

# 蛋白质疏水性测定方法的相关性及适用性

曾茂茂, 王 霄, 陈 洁\*

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘 要:** 针对蛋白质的疏水性, 以食品中常用的蛋白质如大豆分离蛋白(SPI) 及其水解物和乳清蛋白为对象, 研究不同疏水性测定方法的相关性及适用性。结果表明: ANS 荧光探针法对各种蛋白质及其水解物(DH < 23)疏水性的测定均比较合适; CPA 荧光探针法不适合于测定疏水性较弱的蛋白质; 反相高效液相色谱法较适合测定疏水性适中及较强的蛋白质; 表面张力法中如采用气液界面参数进行表征, 则其线性存在一定的缺陷。

**关键词:** 蛋白质; 疏水性; 荧光探针法; 高效液相色谱(HPLC); 表面张力

## Correlation and Applicability of Different Methods for Determining Protein Hydrophobicity

ZENG Mao-mao, WANG Xiao, CHEN Jie\*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Proteins regularly used in foods such as soy protein isolate (SPI) and whey protein as well as their hydrolysates were selected as the experimental subjects to explore the correlation and applicability of different methods for determining protein hydrophobicity. The results indicated that ANS (1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid) fluorescent probe method was an appropriate method for measuring the hydrophobicity of various kinds of proteins and their hydrolysates (DH < 23); CPA (*cis*-parinaric) fluorescent probe method was not suitable for determining proteins with relatively weak hydrophobicity; reverse-phase high performance liquid chromatography method was a good method for proteins with relatively moderate and strong hydrophobicity; the linearity of surface tension method had shortcomings when the hydrophobicity was characterized by gas-liquid interface parameters. All of these investigations provided a theoretical basis for determining hydrophobicity in food protein systems.

**Key words:** protein; hydrophobicity; fluorescent probe method; high performance liquid chromatography (HPLC); surface tension

中图分类号: TQ93

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0117-04

疏水性是指由于水对非极性分子的排斥, 非极性基团或分子在水溶液中出现相互缔合的趋势<sup>[1]</sup>。疏水性在蛋白质的结构、构象及与其他蛋白质的相互作用等方面具有重要作用, 并且被认为与蛋白质的功能性质密切相关<sup>[2]</sup>。研究人员在蛋白质疏水性的测定方面做了大量的工作, 然而, 到目前为止仍然没有一种适合所有蛋白质样品疏水性测定的标准方法<sup>[3]</sup>。大豆分离蛋白(SPI)和乳清蛋白由于具有良好的功能性质, 被广泛应用于多种食品体系<sup>[4]</sup>, 而在其功能性质的应用中, 常需要测定其疏水性。本实验以 SPI 及其水解物和乳清蛋白为对象, 探讨了 ANS 荧光探针法<sup>[1]</sup>、CPA 荧光探针法<sup>[5]</sup>、反相高效液相色谱法<sup>[6]</sup>和表面张力法<sup>[7]</sup>的相关性及实用性, 以

期为蛋白质疏水性测定方法的选择提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

原料豆(台湾 292) 开原市宏大种子有限公司; 顺十八碳四烯酸(CPA)、1- 苯胺基 -8- 萘磺酸(ANS) 美国 Sigma 公司; Alcalase 蛋白酶(2.4AU/g) Novozymes 公司; 乳清蛋白、酪蛋白、明胶 南通光合生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

机械搅拌器和磁力搅拌器 广州仪科试验仪器有限公司; JYW-200D 自动界面张力仪 承德市世鹏检测设

收稿日期: 2010-11-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(20976071; 30972290)

作者简介: 曾茂茂(1982—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食品蛋白质功能。E-mail: mmzeng@yahoo.com.cn

\* 通信作者: 陈洁(1969—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品蛋白质功能。E-mail: chenjie@jiangnan.edu.cn

备有限公司; 650-60 型荧光分光光度计 日本日立公司; DELTA 320 型酸度计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; JZ7114 型粉碎机 上海朝阳微电机厂; Avanti J-26 XP 高速离心机 美国 Beckman 公司; HH-4 数显恒温水浴锅 江苏金坛市荣华仪器制造有限公司; Shimadzu LC-20A 高效液相色谱系统 日本岛津公司; PT-20C 管板式组合式超高温杀菌机 日本 Powerpoint International 公司; Christ 冷冻干燥机 德国 Martin Christ 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 SPI 的制备

SPI 的提取参考 Feng 等<sup>[8]</sup>的方法。大豆去皮碾碎成粉末(60 目), 以正己烷乙醇溶液(9:1, V/V)脱脂, 料液比为 1:3(m/V), 室温搅拌 30min, 浸提 2 次。脱脂豆粉与水按 1:10(m/V)在室温下搅拌 1h, 8 层纱布过滤, 滤液用 2mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH8, 室温下搅拌 2h, 15900 × g 离心 25min。取上清液用 2mol/L 盐酸溶液调节 pH 4.5, 3300 × g 离心 15min, 得到的沉淀复溶后调节 pH 值到中性, 微量凯式定氮测定其浓度, 冷冻干燥后保藏, 蛋白质的纯度为 92.6%。

#### 1.3.2 SPI 的水解

5g/100mL SPI 在酶反应器中于 40℃ 充分溶解 1h 后, 用碱性蛋白酶(Alcalase)对 SPI 进行有限水解, 水解的 pH 值为 7, 温度为 50℃, 酶与底物的比分别为 0.2%、0.6% 和 1%。水解结束后, 立即沸水浴灭酶 10min, 冷却后以 10000 × g 离心 15min, 取上清液。采用 Lowry 法<sup>[9]</sup>测定水解上清液的浓度。

#### 1.3.3 水解度(DH)的确定

采用 pH-stat 法<sup>[10]</sup>计算蛋白质的水解度(DH), 公式如下:

$$DH = \frac{B \times N_b \times 100}{\alpha \times M_p \times h_{tot}}$$

式中:  $B$  为水解过程中消耗 NaOH 溶液的体积/mL;  $N_b$  为 NaOH 溶液的浓度/(mol/L);  $\alpha$  为  $\alpha$ -氨基的解离度;  $M_p$  为底物蛋白质含量/g;  $h_{tot}$  为蛋白质中总的可被水解的肽键数, SPI 为 7.8meqv/g。

实验中每次水解的 SPI 溶液的体积为 100mL, 所用 NaOH 溶液的浓度为 0.1mol/L, 则欲取得所需水解度的溶液, 应保持温度和 pH 值恒定, 水解度为 3、8、13、18 和 23 时滴加的 NaOH 溶液的体积分别为 4.45、11.88、19.30、26.73mL 和 34.15mL。

#### 1.3.4 蛋白质溶液浓度的测定

采用 GB 5009.5—2010《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》测定蛋白质溶液中蛋白质的质量浓度( $N \times 6.25$ )。

#### 1.3.5 ANS 荧光探针法测定蛋白质疏水性

采用 ANS 荧光探针法<sup>[11]</sup>测定蛋白质的疏水性。将蛋白质样品溶解于 0.01mol/L、pH7.0 的磷酸缓冲液中, 质量浓度范围为 0.05~10.8mg/mL。取样品液 2mL, 加入 20  $\mu$ L 8mmol/L ANS, 振荡, 静置 3min。设定激发波长  $\lambda_{ex}$ =390nm(狭缝校正 5nm), 发射波长  $\lambda_{em}$ =470nm(狭缝校正 5nm), 测定荧光强度。以荧光强度对蛋白质质量浓度作曲线, 曲线初始阶段的斜率即为蛋白质的表面疏水性指数( $S_o$ )。

#### 1.3.6 CPA 荧光探针法测定蛋白质疏水性

采用 CPA 荧光探针法<sup>[12]</sup>测定蛋白质的疏水性。将蛋白质样品溶解于 0.01mol/L、pH7.0 的磷酸缓冲液中, 质量浓度范围为 0.05~10.8mg/mL。取样品液 2mL, 加入 20  $\mu$ L 10mmol/L CPA, 振荡, 静置 3min。设定激发波长  $\lambda_{ex}$ =325nm(狭缝校正 2nm), 发射波长  $\lambda_{em}$ =420nm(狭缝校正 5nm), 测定荧光强度。以荧光强度对蛋白质浓度作曲线, 曲线初始阶段的斜率即为蛋白质分子的表面疏水性指数( $S_o$ )。

#### 1.3.7 HPLC 法测定蛋白质疏水性

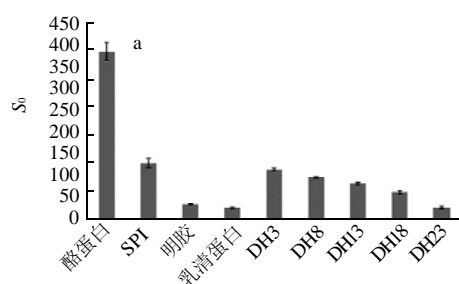
采用反相高效液相色谱法测定蛋白质的疏水性, 根据出峰时间判定蛋白质的疏水程度<sup>[6]</sup>。配制质量浓度为 0.5g/100mL 的蛋白质溶液, 采用 Shimadzu LC-20A HPLC 仪, Symmetry-C<sub>18</sub>(250mm × 4.6mm, 5  $\mu$ m)色谱柱, SPD-M20A 二极管阵列检测器, 流动相流速为 1.0mL/min, 柱温为 30℃, 检测波长为 280nm, 进样量为 10  $\mu$ L。以水为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 洗脱梯度为: 0min, 5% B; 0~30min, 5%~90% B; 30~33min, 90%~5% B; 33~40min, 5% B。

#### 1.3.8 表面张力法测定蛋白质疏水性

采用表面张力法测定蛋白质的疏水性<sup>[7]</sup>。配制质量浓度为 1g/100mL 的蛋白质溶液, 35℃ 恒温水浴后放入自动界面张力仪中测定蛋白质溶液的气液界面的表面张力, 以此作为蛋白质的疏水性指数。断裂比值: 50%, 停止时间: 2min, 上相密度: 0, 下相密度: 0.994g/mL。

## 2 结果与分析

### 2.1 荧光探针法测定蛋白质疏水性



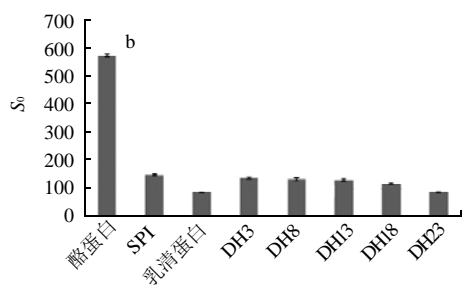


图1 ANS (a)和CPA (b)荧光探针法测得的不同蛋白质及其SPI水解物的疏水性

Fig.1 Hydrophobicity of different proteins and their hydrolysates determined by ANS (a) and CPA (b) fluorescence probe methods

图1a、1b分别为采用ANS和CPA荧光探针法测得的酪蛋白、SPI、明胶、乳清蛋白以及SPI水解物的疏水性测定结果,采用不同质量浓度下荧光强度与蛋白质质量浓度比值曲线的初始斜率来表征所测定蛋白质的疏水性。从图1a可知,ANS荧光探针法测定的结果与溶解性等宏观指数相符,极难溶于水的酪蛋白的疏水性最强,较难溶于水的SPI也具有较强的疏水性,而易溶于水的明胶和乳清蛋白的疏水性则很低。同时,SPI水解物的疏水性随水解度的上升逐渐下降。当SPI的水解度由18升高到23时,其疏水性显著性降低,在水解度为23时,疏水性与明胶和乳清蛋白相似,已经是完全亲水的物质,该结果与文献[11]中所测定的SPI的疏水性结果一致。

图1b的结果表明,CPA荧光探针法与ANS荧光探针法的结果并没有很好的相关性。CPA荧光探针法对亲水物质疏水性的测定并不敏感,在实验中明胶的疏水性无法通过CPA荧光探针法测定。另外,几种水解度不同的SPI水解物的疏水性数据梯度也很小,但CPA荧光探针法所测得数据的标准偏差较ANS荧光探针法小。CPA荧光探针法所得结果与CPA荧光探针的性质是比较吻合的,CPA是一种脂肪酸,在水溶液环境中的荧光可以忽略,但在亲脂性环境中,比如在蛋白质的亲脂性结合位点中,CPA的荧光会大大增强。

## 2.2 HPLC法测定蛋白质疏水性

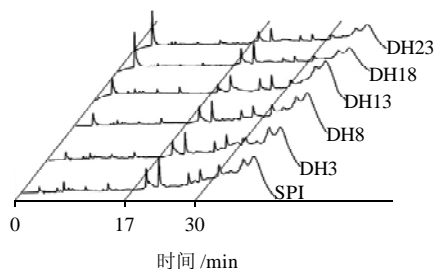


图2 SPI及其不同水解度SPI水解物的反相高效液相色谱图

Fig.2 Chromatograms of SPI and its hydrolysates with different hydrolysis degrees

由图2可知,在17min前,由下至上峰面积依次增大,而在17min之后的峰面积则依次减小,因此可将17min作为疏水性大小的分界线。根据出峰时间、峰面积与极性和疏水性的关系,将17min后的峰面积与总峰面积的比值作为疏水性强弱的判断依据(表1),比值越大,则疏水性越强,且比值符合各产物疏水性强弱规律。明胶与乳清蛋白为亲水性蛋白,而反相高效液相色谱适合于分析非极性和弱极性物质,具有较强极性的物质在反相柱上的保留很弱,因此,反相高效液相色谱法不适合于测定明胶和乳清蛋白的疏水性。酪蛋白由于溶解性太差,无法达到反相高效液相色谱所需的最小质量浓度,尽管可以加入NaOH溶液帮助其溶解,但因为生成了酪蛋白酸钠,改变了其疏水性,因此也不适合于采用反相高效液相色谱法测定其疏水性。

表1 反相高效液相色谱分析法中疏水性物质峰面积及其峰面积比值

Table 1 HPLC peak areas and peak area percentages of hydrophobic compounds in SPI and its hydrolysates with different hydrolysis degrees

产物		峰面积			峰面积比值
		0~17min	17~30min	总面积	
SPI 水解物	SPI	51184	199381	250565	0.795726
	DH3	102561	382823	485384	0.788701
	DH8	83548	163749	247297	0.662155
	DH13	86702	160625	247327	0.649444
	DH18	234657	271142	505799	0.536067
	DH23	234974	161361	396335	0.407133

## 2.3 表面张力法测定蛋白质疏水性

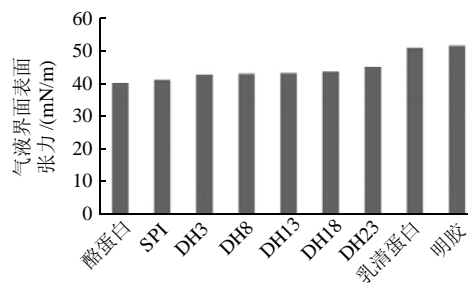


图3 不同蛋白质溶液的气液界面表面张力

Fig.3 Surface tension at the gas-liquid interface of different protein solutions

图3为采用气液界面表面张力仪测定质量浓度为1g/100mL的各溶液的气液界面表面张力,除乳清蛋白和明胶的表面张力较大外,其他几种溶液的表面张力差异较小。ANS和CPA探针法测得的酪蛋白的疏水性最大,而其表面张力则最小;乳清蛋白和明胶的疏水性最小,而其表面张力则最大;大豆蛋白的水解物随着水解度的增加其疏水性逐渐减小,而其表面张力则呈增大趋势。

由此可知,表面张力的测定结果与荧光探针法测得的疏水性结果具有一定的相关性,疏水性高的溶液其表面张力则较低,但并不呈线性关系。

#### 2.4 4种蛋白质疏水性测定方法的比较

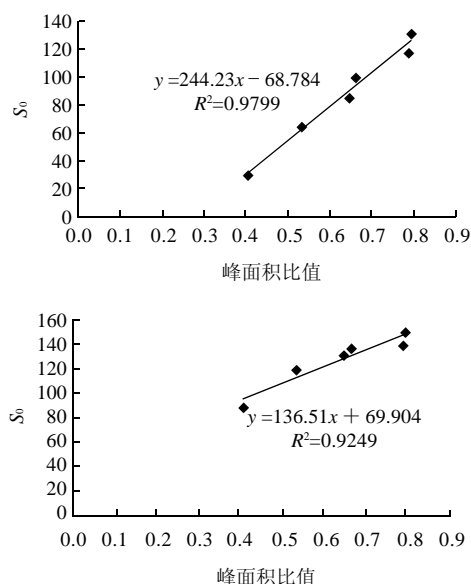


图4 SPI及其水解物采用反相高效液相色谱法与ANS(a)和CPA(b)荧光探针法测得疏水性结果的相关性

Fig.4 Correlation analysis of hydrophobicity of SPI and its hydrolysates determined by reverse-phase HPLC, ANS and CPA fluorescence probe methods

由图4对SPI及其水解产物采用反相高效液相色谱法与ANS和CPA荧光探针法测得数值的相关性分析可知,反相高效液相色谱法与ANS和CPA荧光探针法均具有很好的相关性,相关系数分别达到0.9799和0.9249,说明反相高效液相色谱法可以用来测定蛋白质的疏水性。另外,通过色谱分析,可以直观地判断各种分离组分,还可以对不同的蛋白质进行定性定量分析。

对于表面张力法而言,尽管所测得的数据与疏水性有一定的相关性,疏水性高则表面张力低,但并不成线性关系。由于所测定的是溶液在气液界面的表面张力,被测物质亲水性越强,其表面张力越大,疏水性是决定表面张力大小的一个重要因素,但表面张力并不仅仅由疏水性决定,因此实验测得的数据表现出疏水性高则表面张力低的趋势,但并不呈线性关系。

### 3 结论

本实验的研究结果表明,ANS荧光探针法可作为多种蛋白质及其水解物疏水性测定的标准方法,而CPA荧光探针法无法测定明胶等亲水性较强的蛋白质的疏水性,且测得蛋白质水解物的疏水性的梯度不明显,但对于疏水性较强的蛋白质,CPA荧光探针法测得的数据稳定性较好。反相高效液相色谱法对于蛋白质的疏水性有着良好的说明性,特别是对于SPI及其水解物,但对于极性较大的蛋白质如明胶等则很难表征。表面张力法若采用气液界面参数进行表征,其线性存在着一定的缺陷。本实验的结果为合理选择蛋白质疏水性的测定方法提供了一定的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] CARDAMONE M, PURI N K. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins[J]. *Biochemical Journal*, 1992, 282 (2): 589-593.
- [2] NAKAI S. Structure-function relationships of food proteins: with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1983, 31(4): 676-683.
- [3] HASKARD C A, LI-CHAN E C Y. Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS-) fluorescent probes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(7): 2671-2677.
- [4] WEBB M R, NAEEM H A, SCHMIDT K A. Food protein functionality in a liquid system: a comparison of deamidated wheat protein with dairy and soy proteins[J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67(8): 2896-2902.
- [5] ALIZADEH-PASDAR N, LI-CHAN E C Y. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(2): 328-334.
- [6] DORSEY J G, KHALEDI M G. Hydrophobicity estimations by reversed-phase liquid-chromatography-implications for biological partitioning processes[J]. *Journal of Chromatography A*, 1993, 656(1/2): 485-499.
- [7] BULL H B, BREESE K. Surface-tension of amino-acid solutions-hydrophobicity scale of amino-acid residues[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1974, 161(2): 665-670.
- [8] FENG J, XIONG Y L. Interaction and functionality of mixed myofibrillar and enzyme-hydrolyzed soy proteins[J]. *Journal of Food Science*, 2003, 68(3): 803-809.
- [9] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265-275.
- [10] ADLER-NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1979, 27(6): 1256-1262.
- [11] 黄曼, 卞科. 理化因子对大豆蛋白疏水性的影响[J]. *郑州工程学院学报*, 2002, 23(3): 5-9.