

动态超高压微射流对卵清蛋白微观结构的影响

涂宗财, 王 辉, 刘光宪, 陈 钢, 豆玉新, 张雪春

南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047

摘 要 采用圆二色谱(CD)、X射线衍射(XRD)、ANS荧光探针和紫外(UV)光谱研究了动态超高压微射流对卵清蛋白微观结构的影响。结果表明: 卵清蛋白的微观结构的变化与处理压力有关, CD显示不同压力处理的卵清蛋白二级结构中的 α 螺旋, β 折叠, β 转角和无规卷曲之间发生相互转化, 二级结构的有序性提高; X射线衍射图谱直观显示不同压力处理的卵清蛋白晶体结构增加, 160 MPa处理下结晶区最大, 说明蛋白结构的有序性提高, 与CD分析结果相似; ANS荧光探针光谱显示卵清蛋白的表面疏水性随着处理压力的增大而提高, 120 MPa处理下达到最大; 紫外光谱显示随着处理压力的增大, 卵清蛋白最大紫外吸光值下降, 卵清蛋白分子表面的具有紫外吸收的芳香氨基酸残基被包埋于分子内部, 卵清蛋白的三维结构发生改变。

关键词 动态超高压微射流; 卵清蛋白; 圆二色谱; X射线衍射; ANS荧光探针; 紫外光谱

中图分类号: Q663.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)02-0495-04

引 言

动态超高压微射流均质技术是一种高效的超微细化技术^[1,2], 在均质过程中, 剧烈的处理条件, 如液体高速撞击、高剪切、空穴爆炸、高速振荡等作用可能导致大分子结构的变化^[3], 其中的生物大分子, 如蛋白质、淀粉等会发生结构上的变化, 从而导致其功能性质的改变。迄今为止, 围绕动态超高压微射流对生物大分子的改性研究逐年增多^[4-8], 但是这些研究主要集中于对功能性质的研究, 原料均为混合物, 对动态超高压微射流的改性机理研究很少, 原料的复杂性阻碍了对改性机理的研究。本文以卵清蛋白这一单体作为原料, 研究了动态超高压微射流均质对卵清蛋白的微观结构的改性, 通过圆二色谱、X射线衍射、ANS荧光探针和紫外光谱分析卵清蛋白在处理前后的结构变化, 从而进一步探讨其改性机理。这对于充分研究动态超高压微射流技术对大豆蛋白、蛋清蛋白、花生蛋白等生物大分子的改性机理, 拓展该技术的应用范围, 开发高性能的新产品等具有重要的意义。

1 实验部分

1.1 卵清蛋白的制备

以超市内购买的新鲜鸡蛋为原料, 采用盐析法分离纯化

出卵清蛋白, 冷冻干燥后备用。

1.2 动态超高压微射流处理

采用上述卵清蛋白为原料, 配制6%卵清蛋白溶液, 经过M-700微射流均质机处理, 均质的压力分别为40, 80, 120, 160 MPa。收集样品, 置4℃冰箱中备用。

1.3 光谱的测定

采用JASCO J-810旋光仪(日本JASCO公司)测定卵清蛋白的远紫外圆二色谱^[9]。选用0.1 cm厚的椭圆形比色皿, 在25℃和连续充氮的条件下, 扫描区间为190~250 nm, 速度为50 nm·min⁻¹, 光谱间隔0.1 nm, 三次累积。

采用X射线衍射仪(英国Bede)测定卵清蛋白的结晶结构^[10]。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°扫描, 微机处理数据。

采用ANS荧光探针法测定卵清蛋白的表面疏水性^[11]。

采用UV-VS 2501PC紫外分光光度计对卵清蛋白溶液进行扫描, 扫描速度100 nm·min⁻¹, 范围: 250~420 nm。

2 结果与讨论

2.1 CD谱对卵清蛋白二级结构的研究

蛋白质的二级结构是指多肽链骨架中局部空间结构, 不考虑侧链的构象及整个肽链的空间排列。常见的二级结构有 α 螺旋、 β 折叠等规则结构、转角、环形半规则和卷曲无规则

收稿日期: 2009-02-28, 修订日期: 2009-06-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(20666004)和教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0540)资助

作者简介: 涂宗财, 1965年生, 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室教授 e-mail: tuzc_mail@yahoo.com.cn

结构等^[12]。 α 螺旋和 β 折叠结构中存在较多的氢键,导致规则二级结构具有一定的刚性; β 转角以及无规卷曲中不存在氢键或其他的相互作用,使肽段中的各个残基间有更大的自由度,没有刚性,从而表现出极大的柔性。 α 螺旋和 β 折叠结构是二级结构中的有序结构,结构的有序性与蛋白质的某些功能性质存在协同性。

在蛋白质和多肽中主要的光活性基团是肽链骨架中的肽键、芳香氨基酸残基及二硫键。CD 色谱根据蛋白质的光活性基团的圆二色性来研究蛋白质的二级结构。动态超高压微射流处理后的卵清蛋白的 CD 测定结果见表 1。

结果表明:未处理的卵清蛋白的二级结构分别是由 α 螺旋(53.0%), β 折叠(1.3%), β 转角(15.8%)和无规卷曲(29.9%)组成,以 α 螺旋为主。经 40 MPa 处理后, α 螺旋变化不大, β 折叠含量明显增加, β 转角和无规则卷曲减少;经过 80 和 120 MPa 处理后, β 折叠增加,发生去折叠现象;经过 160 MPa 处理后, α 螺旋向 β 折叠转变。以上分析表明,动态超高压微射流均质可使卵清蛋白的二级结构中的 α 螺旋, β 折叠, β 转角和无规卷曲之间发生相互转化。动态超高压微射流均质的作用,影响分子内部的电荷分布,而且不同的均质强度对卵清蛋白氨基酸残基的结合牢固程度有不同程度的影响,从而导致了二级结构的变化。经过动态超高压微射流处理后,卵清蛋白的有序二级结构的含量提高,分子的刚性提高,有序性提高。蛋白质的二级结构的有序性与蛋白质的功能性质如凝胶性存在一定的协同性,因此,本文研究结果为动态超高压微射流均质对蛋白质的改性提供了理论依据,为进一步研究动态超高压微射流对蛋白质的改性机理提供了数据参考。

Table 1 Changes in the second structure of ovalbumin treated by different pressures

	未处理	40 MPa	80 MPa	120 MPa	160 MPa
α 螺旋	53.0 %	48.7 %	54.2 %	55.7 %	53.9 %
β 折叠	1.3 %	11.5 %	0 %	0.0 %	2.2 %
β 转角	15.8 %	14.3 %	17.1 %	16.0 %	15.7 %
无规卷曲	29.9 %	25.5 %	28.7 %	28.3 %	28.3 %
总量	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

2.2 X射线衍射对卵清蛋白晶体结构的研究

X 射线衍射法是测定生物大分子结构,研究功能与结构关系,探索生命机制的一个重要手段。通过对 X 射线衍射图样上的结晶区和非结晶区的分析研究,可以了解物料经物理或化学方法变性后的颗粒结晶结构变化情况^[13]。据报道,卵清蛋白具有一定的晶体结构^[14]。图 1 为动态超高压微射流处理后卵清蛋白的 X 射线衍射图谱。

X 射线衍射图的不同反映出结晶结构的差别,衍射图中的峰高(衍射强度)和半峰宽(衍射角)与内部结晶区的晶粒大小有关,晶粒越大,衍射峰越高,半峰宽越小,背景高度主要来自非结晶区^[15]。由衍射图得出,与未经处理的蛋白样品相比较,经过动态超高压微射流均质处理后卵清蛋白的结晶形式(峰的形状)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。160 MPa 处理下的卵清蛋白的峰衍射强度最高,结晶区最大,可见,动态超高压微射流处理可以提高卵清蛋白结构的有序性,促进卵清蛋白晶体结构的增加,这与 CD 图谱获得的信息相似,即经过动态超高压微射流处理后,卵清蛋白的规则二级结构的含量增加,从而促进卵清蛋白晶体结构的形成,提高了卵清蛋白的稳定性(表 2)。

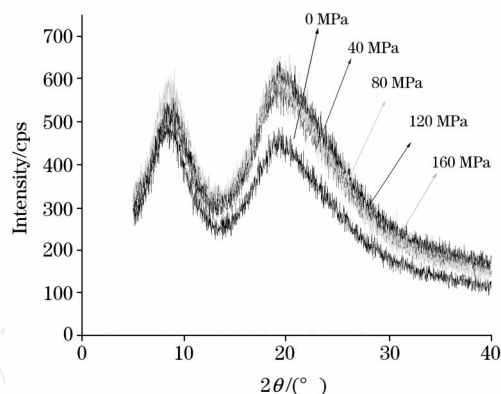


Fig 1 XRD curves of ovalbumin treated by different pressures

Table 2 XRD parameters of ovalbumin treated by different pressures

样品	No.	2 θ	<i>d</i>	Intensity
0 MPa	1	8.200	10.773 9	64
	2	19.240	4.609 3	42
40 MPa	1	8.761	10.085 2	82
	2	19.201	4.618 7	58
80 MPa	1	8.862	9.970 3	81
	2	19.841	4.471 1	44
120 MPa	1	8.380	10.543 1	75
	2	19.360	4.581 0	46
160 MPa	1	8.440	10.467 6	89
	2	19.020	4.662 2	56

2.3 荧光光谱法对卵清蛋白表面疏水性的研究

疏水相互作用是维持蛋白质三级结构的主要作用力,它对卵清蛋白结构的稳定和功能性质具有重要的作用^[16, 17]。采用 ANS 荧光探针法可以测定蛋白的表面疏水性,疏水相互作用是维持蛋白质三级结构最重要的作用力^[18]。动态超高压微射流处理后卵清蛋白的表面疏水性变化如图 2。

由图可以看出,与未经动态超高压微射流处理的蛋白样品比较,随着均质压力的增加,卵清蛋白的荧光强度提高,最大吸收波长 $\lambda_{\max}$ 轻微蓝移,但是经 160 MPa 处理后,荧光强度相对 120 MPa 处理有所下降。这表明卵清蛋白在动态超高压微射流均质机的反应腔内受到不同程度的作用力,促使分子内的振动增强。从而破坏了维系空间结构的次级键,导致蛋白质结构松弛,蛋白内部的疏水基团暴露在外,使卵清蛋白的表面疏水性增强,同时,蛋白质分子之间存在疏水相互作用力,当暴露的疏水基团较多时,会重新通过疏水相互作用而重新聚合。因此,相对于 120 和 160 MPa 处理后的卵清蛋白的表面疏水性下降。

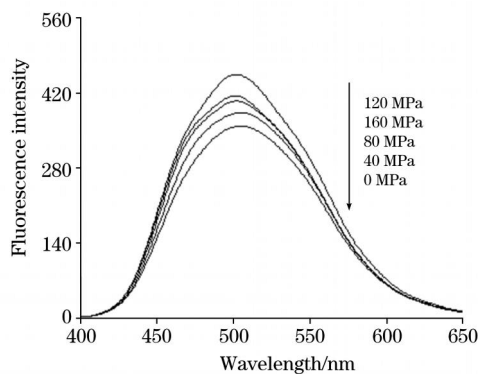


Fig 2 Surface hydrophobicity of ovalbumin treated by different pressures

2.4 紫外光谱法对卵清蛋白构象的研究

紫外光谱法是研究溶液中的蛋白质构象的一种有效方法。蛋白质能够吸收一定波长范围的紫外光,其主要原因是由于色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)残基的侧链基团对光的吸收,其次是Phe, His, 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。在蛋白质分子中,生色基团的分布不同,其微环境也不同。而微环境的性质是由蛋白质分子构象所决定的^[19]。本文采用紫外吸收光谱对卵清蛋白进行分析,结果见图3和图4。

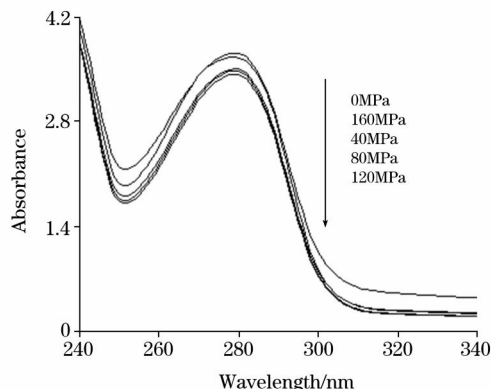


Fig 3 UV spectra of ovalbumin treated by different pressures

分析图谱可知,所有卵清蛋白样品的最大紫外吸收峰均在279 nm处,并没有发生蓝移或红移。这说明卵清蛋白的

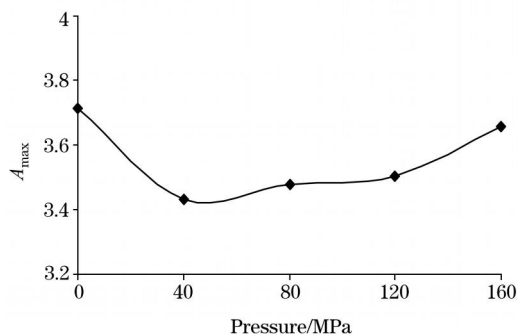


Fig 4 Changes of the highest absorbance of ovalbumin treated by different pressures

色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)残基的侧链基团分布没有发生变化。但是经动态超高压微射流处理后卵清蛋白的最大吸光度值却有所变化,由图4看出,与未处理蛋白样品相比较,经动态超高压微射流处理后的卵清蛋白的最大紫外吸光度值下降。当160 MPa处理后,其最大吸光度值才有所增加,不过也未高于未处理的蛋白样品的紫外吸收值。这可能是由于卵清蛋白分子在均质过程中有序二级结构增多,蛋白质分子表面的具有紫外吸收的芳香氨基酸残基包埋到分子内部,使得蛋白分子表面具有紫外吸收的残基减少,从而导致其紫外吸光度降低。

3 结论

(1) 动态超高压微射流均质可使卵清蛋白的二级结构中的 α 螺旋, β 折叠, β 转角和无规卷曲之间发生相互转化,经过动态超高压微射流处理后,卵清蛋白的有序二级结构的含量提高,分子的刚性提高,有序性提高;

(2) 动态超高压微射流处理可提高卵清蛋白结构的有序性,促进卵清蛋白晶体结构的增加,提高了卵清蛋白的稳定性;

(3) 动态超高压微射流处理可促进卵清蛋白表面疏水性的提高;

(4) 经动态超高压微射流处理后的卵清蛋白的最大紫外吸光度值下降,表明卵清蛋白分子表面的具有紫外吸收的芳香氨基酸残基被包埋于分子内部,卵清蛋白的三维结构发生改变。

参 考 文 献

- [1] Seid Mahadi Jafari, Elham Assadpoor, Yinghe He, et al. Food Hydrocolloids, 2008, 22(7): 1191.
- [2] Seid Mahadi Jafari, Yinghe He, Bhesh Bhandari. Journal of Food Engineering, 2007, 82(4): 478.
- [3] Pereda J, Ferragut V, Buffa M, et al. Food Chemistry, 2008, 11(3): 696.
- [4] Liu Wei, Liu Jianhua, Liu Chengmei, et al. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2008, 10(2): 142.
- [5] TU Zong-cai, WANG Jing-qin, LI Jin-lin, et al (涂宗财, 汪菁琴, 李金林, 等). Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报), 2007, 28(11): 2225.
- [6] TU Zong-cai, ZHANG Xue-chun, LIU Cheng-me, et al (涂宗财, 张雪春, 刘成梅, 等). Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (农业工程学报), 2008, 24(9): 306.
- [7] Iordache M, Jelen P. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2003, 4(4): 367.

- [8] Diane L Van Hekken, Michael H Tunick, Edyth L Malin, et al. *LWT-Food Science and Technology*, 2007, 40(1) : 89.
- [9] Tani F, Shirai N, Onishi T, et al. *Protein Sci.*, 1997, 6(7) : 1491.
- [10] Justin Nijdam, Alexander Ibach, Klaus Eichhorn, et al. *Carbohydrate Research*, 2007, 342(16) : 2354.
- [11] Alizadeh-Pasdar N, Li-Chan E C Y. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(2) : 328.
- [12] LU Yan, ZHANG Wei-wei, WANG Gong-ke (卢 雁, 张玮玮, 王公轲). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*, 2008, 28(1) : 88.
- [13] 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.
- [14] Stein P E, Leslie A G, Finch J T, et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, 221 : 941.
- [15] YE Huai-yi, YANG Sirling, 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.
- [16] Stefania Iametti, Elena Donnizzelli, Giuseppe Vecchio, et al. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46(9) : 3521.
- [17] Zhang Hongkang, Li Lite, Tatsumi Eizo, et al. *Innovative Food Science and Emerging Twchnologies*, 2003, 4(3) : 269.
- [18] 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) : 1341.
- [19] 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 Dynamic High Pressure Microfluidization Treatment on the Microstructure of Ovalbumin

TU Zong-cai, WANG Hui, LIU Guang-xian, CHEN Guang, DOU Yu-xin, ZHANG Xue-chun
State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047 China

Abstract The effect of dynamic high pressure microfluidization on the microstructure of ovalbumin was studied by CD spectra, XRD spectra, ANS fluorescence probe emission spectra and UV absorption spectra. The results indicated that the changes in the microstructure were dependent on the pressure. CD spectra were used to examine the changes in the secondary structure of the ovalbumin treated by different pressures. When the pressure increased, the mutual transformation between α -helix, β -sheet, β -turn and the random coil was observed. The orderliness of the secondary structure was increased with increasing the pressure. XRD spectra analysis showed that the crystal structure content of the ovalbumin treated increased with increasing the pressure and the largest data was observed at 160 MPa, 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 the dynamic high pressure microfluidization induced an increase in surface hydrophobicity following high pressure treatment, while the largest data was observed at 120 MPa. In addition, UV absorption spectra analysis indicated that dynamic high pressure microfluidization treatment also resulted in a decrease in the UV-absorption maximum wavelength with increasing the pressure, indicating that the aromatic amino acid was buried in the molecular interior and the three dimensional structure of ovalbumin was changed.

Keywords Dynamic high pressure microfluidization; Ovalbumin; Circular dichroism; XRD spectra; ANS fluorescence probe; Ultraviolet spectra

(Received Feb. 28, 2009; accepted Jun. 2, 2009)