

S-构型转化对卵白蛋白微观结构的影响

黄 群^{1, 2}, 马美湖^{1*}, 蔡朝霞¹, 罗 章^{1, 3}, 黄 茜¹, 孙术国^{1, 2}

1. 国家蛋品加工技术研发分中心, 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070

2. 吉首大学食品科学研究所, 湖南 吉首 416000

3. 西藏农牧学院食品科学学院, 西藏 林芝 860000

摘 要 采用圆二色谱(CD)、X射线衍射(XRD)、ANS荧光探针和紫外光谱(UV)研究了S-构型转化对卵白蛋白微观结构的影响。结果显示,不同诱导时间处理的卵白蛋白二级结构的 α -螺旋, β -折叠, β -转角和无规卷曲之间相互转化, α -螺旋略有减少, β -折叠相应增加,分子有序性提高;S-构型转化后卵白蛋白晶体结构增加,72 h处理后结晶区最大,说明蛋白结构的有序性提高,与CD分析结果一致;卵白蛋白的表面疏水性随诱导时间的延长而增强,72 h处理后达到最大值;S-构型转化使卵白蛋白分子表面具有紫外吸收的芳香氨基酸残基包埋于分子内部,导致最大紫外吸光值随诱导时间的延长而下降。研究表明,卵白蛋白的微观结构变化与S-构型转化有关。

关键词 S-构型转化;卵白蛋白;圆二色谱;X射线衍射;ANS荧光探针;紫外光谱

中图分类号:Q632 文献标识码:A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)12-3319-04

引 言

卵白蛋白,又称卵清蛋白,占蛋清蛋白54%~63%,为单体、球状磷酸糖蛋白,相对分子质量43.0 kDa,等电点4.5,由385个氨基酸残基组成,其中50%以上为疏水氨基酸^[1, 2]。经0.195 nm分辨率的晶体结构测定,卵白蛋白为7 nm×4 nm×5 nm的椭圆形状,几乎所有的多肽链由已知的二级结构组成^[3]。自然卵白蛋白(N-卵白蛋白)在禽蛋贮藏或孵化期间转化为热稳定形式,Smith将其命名为S-卵白蛋白^[4-7]。研究表明,S-卵白蛋白为N-卵白蛋白的构象异构体,而非化学改性衍生物^[8, 9]。Smith报道N-卵白蛋白可在碱性条件下热处理而人工诱导制备S-卵白蛋白,在S-构型转化过程中分子特性与功能性质发生相应变化^[10-12]。许多研究者对S-卵白蛋白进行了研究,主要集中于形成途径与机理、影响因素及疏水性、凝胶特性等部分理化性质,未见S-构型转化对卵白蛋白微观结构影响的相关报道。本工作以N-卵白蛋白为原料,通过紫外光谱、ANS荧光探针、X射线衍射和圆二色谱研究S-构型转化前后卵白蛋白的微观结构变化情况,以期能够为进一步阐释S-卵白蛋白形成机制以及S-构型转化对其理化性质的影响机理提供理论依据,为开发高性能卵

白蛋白新产品提供新的途径。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

当日产鲜鸡蛋(武汉九峰山养鸡场),SCR20BC高速冷冻离心机(日本日立公司),ALPHA 1-4LD真空冷冻干燥机(德国CHRIST公司),JASCOJ-810旋光仪(日本JASCO公司),Bruker D-8多功能X射线衍射仪(德国布鲁克公司),IF-5401荧光分光光度计(日本日立公司),DU700紫外/可见分光光度计(美国贝克曼库尔特有限公司)等。

1.2 卵白蛋白的制备

1.2.1 N-卵白蛋白的制备

采用DEAE Sepharose Cl-6B离子交换法制备^[13]。当日产蛋清(约300 mL)中加入600 mL pH7.5,含有10 mmol·L⁻¹巯基乙醇的50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲液,4℃搅拌24 h。溶液在14 000 g、4℃离心30 min,除去沉淀,向上清液中添加1 800 mL 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 7.5),温和搅拌30 min后,滤纸过滤。向滤液中添加500 g DEAE Sepharose Cl-6B,4℃温和搅拌20 h。溶液用玻璃过滤器(G2)过滤,随后用大量的10 L软化水和5 L 0.1 mol·L⁻¹ NaCl先

收稿日期:2011-03-14,修订日期:2011-06-20

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金项目(nycytx-41-g22)资助

作者简介:黄 群,1977年生,华中农业大学食品科学技术学院博士生 e-mail: huangqunlaoshi@126.com

*通讯联系人 e-mail: mameihuhn@yahoo.com.cn

后洗涤。蛋白质用一系列 1 L 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.35 mol · L⁻¹ NaCl 逐步洗脱。0.15 和 0.20 mol · L⁻¹ NaCl 批组收集后超滤浓缩(分子截留量 10 kDa), 浓缩液透析后于 -20 °C 和 0.1~0.5 mbar 冻干, 于 -20 °C 贮存备用。

1.2.2 S-卵白蛋白的制备

根据 Smith 与 Back 等^[10, 13]报道的方法由 N-卵白蛋白制备。将 2.5 g N-卵白蛋白溶解于 60 mL 去离子水中, 用 0.1 mol · L⁻¹ NaOH 调整 pH 值至 9.9。溶液置于 55 °C 诱导 72 h, 每 24 h 取样一次。诱导后溶液用 0.1 mol · L⁻¹ HCl 中和至 pH 7.0, 于 4 °C 透析。透析后蛋白冷冻干燥, 于 -20 °C 贮存备用。

1.3 光谱的测定

1.3.1 圆二色谱

连续充氮、25 °C 条件下, 190~250 nm 扫描, 速度 100 nm · min⁻¹, 光谱间隔 0.1 nm, 选用 0.1 cm 厚椭圆形比色皿测定远紫外圆二色谱, 8 次累积。

1.3.2 X 射线衍射

测定条件: 特征衍射线 Cu 和 Ni, 管压 40 kV, 电流 50 mA, 预置时间 0.1 s, 5~40 °C 扫描, 测定卵白蛋白的结晶结构。

1.3.3 ANS 荧光探针光谱

用 0.05 mol · L⁻¹ pH 7.4 磷酸缓冲液稀释至蛋白浓度 0.01 mg · mL⁻¹, 取不同诱导时间的稀释样品 4 mL, 加入 20 μL ANS 溶液作为荧光探针并于室温保持 1 h。样品用荧光分光光度计扫描, 扫描条件为激发波长 295 nm, 发射波长 300~450 nm, 狭缝宽度 5 nm, 扫描速度 100 nm · min⁻¹。

1.3.4 紫外光谱

将卵白蛋白溶于 50 mmol · L⁻¹、pH 7.4 磷酸缓冲液中, 配制成 0.01 mg · mL⁻¹ 蛋白质溶液, 样品分别在 240~340 nm 下用紫外-分光光度计扫描(速度 100 nm · min⁻¹)。

2 结果与讨论

2.1 CD 光谱研究卵白蛋白二级结构

蛋白质、多肽的主要光活性基团为肽链骨架中的肽键、芳香氨基酸残基及二硫键, CD 光谱根据这些基团的圆二色性对二级结构进行研究, S-构型转化处理后的卵白蛋白的 CD 测定结果如表 1 所示。结果表明, N-卵白蛋白的二级结构由 α-螺旋(28.7%), β-折叠(34.3%), β-转角(15.7%)和无规卷曲(21.3%)组成, 以 α-螺旋和 β-折叠为主; 经 72 h 诱导处理后, α-螺旋略有减少(27.3%), β-折叠含量相应增加(37.1%), β-转角稍有增加(16.9%), 无规卷曲减少(18.7%)。

S-构型转化不同诱导时间对卵白蛋白氨基酸残基的结合牢固程度有不同程度的影响, 同时影响蛋白分子内部的电荷分布, 从而导致二级结构发生部分变化。α-螺旋与 β-折叠是蛋白质的有序二级结构, 结构有序性与部分功能特性存在协同作用。S-构型转化使卵白蛋白的 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规卷曲之间发生相互转化; 有序二级结构含量略有提高, 分子刚性增强、有序性提高。Egelund 报道的 S-卵白蛋白热

诱导凝胶的强度远低于 N-卵白蛋白可被该结果所支持; 此外, S-卵白蛋白热稳定性提高也与该现象有关^[14]。

Table 1 Changes in the second structure of ovalbumin during S-ovalbumin information process

	0 h	24 h	48 h	72 h
α-螺旋/%	28.7	28.3	27.8	27.3
β-折叠/%	34.3	34.8	36.6	37.1
β-转角/%	15.7	16.0	16.5	16.9
无规卷曲/%	21.3	20.9	19.1	18.7

2.2 X 射线衍射研究卵白蛋白晶体结构

通过 X 射线衍射分析可了解蛋白质经物理或化学方法处理后的颗粒结晶结构变化情况^[15]。X 射线衍射图反映结晶结构差别, 峰高(衍射强度)和半峰宽(衍射角)与内部结晶区的晶粒大小有关, 晶粒越小, 衍射峰的峰高强度越低, 半峰宽越大^[16, 17]。S-构型转化后卵白蛋白的 X 射线衍射图谱如图 1 所示。

由图 1 分析可知, 与未经诱导的样品相比, S-构型转化诱导后卵白蛋白的结晶形式变化不明显, 只有衍射线强度有所增加, 分子链之间排列更为有序。诱导 72 h 后的卵白蛋白的峰衍射强度最高, 结晶区最大, 由此可推测 S-构型转化可提高卵白蛋白的结构有序性, 促进晶体结构的增加。这与 CD 图谱获得的信息一致, 即卵白蛋白经 S-构型诱导处理后, 规则二级结构含量增加、促进了晶体结构的形成(表 2)。

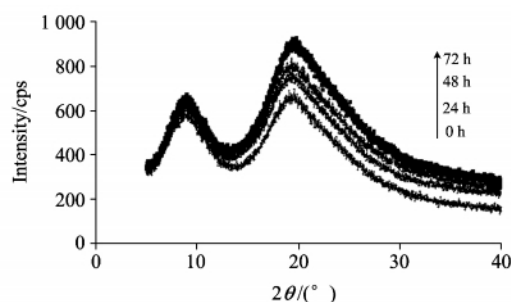


Fig 1 XRD curves of ovalbumin during S-ovalbumin information process

Table 2 XRD parameters of ovalbumin during S-ovalbumin information process

样品	No	2θ	d	Intensity
0 h	1	8.790	9.279 5	47
	2	19.549	3.375 4	51
24 h	1	9.106	8.929 2	44
	2	19.351	4.661 4	58
48 h	1	9.027	8.993 3	47
	2	19.371	4.486 5	62
72 h	1	8.988	9.030 54	50
	2	19.411	4.174 4	68

2.3 荧光光谱研究卵白蛋白表面疏水性

蛋白质中氨基酸残基非极性侧链之间的疏水相互作用是

蛋白质折叠成独特三维结构的主要原因,是维持蛋白质三级结构最重要的作用力,对蛋白质的功能性质也有重要作用^[18, 19]。ANS 荧光探针法是评价蛋白质表面疏水性的经典方法,是水溶液中蛋白质三维结构的一种反映^[20]。S-构型诱导处理后卵白蛋白的表面疏水性变化如图 2 所示。

由图 2 分析可知,与未经 S-构型转化处理的样品相比,随着诱导时间的延长,卵白蛋白的荧光强度提高,但最大吸收波长($\lambda_{\max}$)仍为 277 nm,没有发生蓝移或红移现象。卵白蛋白 50 % 以上为疏水氨基酸残基,在 S-构型转化进程中受碱性环境、热力的不同程度作用,分子内的振动增强、维系空间结构的次级键遭到破坏,导致蛋白的结构松弛、活性中心内部的疏水基团暴露,从而增强卵白蛋白的表面疏水性^[7]。

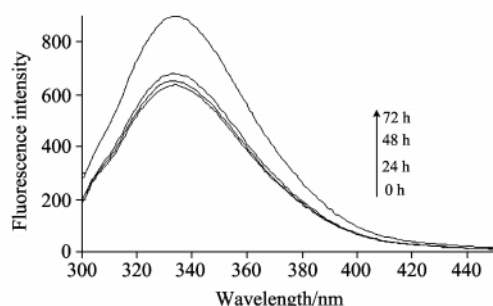


Fig 2 Surface hydrophobicity of ovalbumin during S-ovalbumin information process

2.4 紫外光谱研究卵白蛋白构象

由于色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)残基的侧链基团对光的吸收,其次是苯丙氨酸(Phe)、组氨酸(His)、半胱氨酸(Cys)残基的侧链和肽键对光的吸收,其中 Trp 和 Tyr 在 280 nm 波长附近有一个吸收峰,因此蛋白质能够吸收一定波长范围的紫外光,紫外光谱法是研究溶液中蛋白质构象的有效方

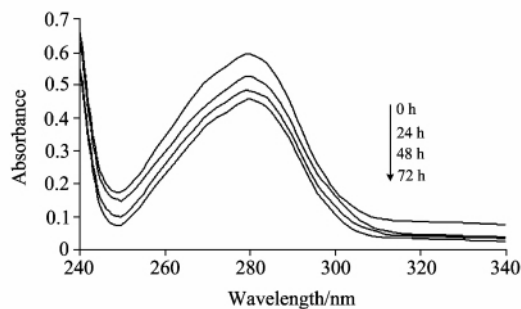


Fig 3 UV spectra of ovalbumin during S-ovalbumin information process

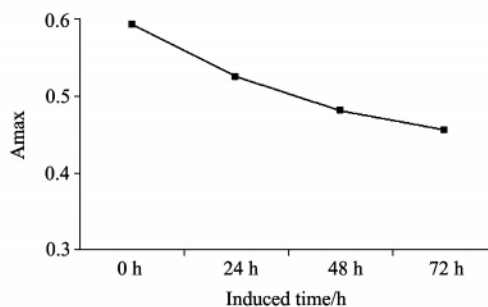


Fig 4 Changes in the highest absorbance of ovalbumin during S-ovalbumin information process

法^[21]。卵白蛋白的紫外吸收光谱分析结果如图 3 和图 4 所示。

由图 3 分析可知,所有样品的最大紫外吸收峰($\lambda_{\max}$)均在 280 nm 处,并没有发生蓝移或红移,说明卵白蛋白 Trp 和 Tyr 残基的侧链基团分布并没有发生变化。但经 S-构型转化后卵白蛋白的最大吸光度发生变化,由图 4 分析可知,经 S-构型转化处理后的卵白蛋白的最大紫外吸光值呈下降趋势,由 0 h 的 0.593 6 下降至 72 h 的 0.456 8,下降幅度达 23.05 %。这主要是因为 S-构型转化进程中,卵白蛋白分子的有序二级结构增多,具有紫外吸收的芳香氨基酸残基由分子表面被包埋至内部,使分子表面具有紫外吸收的氨基酸残基减少,从而导致紫外吸光值降低。

3 结 论

本研究利用圆二色谱、X 射线衍射、ANS 荧光探针和紫外光谱研究了 S-构型转化对卵白蛋白微观结构的影响。S-构型转化影响卵白蛋白分子内部的电荷分布、氨基酸残基的结合牢固程度,致使二级结构中的 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲之间发生相互转化,有序二级结构的含量稍有提高,分子刚性、有序性提高。S-构型转化处理后的卵白蛋白的结晶形式无大变化,但结晶区的衍射线强度有所增加,分子链之间排列更为有序,促进卵白蛋白晶体结构的增加。S-构型转化处理后的卵白蛋白的最大荧光吸收波长没有发生偏移,但荧光强度随诱导时间的延长而提高,S-构型转化可促进卵白蛋白表面疏水性的提高。S-构型转化使卵白蛋白分子表面具有紫外吸收的芳香氨基酸残基被包埋于分子内部,处理后样品的最大紫外吸收峰均在 280 nm 处,但最大紫外吸光值下降。研究结果表明,卵白蛋白的微观结构变化与 S-构型转化有关,这为进一步阐释 S-卵白蛋白形成机制及 S-构型转化对其理化性质影响的机理提供理论依据。

References

- [1] Mine Y. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 2924.
- [2] Donvan J W, Mapes C J. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1976, 27: 197.
- [3] Masayuki Yamasaki, Nobuyuki Takahashi, Masaaki Hirose. Journal of Biological Chemistry, 2003, 37: 35524.
- [4] Hammersh M, Larsen L B, Andersen A B. Lebensm. Technol., 2002, 35: 62.

- [5] Castellano A C, Barteri Binconi A, et al. Zeitschrift für Naturforschung, 1996, 51: 379.
- [6] Huntington J A, Patston P A, Ettins P G W. Protein Science, 1995, 4: 613.
- [7] Lucisano M, Hidalgo Comelli E M. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44: 1235.
- [8] Takahashi T, Atsumi E, Orita T. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1996, 60: 1464.
- [9] Jolan de Groot, Hans A. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 97(4): 475.
- [10] Smith M, Back B. Australian Journal of Biological Science, 1965, (18):365.
- [11] Hammersh M, Larsen L B, Qvist K B. Journal of Texture Studies, 2001, (32): 105.
- [12] Chang Y, Chen T C, Lang. International Journal of Food Properties, 1999, (49): 2001.
- [13] Jolan de Groot, Harmen H J, De Jongh. Protein Engineering, 2003, 16(12): 1035.
- [14] Egelndal B. Journal of Food Science, 1980, 45: 570.
- [15] YANG Xin-ping(杨新萍). Journal of Shanxi Normal University(Natural Science Edition)(山西师范大学学报·自然科学版), 2007, 21(1): 72.
- [16] Stein P E, Leslie A G, Finch J T, et al. J. Mol. Biol., 1991, 221: 941.
- [17] YE Huai-yi, YANG Su-ling, XU Qian(叶怀义, 杨素玲, 徐倩). Journal of the Chinese Cereals and Oils Association(中国粮油学报), 2000, 15(6): 24.
- [18] Stefania Iametti, Elena Donnizzelli, Giuseppe Vecchio, et al. J. Agric. Food Chem., 1998, 46(9): 3521.
- [19] Zhang Hongkang, Li Lite, Tat Sumi Eizo, et al. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2003, 4(3): 269.
- [20] CHEN Zhen-zhen, ZHANG Ning, ZHANG Wen-shen, et al(陈蓁蓁, 张宁, 张文申, 等). Chinese J. of Anal. Chem.(分析化学), 2006, 34(9): 134.
- [21] WU Dan, XU Gui-ying(吴丹, 徐桂英). Acta Phys-Chim. Sin.(物理化学学报), 2006, 22(2): 254.

Effect of S-Configuration Transformation on the Microstructure of Ovalbumin

HUANG Qun^{1, 2}, MA Mei-hu^{1*}, CAI Zhao-xia¹, LUO Zhang^{1, 3}, HUANG Xi¹, SUN Shu-guo^{1, 2}

1. National Research and Development Center for Egg Processing, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China
2. Institute of Food Science, Jishou University, Jishou 416000, China
3. College of Food Science, Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Linzhi 860000, China

Abstract The effect of S-configuration transformation on the microstructure of ovalbumin was studied by CD spectra, XRD spectra, ANS fluorescence probe emission spectra and UV absorption spectra. CD spectra was used to examine the changes in the secondary structure of the ovalbumin during S-ovalbumin information process. When the induction time was prolonged, the mutual transformation between α -helix, β -sheet, β -turn and the random coil was observed, and the orderliness of the secondary structure was increased with α -helix decreasing slightly and β -sheet increasing correspondingly. XRD spectra analysis showed that the crystal structure content of the ovalbumin increased with prolonging the induction time and the largest data was observed at 72 h, indicating that the orderliness of the secondary structure was increased. The results were similar to CD spectra analysis. The ANS fluorescence probe emission spectra analysis demonstrated that S-configuration transformation induced an increase in surface hydrophobicity with prolonging the induction time, and the largest data was also observed at 72 h. In addition, UV absorption spectra analysis indicated that S-configuration transformation resulted in a decrease in the UV-absorption maximum value with prolonging the induction time, indicating that the aromatic amino acid was buried in the molecular interior. The results indicated that the changes in the microstructure of ovalbumin were relevant to S-configuration transformation.

Keywords S-configuration transformation; Ovalbumin; Circular dichroism; XRD spectra; ANS fluorescence probe; Ultraviolet spectra

* Corresponding author

(Received Mar. 14, 2011; accepted Jun. 20, 2011)