

莲子蛋白组分二级结构的研究

蔡联辉, 曾虹燕*, 蔡西玲, 王亚举

湘潭大学化工学院, 湖南 湘潭 411105

摘要 对莲子蛋白质进行了 Osborne 蛋白质分类。采用傅里叶变换红外光谱(FTIR)对清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白进行二级结构分析。应用去卷积和曲线拟合方法对四种蛋白组分的酰胺 I 和 III 带进行分析, 清蛋白和球蛋白之间以及醇溶蛋白和谷蛋白之间各相应子峰峰位和二级结构峰面积百分比差异较小, 但前两者各相应子峰峰位与后两者略有差异; 而前两者各相应二级结构峰面积百分比与后两者有较大差异, 特别是前两者的各相应有序结构(α -螺旋+ β -折叠)峰面积的百分比明显大于后两者。用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液提取的球蛋白和清蛋白有序结构含量均在 55% 左右, 而醇或碱提的醇溶蛋白和谷蛋白的有序结构含量仅为 40% 左右, 盐提的蛋白质二级结构有序性和稳定性更高。

关键词 莲子; 蛋白; FTIR; 二级结构; 曲线拟合

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)09-2394-05

引言

莲子营养丰富, 富含蛋白质^[1]。蛋白质具有的特定生理活性在很大程度上由其构象决定, 莲子蛋白的功能与其结构有很大的关联。红外光谱法因具宏观整体鉴定复杂体系的优点及无损快速的特点, 成为研究蛋白质二级结构的有效方法。前期工作我们已经研究了莲子蛋白组分的氨基酸成分及其营养价值^[1], 目前国内莲子蛋白的研究多停留在提取工艺和组成方面^[2,3], 而对莲子蛋白质结构研究鲜有涉及。本文对莲子蛋白质进行了 Osborne 蛋白质分类, 应用 FTIR 结合去卷积、二阶导数和曲线拟合技术对酰胺 I 和 III 带进行处理, 对蛋白组分二级结构的变化进行研究, 以期对莲子蛋白质品质变化的机理研究提供有参考价值的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与化学试剂

空心白莲(湖南宏兴隆湘莲食品有限公司), 37 °C 干燥, 制成莲子粉(100 目)。所有化学试剂均为分析纯。

1.2 蛋白质的分级制备及纯化

蛋白质的分级制备及纯化见文献^[1]。

1.3 红外光谱测定

精确称取待测蛋白组分样品(5.0 mg)和溴化钾(100.0 mg)压片, 采用 PE 公司的 Spectrum GX 傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)测定。DTGS 检测器, 光谱测量范围为 $4\,000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$, 光谱分辨率为 4 cm^{-1} , 信号扫描累加 64 次。经 Origin 8.0 去卷积和二阶导数转换, Peakfit 软件曲线进行拟合。

1.4 红外光谱数据处理

分别对各蛋白组分的 $4\,000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 区间的 FTIR 进行分析, 在此基础上进一步分析其在 $3\,100 \sim 2\,800 \text{ cm}^{-1}$ (脂肪酸带)、 $1\,800 \sim 1\,500 \text{ cm}^{-1}$ (酰胺 I 和 II 带)、 $1\,500 \sim 1\,200 \text{ cm}^{-1}$ (指纹带, 包括酰胺 III 带)和 $1\,200 \sim 900 \text{ cm}^{-1}$ (多糖带)谱带差异, 以皮尔森相关系数计算 D 值, 以 D 为指标比较各蛋白组分间的差异。其中 D 表示两个光谱的相关性^[4]

$$r_{y_1 y_2} = \frac{\sum_{i=1}^n y_{1i} y_{2i} - n \bar{y}_1 \bar{y}_2}{\sqrt{\sum_{i=1}^n y_{1i}^2 - n \bar{y}_1^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n y_{2i}^2 - n \bar{y}_2^2}}$$
$$D = (1 - r_{y_1 y_2}) \times 1\,000$$

其中 y_1 和 y_2 为给定波长的吸光度, n 为给定波长范围内比较数据点个数, \bar{y}_1 和 \bar{y}_2 分别为 y_1 和 y_2 平均值。当 D 值为 0, 1 000 和 2 000 时分别表示两光谱完全相关, 完全不相关, 完全负相关。当 D 值在 0~1000 范围时, 两光谱存在部分相关, 其值越大, 差异越大, 相关性越小。

收稿日期: 2010-12-16, 修订日期: 2011-03-30

基金项目: 湖南省高校科技创新团队支持计划和教育部大学生创新实验计划(101053021)资助

作者简介: 蔡联辉, 1986 年生, 湘潭大学化工学院硕士研究生 e-mail: cailianhui1234@163.com

* 通讯联系人 e-mail: hyzeng@xtu.edu.cn

2 结果与讨论

2.1 莲子蛋白组分光谱 D 值分析

从表 1 可知, 四种蛋白组分无论在总谱带 4 000~400 cm^{-1} 区间, 还是在分区谱带 3 100~2 800, 1 800~1 500, 1 500~1 200 和 1 200~900 cm^{-1} 区间, 四种蛋白组分均为部分相关。在 4 000~400 cm^{-1} 区间, 清蛋白和谷蛋白的 D 值为 19.53, 醇溶蛋白和谷蛋白的 D 值为 28.40, 而清蛋白和醇溶蛋白、清蛋白和谷蛋白及球蛋白和谷蛋白之间的 D 值分别提高到 223.92, 363.92 和 137.97, 这说明了清蛋白和球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白之间的光谱差异较小, 但清蛋白和球蛋白与醇溶蛋白和谷蛋白相比差异大。在 3 100~2 800 和 1 200~900 cm^{-1} 范围内, 球蛋白和清蛋白之间、醇溶蛋白和谷蛋白之间的光谱同样差异不大, 相关性好。1 800~1 500 cm^{-1} (酰胺带 I 和 II) 区间显示蛋白质结构, 清蛋白和球蛋白

的 D 值为 24.3, 醇溶蛋白和谷蛋白的 D 值为 45.01, 说明清蛋白和球蛋白结构相似, 醇溶蛋白和谷蛋白结构相似; 而清蛋白与醇溶蛋白和谷蛋白的 D 值分别为 175.63 和 360.62, 球蛋白与醇溶蛋白和谷蛋白的 D 值分别为 83.38 和 235.94, 说明清蛋白(或球蛋白)对醇溶蛋白(或谷蛋白)的相关性较小, 暗示其蛋白结构存在差异。在 1 500~1 200 cm^{-1} 属于酰胺 III 区间, 清蛋白和球蛋白的 D 值为 23.46, 醇溶蛋白和谷蛋白的 D 值为 20.23, 这与 1 800~1 500 cm^{-1} 区间各蛋白组分 D 值相似, 清蛋白与醇溶蛋白和谷蛋白的 D 值分别为 121.74 和 112.6。综上所述, 四种蛋白组分的 FTIR 光谱各相对应峰强有一定差异, 特别是清蛋白(或球蛋白)对醇溶蛋白(或谷蛋白)的差异较大。其中在酰胺 I, II 和 III 带区间差异最大。可能由于不同溶剂提取的蛋白组分中蛋白质不同, 从而导致其结构上的差异, 尤其是他们的二级结构发生了改变, 从而导致了他们的酰胺带光谱的各相对应峰强差异。

Table 1 Spectral distance among averaged FTIR spectra of different protein fractions

Spectral window/ cm^{-1}	Protein fractions	Value of index D-FTIR spectra			
		Albumin	Globulin	Prolamin	Glutelin
4 000~400	Albumin	0			
	Globulin	19.53	0		
	Prolamin	223.92	52.09	0	
	Glutelin	363.92	137.97	28.40	0
3 100~2 800	Albumin	0			
	Globulin	7.09	0		
	Prolamin	26.61	50.64	0	
	Glutelin	12.12	30.68	6.69	0
1 800~1 500	Albumin	0			
	Globulin	24.3	0		
	Prolamin	175.63	83.38	0	
	Glutelin	360.62	235.94	45.01	0
1 500~1 200	Albumin	0			
	Globulin	23.46	0		
	Prolamin	121.74	52.24	0	
	Glutelin	112.6	42.22	20.23	0
1 200~900	Albumin	0			
	Globulin	2.79	0		
	Prolamin	33.31	37.83	0	
	Glutelin	24.27	27.45	2.76	0

2.2 酰胺 I 带去卷积和二阶导数 FTIR 谱图分析

酰胺 I 带(1 700~1 600 cm^{-1})对蛋白质二级结构(α -螺旋、 β -折叠、无规卷曲、转角结构)的变化最为敏感, 故用酰胺 I 带分析各莲子蛋白组分的二级结构的差异。1 615~1 640 和 1 689~1 698 cm^{-1} 谱带归属于蛋白质 β -sheet 区间^[5-7], 清蛋白在 1 627, 1 638, 1 691 和 1 696 cm^{-1} 存在强吸收峰, 球蛋白在 1 620, 1 636, 1 692 和 1 696 cm^{-1} 也为强且宽的吸收峰, 而醇溶蛋白和谷蛋白在 1 628, 1 691 和 1 696 cm^{-1} 的吸收峰明显弱于清蛋白和球蛋白的(表 2), 表明清蛋白和球蛋白含有较多的 β -sheet 结构。1 641~1 649 cm^{-1} 为

蛋白质的无规卷曲区间, 四种莲子蛋白组分均在约 1 643 cm^{-1} 处有吸收峰, 除了球蛋白, 其他组分在 1 649 cm^{-1} 处还有吸收峰; 球蛋白和谷蛋白在约 1 645 cm^{-1} 处有吸收峰, 而清蛋白和醇溶蛋白在此处无吸收峰。在 1 650~1 659 cm^{-1} 处是蛋白质 α -螺旋区间^[6], 四种莲子蛋白组分均在 1 656 和 1 659 cm^{-1} 处有吸收峰, 仅球蛋白在 1 650 cm^{-1} 处又出现一新吸收峰。清蛋白在 1 656 和 1 659 cm^{-1} 有强且宽的吸收峰, 球蛋白在 1 650, 1 656 和 1 659 cm^{-1} 也存在强吸收峰, 而醇溶蛋白和谷蛋白在此处吸收峰强较弱, 表明清蛋白和球蛋白相对于醇溶蛋白和谷蛋白含有较多的 α -螺旋结构。1 660~

Table 2 Curve fitting analyses expressed as component bands, percentage areas and assignments of main protein secondary structures for the protein fractions

Assignment	Albumin		Globulin		Prolamin		Glutelin	
	Peak centers	Areas						
	/cm ⁻¹	/%						
β-Sheet	1 616	5.83	1 616	4.98	1 617	6.52	1 617	5.48
	—	—	1 620	4.54	1 624	5.25	1 624	3.80
	1 628	11.95	1 629	4.87	1 630	4.10	1 630	3.63
	1 638	5.70	1 636	8.30	1 636	5.91	1 636	4.95
	1 691	5.60	1 692	4.32	1 690	3.14	1 692	2.46
	1 696	4.80	1 696	7.86	1 697	1.75	1 697	3.02
Random coil	1 643	1.49	1 643	7.53	1 642	5.73	1 642	6.14
	—	—	1 646	5.65	—	—	1 645	5.36
	1 649	7.28	—	—	1 648	9.17	1 649	5.35
α-Helix	—	—	1 650	10.52	—	—	—	—
	1 655	14.18	1 656	6.53	1 654	8.93	1 653	15.76
	1 659	6.21	1 659	7.21	1 659	8.09	1 657	0.78
	1 665	12.1	1 663	6.42	1 664	9.35	1 664	9.05
	1 671	6.50	1 672	8.31	1 670	10.26	1 671	6.06
	—	—	—	—	1 674	1.27	—	—
β-turn	—	—	—	—	1 676	9.05	1 676	5.81
	1 679	3.58	1 678	5.32	1 680	3.74	1 680	7.60
	1 686	14.78	1 686	7.64	1 686	7.74	1 686	14.75

1 688 cm⁻¹ 归属于 β-turn 结构的吸收峰, 四种莲子蛋白组分均在约 1 664, 1 670, 1 680 和 1 686 cm⁻¹ 处有吸收峰, 醇溶蛋白在 1 674 和 1 676 cm⁻¹ 处出现新的吸收峰, 谷蛋白在 1 676 cm⁻¹ 处也有一新吸收峰。

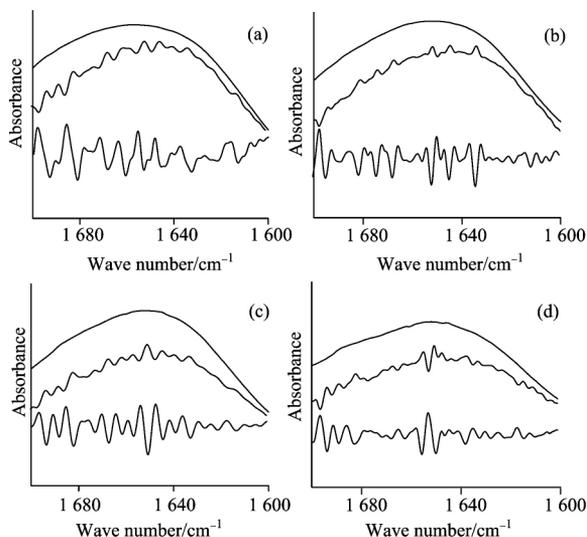


Fig 1 Original (upper), deconvoluted (middle) and second derivative (bottom) infrared spectrum of the protein fractions

(a): Albumin; (b): Globulin; (c): Prolamin; (d): Glutelin

2.3 酰胺 I 带拟合结果分析

莲子蛋白组分二级结构的相对含量决定了莲子蛋白组分酰胺 I 带的吸收峰形状。对酰胺 I 带处二阶导数和去卷积所得 13~16 个子峰进行高斯拟合(图 2)。各子峰面积在总面积

中的百分含量对应其所归属的相应的二级结构的含量^[5-8], 蛋白组分各子峰的面积百分比及归属见表 2。从表 3 中各蛋白组分在酰胺 I 带归属的主要二级结构(α-螺旋、β-折叠、转角及无规卷曲)的面积百分含量可知, 清蛋白二级结构含量依次为: β-转角 36.96%, β-折叠 33.88%, α-螺旋 20.39% 和无规卷曲结构 8.77%; 球蛋白 β-折叠 34.87% 含量最高, 其次是 β-转角 27.69%, α-螺旋 24.25%, 无规卷曲结构 13.18% 含量最少; 醇溶蛋白 β-转角含量 41.39% 为最高, 其他依次为 β-折叠 26.67%, α-螺旋 17.02%, 最少为无规卷曲结构 14.9%; 谷蛋白 β-转角含量 43.27% 居于首位, 次之 β-折叠 23.34%, 无规卷曲 16.85% 和 α-螺旋 16.54%。

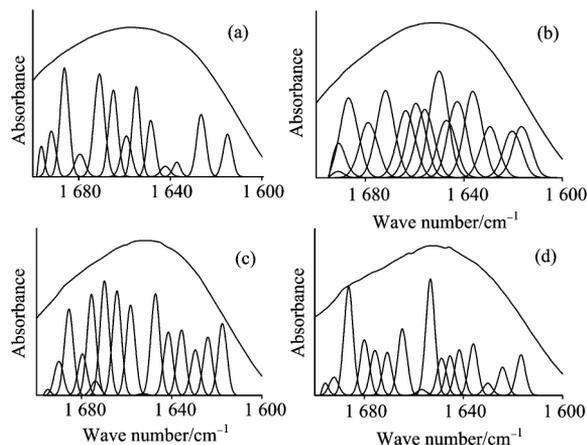


Fig 2 Original FTIR spectra (upper) and the curve-fitted individual component bands (bottom) of protein fractions in amide I region

(a): Albumin; (b): Globulin; (c): Prolamin; (d): Glutelin

在蛋白质的二级结构中, α -螺旋和 β -折叠结构具高度稳定性, 为蛋白质的有序结构; 而 β -转角和无规卷曲为蛋白质的无序结构, 为此可将 α -螺旋和 β -折叠结构含量用于衡量蛋白结构的稳定性^[9,10]。在酰胺 I 带清蛋白和球蛋白之间以及醇溶蛋白和谷蛋白之间各相应子峰峰位基本无差异, 但前两者各相应子峰峰位的与后两者的略有差异。而四种蛋白组分各相应二级结构峰面积的百分比却存在不同, 球蛋白中有序结构(α -螺旋+ β -折叠)的含量最高为 59.12%, 清蛋白其次为 54.27%, 醇溶蛋白为 43.69%, 谷蛋白最少为 39.88%。清蛋白和球蛋白之间以及醇溶蛋白和谷蛋白之间各相应二级结构峰面积百分比差异较小, 但前两者与后两者的峰面积百分比存在明显不同, 特别是前两者的各相应有序二级结构(α -螺旋+ β -折叠)峰面积百分比明显大于后两者。差异最大的几个峰主要来自 α -螺旋结构(1 655 和 1 659 cm^{-1})、 β -折叠结构(1 696 cm^{-1})和 β -转角结构(1 676 cm^{-1})的振动吸收(表 2)。上述分析表明, 莲子经过不同溶剂提取后, 蛋白质的结构不同, 其中 0.1 mol · L⁻¹ NaCl 溶液提取所得的球蛋白和清蛋白整个分子构象有序度、二级结构稳定, 而醇提的醇溶蛋白和碱提的谷蛋白的分子构象有序度、结构稳定性均较差。

2.4 酰胺 III 带拟合结果分析

由于酰胺 III 带信号较弱, 各种二级结构谱带的指认技术相对还不太成熟, 不同文献的谱带归属区别较大。本文根据 Fu^[11]和谢孟峡^[12]等研究, 对酰胺 III 带的谱峰作如下归属: 1 330~1 290 cm^{-1} 为 α -螺旋; 1 295~1 265 cm^{-1} 为 β -转角; 1 270~1 245 cm^{-1} 为无规卷曲; 1 250~1 220 cm^{-1} 为 β -折叠。相对于酰胺 I 带, α -螺旋和无规卷曲在酰胺 III 带中间隔较远, 不易混淆。故同时分析酰胺 I 带与酰胺 III 带有利于得到更为准确、可靠的蛋白质二级结构。采用曲线拟合的方法对酰胺 III 带进行拟合(表 3), 四种蛋白组分在酰胺 I 带和酰胺 III 带的主要二级结构相对含量接近, 两组谱带的拟合结果基本吻合, 说明用酰胺 I 带分析各蛋白组分的二级结构是准

确的, 结果可信。

Table 3 Main protein secondary structure amounts for the protein fractions

Protein	Method	Second structure composition/%			
		α -helix	β -sheet	β -turn	Random coil
Albumin	Amide I	20.39	33.88	36.96	8.77
	Amide III	20.58	32.89	38.55	7.98
Globulin	Amide I	24.25	34.87	27.69	13.18
	Amide III	24.80	35.09	28.00	12.11
Prolamine	Amide I	17.02	26.67	41.39	14.90
	Amide III	16.19	27.40	40.13	16.28
Glutelin	Amide I	16.54	23.34	43.27	16.85
	Amide III	15.34	22.51	43.51	18.64

3 结 语

四种莲子蛋白组分的 FTIR 谱图存在差异, 其中在酰胺带上清蛋白和球蛋白组分的各相对应峰强与醇溶蛋白和谷蛋白组分的差异较为明显。通过对蛋白组分酰胺 I 带各子峰进行分析, 清蛋白和球蛋白之间以及醇溶蛋白和谷蛋白之间各相应子峰峰位和二级结构峰面积百分比差异较小, 但前两者各相应子峰峰位与后两者略有差异; 前两者的各相应有序结构(α -螺旋+ β -折叠)峰面积的百分比明显大于后两者。说明清蛋白和球蛋白的结构稳定性大于醇溶蛋白和谷蛋白, 即 0.1 mol · L⁻¹ NaCl 溶液提取所得的球蛋白和清蛋白有序结构(α -螺旋+ β -折叠)的含量比较高, 无序结构(β -转角+无规卷曲)的含量少, 二级结构稳定性高, 而用醇或碱提的醇溶蛋白和谷蛋白的分子构象有序度低, 二级结构稳定性差。四种蛋白组分在酰胺 I 带和酰胺 III 带的主要二级结构相对含量接近, 两组谱带的拟合结果基本吻合, 说明用酰胺 I 带分析各蛋白组分的二级结构是准确的, 结果可信。

References

- [1] CAI Lian-hui, ZENG Hong-yan, WANG Ya-ju, et al(蔡联辉, 曾虹燕, 王亚举, 等). Acta Nutrimenta Sinica(营养学报), 2010, 32(5): 503.
- [2] TANG Pei-hua, JIANG Zai-jie, MEI Chu-hong, et al(唐佩华, 姜在阶, 梅楚红, 等). Journal of Beijing Normal University · Natural Science(北京师范大学学报·自然科学版), 1998, 34: 532.
- [3] ZHANG Yu, ZHENG Tie-song, CHEN Jing(张羽, 郑铁松, 陈静). Food Science(食品科学), 2007, 28: 144.
- [4] Naumann D, Labischinski H, Giesbrecht P. Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis. New York, USA: VCH Publishers, 1991. 43.
- [5] Kong J L, Yu S N. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007, 39(8): 549.
- [6] Zhao X Y, Chen F S, Xue W T, et al. Food Hydrocolloids, 2008, 22(4): 568.
- [7] Palaniappan PL RM, Vijayasundaram V. Romanian Journal of Biophysic, 2008, 18(2): 135.
- [8] FAN Lu, WANG Mei-mei, YANG Hong-wei, et al(范璐, 王美美, 杨红卫, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2007, 35(3): 390.
- [9] Choi S M, Ma C Y. Food Chemistry, 2007, 102: 150.
- [10] Lin S Y, Li M J, Wei Y S. Spectrochimica Acta Part A, 2004, 60: 3107.
- [11] Fu K, Griebenow K, Hsieh L, et al. Journal of Controlled Release, 1999, 58: 357.
- [12] XIE Meng-xia, LIU Yuan(谢孟峡, 刘媛). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2003, 24(2): 226.

Second Structure of the Protein Fractions from Lotus Seeds

CAI Lian-hui, ZENG Hong-yan* , CAI Xi-ling, WANG Ya-ju
School of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, China

Abstract Following the sequential Osborne extraction procedure, the proteins of lotus seeds were classified. The secondary structures of albumin, globulin, prolamine and glutelin fractions were determined by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The FTIR images of amide I and III bands from the four protein fractions were analyzed using Fourier deconvolution and curve-fitting technique. The results showed that there were minor differences in every corresponding peak position and peak area percent of secondary structure between albumin and globulin as well as between prolamin and glutelin. But there were differences in every corresponding peak position between albumin (or globulin) and prolamin (or glutelin). Especially the area percents of the corresponding nonrandom structures (α -helix and β -sheet) of albumin and globulin were significantly larger than those of prolamin and glutelin. The contents of nonrandom structures of albumin and globulin extracted with $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl solution were about 55% and those of prolamine and glutelin fractions were only at round 40%, indicating that the secondary structures of the salt-extraction protein were ordered and stable.

Keywords Lotus seed; Protein; FTIR; Secondary structure; Curve fitting

(Received Dec. 16, 2010; accepted Mar. 30, 2011)

* Corresponding author