

醇变性大豆蛋白的结构特征及物化性质的研究

华欲飞 谷文英 沈培英 刘复光

(食品学院)

摘要 圆二色性分析结果表明,醇变性使大豆蛋白 α -螺旋构象的含量增加,结构更加有序;同时,荧光偏振测定显示大豆蛋白分子的链运动自由度发生变化。另一方面,大豆蛋白紫外差示光谱未出现负峰,荧光发射波长不变,说明蛋白质的疏水核未被破坏,因而是一种局部变性。运用“溶剂吸附”模型对大豆蛋白的醇变性过程作了理论阐述。

主题词 大豆;蛋白;构象

中图分类号 TS201.21

0 引言

大豆蛋白的热变性及化学变性对分子结构的影响已被充分研究^[1],与此形成对照,对大豆蛋白醇变性,包括大豆蛋白醇变性的过程以及变性蛋白的最终结构的研究却少得多。除有关醇变性大豆蛋白的溶解度降低和易被蛋白酶作用的报道之外,尚无直接的实验证据说明其结构变化特征。Fukushima 提出的“油滴”模型仍被经常引用作为大豆蛋白醇变性的标准解释^[2],该模型认为疏水核在变性时被破坏,疏水基团转移到分子表面。然而,在大豆蛋白醇变性时上述过程是否必然发生,也只有通过实验才能加以验证。

作者将紫外差示光谱、荧光、荧光偏振等现代生物物理方法应用于该领域,从不同的角度探讨醇变性大豆蛋白的分子结构和物化性质,为研究大豆蛋白的醇变性提供实验依据,从而完善大豆蛋白醇变性理论并有助更深入地了解大豆蛋白的分子结构及物化性质。

1 材料与方法

1.1 11S 大豆球蛋白的制备和提纯

11S 大豆球蛋白按照 Thanh 和 Shibasaki 的方法从低温脱溶脂大豆粕(黑龙江佳木斯三江公司提供)中制取 11S 粗组分^[3]。通过凝胶层析进一步提纯。层析条件为:Sepharose 6B (瑞典 Pharmacia 公司产品),柱尺寸:2.6×90cm,洗脱液:0.035mol/L 磷酸盐缓冲液+0.4mol/L KCl(pH7.6),流速 30ml/h,280nm 处测定洗脱液紫外吸收,收集 11S 蛋白质组分。

1.2 大豆蛋白二级结构的测定

圆二色性(Circular Dichroism,简称 C. D.)谱在 JASCO J-500C Spectropolarimeter 上

收稿日期:1995-06-06

测定。分析条件如下,灵敏度: 2×10^{-3} 度/cm,扫描速度:5nm/min,光径:0.2cm,蛋白样品浓度:1mg/ml,扫描范围:200~250nm。按 Chang 等人的方法计算大豆蛋白分子中 α -螺旋, β -折叠和随机卷曲构象所占的比例^[4]。

1.3 荧光偏振

荧光试剂 1-(二-甲基胺)-萘-5-磺酰氯(DNS-Cl)购自上海生化所。11S 大豆球蛋白-DNS 偶合物制备方法如下:200mg 蛋白质溶于 10ml 0.1mol/L NaHCO₃ 溶液中(pH8.5),冷却至 0℃以下后,在搅拌中加入 1ml 0.4%DNS-Cl 悬浮液。在 0℃下放置过夜,未反应的 DNS-Cl 通过高速离心(20000r/min),1h 除去,溶液中的 11S-DNS 偶合物用饱和 (NH₄)₂SO₄ 沉淀,并用 0.3mol/L KCl 洗涤,对去离子水透析 24h^[5]。

荧光偏振用日立-635 荧光分光光度仪测定,使用带循环水比色架,激发波长 350nm,偏振度 = $\frac{I_{//}-GI_{\perp}}{I_{//}+GI_{\perp}}$, $I_{//}, I_{\perp}$ 分别为荧光的平行和垂直分量的强度, G 为校正因子,可由仪器自动求得。

1.4 紫外光谱和差示紫外光谱

仪器为岛津 UV-240 分光光度仪,1cm 石英比色皿,扫描速率:10nm/min;差示紫外光谱按照文献[6]的方法测定,即在样品光路上放置蛋白质的乙醇溶液和水,在参比光路放置蛋白质的水溶液和乙醇溶液,两光路中的蛋白质浓度和乙醇浓度必须一致。

1.5 荧光发射光谱

仪器为日立-635 荧光分光光度仪,1cm 石英比色皿,激发波长为 280nm

2 结果与讨论

2.1 醇变性对大豆蛋白二级结构的影响

图 1 为在不同浓度乙醇中,11S 大豆球蛋白在远紫外区段(200~250nm)的 C. D 谱图。从图中可以看出,随着乙醇浓度增大,C. D 谱图产生以下变化:在 210nm 附近的负槽移至 220nm 附近;负槽的峰值(绝对值)明显增大。

根据图 1 计算得 11S 大豆蛋白在乙醇溶液中二级结构的变化趋势,如表 1 所示。

表 1 11S 大豆球蛋白的各种结构成分在不同浓度乙醇溶液中的变化情况

乙醇浓度(%)	二 级 结 构 (%)		
	α -螺旋	β -折叠	随机卷曲
0	15.8	41.5	42.7
20	12.5	51.0	36.5
40	27.5	35.5	37.0
60	35.0	23.5	41.5

从表 1 中可看出,天然 11S 大豆蛋白的螺旋构象比例很低,仅占 15.8%,除去 41.5% β -折叠构象之外,随机卷曲占有很大比例(42.7%)。经过醇变性后, α -螺旋的含量

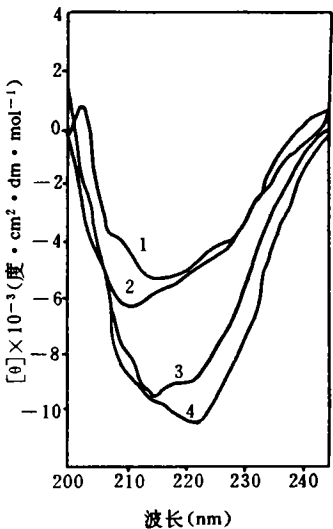


图 1 不同浓度乙醇溶液中大豆蛋白的圆二色性谱图

1 20%乙醇 2 0%乙醇 3 40%乙醇 4 60%乙醇

从 15.8% 增加至 35%, 这说明醇变性后大豆蛋白的结构变得更加有序, 符合 Tanford 提出的有机溶剂变性蛋白质的结构特征^[7]。

然而, 如在醇变性之前, 先用 NaOH 溶液将 11S 大豆蛋白的原有结构全部破坏, 则这种碱处理-醇变性产物的 α -螺旋构象将可达到 70% 左右^[8], 比天然大豆蛋白醇变性产物的 α -螺旋高得多。这说明天然大豆蛋白分子内部结构的内聚力较大, 不能被醇分子所破坏, 其结构不会随着醇变性的进行而改变。

从表 1 可知, 在 20% 乙醇浓度时 α -螺旋的比例达到最小值, 在此之后, 随着醇浓度增大 α -螺旋逐渐增加, 因此, 大豆蛋白变性过程中经过了一个中间态(20% 乙醇浓度), 在这种状态时, 大豆蛋白的原有结构被破坏, 呈现一种比天然大豆蛋白更加无序的状态。

2.2 醇变性对大豆蛋白分子形状及柔性的影响

图 2 为 11S 大豆球蛋白在不同浓度乙醇溶液中的 Perrin 图, 在乙醇溶液中 $1/P \sim 1/3 \sim T/\eta$ 关系在较低温度下(40~50℃)即偏离直线, 说明乙醇可增强温度对蛋白质结构的影响, 符合有关醇溶液中蛋白质变性温度降低的报道^[10]。

从图 2 计算得到大豆蛋白旋转弛豫时间(见表 2)。

表 2 不同浓度醇溶液中大豆蛋白的弛豫时间

%乙醇浓度 (V/V)	P_0	$\rho_h \times 10^7$ (s)	$\rho_0 \times 10^7$ (s)	β	$\tau \times 10^8$ (s)
0	0.293	3.44	3.03	1.135	1.2
20	0.324	0.676	4.17	0.162	1.2
40	0.353	0.319	7.34	0.0435	1.0
60	0.359	0.231	5.00	0.0462	0.8
80	0.319	0.229	4.14	0.0553	0.8

11S 大豆蛋白质的 β 值为 1.135, 表明天然大豆蛋白接近于球体, 同时, 蛋白分子内肽链段运动受到限制。符合 11S 大豆球蛋白结构模型^[11]。在乙醇溶液中, 11S 大豆球蛋白的 ρ_h 明显降低, 且 β 值远小于 1, 说明醇变性后, 大豆蛋白分子内肽链段运动自由度迅速增长, 从而证明醇变性使大豆蛋白的柔性增加。

醇变性使大豆蛋白分子柔性增加的主要原因包括: 分子内疏水作用被削弱; 醇溶液介电常数较小使带相同电荷基团的静电排斥力增加。从表 2 可看出, ρ_h 在 0~20% 浓度范围内的变化较大, 正对应于天然大豆蛋白分子转变为无序中间态, 表明大豆蛋白质原有构象的破坏导致蛋白质柔性增加。

2.3 醇变性过程中蛋白分子三级结构的变化

图 3 为 11S 大豆球蛋白在乙醇溶液(30% V/V)中的紫外差示光谱图, 从图中可看到, 在 275~285nm 和 230nm 处各有一个正吸收峰。

在紫外差谱中, 正峰是发色基团所处环境从极性(折射率小)向非极性(折射率大)变化中产生, 从非极性向极性变化时则产生负峰^[12]。一般情况下, 蛋白质变性时, 伴随着肽链的伸展, 将处于分子内部疏水区的生色基团暴露到水中, 因而产生负的差谱峰(见图 4)。

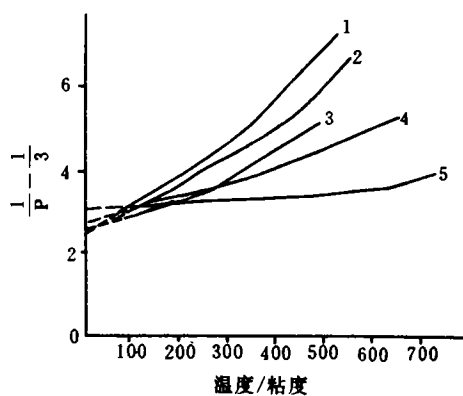


图 2 11S 大豆球蛋白在不同浓度乙醇溶液中的 Perrin 图

1 40%乙醇 2 60%乙醇 3 80%乙醇
4 20%乙醇 5 0%乙醇

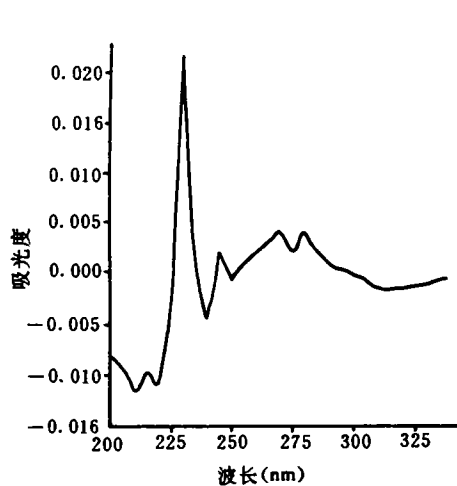


图3 11S大豆球蛋白的乙醇变性
紫外差示谱图

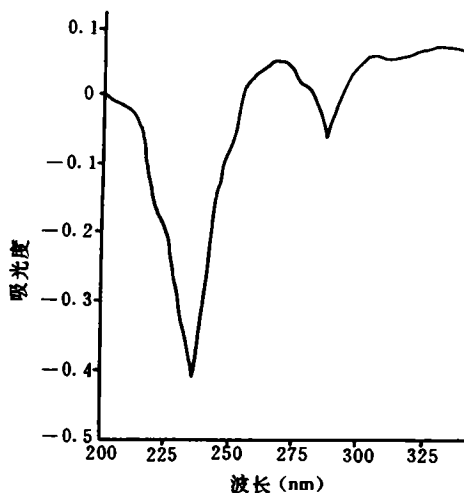


图4 11S大豆球蛋白的6mol/L尿素溶液
紫外差示谱图

由于圆二色性及荧光偏振都证明大豆蛋白在醇溶液中确已被变性;而尿素变性的紫外差谱图(图4)表明 Tyr 和 Trp 基团并不是处于强极性区域中,因此,对紫外差谱出现正峰的唯一解释是大豆蛋白醇变性时仅仅是分子外层结构发生了变化,但分子内部疏水核的变化较小。这表明大豆蛋白疏水核心具有独特的结构,基团间除疏水键外,还包括氢键力和静电作用力。尿素同时影响疏水键和氢键作用,从而可以破坏疏水核心,出现负差谱峰。相反,醇溶液虽然可削弱疏水作用力,但氢键力和静电作用力反而得到加强,保证疏水核不被破坏,因而大豆蛋白的醇变性是一种局部变性。

图5中曲线表示11S大豆球蛋白的醇变性的紫外差吸收 ΔA 与乙醇浓度的关系。从图中可看出,曲线在10%~20%浓度范围内出现一个拐点,对应于大豆蛋白从天然态转变为中间态。然而 ΔA 始终随着乙醇浓度增加而增大,表明大豆蛋白醇变性后仅使分子外层的结构被破坏,否则, ΔA 将在该点出现一个由正到负的转折点。

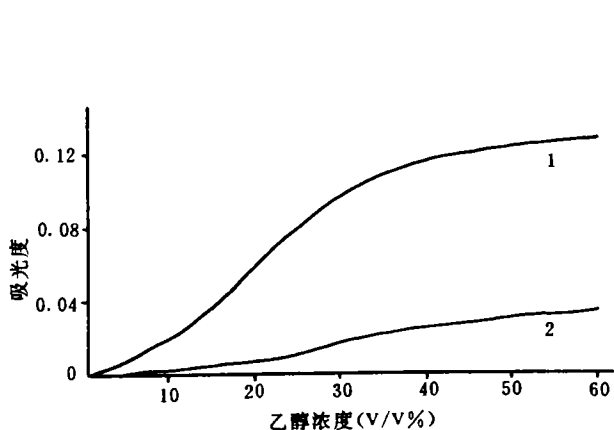


图5 醇变性紫外差吸收与醇浓度的关系
1 230nm 2 283nm

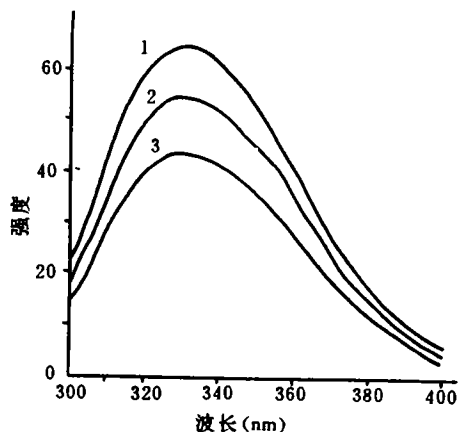


图6 11S大豆球蛋白的荧光发射谱图
1 60%乙醇 2 40%乙醇 3 0%乙醇

图 6 是 11S 大豆球蛋白的荧光发射光谱,激发波长为 280nm,其最大发射波长 λ_m 为 332nm. λ_m 与生色基团在蛋白质分子中所处位置紧密相关^[6] 若发射波长 λ_m 为 330 ~ 333nm,表明生色基团位于蛋白质疏水区域内,若 λ_m 为 340 ~ 342nm,说明生色基团位于蛋白质的极性区域,基团可能被结合水包围;若发射波长为 350~353nm,则表示基团所处微环境已同游离 Trp 相似。由于 11S 大豆球蛋白的荧光发射波长为 332nm,说明生色基团(至少部分)位于蛋白质的疏水区域。

从图中可看出, λ_m 基本不变化,说明生色基团所处环境无变化,进一步证实了蛋白质的疏水核心未被破坏。然而荧光强度随着乙醇浓度增大而显著变化。与荧光发射波长不同,荧光强度取决于温度,粘度,pH,溶剂极性条件。随着乙醇的加入,使粘度增大,极性降低,从而增大荧光强度。

2.4 大豆球蛋白醇变性机理

上述各项实验结果表明,大豆蛋白醇变性是一种局部变性,因此,至少在两方面与 Fukushima 所提出的“油滴”模型不相符,其一,大豆蛋白醇变性为“三态”过程,即天然态→中间态→高螺旋态,而在“油滴”模型中为“二态”过程,即天然态→变性态;其二,大豆蛋白醇变性疏水核未遭破坏,“油滴”模型则认为疏水核已被瓦解,疏水基团全部暴露在分子表面。由此可见,Fukushima 的“油滴”模型不能正确地解释大豆蛋白醇变性,必须在实验的基础上,建立新的大豆醇变性模型。

通过热力学分析,并总结前述实验结果可知,大豆蛋白醇变性应包括以下几个过程:

1) 天然大豆蛋白是由亲水基团组成的外壳和疏水基团组成的核心,在水溶液中,蛋白质外壳水化,因此,体系是稳定的 ($\Delta G \leq 0$),蛋白质处于天然态。

2) 加入乙醇后,由于醇分子与亲水外壳无法形成疏水键,因而不能吸附在蛋白质表面,在蛋白质—主体溶液界面上形成一乙醇浓度梯度,体系变得不稳定, ($\Delta G > 0$),迫使蛋白质分子改变结构,吸附更多的醇分子。这时亲水外壳的结构变得松散、无序,使醇分子能穿越亲水层吸附到疏水核心上。由于乙醇浓度梯度消失,体系趋于稳定。另一方面,由于大豆蛋白的疏水核心非常稳定,其结构不会因醇分子的吸附而瓦解。蛋白质处于无序的中间态。

3) 若乙醇浓度进一步增大,上述平衡又一次被打破,由于在疏水核心上吸附的醇分子已经饱和,蛋白质分子已不可能再通过增加醇吸附点的方式建立平衡,唯一途径将是减少蛋白分子的水化点,这将可能提高蛋白分子吸附醇分子的相对浓度。因此,松散无序的亲水外层将转变为 α -螺旋结构,因为在这种构象中肽键将相互之间形成氢键而无法大量水化,从而蛋白质分子成为高螺旋状态。

以上过程可以认为是大豆蛋白醇变性的“溶剂吸附”模型,这一模型提出:

1) 醇变性的“驱动力”主要是蛋白分子—溶剂界面与主体溶液之间因醇浓度不同而产生的自由能差。

2) 醇变性过程是“三态”(天然态,中间态,和变性态)过程,区别于其他“二态”(天然态和变性态)变性过程。

3) 大豆蛋白醇变性时疏水核未破坏,区别于一般变性分子是由紧密球状转向松弛棒状。

4) 醇变性使分子成为高螺旋状态,区别于一般变性是分子有序转向无序。

参 考 文 献

- 1 Wu Y V, Inglet G E. J. Food Sci. 1974,39:219
- 2 Fukushima D. Cereal Chem. 1969,46:156
- 3 Thanh V H, Shibasaki K. J. Agric. Food Chem. 1976,24:1117
- 4 Chang C T, et al. Anal Biochem 1978,91:12
- 5 Steiner R F, Edelhoch H. J. A. C. S 1962,84:2193
- 6 Demchenko A P. Ultraviolet Spectroscopy of Protein Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 1986
- 7 Tanford C. In Advance in Protein Chemistry. 1968,21:121
- 8 Koshiyama I, Fukushima D. Cereal Chem. 1973,50:115
- 9 Cann J. J. A. C. S. 1953,75:4213
- 10 Schrier E E, Ingwall, et al. J. Phys. Chem. 1965,69:298
- 11 Badley R A, et al. Biochim. Biophys. Acta 1975,412:214
- 12 Hamagkch K, Kurono A. J. Biochem. 1963,54:497

Structure and Physicochemical Properties of Alcohol Denatured Soy Protein

Hua Yufei Gu Wenying Shen Peiying Liu Fuguang

(School of Food Science & Technology)

Abstract Circular dichroism(CD) demonstrated that the content of α -helix conformation of alcohol denatured soy protein increased, fluorescence polarization analysis showed that, after alcohol denaturation, the peptide chain became more flexible. On the other hand, UV difference spectroscopy did not give negative peaks and the fluorescence emit wavelength did not shift toward red end. The results led to the conclusion that soy protein undergoes a kind of "partial denaturation, in which the hydrophobic core of soy protein remains intact while the conformation of the hydrophilic shell has been changed. Theoretical elucidation of soy protein alcohol denaturation by solvent preferential binding was attempted.

Subject-words Soybean; Protein; Conformation