

# 亚油酸氧化诱导大豆分离蛋白氧化对其结构的影响

陈曦,汪娟,孙为正\*

(华南理工大学 食品科学与工程学院,广东 广州,510641)

**摘要** 利用脂肪氧合酶催化不同底物浓度亚油酸氧化大豆分离蛋白,通过测定氧化后大豆分离蛋白的羰基值、巯基、表面疏水性、内源荧光以及凝胶电泳等指标,对氧化修饰后大豆分离蛋白的结构进行分析,并通过分析氧化后大豆分离蛋白在不同溶剂中溶解性能表征其分子间相互作用力。结果表明,随体系中亚油酸浓度的增加,大豆分离蛋白羰基含量增加 56.3%,总巯基和游离巯基含量降低,表面疏水性呈先增大后减小趋势,内源荧光强度降低,发生先红移后蓝移现象,大豆分离蛋白粒径先减小后增大,主要分布于 5~40 nm 之间,蛋白质氧化过程发生去折叠和重聚集,蛋白质交联中存在非二硫键共价键生成。

**关键词** 蛋白质氧化;大豆分离蛋白;分子结构;亚油酸氧化

大豆分离蛋白(SPI)是重要的植物蛋白质之一,富含多种氨基酸,其营养价值可与优质的动物性蛋白质相媲美<sup>[1]</sup>。大豆分离蛋白被广泛应用于脂质丰富的食品中,是大豆制品的主要成分之一,能够有效提高该类食品的质量品质。在酶促和非酶促条件下不饱和脂肪酸容易发生氧化,脂质过氧化反应产生自由基以及过氧化物,可与食品中蛋白质发生反应,引起蛋白质的氧化<sup>[2]</sup>。大豆中富含脂肪氧合酶(EC1.13.11.12, Lipoygenase, LOX),可直接作用于含 1,4-顺,顺-戊二烯结构的多不饱和脂肪酸;亚油酸(顺,顺-9,12-十八(碳)二烯酸)是大豆中主要的多不饱和脂肪酸之一。亚油酸在脂肪氧合酶的催化下可产生大量活性氧自由基和具活性的次生氧化产物,从而引起大豆蛋白氧化<sup>[3]</sup>。食品工业中大豆经低温脱脂后仍然会有脂质残留,且脂肪氧合酶未完全失活,脂肪氧合酶可造成残留脂质氧化,从而对大豆蛋白相关产品的质量品质产生不利影响<sup>[1]</sup>。

针对大豆分离蛋白的氧化,陈楠楠等研究了烷过氧自由基(ROO·)和丙二醛对大豆分离蛋白结构的影响<sup>[3-4]</sup>。吴伟等也分别研究了烷过氧自由基、丙二醛和丙烯醛对大豆分离蛋白的影响<sup>[5-7]</sup>。结果表明,大豆分离蛋白经过氧化后结构发生显著变化,并且伴随蛋白质聚集体或蛋白质共价交联物的产生。不饱

和脂肪酸的过氧化反应是一个较为复杂的过程,通常可产生多种具有诱导蛋白质氧化的活性氧自由基等,脂肪氧合酶催化氧化亚油酸可产生相对复杂的活性氧自由基体系。黄友如等对脂肪氧合酶诱导亚油酸对大豆分离蛋白氧化进行了研究,结果表明,氧化可诱导大豆分离蛋白发生聚集<sup>[1,8-10]</sup>。由于体系复杂,其氧化分子机制仍不清晰。本文以脂肪氧合酶催化氧化多不饱和脂肪酸亚油酸模拟氧化大豆分离蛋白,表征氧化后大豆分离蛋白的结构,探究油脂氧化对大豆分离蛋白氧化的影响机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

低温脱脂大豆粕,山东;亚油酸,Aladdin;脂肪氧合酶,Sigma;其他化学试剂均为分析纯。

pHS-25 数显 pH 计,瑞士梅特勒-托利多公司;CS150NX 超速离心机,日本 HITACHI 公司;SP-721 可见分光光度计,上海精密仪器仪表有限公司;F-7000 荧光分光光度计,日本日立公司;Nano ZS 纳米粒度分布仪,英国 Malvern 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 大豆分离蛋白的制备

参考 CHEN 等<sup>[3]</sup>的方法并略加改进,将低温脱脂豆粕粉碎后与去离子水按 1:15(g:mL)混合后,使用 2 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.5。浸提 2 h 后在 4℃、8 000 g 下离心 20 min,取上清液用 2 mol/L HCl 调 pH 值至 4.5。静置后在 4℃、8 000 g 下离心 10 min,所得沉淀进行复溶,使用 2 mol/L NaOH 调 pH

第一作者:硕士研究生(孙为正教授为通讯作者,E-mail: fewzh-sun@scut.edu.cn)。

基金项目:“广东特支计划”科技创新青年拔尖人才项目(2014TQ01N538);广州市珠江科技新星专项(201610010105);中央高校基本科研业务费项目(2015ZM155)

收稿日期:2017-02-07,改回日期:2017-03-10

值至 7.0,然后在 4 ℃ 下透析 72 h,经冷冻干燥后即得大豆分离蛋白。

### 1.2.2 氧化大豆分离蛋白的制备

底物亚油酸(LA)溶液配制:取 1.5 g 亚油酸于烧杯中,依次加入 1 mL 5 mmol/L NaOH 溶液,10 mL 0.2 mol/L 的硼酸缓冲液(pH 9.0)和 2 滴 Tween 20,摇匀后使用 0.2 mol/L 的硼酸缓冲液(pH 9.0)进行定容(50 mL),LA 最终浓度为 0.107 mol/L。

配制 5% 的 SPI 溶液,用 2 mol/L NaOH 调 pH 值至 9.0。分别称 100 g 溶液置于 5 组编号为 1~5 的锥形瓶中,每组加酶液 10 mL,并分别加入 0、3、5、7、9 mL 底物亚油酸溶液,振荡混匀,在 25 ℃ 摇床中培养 6 h 后取出,迅速冷却至 0 ℃,用 2 mol/L HCl 调 pH 值至 4.5,在 4 ℃、5 000 g 下离心 30 min,取出沉淀物,按沉淀物:乙醇:正己烷 = 1 g:4 mL:2 mL 的比例浸提约 30 min,抽滤,将滤饼醇洗,并 90 ℃ 灭酶约 30 min。最后复溶,经冷冻干燥得到氧化大豆分离蛋白 SPI-1 至 SPI-5。

### 1.2.3 大豆蛋白羰基含量的测定

参考 WU 等<sup>[6]</sup>的方法(2,4-二硝基苯肼比色法)测定大豆分离蛋白经氧化后的羰基含量,消光系数为 22 000 mol/(L·cm),计算每毫克大豆分离蛋白羰基含量。

### 1.2.4 大豆蛋白巯基的测定

参考 WU 等<sup>[6]</sup>的测定方法。取 3 mL 的蛋白质溶液(4 mg/mL),加入 3 mL 0.1 mol/L、pH 8.0 含有 1 mmol/L 乙二胺四乙酸和 1% 十二烷基硫酸钠的磷酸盐缓冲液,室温下磁力搅拌 2 h 后 8 000 g 离心 20 min。取上清液测定总巯基和游离巯基的含量。

### 1.2.5 大豆蛋白表面疏水性的测定

采用 ANS 荧光探针法<sup>[11]</sup>,用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)稀释至蛋白浓度为 0.005~0.5 mg/mL 不等;荧光分光光度计激发波长 365 nm、发射波长 484 nm(狭缝均为 5 nm)。

### 1.2.6 大豆蛋白内源荧光的测定

参考 CHEN 等<sup>[4]</sup>的测定方法,将大豆蛋白分散于 0.01 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液中,磁力搅拌 2 h 后在 4 ℃、10 000 g 下离心 30 min,采用双缩脲法测定上清液中蛋白浓度,通过稀释使得上清液中蛋白浓度达到 0.1 mg/mL。采用荧光分光光度计在激发波长 295 nm 条件下得到 300~400 nm 之间的发射光谱,以 pH 7.0、0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液为空白。

### 1.2.7 粒径

将 SPI-1~5 溶解于 0.01 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液中,稀释到适当浓度(2 mg/mL),用纳米粒度分析仪测定氧化后大豆分离蛋白的粒径分布。

### 1.2.8 溶解度

参考 CHEN 等<sup>[3]</sup>的测定方法,将 SPI-1~5 分别分散在下列溶剂中:(a)磷酸盐缓冲液(PBS);(b)1% 十二烷基硫酸钠(SDS)+PBS;(c)8 mol/L 尿素+1% SDS+PBS;(d)20 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)+8 mol/L 尿素+1% SDS+PBS。在 25 ℃ 静置 10 h 后,将样品在 25 ℃、10 000 g 下离心 10 min,取上清液,用 BCA 法分析上清液中蛋白质浓度,在 d 组的上清液中加碘乙酰胺溶液进行稀释,来消除 DTT 对 BCA 蛋白测定的影响。上清液的蛋白质含量与初始蛋白质含量的比值即为蛋白质溶解度。

### 1.2.9 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

SDS-PAGE 参照 LAEMMLI 的方法<sup>[12]</sup>。分离胶质量分数为 12%,浓缩胶质量分数为 5%,电泳前将已和样品缓冲液混合的样品煮沸 5 min,并在 4 ℃、10 000 g 下离心 5 min,取 15 μL 上清液进样,凝胶电泳在恒流下进行,浓缩胶中电流为 20 mA,进入分离胶后增至 40 mA。

## 2 结果与分析

### 2.1 氧化大豆分离蛋白羰基含量、总巯基和游离巯基含量

羰基含量是被广泛用来衡量蛋白质氧化程度的重要指标之一<sup>[13]</sup>,如图 1 所示,SPI-1 的羰基含量为 4.17 nmol/mg 蛋白,这与 HUANG<sup>[8]</sup>的 4.31 nmol/mg 蛋白接近。随着底物亚油酸的浓度升高,羰基含量上升了 56.3%,表明大豆分离蛋白发生了显著的氧化。亚油酸的过氧化产生活性氧自由基和氢过氧化物等,自由基反应活性强,能直接引起大豆分离蛋白氧化,引起蛋白质主肽链的断裂而羰基化;自由基可与侧链

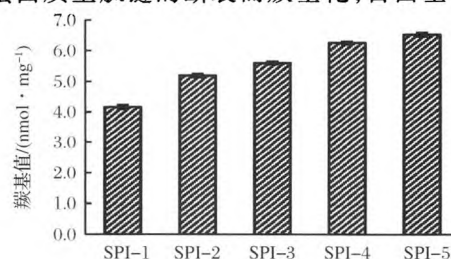


图 1 大豆分离蛋白羰基含量变化图

Fig. 1 Carbonyl group content of modified SPI

基团形成氢过氧化物,其在一定条件下生成具活性的羰基化合物,从而与蛋白质侧链发生共价交联,引起羰基化<sup>[14]</sup>,导致大豆分离蛋白结构发生变化。

半胱氨酸残基很容易受到攻击,引起巯基含量的变化,其是表征蛋白质氧化的重要指标之一,图2和图3分别为游离巯基和总巯基的变化情况。由图2可知,随着底物浓度的增加,大豆分离蛋白的游离巯基从SPI-1的3.79 nmol/mg减小到SPI-5的2.38 nmol/mg。由图3可知,总巯基也有下降趋势,其中SPI-4、SPI-5总巯基值下降尤为明显。半胱氨酸是容易受到氧化攻击的一种氨基酸,氧化会使半胱氨酸的氧化还原状态发生改变,影响蛋白质巯基和二硫键之间的交互反应平衡常数,进一步改变巯基及二硫键的含量以及分布情况<sup>[15]</sup>。EATON研究表明,蛋白质的巯基氧化有可逆与不可逆2种,可逆氧化会生成二硫键和次磺酸,不可逆氧化则主要生成磺酸和亚磺酸<sup>[16]</sup>。随底物浓度增加,总巯基含量减小幅度分别为0.326、0.445、2.254、1.806 nmol/mg,游离巯基含量减小幅度分别为0.495、0.271、0.206、0.437 nmol/mg,由此可以看出,在低底物浓度时,游离巯基变化量稍大,说明氧化过程中有巯基向二硫键转化,但是当底物浓度增加,总巯基变化量显著增大,说明这个氧化阶段中有非二硫键形式的化合物生成,这与WU等研究结果中对应指标都下降的结论相一致<sup>[7]</sup>。

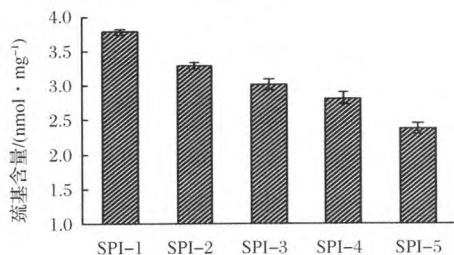


图2 大豆分离蛋白游离巯基含量变化图

Fig. 2 Free sulphhydryl content of modified SPI

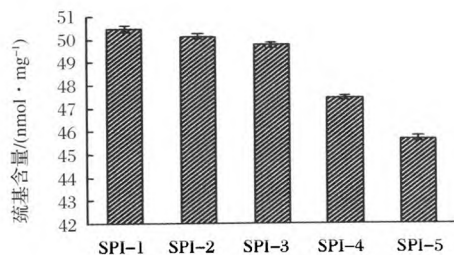


图3 大豆分离蛋白总巯基含量变化图

Fig. 3 Total sulphhydryl content of modified SPI

## 2.2 氧化大豆分离蛋白表面疏水性、内源荧光

疏水相互作用力是维持蛋白质三级结构的重要分子作用力之一<sup>[17]</sup>。表面疏水性的变化如图4所示,随着底物亚油酸浓度增加,大豆蛋白的表面疏水性呈现先增大后减小的趋势。HUANG等发现大豆蛋白氧化后表面疏水性会增加<sup>[8]</sup>,而WU等研究结果表明氧化会使大豆蛋白表面疏水性降低<sup>[7]</sup>。蛋白质氧化过程中球蛋白表面氨基酸先被氧化,疏水性基团变为亲水性基团,并且通过氢键和范德华力进入球蛋白内部,自由基进一步氧化球蛋白内部氨基酸残基,造成蛋白质去折叠,疏水基团暴露,引起蛋白质表面疏水性升高。随着氧化进行,暴露的疏水性基团可以通过疏水相互作用力引起聚集,表面疏水性降低。该结果说明氧化大豆分离蛋白的去折叠和聚集体形成的过程中结构发生了变化<sup>[18]</sup>。

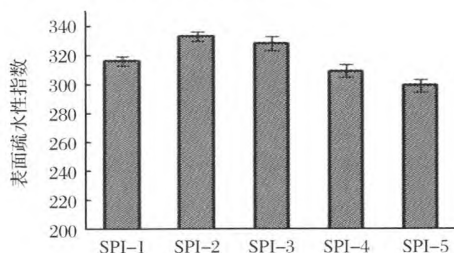


图4 大豆分离蛋白表面疏水性变化图

Fig. 4 Surface hydrophobicity of modified SPI

图5为氧化大豆分离蛋白内源荧光的变化图。

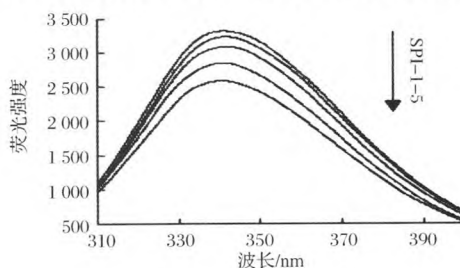


图5 大豆分离蛋白内源荧光变化图

Fig. 5 Fluorescent emission spectra of modified SPI

随着底物亚油酸浓度的升高,大豆分离蛋白的内源荧光强度持续降低,最大吸收波长 $\lambda_{\max}$ 先略微增大后又减小,分别发生红移和蓝移。内源荧光表征了大豆分离蛋白中色氨酸残基的氧化程度以及它所处微环境的变化。色氨酸具有低单电子氧化势能,极易被自由基通过夺氢反应而转化为不稳定的色氨酸自由基,进而氧化为过氧自由基,转化为犬尿氨酸,使内源荧光强度下降<sup>[11,19]</sup>。红移说明在蛋白质去折叠的过

程中色氨酸残基逐渐暴露在外环境中,而随着反应进一步进行,蛋白质的聚集可能使分子中的色氨酸残基回到分子中的非极性环境,从而导致其最大吸收波长  $\lambda_{\max}$  发生蓝移。本文蛋白质最大吸收波长变化与表面疏水性的分析结果相一致,再次证明氧化过程中大豆分离蛋白结构发生了去折叠和重新聚集的复杂变化。

### 2.3 氧化大豆分离蛋白的粒径分布

底物亚油酸的诱导氧化,使蛋白质的结构发生改变,粒径也随之改变,由图 6 可以看出,当底物浓度增加,大豆分离蛋白的粒径先减小, SPI-3 粒径达到最小,当浓度继续增加,粒径增大,最大氧化程度的 SPI-5 粒径略大于对照组 SPI-1,粒径上述变化趋势的原因可能是在氧化初始阶段,大豆分离蛋白去折叠分子展开,平均粒径减小,随着氧化程度加深,暴露的表面疏水性基团发生相互作用,导致大豆分离蛋白聚集体的形成,使平均粒径增大。这与表面疏水性(图 4)和内源荧光(图 5)变化相一致。

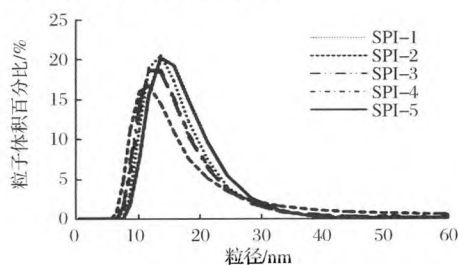


图 6 大豆分离蛋白的粒径变化图

Fig. 6 Particle size distribution change of modified SPI

### 2.4 氧化大豆分离蛋白分子间相互作用力分析

通过添加不同的试剂规避分子间作用力,通过溶解度的变化来分析大豆分离蛋白氧化后分子间作用力变化。由图 7 可以看出,相比 4 种溶剂, PBS 中蛋白质的溶解度明显低于其他 3 种溶剂,当依次加入 SDS、尿素、DTT,溶解度都有一定程度增加。在 PBS 中,随着底物浓度增加,溶解度降低,表明大豆分离蛋白结构发生了变化,影响其溶解度。添加 SDS 和尿素后,溶解度有很大提高, SDS 和尿素能够破坏氢键和疏水键等非共价键,同时,对比在 PBS 溶剂和含 PBS、SDS、尿素溶剂中溶解度增加量,分别为 27.77%、33.39%、39.43%、36.83%、36.48%,说明在氧化初期,大豆分离蛋白非共价的分子相互作用力较强。当溶剂中继续添加强还原剂 DTT,溶解度进一步增大,氧化程度高的增加越明显, DTT 能够裂解二硫键,说明氧化过程有二硫键生成, CHEN 等<sup>[3]</sup> 的研

究也得出在丙二醛诱导大豆分离蛋白氧化过程中生成二硫键。但是在底物浓度较高时,仍然有不溶物,说明此过程生成了非二硫键形式的共价化合物,这与巯基变化结果相一致。

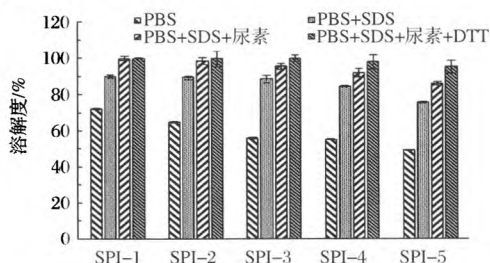


图 7 大豆分离蛋白在不同溶剂中溶解度

Fig. 7 Solubility of modified SPI in four types of solution

### 2.5 氧化大豆分离蛋白的 SDS-PAGE 分析

由电泳图 8 可知,空白组大豆分离蛋白 SPI-1 的电泳条带是  $\beta$ -伴大豆球蛋白和大豆球蛋白亚基的特征条带,随着氧化程度加深,有大分子聚集物产生。 $\beta$ -伴大豆球蛋白亚基  $\alpha'$  和  $\beta$  条带变模糊,在 A、B 亚基条带变浅,说明在氧化过程中 7S、11S 受到攻击,可能脂质与蛋白质结合,或者是大豆分离蛋白亚基之间的共价交联,并且随着蛋白质氧化加深,在聚集过程中形成了可溶性的聚集体<sup>[10]</sup>。

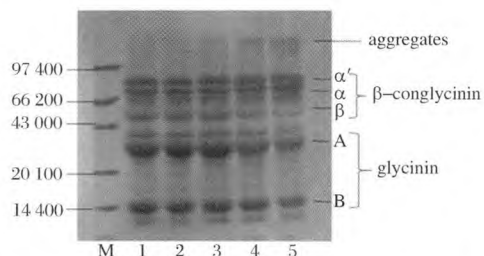


图 8 大豆分离蛋白的 SDS-PAGE (M 为标准蛋白, 1-5 分别对应 SPI-1 ~ 5)

Fig. 8 SDS-PAGE analyses of modified SPI

## 3 结论

亚油酸氧化引起大豆分离蛋白氧化,进而引起蛋白结构改变,随着氧化程度加深,蛋白质表面疏水性呈现先增大后减小趋势,内源荧光发生先发生小幅红移,后发生蓝移现象,蛋白粒径先减小后增大,上述变化表明蛋白质氧化过程中先发生去折叠后聚集。大豆分离蛋白在不同溶剂中溶解度变化和凝胶电泳图谱表明蛋白质分子结构发生了改变,氧化过程中形成了以非二硫键形式的共价键键合的蛋白聚集体。



## 参 考 文 献

- [1] 黄友如,华欲飞,袁爱泳. 脂质氧化诱导的大豆蛋白质聚集机理的研究[J]. 中国粮油学报, 2006(1): 80-87.
- [2] CHAMULITRAT W, MASON R P. Lipid peroxy radical intermediates in the peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenase. Direct electron spin resonance investigations[J]. J Biol Chem, 1989, 264(35): 20 968-20 973.
- [3] CHEN N, ZHAO Q, SUN W, et al. Effects of malondialdehyde modification on the *in vitro* digestibility of soy protein isolate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(49): 12 139-12 145.
- [4] CHEN N, ZHAO M, SUN W, et al. Effect of oxidation on the emulsifying properties of soy protein isolate[J]. Food Research International, 2013, 52(1): 26-32.
- [5] WU W, HUA Y, LIN Q. Effects of oxidative modification on thermal aggregation and gel properties of soy protein by malondialdehyde[J]. J Food Sci Technol, 2014, 51(3): 485-493.
- [6] WU W, WU X, HUA Y. Structural modification of soy protein by the lipid peroxidation product acrolein[J]. LWT-Food Science and Technology, 2010, 43(1): 133-140.
- [7] WU W, ZHANG C, KONG X, et al. Oxidative modification of soy protein by peroxy radicals[J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 295-301.
- [8] HUANG Y, HUA Y, QIU A. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation[J]. Food Research International, 2006, 39(2): 240-249.
- [9] WU W, HOU L, ZHANG C M, et al. Structural modification of soy protein by 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid. [J]. European Food Research and Technology, 2009, 229(5): 771-778.
- [10] 黄友如. 脂肪氧合酶催化亚油酸诱导大豆蛋白聚集机理[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [11] 吴伟, 邓克权, 华欲飞, 等. 脱脂豆粕预处理对大豆球蛋白结构的影响[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(5): 19-23.
- [12] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5 259): 680-685.
- [13] 蔡勇建, 叶建芬, 吴晓娟, 等. 米糠贮藏时间对米糠蛋白功能性质影响[J]. 粮食与油脂, 2015(6): 31-34.
- [14] SIMAT T J, STEINHART H. Oxidation of free tryptophan and tryptophan residues in peptides and proteins[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46(2): 490-498.
- [15] TSUMURA K, SAITO T, KUGIMIYA W, et al. Selective proteolysis of the glycinin and  $\beta$ -conglycinin fractions in a soy protein isolate by pepsin and papain with controlled pH and temperature. [J]. Food Sci Biotechnol, 2004, (69): 363-367.
- [16] EATON P. Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 40(11): 1 889-1 899.
- [17] 王玲, 朱秀清, 李佳栋, 等. 低温冷冻条件对大豆分离蛋白分散液表面疏水性及二硫键的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(7): 28-32.
- [18] 吴伟, 林亲录, 华欲飞. 脂质氢过氧化物氧化修饰对大豆蛋白去折叠和复折叠性质的影响[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(7): 17-21.
- [19] STADTMAN E R, LEVINE R L. Protein oxidation[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2000, 899(1): 191-208.

## Effect of protein oxidation induced by linoleic acid oxidation on the structure of soy protein isolate

CHEN Xi, WANG Juan, SUN Wei-zheng\*

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

**ABSTRACT** Soy protein isolate (SPI) oxidation was induced by lipoxygenase-catalyzed linoleic acid. Protein carbonyl content, sulfhydryl content, surface hydrophobicity, intrinsic fluorescence, and gel electrophoresis were tested to evaluate the effect of protein oxidation of SPI. The solubility of SPI in different solvents was also analyzed to elaborate the inter- and intra-molecular interactions. Results indicated that with the increase of linoleic acid substrate, carbonyl value significantly increased, total sulfhydryl and free sulfhydryl group content decreased, surface hydrophobicity increased and then decreased, intrinsic fluorescence decreased, red shift of SPI was first observed and then blue shifted, the particle size of SPI decreased and then increased and was in the range 5-40 nm. The SPI oxidation caused protein unfolding and aggregation, and non-disulfide covalent bond generated.

**Key words** protein oxidation; soy protein isolate; molecular structure; linoleic acid oxidation