压力微射流处理(HPM)对大豆分离蛋白(SPI)构象和功能特性的影响。HPM 诱导不溶性蛋白聚合物解聚, 增加 SPI 的溶解度、乳化活性指数和疏水性。DSC 图谱结果表明, 处理后的 SPI 变性温度基本维持不变, 但变性焓值呈现下降趋势。CD 光谱分析表明, HPM 对 SPI 的二级、三级结构没有明显的影响。

关键词: 大豆分离蛋白; 高压微射流; 功能特性; 构象

Effect of High Pressure Microfluidization on Functional and Conformational Properties of SPI

SHEN Lan, WANG Chang-sheng, TANG Chuan-he*

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

Abstract: The effect of high pressure microfluidization (HPM) on functional properties and conformational properties of soy protein isolated(SPI) was investigated by measuring solubility, emulsification, hydrophobic properties, DSC thermogram and UV-CD spectrum. HPM could cause insoluble aggregates to dissociate, thus improving the solubility, emulsifying activity index (EAI) and hydrophobic properties of SPI. DSC analysis indicated T_d remained basically unchanged, but ΔH tended to decline. UV-CD spectrum analysis showed that both the tertiary conformation and secondary structure of SPI were nearly unaffected by HPM treatment.

Key words: soy protein isolated (SPI); high pressure microfluidization; functional properties; conformation

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)03-0072-05

大豆蛋白以其较高营养价值和独特的功能特性, 已经成为目前世界上最大的具有商业价值的植物蛋白。随着我国经济建设的飞速发展, 人们生活水平的日益提高, 大豆蛋白常作为添加剂来改善食品的品质, 在食品、医药保健食品、婴儿食品和饮料食品等领域得到越来越广泛的应用。然而, 商用大豆蛋白的功能特性通常较差, 很大程度地限制了其应用范围^[1]。

高压技术被认为是一种环境友好的物理改性手段, 目前有高压微射流、高静压和传统动态高压处理。在样品高压微射流处理过程中, 高速流动的蛋白质溶液快速通过具有一定几何形状的腔体, 物料同时受到高速剪切、高频振荡、空穴效应对流撞击等机械力作用和相应的热效应, 由此引发的机械力化学效应可诱导生物大分子物理、化学及结构性质的变化^[2]。由于其处理的时间短, 温度低, 效果独特, 被认为是很有发展前景

的一种低温物理加工方法^[3]。Sathe^[4]利用动态超高压微射流技术制备了亚微米级的乳状液; Iordache 等^[5]探讨了高压微射流处理对变性乳蛋白质溶液粒径、功能特性以及解聚行为的影响, 研究表明高压微射流处理可以降低蛋白质的粒径, 诱导不溶性聚集物解聚, 改善蛋白溶解特性。基于此, 研究高压微射流处理对大豆分离蛋白(SPI)功能特性和构象的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

大豆粕 山东禹王有限公司; 大豆色拉油(食品级) 中粮食品营销有限公司; 牛血清白蛋白(BSA) Fitzgerald 公司; 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

M-110EH高压微射流纳米均质机 美国Microfluidics

收稿日期: 2011-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972049)

作者简介: 沈兰(1986—), 女, 硕士研究生, 主要从事植物蛋白研究。E-mail: slflesy@126.com

* 通信作者: 唐传核(1973—), 男, 副教授, 博士, 主要从事植物蛋白研究。E-mail: chtang@scut.edu.cn

公司; F-7000 荧光分光光度计、CR22G 高速冷冻离心机 日本 Hitachi 公司; MOS-450 圆二色光谱仪 法国 Bio-Logic 公司; 2501PC 紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; Q100 差示扫描量热仪 美国 TA Instruments 公司; IKAT25 高速分散机 德国 IKA 公司。

1.3 方法

1.3.1 大豆分离蛋白(SPI)的制备

大豆分离蛋白(SPI)的制备采用经典的碱提-酸沉工艺^[6], 并稍作改动。称取 100g 大豆粕粉分散于 1.5L 去离子水(1:15, *m/V*)中, 用 2mol/L NaOH 溶液调 pH 值至 8.0, 在室温下搅拌 2h, 离心(8000 × *g*, 30min, 4℃), 弃其沉淀物。将上清液 pH 值调到 4.5, 离心(5000 × *g*, 20min, 4℃)。弃其上清液, 所得沉淀物经两次水洗(pH4.5)后, 分散于适量的去离子水中, 调 pH 值至 7.5。充分溶解后置于去离子水透析 24h, 冷冻干燥后于 -20℃ 贮存备用。

1.3.2 高压微射流处理

称取一定量的 SPI 溶解于去离子水中, 配成 5g/100mL 的 SPI 溶液。采用高压微射流纳米均质机, 对其进行均质处理, 分别于 0、40、80、120、160MPa 条件下循环均质 3 次。处理后的蛋白溶液冷冻干燥, -20℃ 贮存备用。

1.3.3 溶解度测定

将不同压力处理的样品分别配成 1.0g/100mL 不同 pH 值的蛋白溶液, pH 值范围设置为 2.0~10.0。充分溶解后, 离心(10000 × *g*, 30min, 15℃)^[7]。上清液进行适当稀释后, 采用 Bradford 法测定蛋白质含量, 以牛血清白蛋白(BSA)为标准物做标准曲线。SPI 的溶解度表示为上清液蛋白质量浓度占总蛋白质量浓度的百分比。样品在 0.1mol/L NaOH 溶液中的溶解度记为总蛋白质量浓度^[8]。

1.3.4 乳化特性测定

在测定小烧杯中分别加入 15mL 0.1g/100mL 蛋白质溶液(pH 值分别为 3.0、5.0、7.0、9.0)和 5mL 玉米油, 利用高速分散机经 24000 × *g* 处理 1min 后, 从测试管底部取出 50μL 乳液, 用 0.1g/100mL 的 SDS 稀释 100 倍(5mL), 于 500nm 波长处测其吸光度 A_{500nm} 。

乳化活性指数(emulsifying activity index, EAI)和乳化稳定性指数(emulsifying stability index, ESI)的计算公式分别如下^[9]:

$$EAI/(m^2/g) = 2 \times \frac{2.303 \times A_0 \times DF}{\rho \times \phi \times (1 - \theta) \times 100} \quad (1)$$

$$ESI/\text{min}^{-1} = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times 10 \quad (2)$$

式中: A_0 为吸光度; DF 为稀释因子, DF=100; ρ 为蛋白质量浓度/(g/mL); ϕ 为光程($\phi=0.01\text{m}$); θ 为油相所占分数($\theta=0.25$); A_0 、 A_{10} 分别为 0min 和 10min 时在 500nm 波长处的吸光度。

1.3.5 表面疏水性测定

将一定量待测蛋白样品溶于 10mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)中, 配制成质量浓度为 1.5g/100mL 蛋白质溶液。分别移取 10、20、30、40、50μL 的蛋白溶液加入到 4mL 的磷酸缓冲液(pH7.0)中。在测试前添加 20μL 8mmol/L ANS 储备液, 振荡均匀, 在室温下反应 8~15min。样品的荧光强度(fluorescence intensity, FI)采用荧光分光光度计测定。测试条件为: 激发和发射波长分别 390nm 和 470nm, 激发和发射狭缝宽均为 5nm。以蛋白质量浓度为横坐标, 相应的 FI 为纵坐标做图, 其斜率即为蛋白质的疏水性指数 H_0 。

1.3.6 热学特性分析

热学特性用差示扫描量热仪分析测定。称取约 2mg 蛋白样品置于铝盒中, 加入 10μL 10mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)充分搅匀后压盘。以空铝盒为对照, 温度扫描范围: 30~120℃; 升温速率: 5℃/min; 保护氮气流速: 50mL/min。采用 Theunivers2000 分析软件计算蛋白质的热力学参数, 其中, t_0 为起始变性温度; t_d 为最大变性温度; $t_{1/2}$ 为半峰宽; ΔH 为变性焓。结果为 3 次测量的平均值。

1.3.7 构象分析

样品的构象变化采用圆二色光谱仪进行测定。将扫描波长设定 190~250nm 远紫外区域, 用于研究不同蛋白样品的二级结构。称取 5mg 蛋白样品溶于 5mL 磷酸缓冲液(10mmol/L, pH7.0), 充分搅拌均匀后于 10000 × *g* 离心 10min。将上清液稀释至 0.1mg/mL, 用于二级结构的测定。所用样品池的光径为 2mm, 测量温度设为 25℃, 测定时所用的分辨率为 0.5nm, 扫描速度为 100nm/min, 灵敏度为 100(m·deg)/cm, 实验值为 3 次扫描的平均值。

将波长设定于 250~320nm 近紫外区域可用于蛋白质的三级结构的测定。配制蛋白质量浓度为 1mg/mL, 充分搅拌均匀后于 10000 × *g* 离心 20min, 取上清液用于三级结构的测定。所用样品池的光程为 10mm, 测量温度设为 25℃, 测定时所用的分辨率为 0.5nm, 扫描速度为 100nm/min, 灵敏度为 100(m·deg)/cm, 实验值为 3 次扫描平均值。

2 结果与分析

2.1 大豆分离蛋白的溶解度

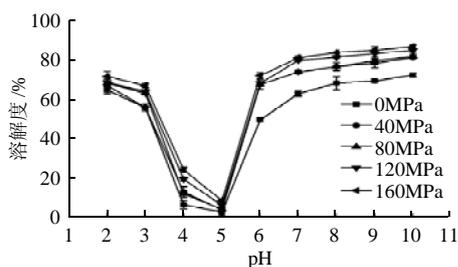


图1 高压微射流处理后大豆分离蛋白的溶解度-pH值变化曲线
Fig.1 Protein solubility-pH curves of HPM-treated SPIs

溶解性是蛋白质水化作用的重要体现。溶解性数据对天然来源蛋白质的提取、纯化和分离条件的确定至关重要,为蛋白质的可应用性提供一个良好的指标^[1]。从图1可以看出,高压微射流处理可以改善蛋白质的溶解特性,这种改善依赖于所施加的压力及pH值。在各pH值条件下样品的溶解度均随着压力的增加而增加。在酸性条件下改善程度并不明显,但在碱性条件下,0~80MPa范围内溶解度增加幅度较大,80~160MPa范围内的改善程度则与酸性条件下类似,变化很小。胡宝松等^[3]运用超高压射流在0~140MPa内研究SPI的功能性质时,发现pH8的条件下,SPI的溶解度在0~80MPa条件下变化较大,而在80~140MPa条件下溶解度变化很小,这与该实验结果是一致的。尹寿伟等^[2]采用高压微射流研究芸豆分离蛋白也得出了类似的结论。这可能是因为在0~80MPa条件下,高压微射流的高速剪切处理使SPI的不溶性聚集体解聚,使之成为更小的蛋白胶团颗粒,从而增大了SPI与水的接触面积;另一方面,SPI的立体结构变得松散,蛋白质分子有一定程度的解离和伸展,从而暴露出更多的极性基团,因此溶解度也得到改善。而在80~160MPa条件下,由于大量活性基团的暴露,使得蛋白质分子间又相互形成新的化学键,导致溶解度变化不大。

2.2 大豆分离蛋白乳化特性

蛋白质的乳化特性与其溶解度、表面疏水性和表面电荷分布相关。在蛋白质溶解度较低的情况下,溶解度是决定蛋白质乳化特性的主要因素;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^[10]。

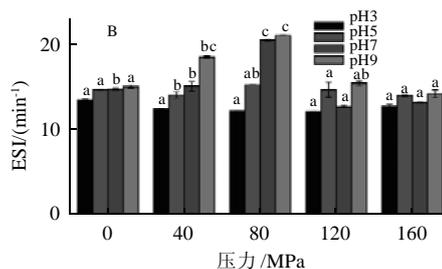
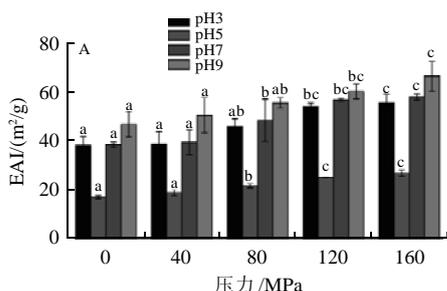


图2 高压微射流处理大豆分离蛋白在不同pH值条件下的EAI(A)和ESI(B)
Fig.2 Effect of HPM treatment on EAI and ESI of SPI

蛋白质的乳化特性可通过乳化活性指数(EAI)和乳化稳定性指数(ESI)来表征^[2]。样品的EAI和ESI与pH值的关系如图2A、B所示。从图2A可以看出,同一pH值条件下,EAI随着压力的增高而显著增大,这主要归因于高压微射流使蛋白质分子结构松散,暴露出更多的亲水性基团,使得亲水性提高;与此同时分子内部的疏水基团也暴露出来,亲油性也增强,两者达到较好的平衡^[11]。

ESI则在酸性条件下变化不明显,在pH7.0和pH9.0下经高压微射流40MPa和80MPa处理后有显著的增加,随后随着压力的升高有下降的趋势(图2B)。Wang Xiansheng等^[12]研究高压对SPI的功能性质的影响时则发现,样品经200~600MPa超高压处理后,其ESI呈现出下降趋势,与本实验数据相吻合。这可能是由于在中性或碱性条件下,超过某一临界压力后,由于蛋白质分子的聚集导致柔曲性降低。而柔曲性是影响乳化稳定性的一个重要因素^[13]。

此外,EAI对pH值具有依赖性。由图2A可以看出,在pH5.0处(等电点附近),EAI最低(16.9~26.7m²/g),而在偏离等电区域EAI则迅速增加,在pH9.0处,其EAI可达46.7~66.4m²/g,这表明蛋白质的乳化性与蛋白质的溶解度呈正相关。

2.3 大豆分离蛋白表面疏水性和DSC变性参数

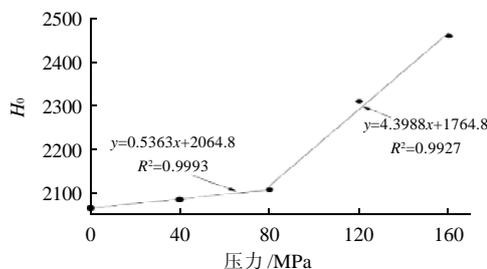


图3 高压微射流处理对大豆分离蛋白的表面疏水性影响
Fig.3 Effect of HPM treatment on H_0 of SPI

图3为高压微射流处理对大豆分离蛋白疏水性的影

响。在较低压力处理(0~80MPa)和较高压力处理(80~160MPa)后,蛋白的表面疏水性与处理压力均呈线性相关性。在高于80MPa处理的样品,表面疏水性变化显著,呈急速上升的趋势。这可能是因为,在0~80MPa范围内,蛋白分子逐渐展开,导致内部疏水基团部分外露, H_0 开始缓慢增加;而随着压力的增加,在80~160MPa范围内,蛋白分子展开得更加完全,导致 H_0 急速上升。Molina 等^[14]采用超高压手段研究7S球蛋白、11S球蛋白和SPI时,发现0.1~200MPa范围内,这3种蛋白的 H_0 均呈现出上升趋势;Wang Xiansheng 等^[12]采用超高压处理SPI时,得出了同样的结果。这与本实验结论是一致的。

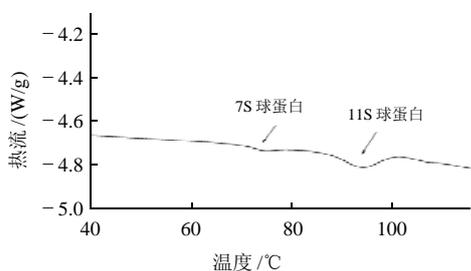


图4 典型的SPI热变性DSC图谱
Fig.4 Typical DSC thermogram of SPI

由图4可知,在75°C和90°C处有两个峰,分别对应着7S和11S球蛋白的变性温度。SPI中的11S球蛋白在不同的压力水平(0~160MPa)高压微射流处理后具有相似的变性温度(t_d),表明SPI结构比较紧凑^[15-17]。变性焓变(ΔH)主要用来反映蛋白的变性程度^[18],随着压力的增加(0~160MPa),SPI的变性焓变显著下降(表1),这表明不同压力促使蛋白分子发生不同程度的展开进而发生部分变性。Puppo^[19]、Wang Xiansheng^[12]等均发现SPI经200~600MPa处理后, ΔH 会显著下降,甚至下降为0。这进一步说明,压力可以使蛋白分子展开甚至完全展开,从而导致蛋白部分变性或者完全变性。

表1 高压微射流处理的大豆分离蛋白和对照蛋白的DSC参数
Table 1 Thermal transition properties of native and HPM-treated SPIs

压力	$t_0/^\circ\text{C}$	$t_d/^\circ\text{C}$	$\Delta H/(\text{J/g})$	$t_{1/2}/^\circ\text{C}$
原蛋白	82.59 ± 0.67 ^a	89.81 ± 0.64 ^a	5.75 ± 0.60 ^{bc}	8.29 ± 0.04 ^{ab}
0MPa	82.94 ± 0.29 ^a	90.00 ± 0.08 ^a	6.05 ± 0.20 ^c	7.61 ± 0.19 ^a
40MPa	83.63 ± 0.59 ^{ab}	89.93 ± 0.45 ^a	5.71 ± 0.32 ^{bc}	8.36 ± 0.14 ^{ab}
80MPa	83.43 ± 0.11 ^{ab}	90.42 ± 0.45 ^a	5.63 ± 0.01 ^{bc}	8.44 ± 0.45 ^b
120MPa	82.49 ± 0.53 ^a	90.40 ± 0.14 ^a	5.08 ± 0.05 ^{ab}	8.50 ± 0.18 ^b
160MPa	84.44 ± 0.49 ^b	90.61 ± 0.18 ^a	4.82 ± 0.07 ^a	8.39 ± 0.50 ^b

注: t_0 为11S球蛋白的起始变性温度; t_d 为11S球蛋白的最大变性温度; ΔH 为11S球蛋白的变性焓变; $t_{1/2}$ 为吸热峰半峰宽; 同一列小写字母不同, 差异显著($P < 0.05$)。

2.4 大豆分离蛋白圆二色谱(CD)光谱分析

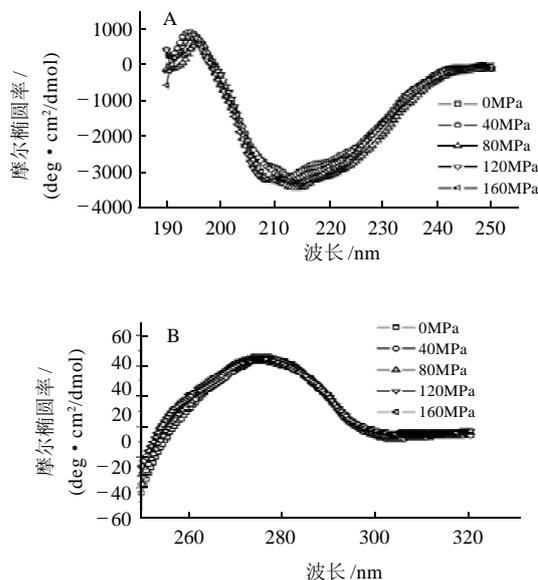


图5 大豆分离蛋白远紫外(A)和近紫外(B)圆二色谱图
Fig.5 Far- and near-UV CD spectra of SPI

对照和高压微射流处理样品的远紫外区域圆二色谱如图5A、B所示。图5A表明,样品在210~220nm处有一较宽的负峰,在196nm处存在一个明显的正峰,这表明大豆分离蛋白的二级结构以 β -类结构为主^[20]。

近紫外区域圆二色谱进一步揭示了大豆分离蛋白三、四级构象。在近紫外区域(250~320nm), CD信号主要源于芳香族氨基酸,每种芳香族氨基酸有其特征的图谱,色氨酸(Trp)的吸收峰主要在290nm,在290~305nm具有精细结构;而酪氨酸(Tyr)的吸收峰在275~282nm之间;苯丙氨酸(Phe)残基具有弱蛋白尖锐的峰,其精细结构在255~270nm范围^[21]。蛋白近紫外区域CD光谱光谱图形状主要取决于蛋白中所含的芳香族氨基酸总类、流动性以及其微环境(氢键,极性基团和极化度)^[21]。由图5B可知,大豆分离蛋白的近紫外-CD光谱呈现出一个主要的正峰在275nm处,为酪氨酸的特征峰。在所施加的压力(0~160MPa)范围内,高压微射流处理后样品远紫外区域圆二色谱相似,表明高压微射流处理对大豆分离蛋白的二、三、四级构象影响甚微。尹寿伟等^[2]运用高压微射流处理芸豆分离蛋白同样发现,高压微射流处理对芸豆分离蛋白的二级构象无显著影响。

3 结论

3.1 高压微射流处理均能不同程度改善各pH值条件下SPI的溶解度,而且碱性条件下的提高程度高于酸性条件下。

3.2 高压微射流处理显著改善了SPI的EAI,而ESI则呈现出先上升后下降的趋势。SPI的EAI与其溶解度呈现正相关性。在pH5.0(等电点附近),乳化活性指数最低,而偏离等电区域乳化活性指数迅速增加,在碱性条件下,大豆分离蛋白乳化活性指数高达 $66.4\text{m}^2/\text{g}$ 。

3.3 表面疏水性和DSC图谱表明,0~160MPa高压微射流处理可以使蛋白分子展开,使蛋白发生部分变性;圆二色光谱结果表明高压微射流处理对于维系蛋白二级、三级结构的次级相互作用力没有明显影响。

参考文献:

- [1] 苏丹,李树君,赵凤敏,等.超高压对大豆蛋白结构和功能性质影响研究进展[J].包装与食品机械,2009(5):111-115.
- [2] 尹寿伟,唐传核,温其标,等.微射流处理对芸豆分离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):112-116.
- [3] 胡宝松,张绍英.超高压微射流破碎对大豆分离蛋白功能特性的影响[J].大豆通报,2004(4):30-34.
- [4] SATHE S K. Dry bean protein functionality[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2002, 22(2): 175-223.
- [5] IORDACHE M, JELEN P. High pressure microfluidization treatment of heat denatured whey proteins for improved functionality[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2003, 4(4): 367-376.
- [6] PUPPO M C, LUPANO C E, ANON M C. Gelation of soybean protein Isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(9): 2356-2361.
- [7] PETRUCCELLI S, ANON M C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy proteins isolates. 1. Structural and hydration properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(10): 2161-2169.
- [8] TANG Chuanhe. Functional properties and *in vitro* digestibility of buckwheat protein products: influence of processing[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 82(4): 568-576.
- [9] CAMERON D R, WEBER M E, IDZIAK E S, et al. Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(4): 655-659.
- [10] LI C E, NAKAI S, WOOD D F. Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties[J]. Journal of Food Science, 1984, 49(2): 345-350.
- [11] PUPPO M C, SPERONI F, CHAPLEAU N, et al. Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins[J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(2): 289-296.
- [12] WANG Xiansheng, TANG Chuanhe, LI Biansheng, et al. Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(4): 560-567.
- [13] KATO A, NAKAI S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure, 1980, 624(1): 13-20.
- [14] MOLINA E, PAPAPOPOULOU A, LEDWARD D A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins [J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15(3): 263-269.
- [15] JIVOTOVSKAYA A V, SENYUK V I, ROTARIV I, et al. Proteolysis of phaseolin in relation to its structure[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(12): 3768-3772.
- [16] ROMERO J, RYAN D S. Susceptibility of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris* L., to *in vitro* enzymic hydrolysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(4): 784-788.
- [17] van der VEEN M, NORDE W, STUART M C. Effects of succinylation on the structure and thermostability of lysozyme[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(14): 5702-5707.
- [18] ARNTFIELD S D, MURRAY E D. The influence of processing parameters on food protein functionality. I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation[J]. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 1981, 14: 289-294.
- [19] PUPPO C, CHAPLEAU N, SPERONI F, et al. Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(6): 1564-1571.
- [20] ZIRWER D, GAST K, WELFLE H, et al. Secondary structure of globulins from plant seeds: a re-evaluation from circular dichroism measurements[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1985, 7(2): 105-108.
- [21] KELLY S, JESS T J, PRICE N C. How to study proteins by circular dichroism[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, 2005, 1751(2): 119-139.