

# 花生分离蛋白氧化过程中的结构变化

## Structural evaluation of peanut protein isolates during oxidation by FTIR

叶林 廖钰 赵谋明

YE Lin LIAO Yu ZHAO Mou-ming

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology,  
Guangzhou, Guangdong 510640, China)

**摘要:**利用 2, 2-盐酸脒基丙烷(AAPH)在有氧条件下热分解产生的烷过氧自由基(ROO·),对花生分离蛋白进行不同程度的氧化修饰,采用傅里叶红外变换光谱,结合去卷积和曲线拟合技术,研究花生分离蛋白氧化过程中的二级结构变化。结果表明,经去卷积后花生分离蛋白红外光谱酰胺 I 带共分出 10 个峰,表征聚集体形成的 1 618, 1 682  $\text{cm}^{-1}$  的吸收值在氧化过程中升高,表明在氧化过程中形成了蛋白聚集体。利用曲线拟合对酰胺 I 带进行定量分析,结果表明,当 AAPH 浓度小于 3.00 mmol/L 时, $\beta$ -折叠和无规则卷曲含量升高,而  $\beta$ -转角和  $\alpha$ -螺旋含量下降;在高氧化浓度(5.00, 10.00 mmol/L)下,花生分离蛋白发生多肽链的断裂,进而影响其二级结构的变化。AAPH 的浓度不同,花生分离蛋白之间的分子相互作用强度不同。在花生分离蛋白聚集体形成中,氢键和疏水相互作用发挥着重要作用。

**关键词:**花生;分离蛋白;蛋白质氧化;结构;傅里叶变换红外光谱

**Abstract:** Peanut protein isolates (PPI) was oxidized by peroxy radicals derived from 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) and the secondary structure of oxidized PPI were evaluated. Structural changes of PPI were elucidated using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Fourier deconvolution combined with iterative curve fitting was used to analyze the amide I of FTIR. After deconvolved amide I FTIR bands, ten major bands associated with conformation of proteins were distinctly observed. Changes in the bands at 1 618  $\text{cm}^{-1}$  and 1 682  $\text{cm}^{-1}$ , which arise from the aggregated intermolecular  $\beta$ -sheets, indicated that protein aggregation

occurred during PPI oxidation. Quantitative analysis was obtained by iterative curve fitting. The results showed that there was an increase in  $\beta$ -sheet structure and random structures accompanied by a decrease in turns and alpha helix, with the increase of oxidizing agent (AAPH < 3.00 mmol/L). Higher level oxidation (5.00 and 10.00 mmol/L) would induce fragmentation through direct breakage of peptide bonds, resulted in changes in the secondary structures. The hydrogen bonds and hydrophobic interactions played an important role in the formation of PPI aggregates.

**Keywords:** peanut; protein isolate; protein oxidation; structure; FTIR

花生蛋白是优质的植物蛋白资源之一,具有丰富的营养价值和优越的功能特性,被广泛应用于食品工业中<sup>[1]</sup>。在花生蛋白加工与使用过程中,蛋白质氧化是影响其功能特性和结构特性的重要因素<sup>[2]</sup>。Ye Lin 等<sup>[2]</sup>利用 2, 2-盐酸脒基丙烷(AAPH)热分解产生烷过氧自由基(ROO·)研究了蛋白质氧化对花生分离蛋白结构、物化特性的影响,结果表明蛋白质氧化显著影响花生分离蛋白的表面疏水性、粒径大小及溶解性。蛋白质的结构是其功能特性的决定因素,蛋白质的消化性也与其结构变化密切相关<sup>[1,3]</sup>。因此,研究花生蛋白质氧化对其结构的影响,对深层次认识花生蛋白在食品加工、贮藏中的作用机制及营养价值的变化具有重要意义。

蛋白质结构的表征技术主要有傅里叶变换红外光谱法(FTIR)、激光拉曼光谱法(laser raman)、圆二色谱法(CD)等<sup>[4]</sup>,FTIR 是其中重要的表征技术。傅里叶红外光谱与之相应的傅里叶去卷积和二阶求导的分析,可用于蛋白质二级结构的定性、定量分析<sup>[5,6]</sup>。

本研究拟利用 2, 2-盐酸脒基丙烷(AAPH)热分解产生烷过氧自由基(ROO·)对花生分离蛋白进行氧化,利用傅里叶变换红外光谱表征氧化对花生分离蛋白结构的影响,为科学认识蛋白质氧化对其结构的影响提供理论依据。

**基金项目:** 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(编号:2013AA102201);“十二五”国家科技支撑计划项目(编号:2012BAD37B08);国家自然科学基金面上项目(编号:31171783)

**作者简介:** 叶林(1976—),男,华南理工大学在读博士研究生。  
E-mail:2374945257@qq.com

**通讯作者:** 赵谋明

**收稿日期:** 2014-11-27

## 1 材料与方法

### 1.1 原料及试剂

低温脱脂花生粕:山东天申生物蛋白有限公司;

AAPH:分析纯,日本和光纯药(Wako)公司;

氢氧化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠:分析纯,国药集团上海化学试剂公司;

其他试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

数显 pH 计:pHS-25 型,瑞士梅特勒-托利多公司;

超速离心机:CS150NX 型,日本 HITACHI 公司;

傅里叶变换红外光谱仪:Vector 33 型,德国 Bruker 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 花生分离蛋白的制备 脱脂花生粕与水 1 : 10 ( $m : V$ )混合,以 2 mol/L NaOH 调节体系 pH 至 8.0,浸提 1 h 后常温 3 000 × g 离心 15 min,得上清液以 2 mol/L HCl 调节 pH 至 4.5,离心后沉淀再用 2 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0,冷冻干燥,制得花生分离蛋白<sup>[7]</sup>。

1.3.2 花生分离蛋白的氧化 将制得的花生分离蛋白溶解于 0.01 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中,蛋白浓度为 25 mg/mL,其中含有 0.5 mg/mL  $\text{NaN}_3$ 。将一定质量的 AAPH 溶解于花生蛋白溶液中,使得 AAPH 的终浓度分别为 0.00,0.04,0.20,0.50,1.00,3.00,5.00,10.00 mmol/L,37 °C 避光条件下将混合液在恒温振荡水浴器中中速振荡反应 24 h。反应结束后将反应液置于冰浴中使温度迅速下降到 4 °C 以下,均匀取样 5 mL 备用。最后将反应液在 4 °C 去离子水中透析 72 h 以除去残余未反应的 AAPH,透析过程中每隔 6 h 更换一次去离子水,最后冷冻干燥得到 ROO· 氧化花生蛋白并于干燥皿中储藏备用。此外,另配置一份蛋白浓度为 25 mg/mL 的花生蛋白溶液,直接透析 72 h 后冷冻干燥,作为对照样品。

1.3.3 花生分离蛋白结构的测定 采用傅里叶红外变换光谱(FTIR)分析氧化前后花生分离蛋白的结构信息。准确称量 2 mg 的样品,加入 100 mg 溴化钾,研钵研磨均匀后压片,用红外光谱仪进行全波段扫描(400~4 000  $\text{cm}^{-1}$ ),扫描次数 128 次。红外光谱的数据处理采用 PeakFit 4.12 软件(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)和 Origin 8.0 软件(Origin-Lab Corp., Northampton, MA, USA)。

### 1.4 数据统计与分析

采用 SPSS 17.0 对数据进行分析处理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 花生分离蛋白酰胺 I 带结构指认

红外光谱图中的酰胺 I 带(1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$ )对蛋白质中的二级结构变化非常敏感,常用来测定蛋白质的二级结

构变化<sup>[6]</sup>。酰胺 I 带的红外光谱主要是由于蛋白质结构中的 C—O 的伸缩振动引起,C—N 的伸缩振动也会部分影响其图谱<sup>[6]</sup>。酰胺 I 带是由不同的蛋白质二级结构谱峰分量叠加而形成的,二阶求导和去卷积技术可以把原来蛋白质红外光谱的酰胺 I 带中未能分辨的峰进一步分解为若干子峰<sup>[8]</sup>。

图 1 为花生分离蛋白去卷积后的红外光谱的酰胺 I 带图谱。由图 1 可知:经去卷积后出现了 10 个与结构相关的峰,表明花生分离蛋白的二级结构非常复杂。结合花生分离蛋白结构特征及前人文献<sup>[9-11]</sup>,上述 10 个峰的对应结构信息指认见表 1。1 605~1 610  $\text{cm}^{-1}$  归属于蛋白质氨基酸残基(如酪氨酸);1 617~1 618  $\text{cm}^{-1}$  归属于分子间的  $\beta$ -折叠,被认为是引起蛋白质聚集体的结构;1 627~1 628  $\text{cm}^{-1}$  归属于分子内的  $\beta$ -折叠,也被认为是引起蛋白质聚集体的结构;1 637~1 639  $\text{cm}^{-1}$  归属于分子内的  $\beta$ -折叠结构;1 645~1 648  $\text{cm}^{-1}$  归属于无规则卷曲或者  $\alpha$ -螺旋结构;1 651~1 653  $\text{cm}^{-1}$  归属于  $\alpha$ -螺旋结构;1 660~1 662  $\text{cm}^{-1}$  归属于  $\beta$ -转角或者 loop 结构;1 672~1 673  $\text{cm}^{-1}$  归属于  $\beta$ -转角;1 682~1 684  $\text{cm}^{-1}$  归属于分子内反平行的  $\beta$ -折叠结构;1 691~1 692  $\text{cm}^{-1}$  与 1 627~1 628  $\text{cm}^{-1}$  一样归属于分子内的  $\beta$ -折叠结构,也被认为是引起蛋白质聚集体的结构。

### 2.2 蛋白质氧化对花生分离蛋白二级结构的影响

由图 1 可知,花生分离蛋白经 AAPH 氧化后其红外光谱的酰胺 I 带发生了显著变化,表明蛋白质氧化对花生分离蛋白的二级结构影响显著。波数 1 617~1 618  $\text{cm}^{-1}$  主要表征分子间的  $\beta$  折叠的聚集体结构,波数 1 682~1 684  $\text{cm}^{-1}$  表征分子内的反平行  $\beta$  折叠结构,也代表聚集体的形成。由

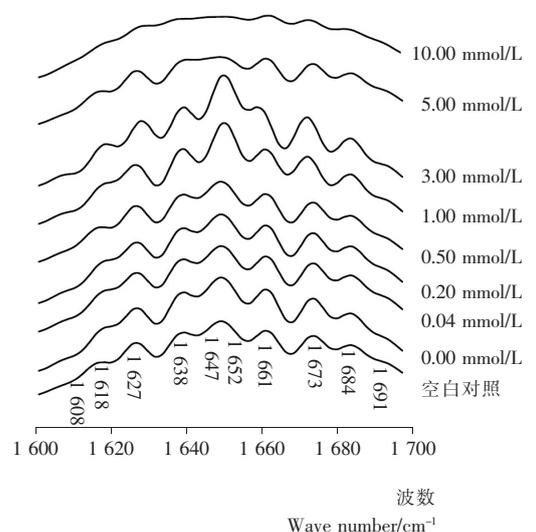


图 1 AAPH 氧化对花生分离蛋白红外光谱去卷积后酰胺 I 带的影响

Figure 1 Effect of AAPH oxidation on deconvoluted FTIR spectra of peanut protein isolate

表 1 去卷积酰胺 I 带各个波数及其结构指认

Table 1 Deconvoluted amide I band frequencies and assignments to secondary structure for protein

波数/cm <sup>-1</sup>	结构指认
1 691~1 692	β-转角结构
1 682~1 684	反平行的 β-折叠结构(分子内)
1 672~1 673	β-转角结构
1 660~1 662	β-转角或者 loop 结构
1 651~1 653	α-螺旋
1 645~1 648	无规则卷曲或者 α-螺旋
1 637~1 639	β-折叠(分子内)
1 627~1 628	β-折叠的聚集体结构(分子内)
1 617~1 618	β-折叠的聚集体结构(分子间)
1 605~1 610	氨基酸残基

图 1 可知,随着氧化浓度的上升,波数 1 617~1 618 cm<sup>-1</sup> 和 1 682~1 684 cm<sup>-1</sup> 逐渐明显,表明蛋白质氧化可导致花生分离蛋白聚集体的形成。但在高氧化浓度下(5.00 mmol/L 和 10.00 mmol/L),酰胺 I 带发生显著变化,可能是由于高氧化浓度下花生分离蛋白发生了肽链的断裂,进一步导致结构发生了显著变化。Lund 等<sup>[12]</sup> 和 Estévez 等<sup>[13]</sup> 认为高氧化条件会致使蛋白质肽链断裂。

二阶求导和去卷积技术可对酰胺 I 带进行分峰处理,再结合曲线拟合的方法,可对蛋白质各二级结构进行定量分析。图 2 为曲线拟合后的花生分离蛋白红外光谱酰胺 I 带的典型图谱,表 2 为 AAPH 氧化对花生分离蛋白酰胺 I 带曲线拟合后各峰归属及其相对含量的影响。

由表 3 可知,经过 37 °C 24 h 的热作用,花生分离蛋白

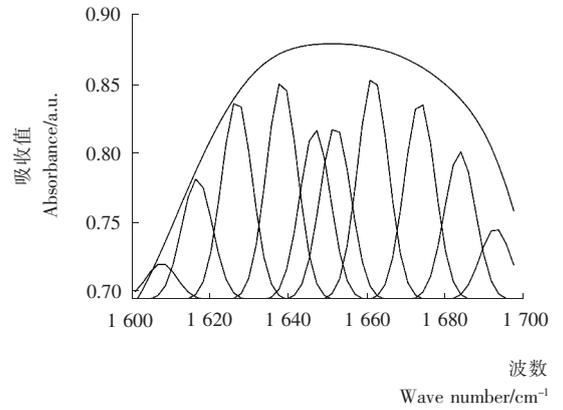


图 2 曲线拟合后的酰胺 I 带图谱(空白对照)

Figure 2 Deconvoluted and curve fitted bands of amide I of peanut protein isolate (control)

的二级结构也发生了一些变化,波数 1 618 cm<sup>-1</sup> 含量稍有增加,表明花生分离蛋白肽链的分子间作用增强;而波数 1 627 cm<sup>-1</sup> 含量降低,表明多肽链分子内作用力下降。热作用可在一定程度上增强蛋白质的疏水相互作用,进而影响蛋白质的二级结构。Ye Lin 等<sup>[2]</sup> 研究表明花生分离蛋白经过 37 °C 24 h 的热作用,其疏水相互作用稍有增加。随着 AAPH 浓度的增加,酰胺 I 带各峰均发生了显著变化。在 AAPH 浓度 3.0 mmol/L 以下,β-折叠上升而 β-转角下降,α-螺旋略有下降而无规则卷曲略有上升。试验结果与 Sun Wei-zheng 等<sup>[14]</sup> 研究结果相一致,其研究发现在一定氧化浓度下,随氧化浓度的升高,蛋白质的 β-折叠上升而 β-转角下降。在高氧化浓度(5.0,10.0 mmol/L)下,花生分离蛋白二级结构显著变化,α-螺旋和 β-转角显著上升,β-折叠下降。上述试验现象可能是由于高氧化浓度致使多肽链断裂,Sun Wei-zheng 等<sup>[14]</sup> 也有类似发现。

表 2 AAPH 氧化对花生分离蛋白酰胺 I 带曲线拟合后各峰归属及其相对含量的影响

Table 2 Effect of AAPH oxidation on determined frequencies of amide I component bands of peanut protein isolate

空白对照	0.00 mmol/L	0.04 mmol/L	0.20 mmol/L	0.50 mmol/L	1.00 mmol/L	3.00 mmol/L	5.00 mmol/L	10.00 mmol/L
1 608(2.35)	1 609(2.39)	1 609(2.48)	1 609(2.46)	1 608(2.34)	1 608(2.41)	1 608(2.33)	1 608(2.30)	1 610(3.46)
1 617(7.76)	1 618(7.81)	1 618(8.01)	1 618(7.95)	1 617(7.63)	1 618(7.61)	1 618(7.91)	1 617(7.78)	1 618(8.31)
1 627(12.81)	1 627(11.90)	1 627(12.02)	1 627(11.97)	1 627(12.65)	1 627(11.75)	1 628(12.34)	1 627(12.96)	1 628(12.21)
1 638(14.01)	1 638(14.03)	1 638(13.91)	1 638(13.93)	1 638(14.04)	1 639(14.95)	1 639(14.68)	1 638(12.95)	1 637(12.61)
1 647(10.89)	1 647(11.07)	1 647(10.89)	1 647(10.93)	1 647(11.05)	1 648(11.05)	1 648(11.33)	1 645(10.90)	1 645(11.80)
1 652(11.12)	1 652(11.44)	1 652(11.22)	1 652(11.26)	1 652(11.34)	1 651(11.01)	1 651(11.07)	1 652(11.99)	1 653(11.98)
1 661(14.31)	1 661(14.83)	1 661(14.56)	1 661(14.62)	1 661(14.61)	1 661(14.48)	1 660(14.20)	1 661(14.36)	1 662(13.64)
1 673(12.69)	1 673(12.94)	1 673(12.87)	1 673(12.91)	1 673(12.79)	1 672(13.22)	1 672(13.27)	1 673(12.73)	1 672(12.25)
1 684(9.48)	1 683(9.36)	1 684(9.54)	1 683(9.51)	1 684(9.29)	1 683(9.45)	1 683(9.07)	1 683(9.46)	1 682(8.88)
1 692(4.59)	1 692(4.23)	1 692(4.50)	1 692(4.45)	1 692(4.27)	1 692(4.09)	1 692(3.79)	1 692(4.57)	1 691(4.87)

† 1 608~1 692 代表蛋白质酰胺 I 带波数,cm<sup>-1</sup>;括弧中数字代表对应的相对含量,%。

表3 AAPH氧化对花生分离蛋白二级结构含量的影响

Table 3 Effect of AAPH oxidation on secondary structural contents of peanut protein isolate

蛋白质二级结构	AAPH 浓度/(mmol·L <sup>-1</sup> )								
	空白对照	0.00	0.04	0.20	0.50	1.00	3.00	5.00	10.00
α-螺旋/%	11.12	11.44	11.22	11.26	11.34	11.01	11.07	11.99	11.98
β-折叠/%	44.05	43.10	43.48	43.36	43.61	43.75	43.99	43.16	42.01
β-转角/%	31.59	32.00	31.93	31.99	31.67	31.79	31.27	31.66	30.76
无规则卷曲/%	10.89	11.07	10.89	10.93	11.05	11.05	11.33	10.90	11.80

† 花生分离蛋白二级结构由表2相应数据计算所得,其中1 651~1 653 cm<sup>-1</sup>代表α-螺旋;1 617~1 618,1 627~1 628,1 637~1 639和1 682~1 684 cm<sup>-1</sup>代表β-折叠;1 691~1 692,1 672~1 673和1 660~1 662 cm<sup>-2</sup>代表β-转角;1 645~1 648 cm<sup>-1</sup>代表无规则卷曲。

在氧化浓度3.0 mmol/L下,波数1 617,1 627 cm<sup>-1</sup>含量有所波动,而波数1 638 cm<sup>-1</sup>含量逐渐上升,表明在氧化过程中,蛋白聚集体的形成伴随着分子间及分子内相互作用的影响,以及分子重排。β-折叠主要是局部的协同性氢键作用形成,在球状蛋白质中,氢键可以在不同肽链或不同分子之间形成,也可以在同一肽链的不同肽段(β-strand)之间形成<sup>[11]</sup>。花生分离蛋白在上述波数的变化,表明氢键在花生分离蛋白聚集体形成过程中具有重要的作用。

影响蛋白质二级结构的作用力主要有范德华力、氢键、静电相互作用和疏水相互作用等。Ye Lin等<sup>[2]</sup>研究表明随着AAPH浓度的升高,花生分离蛋白疏水相互作用呈现先上升后下降的趋势,其在蛋白聚集体的形成过程中有着重要作用。蛋白质二级结构中氢键与疏水相互作用相互影响共同决定其结构。因此,AAPH氧化花生分离蛋白疏水相互作用的变化影响上述二级结构的变化。

### 3 结论

本研究结果表明花生分离蛋白经AAPH氧化后二级结构发生显著变化,其变化规律随氧化浓度的不同而有所差别。在氧化浓度小于3.00 mmol/L时,β-折叠和无规则卷曲含量升高伴随着β-转角和α-螺旋含量下降;而氧化浓度大于3.00 mmol/L时,多肽链的断裂显著影响花生分离蛋白的二级结构。花生分离蛋白二级结构的变化,使其分子相互作用力发生改变,尤其是氢键和疏水性作用,进而导致氧化后花生分离蛋白聚集体的产生。

本研究结果对花生蛋白在加工过程中结构变化的原因进行了进一步补充完善,为正确认识食品加工过程中花生蛋白结构变化提供理论依据。蛋白质结构决定其功能特性,氧化后的花生蛋白结构变化会进一步影响其功能特性,蛋白质氧化下结构变化与功能特性的关系需进行深入探讨。

### 参考文献

- 刘岩,赵冠里,苏新国.花生球蛋白和伴球蛋白的功能特性及构象研究[J].现代食品科技,2013,29(9):2 095~2 101.
- Ye Lin, Liao Yu, Zhao Mou-ming, et al. Effect of protein oxidation on the conformational properties of peanut protein isolate

- [J]. Journal of Chemistry, 2013(1), 1~6.
- Sante-Lhoutellier V, Aubry L, Gatellier P. Effect of oxidation on *in vitro* digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(13): 5 343~5 348.
- 阎隆飞,孙之荣.蛋白质分子结构[M].北京:清华大学出版社,1999.
- Sun Wei-zheng, Zhou Fei-bai, Zhao Mou-ming, et al. Physicochemical changes of myofibrillar proteins during processing of Cantonese sausage in relation to their aggregation behaviour and *in vitro* digestibility[J]. Food Chemistry, 2011, 129(2): 472~478.
- Byler D M, Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra[J]. Biopolymers, 1986, 25(3): 469~487.
- 刘岩,赵冠里,赵谋明,等.花生湿热处理对其分离蛋白的结构和功能特性的影响[J].现代食品科技,2011,27(5):506~510.
- Kong Ji-lie, Yu Shao-ning. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007, 39(8): 549~559.
- Izaskun Carton, Ulrike Böcker, Ragni Ofstad, et al. Monitoring secondary structural changes in salted and smoked salmon muscle myofiber proteins by FT-IR microspectroscopy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(9): 3 563~3 570.
- Wang Jin-mei, Yang Xiao-quan, Yin Shou-wei, et al. Structural rearrangement of ethanol-denatured soy proteins by high hydrostatic pressure treatment[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(13): 7 324~7 332.
- 黄友如,华欲飞,张根华,等.重水环境下的氧化大豆蛋白傅里叶变换红外(FT-IR)分析[J].中国粮油学报,2010,25(5):19~23,29.
- Lund M N, Heinonen M, Baron C P, et al. Protein oxidation in muscle foods: A review[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55(1): 83~95.
- Estévez M. Protein carbonyls in meat systems: A review[J]. Meat Science, 2011, 89(3): 259~279.
- Sun Wei-zheng, Zhou Fei-bai, Sun Da-wen, et al. Effect of oxidation on the emulsifying properties of myofibrillar proteins[J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 6(7): 1 703~1 712.