

·研究简报·

高分子量大豆蛋白的溶液制备及组份分离*

管 娟 田 琨 姚晋荣 邵正中 陈 新**

(教育部聚合物分子工程重点实验室 复旦大学高分子科学系先进材料实验室 上海 200433)

摘 要 商品化的大豆分离蛋白(SPI)主要由7S和11S两种球蛋白组成,两者较难分离.同时,由于球蛋白的紧密结构使SPI难以直接溶解于水中.采用盐酸胍和二硫苏糖醇在溶解过程中对SPI进行处理,从而获得了较高浓度,并且蛋白质分子链未发生降解的SPI水溶液.此外,通过采用盐酸胍溶解和透析的方法,获得以7S球蛋白为主的溶液和以11S球蛋白为主的沉淀,比较简单地实现SPI中两种主要组份的初步分离.

关键词 大豆球蛋白, β -大豆伴球蛋白, 透析, 二硫键, 氢键

随着不可再生资源的消耗殆尽,越来越多的科学家将目光转向了可再生资源,特别是来自生物的天然高分子材料,主要是多糖和非生理活性蛋白质,如纤维素^[1]、壳聚糖^[2]、丝蛋白^[3]以及各种植物蛋白.大豆是重要的经济作物,大豆中含有30%~50%的大豆蛋白,经过提纯的大豆分离蛋白(SPI),蛋白质含量不少于90%,主要包括4种组份:2S(8%)、7S(35%)、11S(52%)和15S(5%),其中7S和11S占到了总质量的70%以上,因此SPI的性质主要取决于这二者的组成、结构和功能^[4].SPI在食品、纺织、材料等领域具有重要的应用价值^[5],如大豆蛋白纤维^[6]和大豆蛋白塑料^[7],因此从基础研究的角度了解其结构和功能显得非常重要.

SPI中的7S组份主要为 β -大豆伴球蛋白(β -conglycinin),11S组份则为大豆球蛋白(glycinin),从氨基酸组成来分析,二者存在较大的差异^[8];从聚集态结构分析,7S含3种亚基,为三聚体,而11S含5种不同的亚基,并且为六聚体^[9].此外,虽然7S和11S的半胱氨酸(Cys)的含量差别并不显著(分别为0.94%和1.30%),但11S的亚基中和亚基之间存在二硫键,而在7S中则没有二硫键的存在^[10].已有研究表明,11S中存在的二硫键对稳定其结构以及促进其热致凝胶转变具有重要的作用^[11].由于7S和11S结构和性质上的差异,人们很早就尝试对其进行分离^[12].分离的手段包括低温沉淀^[13]、盐析^[14]、膜分离^[15]、等电点分离^[16]和层析分离^[8]等,目前应

用较多的是后两种方法以及二者的结合.但是这些分离方法的过程都较为复杂,分离得到的两份的数量也很少,难以满足实际研究的需要.

SPI的溶解性是其所有性质中最基本但也是最重要的一个,制备均匀稳定、具有一定浓度的SPI水分散体系是研究SPI的溶液性质的前提^[4],也是制备各种SPI材料,如薄膜、纤维、支架材料的前提.但是如果直接将市售商品化的SPI粉末溶解在纯水中,其溶解度很小.而如果将其溶解在pH值大于10的碱性水溶液中,虽然溶解度有所增大,但是会不可避免地发生蛋白质的降解^[17].本研究发现,采用两种常见的生化试剂——盐酸胍和二硫苏糖醇(DTT)在溶解过程中对SPI进行处理,不仅能够提高SPI在水中的溶解度,还能对SPI中的7S和11S组份进行初步的分离.

1 原料

SPI(上海深远食品有限公司),蛋白质含量为91%;盐酸胍(国药集团上海化学试剂公司),分析纯;DTT(上海博蕴生物科技有限公司, Sigma公司进口分装),纯度为99.5%.其余试剂均为分析纯,使用时未经进一步处理和纯化.

2 实验方法

2.1 SPI在不同pH值水溶液中的溶解度 在去离子水和pH值为8.2、9.0、10.1、11.1和12.0的水溶液中(采用0.1 mol/L或1.0 mol/L的NaOH溶液进行调节),加入过量的SPI粉末,室温下搅拌溶解12 h,然后采用相应pH的水溶液

* 2009-07-10 收稿,2009-09-07 修稿;国家自然科学基金(基金号 20674011)、教育部新世纪优秀人才支持计划(项目号 NCET-06-0354)、教育部长江学者和创新团队发展计划(项目号 IRT-06-12)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: chenx@fudan.edu.cn

透析 12 h 以除去可能的小分子量降解产物,最后采用 9000 r/min 转速离心 10 min 除去不溶物,收集上清液,用重量法标定其浓度.

2.2 较高浓度 SPI 水溶液的制备 将 SPI 粉末溶解在含有 6 mol/L 盐酸胍和 25 mmol/L DTT 的水溶液中,然后先在 pH = 10 的 NaOH 水溶液中透析 24 h,再用去离子水透析至接近中性 (pH = 7 ~ 8). 透析过程中没有肉眼可见的沉淀产生,待透析完成后,采用 9000 r/min 转速离心 10 min 除去不溶物后得到溶液,用重量法标定其浓度.

2.3 SPI 中 7S 和 11S 组份的分离 将 SPI 粉末溶解在含有 6 mol/L 盐酸胍的水溶液中,然后先在 pH = 10 的 NaOH 水溶液中透析 24 h,再用去离子水透析至接近中性 (pH = 7 ~ 8). 在此透析过程中有沉淀产生,待透析完成后,采用 9000 r/min 转速离心 10 min,同时收集沉淀物和上清液.

2.4 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测试 依照文献 [18] 报道的方法进行 SDS-PAGE 测试. 电泳时,电压恒定为 120 V. 胶板用考马斯亮蓝 R-250 染色,经脱色,扫描,图像处理得到电泳图谱.

2.5 透射电镜测试 将浓度为 0.5% (W/W) 的 SPI 水溶液直接滴在铜网上并采用磷钨酸负染,室温干燥后采用 JEM-2100F 透射电子显微镜 (日本) 进行测试,操作电压为 200 kV.

2.6 动态光散射测试 采用 Zetasizer Nano (Malvern 公司,英国) 在室温下测试浓度为 1.0% (W/W) 的 SPI 水溶液中粒子的流体力学直径与多分散系数,所有测试结果均符合软件的数据分析标准.

3 结果

3.1 SPI 在不同 pH 值水溶液中的溶解度

SPI 的等电点为 4.64^[4] (其中 7S 为 4.8^[19],11S 约为 6.4^[20]),因此 SPI 在碱性水溶液中其蛋白质分子链会发生静电排斥作用而较易溶解,但是其在纯水中的溶解度却很小. Arrese 等研究了 19 种商品 SPI 的溶解性,他们将样品直接溶解在去离子水中 (pH 为 6.8 ~ 7.0),结果发现其水溶液最高的质量百分浓度约为 0.84%,而最低的仅为 0.21%^[21]. 为仔细考察商品 SPI 在不同水溶液中的溶解情况,在本研究中将购置的商品 SPI 分别溶解在去离子水以及 pH = 8.2、9.0、10.1、11.1 和 12.0 的 NaOH 水溶液中,并用重量法标定所得蛋白质溶液的质量百分浓度,结果如图 1 所示. 研

究发现, SPI 在去离子水中质量百分浓度为 0.55% ± 0.04%,符合 Arrese 等的研究结果. 研究结果还表明,随着 pH 的升高,溶液中 SPI 的浓度随之增大,在 pH = 12.0 的 NaOH 溶液中,虽然通过重量法得到的 SPI 质量百分浓度可达 3.15% ± 0.03%,但 SDS-PAGE 却显示 (图 2,条带 C) 此时部分 SPI 发生了降解,分子量有所下降且分布变宽. 当溶液中 NaOH 浓度大于 1.0 mol/L 时,虽然 SPI 可在很短时间内溶解,但其分子量都降解至 10 kDa 以下,在我们的 SDS-PAGE (图 2,条带 D) 中几乎看不到高分子量链段的存在. 因此采用碱溶液溶解 SPI 虽然表面上提高了其溶解度,但是会导致其分子链的降解,这无论对于后继的理论研究或实际应用都是非常不利的.

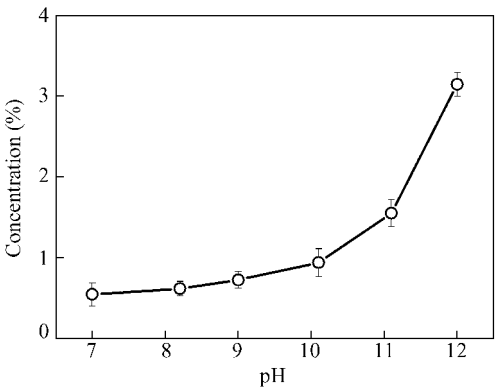


Fig. 1 The concentration of SPI aqueous solution at different pH values

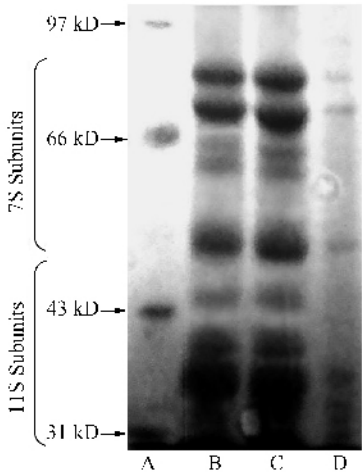


Fig. 2 SDS-PAGE pattern (A) protein markers, (B) SPI aqueous solution at pH = 10.1; (C) SPI aqueous solution at pH = 12.0; (D) SPI aqueous solution with 1.0 mol/L NaOH

The concentration of SPI solution was 1.0% for all samples.

3.2 较高浓度 SPI 水溶液的制备 从 SPI 的结构考虑,其在水中溶解度小的原因在于其蛋白质分子链内和链间存在很强的氢键和静电相互作用,并具有二硫键,所以单纯的水分子很难破坏这些维持 SPI 呈球形堆积的因素而使蛋白质单链能够分散在水中,因此在本研究中选择用以破坏氢键的盐酸胍和破坏二硫键的 DTT 来对 SPI 进行处理,希望可以破坏蛋白质分子链内与链间的相互作用而促使其能够分散在水中. 盐酸胍和 DTT 是蛋白质化学中常用的变性剂,大量研究证明其主要破坏的是蛋白质的二级结构(即构象),不会对蛋白质的一级结构,即蛋白质主链的化学结构造成破坏^[22~24],如 6 mol/L 盐酸胍可使溶菌酶和白蛋白分子链伸展从而破坏其天然构象,但一级结构不变;DTT 可使白蛋白发生构象变化从而促使多肽链上更多的氨基酸残基质子化等. 当然要获得纯的 SPI 水溶液,还必须将盐酸胍和 DTT 除去. 因此本研究首先采用 pH = 10 的弱碱水溶液对含有盐酸胍和 DTT 的 SPI 溶液进行透析,其目的是使分散在水中的蛋白质分子链仍带有一定的相同电荷而相互排斥,从而避免其重新团聚而出现沉淀,并且 pH = 10 的弱碱溶液不会对 SPI 产生明显的降解作用. 最后再用去离子水透析除去溶液中的 NaOH,此时分散在水溶液中的蛋白质分子虽然会因静电排斥作用的减少而发生一定程度的聚集,但尚存的带电氨基酸残基之间的静电排斥作用不会导致进一步的团聚而产生宏观沉淀,因此仍可获得稳定的 SPI 水溶液.

通过这种处理方法,本研究能够制备出质量百分浓度为 3.0% 左右的 SPI 水溶液,是直接在水中溶解的近 6 倍,因此可以说制备得到了“较高浓度”的 SPI 水溶液. 在此基础上,还可采用聚乙二醇水溶液反向渗透的方法^[25] 将 SPI 水溶液浓缩至 10%,大大提高了 SPI 水溶液的应用范围. 动态光散射表明,所获得的 SPI 水溶液中 SPI 分子聚集体的平均流体力学直径为 (93.2 ± 22.2) nm,呈双分散分布,大粒径约为 160 nm,小粒径约为 20 nm. 其中小粒径的大小与 7S 组份的三聚体或 11S 的六聚体尺寸相符,而大粒径则明显是聚集体. 透射电镜照片(图 3)表明溶液中的 SPI 并不仅仅以寡聚体存在,还有尺寸为 100 ~ 200 nm 的不规则聚集体(箭头所指白色部分),符合动态光散射的结果. 这些结果说明虽然在水溶液中 SPI 并不是以单链存在,但是其聚集体尺寸较小,

分布也较为均匀. 更为重要的是 SDS-PAGE 分析显示(图 4,条带 B),通过本研究获得的浓度为 3.0% 的 SPI 水溶液中,蛋白质没有发生降解,其组成和将 SPI 直接溶于水得到水溶液的组成(图 4,条带 E)几乎完全一致,说明由本研究方法得到的是浓度较高的并具有完整组份的 SPI 水溶液.

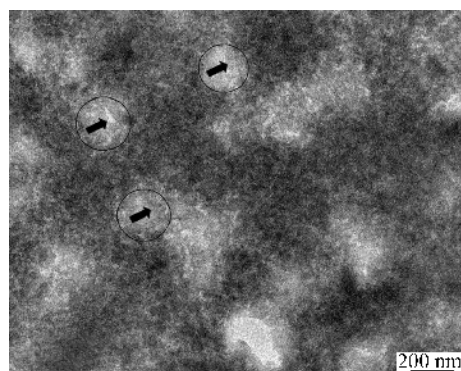


Fig. 3 TEM image of SPI negatively stained by phosphotungstic acid
SPI aggregates were shown in white.

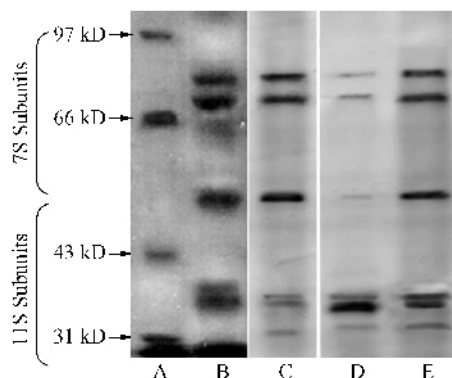


Fig. 4 SDS-PAGE pattern (A) protein markers, (B) SPI aqueous solution obtained by treating with GuHCl and DTT, (C) supernatant obtained by only treating SPI with GuHCl, (D) sediment obtained by only treating SPI with GuHCl, (E) SPI aqueous solution obtained by directly dissolution in de-ionized water

3.3 SPI 中 7S 和 11S 组份的分离 在上述制备高浓度 SPI 水溶液的过程中发现,如果只采用 6 mol/L 的盐酸胍水溶液来溶解 SPI,虽然一开始也能获得透明澄清的溶液,但是在透析过程中却会有沉淀生成. 考虑到 SPI 中只有 11S 组份存在二硫键^[10],而 DTT 的加入是对二硫键进行破坏,因此这些沉淀应该是盐酸胍被透析除去以后依靠仍然存在的二硫键而重新聚集的 11S. SDS-PAGE 分析证实了这一想法,从图 4 可以看出,沉淀中(条带 D)主要是 11S 组份(11S 包含亚基的分子

量均在 50 kD 以下),7S 组份(7S 包含亚基的分子量均在 50 kD 以上)的条带已很浅,表明其含量很少.相反地,上清液中(条带 C)基本都是 7S 组份,11S 组份的条带也已变得非常浅.由此本研究也发现了一种相对简单的初步分离 SPI 中 7S 和 11S 组份的方法,并且其分离获得的 7S 和 11S 的质量也较以往的各种方法有较大幅度的提高.通过本分离过程,每 2.0 g SPI 经溶解、透析,可分离得到 11S 的量为 0.3 g 左右,其产率可以满足大部分实验工作的需求.

从以上研究结果可以发现,虽然盐酸胍对于 SPI 中的 7S 和 11S 组份都是很强的变性剂^[26],可以破坏其原来球蛋白的构象从而分散在水溶液中,但是对于 11S 来讲,二硫键是否遭到破坏是其构象能否重新恢复的关键所在^[27].如果二硫键未遭破坏,在变性因素消失后(如透析除去盐酸

胍),大部分 11S 可通过仍然存在的二硫键的作用诱导多肽链恢复或部分恢复原先紧密的球蛋白结构而变得难溶于水.因此,要提高 SPI 在水中的溶解度,必须破坏其二硫键并阻止其重新生成,从而彻底破坏 SPI 中 7S 和 11S 的球蛋白结构,使其蛋白质分子链可以分散在水中.

4 结论

报道了通过采用两种常见的生化试剂——盐酸胍和 DTT 破坏 SPI 中的氢键和二硫键,再经过透析将它们除去的方法得到了浓度为 3.0% 左右且没有发生明显降解的 SPI 水溶液.同时发现仅用盐酸胍水溶液溶解 SPI 后进行透析,可获得 7S 为主的溶液和 11S 为主的沉淀.虽然这种分离方法获得的 7S 和 11S 组份的纯度相对于等电点分离和层析分离要低,但是处理量明显提高,如作为初级分离手段使用,可明显提高分离效率.

REFERENCES

1 Chen Nina(陈妮娜),Chen Riyao(陈日耀),Zheng Xi(郑曦),Chen Xiao(陈晓),Chen Zhen(陈震). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2008,(11) 1068 ~ 1075

2 Huang Zhihai(黄志海),Li Jihong(李纪宏),Lin Pinghua(林萍华),Dong Yinsheng(董寅生),Guo Chao(郭超),Sheng Xiaobo(盛晓波),Chu Chenglin(储成林). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2009,(3) 273 ~ 277

3 Cheng Cheng(程成),Shao Zhengzhong(邵正中),Chen Xin(陈新). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2008,(10) 974 ~ 978

4 Liu Xiaoya(刘晓亚),Jiang Peng(姜鹏),Zhou Hua(周华),Jiang Jinqiang(江金强),Bai Huiyu(白绘宇),Jiang Ming(江明). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2009,(5) 430 ~ 436

5 Kumar R,Choudhary V,Mishra S,Varma I K,Mattiason B. Ind Crops Prod,2002,16 155 ~ 172

6 Zhang X F,Min B G,Kumar S. J Appl Polym Sci,2003,90 716 ~ 721

7 Lu Y S,Weng L H,Zhang L N. Biomacromolecules,2004,5 1046 ~ 1051

8 Riblett A L,Herald T J,Schmidt K A,Tilley K A. J Agric Food Chem,2001,49 4983 ~ 4989

9 Utsumi S,Maruyama N,Sato R,Adachi M. Enzyme Microb Technol,2002,30 284 ~ 288

10 Adachi M,Takenaka Y,Gidamis A B,Mikami B,Utsumi S. J Mol Biol,2001,305 291 ~ 305

11 Adachi M,Ho C Y,Utsumi S. J Agric Food Chem,2004,52 5717 ~ 5723

12 Tian Kun(田琨),Guan Juan(管娟),Shao Zhengzhong(邵正中),Chen Xin(陈新). Progress in Chemistry(化学进展),2008,20 565 ~ 573

13 Wolf W J,Babcock G E,Smith A K. Arch Biochem Biophys,1962,99 265 ~ 274

14 Wu S W,Murphy P A,Johnson L A,Reuber M A,Fratzke A R. J Agric Food Chem,2000,48 2702 ~ 2708

15 Chove B E,Grandison A S,Lewis M. J Food Hydrocolloids,2007,21 1379 ~ 1388

16 Thanh V H,Shibasaki K J. Agric Food Chem,1976,24 1117 ~ 1121

17 Ishino K,Okamoto S. Cereal Chem,1975,52 9 ~ 21

18 Sathe S K. J Food Biochem,1991,15 33 ~ 49

19 Maruyama N,Sato R,Wada Y,Matsumura Y,Goto H,Okuda E,Nakagawa S,Utsumi S. J Agric Food Chem,1999,47 5278 ~ 5284

20 Iwabuchi S,Yamauchi F. J Agric Food Chem,1987,35 205 ~ 209

21 Arrese E L,Sorgentini D A,Wagner J R,Anon M C. J Agric Food Chem,1991,39 1029 ~ 1032

22 Greene R F,Pace C N. J Biol Chem,1974,249 5388 ~ 5393

23 Santoro M M,Bolen D W. Biochemistry,1988,27 8063 ~ 8068

24 Loo J A,Edmonds C G,Udseth H R,Smith R D. Anal Chem,1990,62 693 ~ 698

25 Chen Xin(陈新),Shao Zhengzhong(邵正中),Zhou Li(周丽). China patent(中国专利),Pat,No. CN1483866. 2004-03-24

26 Sze K W C,Kshirsagar H H,Venkatachalam M,Sathe S K. J Agric Food Chem,2007,55 8745 ~ 8753

27 Wolf W J. J Agric Food Chem,1993,41 168 ~ 176

PREPARATION OF HIGH MOLECULAR WEIGHT SOY PROTEIN AQUEOUS SOLUTION AND SEPARATION OF ITS MAIN COMPONENTS

GUAN Juan, TIAN Kun, YAO Jinrong, SHAO Zhengzhong, CHEN Xin

(The Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers of the Ministry of Education of China,

Department of Macromolecular Science, Laboratory of Advanced Materials, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract Both solubility tests and reference data proved that commercially available soy protein isolate (SPI) had low solubility in pure water. As an alternative, guanidine hydroxyl chloride (GuHCl) and dithiothreitol (DTT) were used to treat SPI during the dissolution process. After dialysis of GuHCl and DTT, an SPI aqueous solution was obtained. Solubility tests showed this SPI aqueous solution had a relatively high concentration (6 times larger as that directly dissolved in pure water), and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed that such an SPI solution did not suffer the degradation of the protein subunits. In addition, through a simple treatment of GuHCl and dialysis process, a 7S-rich solution and an 11S-rich sediment were obtained, so that the two major components of SPI were primarily separated. SDS-PAGE gave the major evidence of the separation, and the possible mechanism of the separation was discussed. It was a relative simple method with high productivity, though the separation efficiency was lower than that of the chromatography method. The paper provides new insights into the role of disulfide bonds that play in stabilizing the structure of SPI, especially that of the component 11S.

Keywords Glycinin, β -Conglycinin, Dialysis, Disulfide bond, Hydrogen bond