

内源性蛋白酶对花生蛋白纤维化凝胶的影响

张宏声, 陈业明, 华欲飞, 孔祥珍, 张彩猛, 李兴飞

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:花生含有内源性蛋白酶可以水解花生蛋白,主要探究该水解作用对花生蛋白纤维化凝胶形成的影响。研究发现花生内源性蛋白酶可在 pH 2~5 下水解花生蛋白,尤其是 Ara h 1。在 pH 3 时,内源性蛋白酶对花生蛋白的水解作用最强,可生成相对分子质量分别为 25、19、17、13 kDa 和 12 kDa 的多肽产物;且在 pH 3 时可形成透明凝胶,而其他 pH 均不可。以 100 g/L 的蛋白溶液体系(反应条件为 pH 3、60 °C)为对象,通过蛋白酶抑制剂对比实验,确定起主导水解作用的是天冬氨酸蛋白酶,该酶导致的花生蛋白水解对于透明凝胶形成起主导作用。透射电子显微镜结果显示,上述透明凝胶的确为纤维状蛋白所形成,此蛋白纤维的直径小于 10 nm,长度超过 1 μm。同时通过考察蛋白质量浓度对透明凝胶形成的影响发现,100 g/L 的蛋白溶液可在 6 h 内形成透明凝胶,50 g/L 的蛋白溶液可在 12 h 形成,而 25 g/L 的蛋白溶液在 24 h 也不能形成。研究为纤维状食源蛋白的制备提供了新思路,并且制备条件较为温和,有利于实际运用。

关键词:花生蛋白;内源性蛋白酶;蛋白纤维化;凝胶

中图分类号:TS201.2;TS229

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2020)12-0012-05

Effects of endogenous proteases on peanut protein fibrosis gel

ZHANG Hongsheng, CHEN Yeming, HUA Yufei, KONG Xiangzhen,
ZHANG Caimeng, LI Xingfei

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Peanut contains endogenous protease which can hydrolyze peanut protein. The effect of hydrolysis on the formation of peanut protein fibrosis gel was explored. The study found that peanut endogenous protease could hydrolyze peanut protein at pH 2 - 5, especially Ara h 1. At pH 3, endogenous protease had the strongest hydrolysis effect on peanut protein, and could produce peptide products with relative molecular weights of 25, 19, 17, 13 kDa and 12 kDa. The transparent gel could be formed at pH 3, but no other pH was possible. 100 g/L protein solution system (reaction conditions: pH 3, 60 °C) was used as the object, it was determined by a protease inhibitor comparison experiment that aspartic protease was the dominant endogenous protease in hydrolysis and the peanut protein hydrolysis caused by this enzyme played a dominant role in the formation of transparent gels. Transmission electron microscopy results showed that the above transparent gel was indeed formed by protein fiber. The protein fiber had a diameter of less than 10 nm and a length of more than 1 μm. In addition, the effect of protein mass concentration on the formation of transparent gels was investigated. The results showed that 100 g/L protein solution could form transparent gel within 6 h, 50 g/L protein solution could form in 12 h, and 25 g/L protein solution could not form transparent gel in 24 h. The

收稿日期:2020-02-05;修回日期:2020-08-31

作者简介:张宏声(1992),男,硕士研究生,研究方向为油脂与植物蛋白(E-mail)zhsjiangnan@163.com。

通信作者:陈业明,副教授,博士(E-mail)chenyeming19821213@163.com。

study provided a new idea for the preparation of fibrous food-borne protein, and the preparation conditions were milder and more conducive to practical application.

Key words: peanut protein; endogenous protease; protein fibrosis; gel

许多食源蛋白,包括乳清蛋白^[1]、大豆蛋白^[2]、燕麦蛋白^[3]和卵蛋白,已经被证实在 pH 2 和高温(80~90℃)下可发生纤维化,并通过静电作用、范德华力、氢键、疏水作用等相互作用形成凝胶。由于其优良的生物相容性和生物降解性,该凝胶可广泛应用于食品(如增稠)和药品(如生物活性成分的载体)领域。有研究表明,乳清蛋白纤维化后,黏度和凝胶性显著增强,在食品加工中可以作为良好的凝胶剂和增稠剂^[4]。纤维化蛋白可对功能性成分起到保护、增溶和递送等作用^[5]。纤维化蛋白还可运载抗肿瘤药物,实现对肿瘤的靶向治疗,也可以搭载检测材料,对肿瘤做早期诊断^[6]。另外,科学家们已经利用纤维化蛋白开发出新一代生物传感器^[7]。

研究证实蛋白质发生纤维化需要一个前提:蛋白需水解生成多肽产物——纤维化蛋白的组装单元^[8]。Wilson 等^[9]研究发现,花生发芽过程中,内源性蛋白酶可水解自身蛋白。基于此,本研究将系统考察未发芽状态下花生内源性蛋白酶对于自身蛋白的水解作用,并考察多肽产物是否可形成纤维化蛋白。同时,考察蛋白质量浓度对于纤维化蛋白形成的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

花生,购于山东聊城。浓盐酸、三羧基氨基甲烷、甲醇、甘油、十二烷基硫酸钠(SDS)、硫酸钾、硼酸、无水硫酸铜、浓硫酸,购于国药集团化学试剂有限公司;磷钨酸、抑肽素(Pepstatin A,天冬氨酸蛋白酶抑制剂),购于 Sigma-Aldrich 公司。

Himac CR21G II 型冷冻离心机,日本日立公司;MODEL BE-210 型垂直电泳仪,日本 BIO CRAFT 公司;凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司;K9840 半自动凯氏定氮仪;MCR301 旋转流变仪,奥地利安东帕有限公司;Optima XPN 型超速离心机,贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司;Jem-2100 型透射电子显微镜,日本电子株式会社。

1.2 实验方法

1.2.1 花生蛋白的制备

根据陈雅静^[10]的方法,称取 50 g 花生,加入 450 g 去离子水,置于冰箱(4℃)浸泡 18 h。手工去红衣后,去离子水清洗 3 次。去红衣花生仁中加去离子水至总质量 300 g,15 000 r/min 下打浆 2 min,4 层纱布过滤除渣,得到花生浆。花生浆通过离心(4℃,7 000 r/min,15 min)可分成上浮 I、清液 I 和沉淀 I。离心可使花生浆中的大部分油脂进入上浮 I,淀粉等颗粒状成分进入沉淀 I,而蛋白成分主要集中在清液 I 中。

对清液 I 进行超速离心(4℃,50 000 r/min,30 min),可分成一层薄薄上浮 II(清液 I 中的残留油脂)、清液 II(清液 I 中的可溶性糖、离子、游离氨基酸和小肽等成分)和沉淀 II(主要为花生球蛋白)。沉淀 II 的蛋白质含量为 50.14%(凯氏定氮法),为本研究的花生蛋白原料。在沉淀 II 中加入去离子水,配成 100、50 g/L 和 25 g/L 的花生蛋白溶液。溶液呈现透明状态,说明油脂脱除充分。

1.2.2 pH 对内源性蛋白酶水解花生蛋白的影响

将 25 g/L 蛋白溶液分成 6 等份,利用 1 mol/L 盐酸溶液将其 pH 分别调至 7、6、5、4、3、2,并于 60℃(本研究室已确定的内源性蛋白酶活性的较佳温度条件)水浴水解 4 h,冷却至室温,作为 Tricine-SDS-PAGE 分析的样品。

1.2.3 Tricine-SDS-PAGE 分析

将 1.2.2 所得样品的蛋白质量浓度调节为 4 mg/mL,并取 500 μL 加入等体积电泳样品溶解液搅拌均匀,加入 2% 二硫苏糖醇(DTT)搅匀,沸水浴中热处理 5 min,冷却至室温即可上样。

电泳胶的浓缩胶 4%,分离胶 16%。样品在进入浓缩胶之前电压为 30 V,进入分离胶后电压调为 100 V。电泳指示剂距分离胶前沿 0.5 cm 时关闭电泳仪,进行固定、染色、脱色。用凝胶成像仪拍照,Image Lab 4.0.1 软件分析条带的强度。

1.2.4 花生蛋白纤维化 pH 条件的初探

将 50 g/L 蛋白溶液分成 6 等份,利用 1 mol/L 或 2 mol/L 的盐酸溶液将其 pH 分别调至 7、6、5、4、3、2,在 60℃ 水浴水解 12 h,放入冰水浴,观察凝胶形成情况。

1.2.5 花生蛋白纤维化与内源性蛋白酶之间关系的确认

将 100 g/L 蛋白溶液分成 2 等份,一份中加入抑肽素(Pepstatin A)至终浓度为 100 μmol/L,另一份作为对照。用 2 mol/L 的盐酸溶液将上述溶液调节至 pH 3,在 60℃ 水浴热处理,并在 0、6、12 h 和 24 h 时,取样置于冰水浴冷却,随后置于 4℃ 保存。

利用上述对照样品的方法,将 50 g/L 和 25 g/L 的蛋白溶液进行处理,考察蛋白质量浓度对花生蛋白纤维化的影响。

1.2.6 透射电子显微镜观察

将待测样品用 pH 3 的盐酸溶液稀释至蛋白质量浓度为 0.25 g/L,同时将未水解花生蛋白稀释至蛋白质量浓度 10 g/L 并调节 pH 为 3。将稀释的样品滴加到专用铜网的碳膜上,尽量摊平,15 s 后用滤纸吸去多余的液体,用 1 mg/mL 的磷钨酸溶液进行处理,15 s 后用滤纸再次吸去多余液体,放入常温干

燥箱干燥,待样品干燥后进行透射电子显微镜观察,操作电压为 200 kV。

1.2.7 黏度分析

利用旋转流变仪分析黏度。测定参数为:剪切速率变化范围 $0.1 \sim 100 \text{ s}^{-1}$,测试过程中记录剪切应力,每 10 s 记录一个点,共计 60 个点。根据 Ostwald - Dewaele 方程对黏度曲线进行拟合,按下式计算蛋白溶液的表观黏度。

$$\eta_a = k\gamma^{n-1} \quad (1)$$

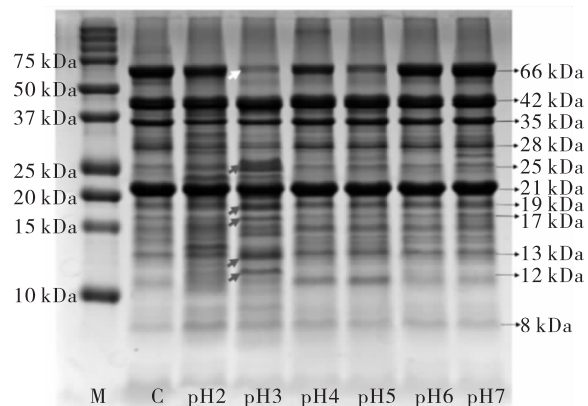
式中: η_a 为蛋白溶液表观黏度, $\text{Pa} \cdot \text{s}$; γ 为剪切速率, s^{-1} ; k 为黏度系数; n 为流变指数。 $n - 1$ 小于 0 说明体系为假塑性流体(剪切变稀); k 值越大,体系黏度越大。

1.2.8 数据处理

实验数据测定 3 次,使用 Excel 2016 处理数据求平均值,使用 Origin8.5 拟合曲线和绘图。

2 结果与分析

2.1 pH 对内源性蛋白酶水解花生蛋白的影响(见图 1)



注:M. 蛋白质标准品;C. 未处理花生蛋白;pH 2 ~ pH 7. 相应 pH 下 60°C 水解 4 h 的花生蛋白溶液。

图 1 不同 pH 条件下内源性蛋白酶对花生蛋白的水解

由图 1 可知,制备所得花生蛋白(泳道 C 的未处理花生蛋白)的主要成分为 Ara h 1 (66 kDa) 和花生球蛋白(42 kDa 条带为球蛋白酸性肽链,21 kDa 条带为球蛋白碱性肽链)。在 pH 2 ~ 5 的范围内,Ara h 1 发生明显的降解,尤其是在 pH 3。Wilson 等^[9]发现花生种子中内源性天冬氨酸蛋白酶可有效水解 Ara h 1,在 pH 2.6 ~ 3 时水解活性最强,与本研究相符。花生球蛋白的酸性肽链(42 kDa)和碱性肽链(21 kDa)在 pH 2 时降解最多,但降解程度不大,pH 3 时次之,其他 pH 不明显。在 pH 3 时,出现了最多的新条带和强度增强的条带(箭头),是花生蛋白酶解形成的多肽产物,相对分子质量分别为 25、19、17、13 kDa 和 12 kDa。

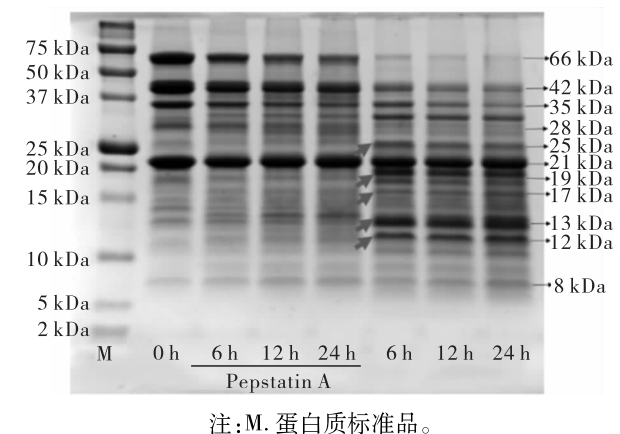
2.2 花生蛋白纤维化 pH 条件的初探

按 1.2.4 方法对 50 g/L 花生蛋白溶液进行

60°C 水浴水解 12 h 及冰水浴处理,结果显示,蛋白溶液只能在 pH 3 条件下形成透明状的凝胶,这应与 pH 3 时形成最多的多肽产物相关。另外,透明状凝胶的形成基本可说明花生蛋白纤维化的发生,此结果将在后续的研究中进行证明。后续研究将在 pH 3 和 60°C 条件下进行。

2.3 花生蛋白纤维化与内源性蛋白酶之间关系的确认

首先,利用 Tricine - SDS - PAGE 考察了抑肽素对内源性蛋白酶水解花生蛋白的影响,结果如图 2 所示。

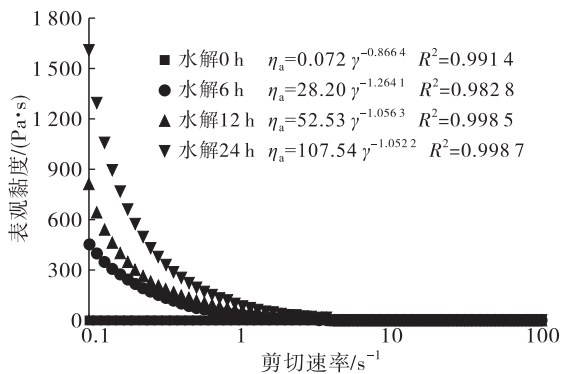


注:M. 蛋白质标准品。

图 2 抑肽素对内源性蛋白酶水解花生蛋白的影响

由图 2 可知,抑肽素可明显抑制 Ara h 1 和花生球蛋白的水解,但是 Ara h 1 和花生球蛋白还是发生了一定程度的水解。这与以下 3 个因素相关:①未被抑肽素抑制的天冬氨酸蛋白酶的水解作用;②其他种类的内源性蛋白酶的水解作用;③酸水解作用。对于第 2 个因素,是因为我们发现丝氨酸蛋白酶抑制剂和巯基蛋白酶抑制剂也具有一定的酶水解抑制作用。图 2 显示,未添加抑肽素的对照样品水解形成的多肽产物与图 1 相同。结果说明,在 pH 3 和 60°C 条件下,主要是天冬氨酸蛋白酶的水解作用生成多肽产物(25、19、17、13 kDa 和 12 kDa),而只有少量的酸水解。该结论也可由图 1 的结果所支持,因为 pH 3 时生成的多肽产物很有限和有规律。而酸水解比较随机,多肽产物多种多样。水解 24 h 和冰水浴后,添加抑肽素的 100 g/L 蛋白体系依然呈现流动状态,而对照样品则是结实的透明凝胶状态。另外,水解 6 h 的对照样品也形成了结实的透明凝胶。

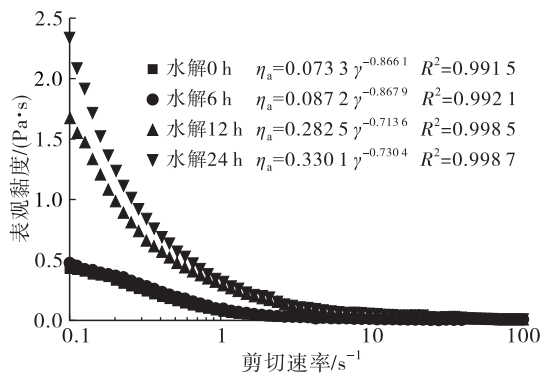
蛋白质形成纤维状结构后,其长径比将急剧增大。与蛋白质聚集体相比,纤维状结构可更有效地形成物理缠结网络,从而可急剧增大体系的黏度^[11]。因此,本研究通过测定花生蛋白溶液热处理过程中的黏度变化,初步确定花生蛋白是否发生了纤维化,结果见图 3。



注:反应体系为 100 g/L 蛋白溶液。

图3 内源性蛋白酶水解对蛋白溶液体系黏度的影响

由图3可知,花生蛋白溶液的初始黏度系数 k 为 0.072,6 h 后 k 增加至 28.20。此时,将花生蛋白体系置于冰水浴冷却,即可形成透明凝胶。随时间延长,蛋白体系的黏度持续增加,24 h 后 k 为 107.54。该结果明确显示,蛋白体系黏度发生了急剧的增大,与 Mohammadian^[12]、Zhang^[13] 等的研究结果相似。图4为蛋白溶液体系加入抑肽素后体系黏度变化情况。

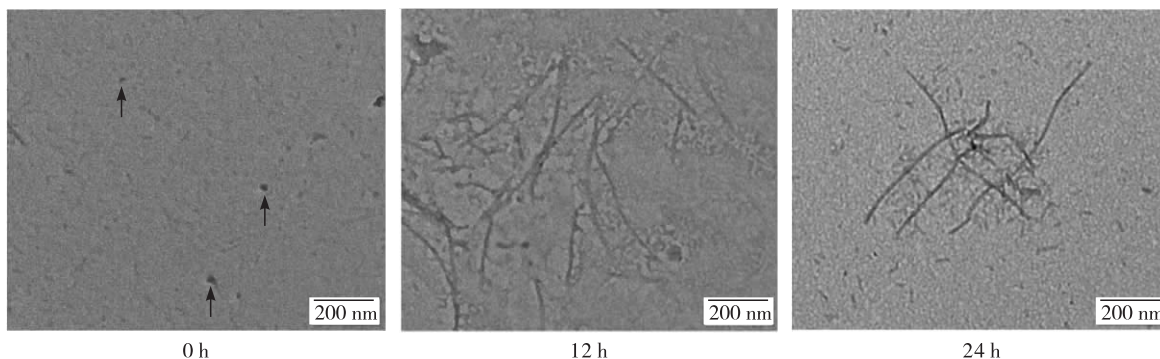


注:反应体系为 100 g/L 蛋白溶液。

图4 抑肽素对蛋白溶液体系黏度的影响

由图4可知,添加抑肽素的蛋白溶液体系初始黏度系数 k 为 0.0733,6 h 后 k 为 0.0872,即使是 24 h 后, k 也仅为 0.3301。以上结果分析可知:在 pH 3 和 60℃ 条件下,酸水解作用非常微弱,内源性蛋白酶导致的蛋白水解是多肽产物生成的主导因素,与上述推论相符;另外,可初步确定形成的透明凝胶是纤维状微结构。

2.4 花生蛋白透明凝胶的微观结构(见图5)



注:反应体系为 100 g/L 蛋白溶液;反应条件为 pH 3 和 60℃。

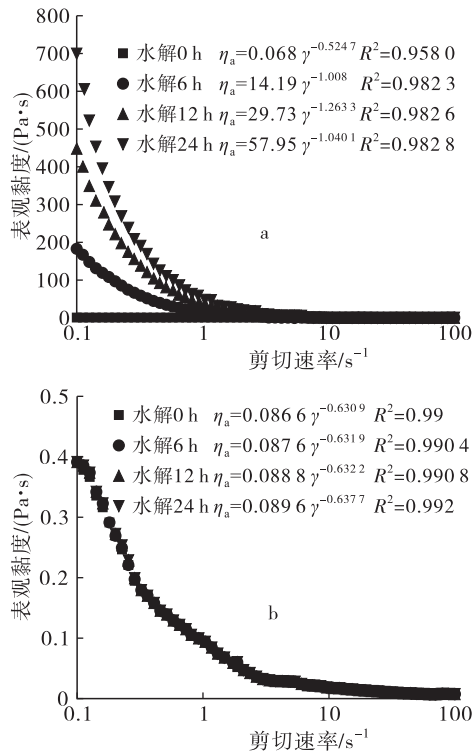
图5 花生蛋白纤维状结构的透射电子显微镜图

由图5可知,未水解的样品主要是一些球状的蛋白,大小在 10 nm 左右,与花生球蛋白尺寸大小相当,说明花生球蛋白基本保持原始的球状结构。水解 12 h 的蛋白体系中,蛋白组装形成了长度大于 1 μm、直径小于 10 nm 的纤维状结构,纤维之间出现了一些交叉和相互作用。水解 24 h 的蛋白体系中,纤维状结构出现增长的趋势,并且相互之间交错缠结。Sasso 等^[14] 制备的乳清蛋白纤维长度在 1 ~ 10 μm,直径在 2 ~ 10 nm 的范围内。大豆分离蛋白^[15]、菜豆蛋白^[16]、酪蛋白^[17] 和米糠蛋白^[13] 等自组装形成纤维的长度与直径基本都在此范围内。这些结果明确说明,在 pH 3 和 60℃ 条件下,内源性蛋白酶导致的花生蛋白水解,可形成纤维状结构的透明凝胶,其结构与 pH 2 和 80 ~ 90℃ 条件下得到的纤维状结构相似。

2.5 蛋白质量浓度对花生蛋白纤维化的影响(见图6)

Veerman 等^[18] 认为蛋白浓度增大,则意味着组装单元的浓度增大,从而增大了组装单元相互作用的概率,有利于蛋白纤维化。

由图6可知,蛋白质量浓度为 50 g/L 时,体系初始黏度系数 k 为 0.068,6 h 后 k 为 14.19,12 h 后 k 为 29.73,24 h 后 k 为 57.95。12 h 的样品在冰水浴静置后,可形成透明凝胶。该结果说明,50 g/L 蛋白溶液体系可形成纤维状结构的凝胶。蛋白质量浓度为 25 g/L 时,体系的初始黏度系数 k 为 0.0866,6 h 后 k 为 0.0876,12 h 后 k 为 0.0888,24 h 后 k 为 0.0896。24 h 的样品在冰水浴静置后,依然呈现液体状态,说明 25 g/L 蛋白溶液体系不能形成纤维状结构。



注:a. 反应体系为 50 g/L 蛋白溶液;b. 反应体系为 25 g/L 蛋白溶液;反应条件为 pH 3 和 60 °C。

图 6 内源性蛋白酶水解对蛋白溶液体系黏度的影响

3 结论

研究发现,在 pH 3 和 60 °C 时,内源性蛋白酶对花生蛋白的水解作用最强,可生成相对分子质量分别为 25、19、17、13 kDa 和 12 kDa 的多肽产物。此时,起主要水解作用的是天冬氨酸蛋白酶。在蛋白质量浓度为 100 g/L 时,水解 6 h 后可形成纤维化结构的透明凝胶,水解 12 h 蛋白纤维的直径小于 10 nm,长度超过 1 μ m。内源性蛋白酶水解花生蛋白对上述凝胶形成起主导作用,酸水解作用(pH 3、60 °C)非常微弱。蛋白质量浓度对于纤维化凝胶形成影响较大,在花生蛋白质量浓度为 50 g/L 和 100 g/L 时可形成凝胶,浓度越大,形成时间越短;蛋白质量浓度为 25 g/L 时水解 24 h 也不能形成凝胶,黏度几乎不变。

参考文献:

[1] MUDGAL P, DAUBERT C R, FOEGEDING E A. Kinetic study of β - lactoglobulin thermal aggregation at low pH [J]. J Food Eng, 2011, 106(2): 159 - 165.

[2] TANG C H, WANG C S. Formation and characterization of amyloid - like fibrils from soy β - conglycinin and glycinin [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(20): 11058 - 11066.

[3] 刘刚. 燕麦蛋白结构、自组装性质及其纳米纤维形成研究[D]. 广州:华南理工大学, 2011.

[4] AKKERMANS C, VAN DER GOOT A J, VENEMA P, et al. Properties of protein fibrils in whey protein isolate

solutions: microstructure, flow behaviour and gelation [J]. Int Dairy J, 2008, 18(10/11): 1034 - 1042.

[5] XU W, JIN W P, ZHANG C L, et al. Curcumin loaded and protective system based on complex of κ - carrageenan and lysozyme [J]. Food Res Int, 2014, 59: 61 - 66.

[6] LIU Y Y, MIYOSHI H, NAKAMURA M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles [J]. Int J Cancer, 2010, 120(12): 2527 - 2537.

[7] ZHANG Y W, LI Y Q, WU W J, et al. Chitosan coated on the layers' glucose oxidase immobilized on cysteamine/Au electrode for use as glucose biosensor [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 60: 271 - 276.

[8] MOHAMMADIAN M, MADADLOU A. Technological functionality and biological properties of food protein nanofibrils formed by heating at acidic condition [J]. Trends Food Sci Tech, 2018, 75: 115 - 128.

[9] WILSON K A, TAN WILSON A. Proteolysis of the peanut allergen Ara h 1 by an endogenous aspartic protease [J]. Plant Physiol Biochem, 2015, 96: 301 - 310.

[10] 陈雅静. 花生水相加工过程中内源性蛋白酶的作用机制研究[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2018.

[11] METZNER A B. Rheology of suspensions in polymeric liquids [J]. J Rheol, 1985, 29(6): 739 - 775.

[12] MOHAMMADIAN M, MADADLOU A. Cold - set hydrogels made of whey protein nanofibrils with different divalent cations [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 89: 499 - 506.

[13] ZHANG Y H, HUANG L H. Effect of heat - induced formation of rice bran protein fibrils on morphological structure and physicochemical properties in solutions and gels [J]. Food Sci Biotechnol, 2014, 23(5): 1417 - 1423.

[14] SASSO L, SUEI S, DOMIGAN L, et al. Versatile multi - functionalization of protein nanofibrils for biosensor applications [J]. Nanoscale, 2014, 6(3): 1629 - 1634.

[15] MORITZ L, ULLUWISHEWA D, HEALY J, et al. Evaluation of protease resistance and toxicity of amyloid - like food fibrils from whey, soy, kidney bean, and egg white [J]. Food Chem, 2016, 192: 491 - 498.

[16] TANG C H, ZHANG Y H, WEN Q B, et al. Formation of amyloid fibrils from kidney bean 7S globulin (Phaseolin) at pH 2.0 [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(13): 8061 - 8068.

[17] PAN K, ZHONG Q X. Amyloid - like fibrils formed from intrinsically disordered caseins: physicochemical and nanomechanical properties [J]. Soft Matter, 2015, 11(29): 5898 - 5904.

[18] VEERMAN C, SCHIFFART G D, SAGIS L M C, et al. Irreversible self - assembly of ovalbumin into fibrils and the resulting network rheology [J]. Int J Biol Macromol, 2003, 33(1/2/3): 121 - 127.