

β -乳球蛋白热变性可逆性的研究

刘通讯 赵谋明 华南理工大学食品工程系 510641

摘 要 对 β -乳球蛋白溶液的差示扫描分析表明,在碱性条件下,由于巯基活性提高,通过巯基的氧化和巯基与二硫键之间的交换反应引起了分子内二硫键的断裂和分子间二硫键的形成, β -乳球蛋白的热变性是不可逆的。然而,在 $\text{pH} \leq 3.5$ 及 β -乳球蛋白的浓度 $\leq 10\%$ 时,它的变性又是部分可逆的。变性的可逆度随着 β -乳球蛋白浓度的提高而降低,并与扫描速率成反比关系。同时,溶液中氯化钠浓度的提高使它的变性从部分可逆变成不可逆。

关键词 β -乳球蛋白 热变性 变性可逆性

Abstract The Differential Scanning Calorimetric study of β -lactoglobulin (β -LG) solutions indicated that, under the alkaline pH region, the denaturation of β -LG was irreversible due to the higher reactivity of sulfhydryl group which formed intermolecular disulfide bonds via oxidation and sulfhydryl group disulfide bond interchange reactions. While at $\text{pH} \leq 3.5$ and at a concentration of β -LG $\leq 10\%$, its denaturation was partial reversible, the degree of reversibility decreased as β -LG concentration increased and was inversely proportional to the scanning rate. Furthermore, its denaturation became irreversible as the concentration of sodium chloride increased.

Key words β -lactoglobulin thermal denaturation reversibility of denaturation

一般来说,对某种蛋白质溶液进行热处理时,那些稳定蛋白质二级和三级结构的键将发生部分或全部的断裂,造成分子构象的改变,其结果是使蛋白质分子卷曲较紧的结构舒展开来,原来包埋在卷曲结构内部的疏水基团和巯基(SH)等也将暴露在分子的表面。若环境条件(如 pH 值,蛋白质浓度,离子强度等)合适,部分变性的蛋白质分子就可能发生二级反应,彼此之间联结起来形成聚集体网络,随着继续加热,网络又不断增大,联结力不断加强,最终因条件不同形成絮凝、凝胶或沉淀等。蛋白质分子间的这些二级反应通常使它的变性不可逆。然而,在某些特定的条件下,它的变性又是部分可逆的。对此,人们所作的研究极有限^[1]。

β -乳球蛋白是牛乳乳清中的主要蛋白质,它具有强的功能性质而日益引起人们的重视。目前,西欧发达国家正在寻求某些能改善 β -乳球蛋白功能性质的分离方法,其中一个方面就是寻求制得变性程度低的蛋白制品。因此,对 β -

乳球蛋白热变性可逆性的研究显然很有必要,因为在某些需要进行热处理的分离方法中,我们可以选择在它变性可逆的条件下进行加热,而获得低变性的产品。

本研究的目的在于探索 β -乳球蛋白热变性的可逆性以及影响变性可逆与否的各种因素,并对它的变性可逆与否作出机理的解释。

1 材料与方法

1.1 实验材料

所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水,并经过离子交换。

1.1.1 分离 β -乳球蛋白(β LG1):由法国农业食品研究所牛奶技术研究室(Rennes, France)提供,它含有 92% 的蛋白质,其中 87% 为 β -乳球蛋白,3.6% 为 α -乳白蛋白,脂肪含量为 0.5%,乳糖为 1.0%,灰分为 3.0%。

1.1.2 浓缩 β -乳球蛋白(β LG2):由欧洲牛奶公司(ULN, France)提供,它含有 85% 的蛋白

质,其中 β -乳球蛋白占66%, α -乳白蛋白为5%,脂肪含量为0.6%,乳糖为0.5%,灰分为7.3%。

1.2 实验方法

1.2.1 β -乳球蛋白热变性可逆性的研究:采用差示的扫描量热仪(DSC-7,Perkin-Elmer)。分别称取40 mg 试样密封于75 μ l的不锈钢盘子里,然后用差示扫描量热仪进行分析,扫描程序如下:

$$120^{\circ}\text{C} \xrightarrow[\text{加热 } n^{\circ}1]{\beta(^{\circ}\text{C}/\text{min})} 100^{\circ}\text{C} \xrightarrow[\text{冷却}]{250^{\circ}\text{C}/\text{min}} 20^{\circ}\text{C} \xrightarrow[\text{加热 } n^{\circ}2]{\beta(^{\circ}\text{C}/\text{min})} 100^{\circ}\text{C}$$

其中, β 为扫描速率,其范围介于2.5~12.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。分别记下第1次和第2次加热时的变性热焓 $\Delta H_{(1)}$ 和 $\Delta H_{(2)}$,以 $\Delta H_{(1)}/\Delta H_{(2)}$ 的百分比作为 β -乳球蛋白的变性可逆度。

1.2.2 巯基含量的测定:分别量取1 ml 10%的 β -乳球蛋白溶液置于试管中,然后在80 $^{\circ}\text{C}$ 下对其加热(0~30 min)。往加热后的试管中加入12 ml 缓冲液(86 mmol/L Tris-4 mmol/L Na_2EDTA -90 mmol/L 的甘氨酸,8 mol/L 尿素,pH7.0)^[2]进行稀释,经均质和离心分离后,取4 ml 上清液加0.04 ml 的Ellman^[3]试剂[即5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)],反应30

min 后,在412 nm 下用分光光度计(Perkin-Elmer,Lambda3)测定OD值,SH基的含量可用下式^[4]计算:

$$\text{SH}(\mu\text{mol/g 蛋白质}) = 73.53 \times \text{OD}_{412} \times f/C$$

其中, OD_{412} 是在412nm 下的OD值, f 是稀释系数, C 是蛋白质浓度,73.53是单位转换系数。

2 结果与讨论

2.1 分离方法对 β -乳球蛋白热变性可逆性的影响

对于用超滤法制取的 β LGI和用离子交换法制得的 β LGC在水相中(5%,pH为3.5和7.0)的差示扫描分析结果如图1所示。可以看出,无论何种分离方法,在pH=7.0时, β -乳球蛋白的变性是不可逆的,因为试样以10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 从20 $^{\circ}\text{C}$ 加热到100 $^{\circ}\text{C}$ 后,虽经250 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度冷却,没有 β -乳球蛋白分子恢复它在变性前的天然结构。这在对试样第2次扫描时,没有变性峰的出现而表现为一条类似惰性物质的直线是一致的。这种在碱性条件下变性的不可逆现象可能是由于分子内二硫键的断裂及分子间二硫键的形成而造成的。

然而,在pH=3.5时,我们看到第2次扫

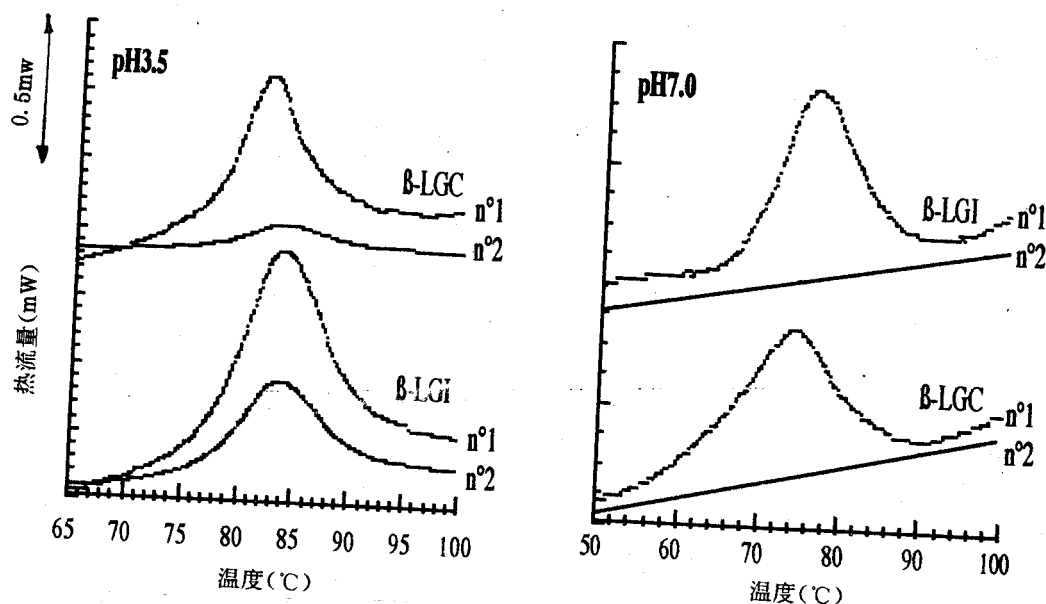


图1 5% β -乳球蛋白分散体系(蒸馏水,pH3.5和7.0)的差示扫描量热图(扫描速率为10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
n°1 为第1次扫描,n°2 为第2次扫描

描时显示了一个变性峰,尽管峰面积没有第1次扫描时的峰面积大。这说明在 pH 值为 3.5 时,它的变性是部分可逆的。对于 β LGI,可逆度为 50%,而对于 β LGC,可逆度只有 10%。这种差异可能是由于它们在成分上的不同而造成的。 β LGI 含有较高含量的乳糖,而乳糖对蛋白质具有保护作用^[5]。同时, β LGC 含有两倍高的灰分,有利于 β -乳球蛋白分子发生聚结、絮凝和凝胶等二级反应^[6],导致了 β LGC 变性可逆度的下降。

需要说明的是,观察到的部分可逆现象并不是第1次扫描时变性不彻底而造成的,因为在 pH3.5 和 pH7.0 时,它们变性的热焓是相同的,而变性热焓则是蛋白质强烈地吸热而展开程度的表示。这说明无论在何种 pH 值下,键的断裂数目和方式是相同的。

从图 1 也可以看出, β -乳球蛋白在 pH3.5 时构象更稳定,因为它的变性峰值温度比在 pH7.0 时高出约 10℃ 左右。同时, β LGI 比 β LGC 构象更稳定,因为 β LGI 具有更高的变性峰值温度。

2.2 溶液的 pH 值和扫描速率的影响

我们采用 β LGC 来研究溶液 pH 值及扫描速率对 β -乳球蛋白变性可逆与否及其可逆度的影响。 β LGC 浓度为 5% 和 10%,pH 介于 1.5~

8.0,扫描速率介于 2.5~12.5℃/min,扫描温度范围介于 20~100℃;其结果如图 2 所示。当 pH>3.5 时, β -乳球蛋白的变性是不可逆的,与浓度和扫描速率无关。然而在 pH≤3.5 时,它的变性可逆度取决于溶液的 pH 值、 β LGC 的浓度和扫描速率。pH 越低、浓度越低和扫描速率越高,则变性的可逆度越大。在 pH=3.5 时,10% 的 β LGC 溶液的变性是不可逆的,而 5% 的 β LGC 只有当扫描速率≥10℃/min 时才显示部分可逆。当 pH 值为 1.5 和 2.5 时,变性的可逆度与扫描速率成反比直线关系。这种变性的可逆度与扫描速率的相关性可用下述理由作解释:即扫描速率越低,溶液的受热时间越长,从而越有利于象聚结、絮凝等二级反应的发生,导致了可逆度的下降。

2.3 β -乳球蛋白浓度的影响

为了排除因浓度不同而造成溶液离子浓度的不同,我们把不同浓度的 β LGC 溶液对 0.1 mol/L NaCl 溶液进行渗析 24 h,从而保证各个不同浓度下的 β LGC 溶液具有相同的离子强度。其结果如图 3 所示,在 pH3.5 及 1% β LGC 时,变性的可逆度达到 83%,随着浓度的升高,可逆度随之下落。当 β LGC 浓度>10%时,它的变性是不可逆的。这说明,随着浓度的提高,象聚结、絮凝等反应越容易产生。事实上,当 β L

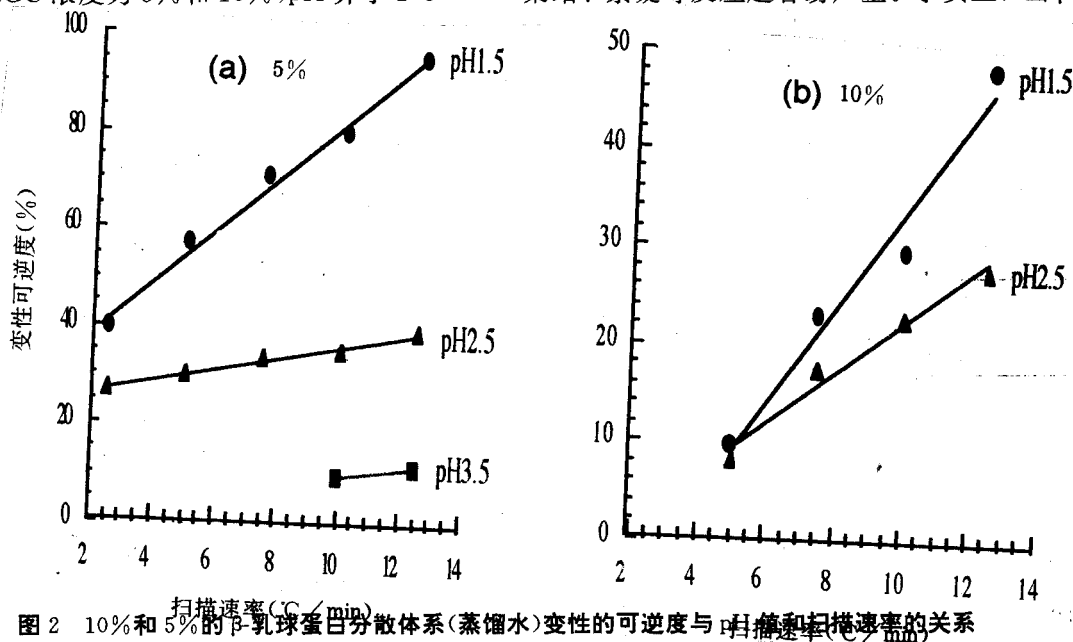


图 2 10%和 5%的 β -乳球蛋白分散体系(蒸馏水)变性的可逆度与 pH 值和扫描速率的关系

GC 浓度大于 10% 时,变性的热焓剧烈下降正说明了这点,因为蛋白质的变性过程是吸热的,而二级反应的过程则是放热的,高浓度下变性热焓的下降正是由于二级反应而放热补偿的结果。

2.4 离子浓度的影响

研究的 β -乳球蛋白为 β LGI,浓度为 5%, pH 值为 3.5,扫描范围为 20~100℃,扫描速率为 10℃/min,氯化钠浓度为 0~0.3 mol/L。其扫描量热分析如图 4 所示,可以看出,随着 Na^+ 浓度的提高, β LGI 变性的可逆度下降。当 Na^+ 的浓度 ≥ 0.2 时,它的变性是不可逆的。这种变性的可逆与否与离子强度的相关性可解释如下:即在低离子强度时, β -乳球蛋白分子以单体形式存在,但当 Na^+ 浓度 ≥ 0.2 时,发生了 β LGI 分子间的缔合作用, β -乳球蛋白以二聚体或多聚体的形式存在,导致了变性的不可逆现象。

2.5 SH 基含量与 pH 值和加热时间的关系

图 5 显示了 10% β LGI 溶液中 SH 基含量在不同 pH 值下随加热时间(80℃)的变化曲线。可以明显地看出,在 $\text{pH} \leq 4.8$ 时,SH 基含量随加热时间略有下降,但不明显。这说明了在酸性条件下 SH 基的惰性,不可能参与 SH 基的氧化和 SH 基与二硫键之间的交换反应,即分子间不可能形成二硫共价交联。然而,在碱性条件下,即使在 80℃ 下加热 2 min,它的下降也是很明显的。这意味着随 pH 值的提高,SH 基变得具有活性,可以通过氧化作用和 SH 基与二硫键之间的交换反应,从而引起分子内二硫键的断裂和分子间二硫共价交联的形成。这一结果与在碱性条件下, β -乳球蛋白变性的不可逆是一致的。

3 结 论

综上所述, β -乳球蛋白热变性的可逆与否取决于溶液的 pH 值、蛋白质浓度、溶液的离子强度及扫描速率等。在 $\text{pH} \leq 3.5$ 时,由于 SH

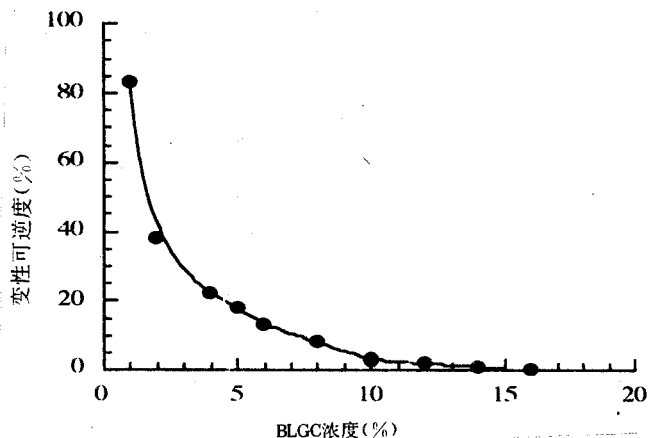


图 3 β LGI 分散体系(蒸馏水, 0.1M NaCl, pH3.5)变性的可逆度与浓度的关系(扫描速率: 10℃/min)

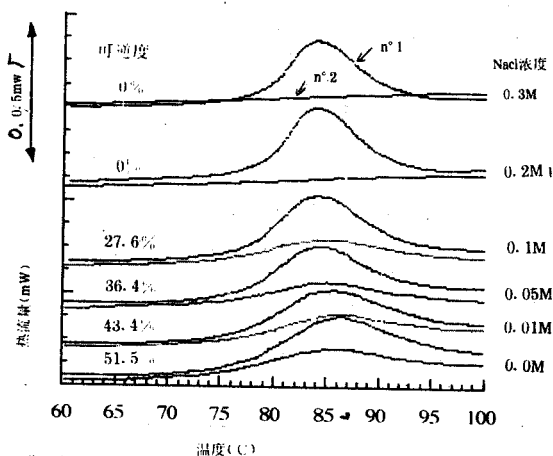


图 4 5% β LGI 分散体系(蒸馏水, pH3.5)的差示扫描量热图与 NaCl 浓度的关系(扫描速率为 10℃/min)
n°1 为第 1 次扫描, n°2 为第 2 次扫描

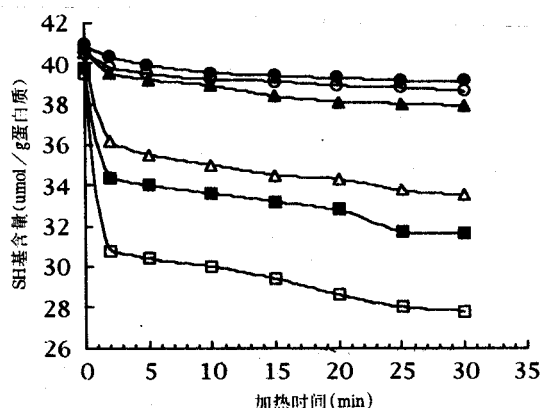


图 5 10% β LGI 分散体系中(蒸馏水)SH 基含量在 80℃ 下随加热时间的变化关系
● pH1.5 ○ pH3.5 ▲ pH4.8 ■ pH7.0 □ pH8.0 △ pH6.0

基的惰性,不可能参与分子间二硫键的形成,而涉及的反应主要是氢键、疏水相互作用等,当 β -乳球蛋白经第1次加热变性后的冷却过程中,有部分分子恢复了它在变性前的天然结构。然而,在碱性 pH 值,由于 SH 基活性的提高,造成分子内二硫键的断裂及分子间二硫交联的形成,导致了变性的不可逆现象。

参考文献

- 1 Relkin P. et al. *Thermochimica Acta*, 1992, 204, 111~121.
- 2 Shimada K and Cheftel J. C. *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36, 1018~1025.
- 3 Ellman G. L. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 40~77.
- 4 Beveridge T. et al. *J. Food Sci.*, 39, 49~51.
- 5 Garrett J. M. et al. *J. Dairy Sci.*, 1988, 71, 10~16.
- 6 Mulvihill D. M. and Kinsella J. E. *J. Food Sci.*, 1988, 53, 231~236.
- 7 Hillier R. M. et al. *J. Sci. Food Agric.*, 1980, 31, 1152~1157.

食品微生物生长预测模型

徐天宇 北京商学院食品教研室 100037

摘要 对食品产品质量的重视,刺激了使用数学模型去预测微生物行为的积极性。过去几年中,用来预测微生物的模型有重大的进展。这些模型为快速地估计环境条件和食品组分对食品中微生物生长的影响提供了新的有力的工具。

关键词 微生物生长 预测 数学模型

Abstract The attach importance to quality of food products has stimulated interest in the use of mathematical modeling to predict microbial behavior. During the past several years there has been substantial advancement in models used in predictive microbiology. There models are providing powerful new tools for rapidly estimating the effects of formulation and environmental conditions on the microbiological growth in food.

Key words Microbial growth Prediction Mathematical model

食品微生物预测模型是近些年来发展比较快的食品微生物学中的一个领域。预测模型被用来描述在不同物理或化学条件下微生物的行为。

近 5~8 年来,有关在食品领域中微生物预测的研究报告显著增加。1992 年 4 月工业微生物协会还在美国佛罗里达州的 Tampa 召开了一次名为“International workshop on the application of predictive microbiology and computer modeling to food industry”的国际会议。有 15 个国家的微生物学家、食品科学家、数学家、工程师和统计学家参会。近些年,之所以发

表了大量的文章,用数学模型研究食品中的微生物行为有 3 条特殊的原因。

第一是由于计算机的普及使用。而数学模型对编制计算机软件是非常重要的。

第二是由于消费者对于食品质量的日益重视。而微生物是影响食品质量的主要因素之一。为了定量分析各种因素对于微生物在食品上生长及产毒的影响,必须发展用于定量分析的工具,即各种有关的数学模型。

第三是有效的数学模型可以向食品工业提供一个重要的手段,以在食品产品设计和评价中建立一个客观的标准,用来预测食品产品的