

采用 FTIR 技术研究高压处理对冻干大豆分离蛋白构象的影响

唐传核¹, 马正勇²

1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640

2. 香港大学生命科学学院, 中国 香港

摘 要 采用傅里叶转换红外光谱技术 (FTIR) 研究了高压 (HP) 处理对冷冻干燥的大豆分离蛋白 (SPI) 构象的影响。在 SPI 的去卷积 FTIR 光谱的酰胺 I' 区域 ($1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$), 观察到 12 个与蛋白构象相关的红外吸收峰, 分别对应于 $\text{C}=\text{O}$ 键伸缩振动与肽键的 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动。通过对该区域的峰强度与波数分析显示, 压力为 $200 \sim 400 \text{ MPa}$ 的 HP 处理导致 SPI 在该区域的峰发生明显的“红移” (约 2 cm^{-1}), 强度也显著增加。更高的 HP 处理进一步增强了 SPI 的酰胺 I' 区域的峰强度。对酰胺 II 峰分析显示, HP 处理导致酰胺 II 峰 (如 $1560 \sim 1500 \text{ cm}^{-1}$) 的强度、面积逐渐增加 (与压力呈正相关)。以上分析显示, HP 处理导致 SPI 的二级与三级结构逐渐打开, 然而变性蛋白的结构在高压释放后经历一个“重构过程”。

关键词 大豆分离蛋白 (SPI); 傅里叶转换红外光谱 (FTIR); 高压; 蛋白构象

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)05-1237-04

引 言

大豆蛋白由于具有良好的营养与功能特性, 作为一种重要的食品组份, 广泛应用于食品工业。对该蛋白进行适当地改性处理, 包括物理、化学及生物手段, 可进一步提高其用途。

国内外较多学者尝试了采用高静压 (HP) 处理改性大豆分离蛋白 (SPI)^[1-4]。譬如 Molina 等^[1]报道压力为 400 MPa 的 HP 处理对大豆 7S 球蛋白的乳化活性指数 (EAI) 的改善最为明显, 而对于 11S 球蛋白来言, 最佳 EAI 值发生于 200 MPa 。Puppo 等^[2]指出, 在 pH 3 和 8 时, 压力介于 $200 \sim 600 \text{ MPa}$ 的 HP 处理导致 SPI 的溶解度、表面疏水度、游离巯基 (SH) 以及二级结构发生了不同程度的变化。HP 处理也可提高大豆蛋白 (特别是 7S 的 β -亚基与 11S 的酸性亚基) 吸附于水包油 (30/70) 乳浊液的 O/W 界面。最近, 我们采用直接以从脱脂豆粕中提取的 SPI 溶液为 HP 处理对象, 检测了 HP 处理对 SPI 的诸多物化与功能性质的影响^[4]。结果发现, HP 处理对 SPI 的性质的影响较大程度上取决于蛋白溶液的蛋白浓度。

尽管广泛开展了 HP 处理对大豆蛋白的物化改性研究, 然而涉及结构性质的报道却非常欠缺, 只有少数工作指出 HP 会对大豆蛋白的结构产生一定的影响。譬如, Puppo 等^[2]使用圆二色光谱 (远紫外 CD) 技术检测了 HP 处理对大豆蛋

白构象的影响, 指出随着 HP 的压力水平的不断增加, 其 α -helix 含量不断下降, 而无规卷曲则不断增加。另一方面, 去卷积 (Deconvoluted) 的傅里叶转换红外 (FTIR) 光谱技术已成为一种经典的蛋白构象分析手段^[5]。本研究的主要目标就是采用 FTIR 技术表征 HP 处理对 SPI 的构象的影响, 以期更多地了解 HP 改性的 SPI 的结构信息。

1 材料与方法

1.1 材料

所采用的 SPI 从脱脂豆粕 (购自山东新奇粮油公司) 按照文献 [4] 方法制备而得。涉及的其他化学试剂均为分析级以上纯度。

1.2 HP 处理

HP 处理在一个 5 L 的反应单元 (中国大洋压力系统) 中进行, 该单元配置有温度与压力调控装置。HP 处理之前, SPI 溶液真空包装于一个密封的聚乙烯包内。高压处理过程中要控制温度的上升, 使其控制在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 以免导致蛋白溶液的过热。SPI 样品分别在压力 200 , 400 及 600 MPa 时 HP 处理 15 min , 升压的速率约为 $250 \text{ MPa} \cdot \text{min}^{-1}$, 降压的速率约为 $300 \text{ MPa} \cdot \text{min}^{-1}$ 。经 HP 处理后, SPI 溶液经冷干制备 HP 处理的 SPI 样品。

1.3 FTIR 光谱

根据 Ellepola 等^[6] 的方法进行蛋白质的 FTIR 分析。首

收稿日期: 2008-02-08 修订日期: 2008-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20876057 和 20436020) 资助

作者简介: 唐传核, 1973 年生, 华南理工大学轻工与食品学院副教授, e-mail: chtang@scut.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

先, 制备溶于 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Deuterated 磷酸缓冲液 (pD 7.4) 的 SPI 分散液 (10%, ρ)。整个实验过程都采用 D_2O 替代 H_2O , 因为前者在 $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 的红外区有较高的透光率。为了确保 D—H 完全交换, 要提前 1 d 制备样品, 并在 4°C 下贮存 (直至红外测量)。

SPI 分散液的红外光谱采用配置有 DTGS 检测器的 Biorad Excalibur FTIR 光谱仪 (Biorad Laboratories Cambridge MA) 收集。样品置于 $25 \mu\text{m}$ 厚的 R 液体池 (介于两片 CaF_2 窗之间)。扫描 32 次, 精度为 2 cm^{-1} 。采用 1.2 的 Merlin 软件 (Biorad Laboratories Inc., Cambridge MA, USA) 对红外光谱进行去卷积处理。用于去卷积的半峰宽为 10 cm^{-1} , 强化因子 (γ) 为 2.0 介于酰胺 I' 区域 ($1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$) 的峰根据以前的文献 [7, 8] 进行归属。根据 Byler & Sussli 等 [7] 使用的 Gaussian 分布及曲线拟和方法, 对不同二级结构进行定量分析。所有 FTIR 实验都测量两次, 所得的数据的标准偏差都小于 10%。

1.4 数理统计

对数值进行 ANOVA 分析, 在 $P < 0.01$ 显著水平比较不同数据的差异。

2 结果与讨论

2.1 酰胺 I' 峰的归属

图 1 为未经处理的 SPI 的去卷积处理前后的典型红外酰胺 I' 图谱 ($1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$)。相对于原始图谱, 去卷积图谱的分辨率更高。在去卷积曲线的酰胺 I' 区域, 可明显观察到 12 个与蛋白构象相关的红外吸收峰。已有大量研究 [7, 9, 10] 把此类峰主要归属于 $\text{C}=\text{O}$ 键伸缩振动及肽键的 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动, 可反映蛋白质的二级结构。SPI 的酰胺 I' 区域的峰可归属为: 1690 cm^{-1} , β -Type turn 及 bend 1674 cm^{-1} , Extended strands (β -strand); 1666 与 1658 cm^{-1} , β -turns; 1651 cm^{-1} , α -helix; 1641 cm^{-1} , Unordered structures (random coils); 1631 cm^{-1} , 反平行 β -sheet 结构。

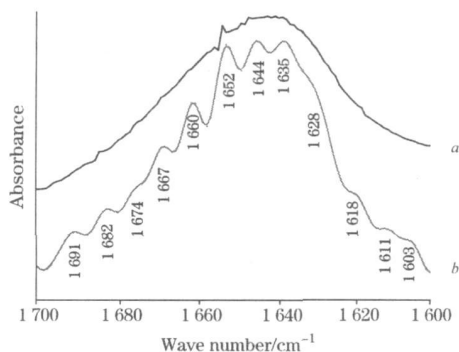


Fig 1 A typical FTIR spectrum of $10 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ SPI

a: Original spectrum; b: Deconvoluted spectrum

另外, 位于约 1628 cm^{-1} 的弱峰可归于强健合的 β -strands [8] 或扭曲的 β -strands [11]。该峰也可显示分子间的 β -sheet 类型结构 [12]。而位于 1611 cm^{-1} 的峰则可归属于侧链如酪氨酸残基的振动 [6], 也可能与精氨酸残基相关 [9]。位于

1681 和 1618 cm^{-1} 的两个峰则经常与蛋白质的絮凝组分相关 [8, 12] (以下称为絮凝峰)。在此场合, 此两峰可能与蛋白质的自絮凝反应相关。前一个峰归属于来自絮凝反应的分子间 β -sheet; 而后者存在则显示具反向结构的 β -sheet [8]。两个峰的存在与以下的事实相一致: 中性条件下大豆蛋白的不同蛋白组分大多以絮凝物或类似于絮凝物的形式存在。根据 Byler [7] 的方法, 该 SPI 的二级结构组成可估计为: 44.9% Extended strands (总和), 21.3% β -turns, 15.4% α -helix 以及 17.6% Random coils, 而絮凝的 Strands (对应于峰 1618 与 1682 cm^{-1}) 的组成则约为 9.6%。

2.2 HP 处理对酰胺 I' 峰的影响

采用 FTIR 光谱技术讨论了 HP ($200 \sim 600 \text{ MPa}$) 处理对 SPI 的构象结构的影响, 结果如图 2 所示。图中列出了 HP 处理的诸多 SPI 样品的酰胺 I' 峰 (去卷积) 的总红外吸收强度。对峰位移与强度的变化模式 (图 2 与图 3) 的分析显示, SPI 的二级结构极易受 HP 处理的影响。此前研究 [4] 已显示, SPI 的不同蛋白组份在高于 200 MPa 的 HP 处理后几乎都完全变性。因此, 可合理地推测: 由于疏水或其他相互作用,

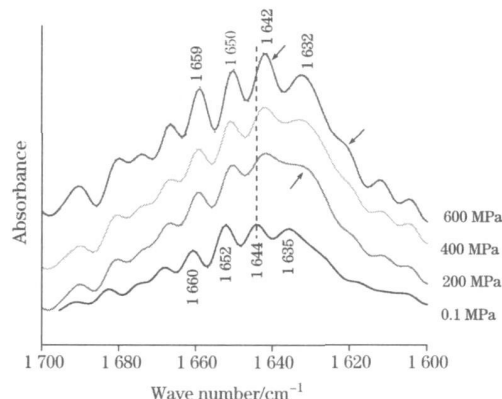


Fig. 2 Stacked plots of deconvoluted FTIR spectra of untreated and HP-treated ($200 \sim 600 \text{ MPa}$) SPI. The arrows indicate the observable changes in the intensity or wave-number shift of the corresponding bands

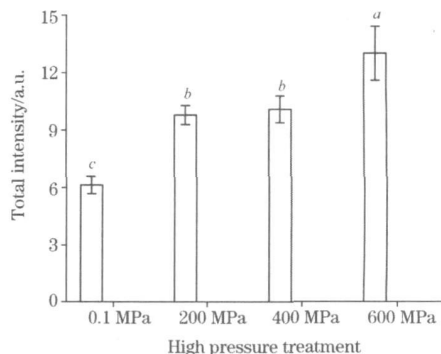


Fig. 3 Effect of HP treatment on total intensity of deconvoluted amide I' bands ($1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$) of SPI. Different characters on the top of columns indicate the significant ($P < 0.05$) differences between different pressure levels ($0.1 \sim 600 \text{ MPa}$)

HP处理的初期阶段形成的结构展开及变性的蛋白可能有某种程度的“再聚集”(re-association)或絮凝反应,在HP释放之后,已破坏的二级结构发生了“复性”现象。在一项检测压力对牛 α -乳白蛋白结构的影响的FTIR研究^[13]中,已确证压力从760 MPa释放至0.1 MPa致使结构已展开(HP诱导)的蛋白部分重构其二级结构。

压力为200 MPa的HP处理致使SPI的酰胺I'峰发生显著的“红移”(约 2 cm^{-1}),峰(特别介于 1660 与 1630 cm^{-1} 之间的峰)的强度也显著增加(图2与图3)。这意味着经压力为200 MPa的HP处理的蛋白的构象结构相对于未处理的蛋白更舒展,因为波数的红移^[14]显示分子间 β -sheet的氢键的强度在HP处理后变得更强。这些现象伴随着Random coil(约 1642 cm^{-1})与 β -type turn或Bend(1690 cm^{-1})的含量的增加,以及 α -helix(1653 cm^{-1})含量的下降(数据未列出)。有趣的是,归属于反平行类型的 β -sheet结构^[9-15]的峰(1636 cm^{-1})向低波数(约 1632 cm^{-1})位移。这种红移现象在压力高于200 MPa的HP处理的SPI中更为明显(图2),也显示出原先埋于蛋白结构内部的 β -sheet结构的氢键强度的增加。这是HP诱导蛋白结构展开的一个间接的证据。

相对于200 MPa的场合,压力为400 MPa的HP处理未导致SPI的酰胺I'峰发生显著的变化(图2与图3)。然而,经更高压力(600 MPa)的HP处理后,位于约 1692 与 1668 cm^{-1} 的峰强度及相对应的Turns与Bends含量明显增加(图3)。这在一定程度上证实了结构展开的蛋白经历了二级结构的“重构过程”,因为越来越多的Turns与Bends结构参与此重构过程。另外,在 1620 cm^{-1} 出现一个明显的肩峰(归属于与絮凝相关的分子间氢键结合的 β -sheet^[8-12,15])也说明了这一点。

2.3 HP处理对酰胺II峰的影响

与酰胺I'峰相比,位于 1550 cm^{-1} 左右的酰胺II峰(在 D_2O 中一些峰会向 1450 cm^{-1} 位移)给出的二级结构信息更少。不过,酰胺II峰与酰胺基团的“面外”(out of phase)与“面内”(in plane)的C-N伸缩振动与N-H弯曲振动相关。该区域的峰强度指示D/H交换的程度,因为蛋白质结构展开,从而允许分子内部的氢与 D_2O 相互交换(例如,N-H向N-D转换)^[15]。因此,酰胺II峰的红外吸收的强度变化

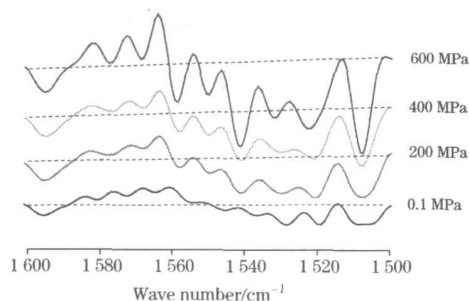


Fig 4 Stacked plot of deconvoluted amide II region in the FTIR spectra of untreated and HP-treated (200~600 MPa) SPI

在一定程度上可反映蛋白三级结构的构象变化。

图4为未处理与HP处理(200~600 MPa)的SPI的酰胺II峰(去卷积)的图谱。总体来说,酰胺II区域由两类不同峰组成,其中一类位于 1600 与 1560 cm^{-1} 之间,另一类则介于 1560 与 1500 cm^{-1} 之间(根据 1500 与 1600 cm^{-1} 之间的基线)。可观察到前一类峰的经积分的强度变化(正)与后一类峰的强度(负)紧密相关(相对于基线)。Milletlb等在BSA的R图谱中也观察到相类似的现象,即酰胺II峰(1560 与 1500 cm^{-1})的强度(负)在 58°C 的反应过程中逐渐增加,并把该现象归结于蛋白三级结构的逐渐展开。基于该发现,我们比较了未处理及HP处理的SPI场合中位于 1507 cm^{-1} 的主要峰的强度或高度以及酰胺II峰的绝对面积(相对于基线),结果如图5所示,其主要峰(1507 cm^{-1})的红外吸收强度随HP处理的压力水平的变化模式与酰胺II峰的绝对面积一致。这说明位于 1507 cm^{-1} 的峰的红外吸收强度的变化可反映SPI的三级结构的变化。

从图5可以看出,SPI的位于 1507 cm^{-1} 的峰的强度在 $0.1\sim 600\text{ MPa}$ 之间随压力的增加而显著增加($P < 0.05$),表明SPI的三级结构的展开程度随HP处理时压力的增加而增加。另外,在此酰胺II区域的大多数峰的波数几乎不受HP处理的影响(图4),反映出SPI的三级结构的维持主要与疏水相互作用相关,而与分子内的氢键无关。可见,HP处理对SPI的三级构象的影响在一定程度上解释了HP处理对SPI的与表面性质相关的改性效果^[4]。

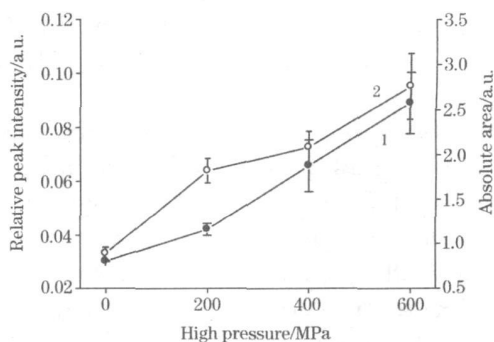


Fig 5 Effects of HP treatment on the peak intensity of the band at 1507 cm^{-1} (relative to the baseline) and absolute area of amide II bands of SPI

1 Peak intensity; 2 Area

3 结 论

FTIR技术可以成功地用于大豆蛋白由HP处理引起的构象变化的表征。SPI经HP处理(200~600 MPa)后,其二级及三级结构发生了显著的变化。通过检测HP处理对SPI的构象的影响,发现尽管SPI的构象结构可被HP处理破坏,在高压释放之后,它仍具有重构其二级与三级结构的能力。对于大豆蛋白的这种构象重构机理仍有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Molina E, Papadopoulou A, Ledward D A. Food Hydrocolloids. 2001, 15: 263.
- [2] Puppo C, Chapleau N, Speroni F, et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004, 52: 1564.
- [3] Puppo M C, Speroni F, Chapleau N, et al. Food Hydrocolloids. 2005, 19: 289.
- [4] Wang X S, Tang C H, Li B S, et al. Food Hydrocolloids. 2008, 22: 506.
- [5] DENG Hua, SONG Zharr-jun, WANG Dewen, et al (邓 桦, 宋占军, 王德文, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2006, 26(8): 1437.
- [6] Ellepola SW, Choi SM, Ma C Y. International Journal of Biological Macromolecules. 2005, 37: 12.
- [7] Byler D M, Susi H. Biopolymers. 1986, 25(3): 469.
- [8] Lefèvre T, Subirade M. Biopolymers. 2000, 54: 578.
- [9] Susi H, Byler D M. Methods for Protein Analysis. Illinois: American Oil Chemists' Society, 1988.
- [10] Prestrelski S J, Byler D M, Thompson M P. International Journal of Peptide and Protein Research. 1991, 37: 508.
- [11] Subirade M, Gueguen J, Pézolet M. Biochimica et Biophysica Acta. 1994, 1205: 239.
- [12] Allain A F, Paquin P, Subirade M. International Journal of Biological Macromolecules. 1999, 26: 337.
- [13] Dzwolak W, Kato M, Shimizu A, et al. Biochimica et Biophysica Acta. 1999, 1433: 45.
- [14] Lefèvre T, Subirade M. Food Hydrocolloids. 2001, 15: 365.
- [15] Boye J I, Ismail A A, Ali I. Journal of Dairy Research. 1996, 63(1): 97.

Effects of High Pressure on the Conformation of Freeze-Dried Soy Protein Isolate: A FTIR Spectroscopic Study

TANG Chuanghe¹, MA Chengyung²

1. Department of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

2. School of Biological Sciences, The University of Hong Kong, Hong Kong, China

Abstract The effect of high pressure (HP) treatment on the conformation of freeze-dried soy protein isolates (SPI) was investigated by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Within the amide I' region ($1\,600\text{--}1\,700\text{ cm}^{-1}$) of the deconvoluted FTIR curve of SPI, more than 10 bands associated with protein conformation were distinctly observed, attributed to the C=O stretching vibration and to a small extent to C—N stretching vibration of the peptide bonds, respectively. The secondary structure of native SPI is estimated to be composed of 15%–16% α -helix, 39%–44% extended strands, 17.5% random coils, and 2%–27% turns. The analyses of intensity and wavenumber of the bands showed that HP treatment at pressures of 200–400 MPa resulted in the increases in intensity and a “red-shift” (about 2 cm^{-1}) of these bands. HP treatment at 600 MPa further increased the band intensity of the amide I' region. The analyses of amide II bands showed that HP treatment led to gradual increases in intensity and absolute area of amide II bands in a pressure-dependent manner. Thus, it is suggested that HP treatment resulted in gradual unfolding of secondary and tertiary structure of SPI, while the structure of denatured proteins underwent a “rebuilding” process after the release of high pressure. These results confirm that the HP-induced modification of SPI is by means of the HP-induced conformational changes.

Keywords Soy protein isolates (SPI); Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR); High pressure; Protein conformation

(Received Feb. 8, 2008; accepted May 12, 2008)