

# 基于多光谱技术表征汉麻分离蛋白构象并分析 pH 对其构象的影响

曾剑华, 孟妍, 刘琳琳, 杨杨, 李美莹, 王子玥, 朱秀清\*, 石彦国\*

哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江省谷物食品与综合加工重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076

**摘要** 汉麻是高端植物油脂的重要来源, 而汉麻饼粕中含有大量的优质蛋白目前尚未得到充分开发利用。汉麻蛋白含有 20 种氨基酸, 必需氨基酸含量相对均衡, 且其精氨酸含量较高, 是一种营养丰富的优质植物蛋白源; 但汉麻蛋白溶解性较差, 这严重限制了其在食品加工中的应用。目前对汉麻分离蛋白构象研究还较少, 在加工过程中酸碱性变化对其构象的影响研究还少未见报道。该研究采用圆二色谱、傅里变换叶红外光谱、荧光光谱和紫外光谱技术对汉麻分离蛋白(HPI)构象进行表征, 并与大豆分离蛋白构象进行比较, 同时探究不同 pH 条件对 HPI 构象的影响。构象分析结果显示: 与大豆分离蛋白相比, 圆二色谱和傅里叶变换红外光谱结果显示 HPI 含有比例更高的  $\alpha$ -螺旋结构(39.1%和 33.1%), 而 SPI 含有较多的  $\beta$ -折叠; 荧光光谱和紫外光谱结果显示, HPI 暴露的芳香族氨基酸残基含量较少, 此外 HPI 分子内含有更多的二硫键( $10.06 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ )以及更高的表面疏水性(374), 且 HPI 的游离巯基/总巯基比值显著( $p < 0.05$ )小于 SPI 中游离巯基/总巯基比值, 表明 HPI 三级结构紧凑程度要高于 SPI 的三级结构。因而导致天然 HPI 分子粒径小于 SPI。强酸强碱条件下, HPI 分子结构得到适当伸展, 粒径变大, 芳香族氨基酸残基之间的距离增大, 降低了 Phe 到 Tyr 和 Trp 的能量传递效率, 最终导致 Try 残基荧光强度减弱, Phe 和 Tyr 残基的荧光部分得到显示, 改变 HPI 的结构特性。相对而言, 在酸性条件下 HPI 的构象稳定性相对较差, 蛋白亚基容易发生解离缔合反应; 而在碱性条件下, HPI 构象则相对稳定, 且构象灵活性更大。借助荧光光谱和紫外二阶导数光谱, 可以推测 HPI 氨基酸残基微环境的变化, 从而了解蛋白质分子三维结构的变化信息。综上所述, 深入对 HPI 构象的了解以及明晰酸碱性变化对 HPI 构象的影响有利于为特异性改性 HPI 制备高品质的汉麻籽蛋白粉以及具有生理活性的多肽提供理论参考。

**关键词** 汉麻分离蛋白; 构象表征; 光谱技术; pH 值

**中图分类号:** TS01 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)12-3748-07

## 引言

汉麻俗称大麻、火麻, 汉麻籽中油脂和蛋白的含量约为 40%~50%和 25%~30%; 国际上将四氢大麻酚含量低于 0.3%的大麻品种称为工业大麻, 我国将工业大麻称为汉麻<sup>[1]</sup>。中国是全球汉麻籽最大生产国和出口国, 目前, 汉麻籽的主要利用方式是提取汉麻纤维和制备高端植物油, 而剩下大量富含蛋白的汉麻籽饼粕没有得到充分的利用。如何充分利用丰富的汉麻籽饼粕资源开发高品质的汉麻籽蛋白粉及其衍生物已成为目前汉麻产业发展的重大问题之一。

国外较早研究报道了汉麻分离蛋白(hemp protein isolate, HPI), 汉麻蛋白主要由 35%的白蛋白和 65%球蛋白组

成, 而球蛋白主要由麻仁球蛋白构成, 其中麻仁球蛋白是由酸性亚基和碱性亚基通过二硫键键合而成的六聚体<sup>[2]</sup>。国外关于汉麻蛋白的功能、生物活性及其衍生物的相关报道已有很多<sup>[3]</sup>; 如, Hadnadjev 等<sup>[4]</sup>研究显示 HPI 的最低溶解度在 pH 5.0, 且碱提过程有助于提高 HPI 的保水性; Teh<sup>[3]</sup>和 Malomo 等<sup>[5]</sup>研究显示汉麻水解物具有抗氧化和降血压等作用。目前国外对汉麻蛋白的研究已深入到蛋白结构与功能的构效关系研究, 如 Malomo 等<sup>[2]</sup>研究了汉麻蛋白中水溶性蛋白和盐溶性蛋白的结构和功能关系, 与麻仁球蛋白比, 白蛋白因含有的二硫键含量较少, 因而其蛋白结构具有良好的柔性, 致使其具有较高的溶解性和起泡性; 发现汉麻蛋白产品的功能特性不仅取决于蛋白浓度和 pH 值, 还与汉麻分离蛋白构象具有密切关系<sup>[6]</sup>。而国内对汉麻蛋白的研究主要是

收稿日期: 2019-10-31, 修订日期: 2020-02-25

基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD2019C005), 黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2019ZX08B01-04)资助

作者简介: 曾剑华, 1993 年生, 哈尔滨商业大学食品工程学院硕士研究生 e-mail: foodleslie@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: xqzhuwang@163.com; yanguosh@163.com

2000 年后,对汉麻蛋白的研究起步较晚;且主要集中在汉麻蛋白的提取及其肽的衍生物制备研究,如张涛等<sup>[7]</sup>通过正交优化得到汉麻蛋白提取率达 70.56%;Tang 等<sup>[8]</sup>研究显示汉麻蛋白水解物具有良好的抗氧化功能。然而,关于汉麻分离蛋白构象特征等研究国内还未有报道,而蛋白构象对其功能性有着重要的影响,因此有必要对 HPI 的构象展开研究。

本试验以脱脂汉麻饼粕为原料制备 HPI,利用圆二色谱、傅里叶红外光谱、荧光光谱和紫外光谱等手段表征 HPI 构象;并探究不同 pH 条件对 HPI 构象的影响。本文对 HPI 构象的研究有助于了解汉麻分离蛋白结构及与小分子相互作用等信息,为特异性改性 HPI 制备高品质的汉麻籽蛋白粉以及具有生理活性的多肽提供理论参考。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Nano-ZS-90 马尔文激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司);Spectrum Two 傅里叶变换近红外光谱仪和 LAMBDA 365 紫外光谱(美国珀金埃尔默股份有限公司);F-7000 荧光光谱仪(日本日立仪器(上海)有限公司);ALPHA 1-2 LD plus 冷冻干燥机(德国 Christ);Chirascan qCD(英国应用光物理公司)。

汉麻籽仁(广西巴马:蛋白 31.11%±1.15%、脂肪 53.05%±2.32%);大豆分离蛋白(实验室自制,蛋白 92.64%±1.34%、脂肪 0.4%±0.12%);硼酸、硫酸铜、磷酸氢二钠,磷酸二氢钠等均为国产分析纯。

### 1.2 汉麻分离蛋白提取

汉麻籽仁先用正己烷以 1:4(w/v)脱脂 4 h,后在通风橱烘干(40℃)。称取一定量的脱脂汉麻籽饼粕(蛋白 57.93%±1.32%),与去离子水以按 1:15(w/v)料液比混合,用 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 调节料液至 pH 8.5,震荡(200 r·min<sup>-1</sup>、60 min、25℃)碱提 1 h,离心(10 000 r·min<sup>-1</sup>、20 min),上清液用 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 调节至 pH 4.7,静置 30 min 后,离心(10 000 r·min<sup>-1</sup>、20 min),得到汉麻籽蛋白凝乳,调节汉麻籽蛋白凝乳 pH 值为 7.0,冷冻干燥得到汉麻分离蛋白(蛋白含量 90.54%±1.45%,脂肪含量 1.4%±0.32%)备用。

如图 1,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析可知 HPI 主要为分子量为 37 kDa(2 号条带)和 21 kDa(3 号条带)由酸性亚基和碱性亚基组成的麻仁球蛋白;光密度分析结果显示 HPI 中麻仁球蛋白组分占 HPI 76.41%,白蛋白占 23.59%左右。此外,51 kDa 和 12 kDa 左右有一条明显的条带(1 和 4 号条带),可能与 HPI 中白蛋白成分相对应,此结论与 Tang 等人研究结论相一致<sup>[13]</sup>。

### 1.3 pH 对 HPI 构象的影响

将 HPI 用 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 不同 pH(3.0~10.0)的磷酸盐缓冲溶液配制成为 2 mg·mL<sup>-1</sup> 蛋白溶液,溶解过夜后备用。

### 1.4 游离巯基和二硫键含量分析

HPI 和 SPI 巯基含量的测定参考 Beveridge<sup>[9]</sup>改进的 Ellman 试剂法。

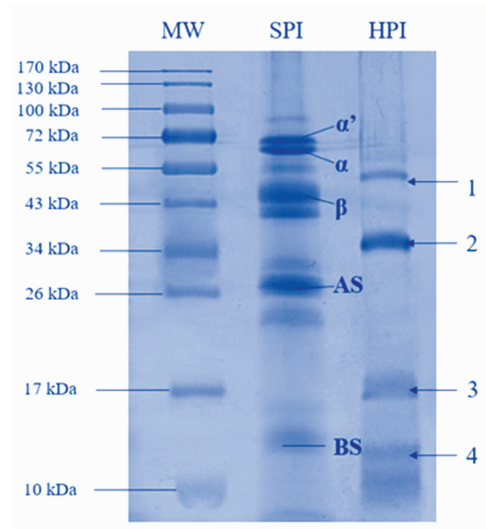


图 1 HPI 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE of HPI

### 1.5 粒径和 zeta 电位测定

采用马尔文激光粒度仪测定样品的流体动力学粒径及其分布。将蛋白样品用 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液配制成为 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的蛋白溶液,过 0.45 μm 水系醋酸纤维素滤膜。测定温度为 25℃、平衡时间为 120 s、分散相折射率为 1.471 和分散剂折射率为 1.330 条件下测定 3 次取平均值。将蛋白样品用 DTS1060C 皿在 Malvern Zeta Plus 测定电位。

### 1.6 圆二色谱

将样品用磷酸盐缓冲液(pH 7.2, 0.01 mol·L<sup>-1</sup>)稀释成浓度为 0.2 mg·mL<sup>-1</sup>,采用 Chirascan qCD 圆二色谱仪在波长范围为 190~260 nm 内扫描三次取平均值,光径 10 mm,扫描频率为 90 nm·min<sup>-1</sup>,间隔时间 0.25 s,以相应磷酸盐缓冲液为溶剂空白。

### 1.7 傅里叶变换红外光谱

将冻干的蛋白样品置于干燥器内,充分干燥,精确称取 2 mg 干燥的蛋白样品,加入 200 mg 的 KBr,研磨混合均匀,然后进行压片,样品红外光谱扫描,扫描波段 4 000~400 cm<sup>-1</sup>,分辨率 4 cm<sup>-1</sup>,扫描次数 32。采集的红外图谱进行基线校正和平滑处理后,使用 Peakfit 4.0.2 结合 Origin 2017 对蛋白酰胺 I 带(1 700~1 600 cm<sup>-1</sup>)做二阶导数、去卷积和高斯曲线拟合,根据峰面积计算各种二级结构的相对百分含量。

### 1.8 荧光光谱

采用 F-7000 荧光光谱仪测定蛋白样品荧光光谱,将样品液用 pH 7.2 的盐酸缓冲溶液(PBS)稀释为浓度为 0.1 mg·mL<sup>-1</sup>,在激发和发射狭缝均为 5 nm、电压为 500 V 条件下,以激发波长 295 nm,从 300~400 nm 波长范围扫描得到荧光光谱,扫描 3 次取平均值最后得到内源荧光光谱。

外源荧光采用 1-苯胺基-8-萘磺酸荧光探针(ANS)法测定疏水性,用 pH 7.2 磷酸盐缓冲液配制 2 mg·mL<sup>-1</sup> 的蛋白样品溶液,并稀释成 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 和 1 g·mL<sup>-1</sup> 的蛋白样品溶液;测试前,取 2 mL 样品液加入 20 μL 8

mmol · L<sup>-1</sup> ANS, 摇匀静置 3 min; 在狭缝为 5 nm、激发波长 330 nm、发射波长 490 nm 测定样品荧光强度(FI); 试剂做空白。以相对荧光强度对蛋白浓度作图, 曲线初始阶段的斜率即为蛋白质分子的表面疏水性指数( $H_0$ )。

### 1.9 紫外光谱

称取一定量的蛋白样品, 溶于 10 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液(pH 7.2)中, 配置成浓度为 0.5 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液, 磁力搅拌后于 25 °C 离心(10 000 r · min<sup>-1</sup>, 10 min), 上清液用于紫外光谱分析。波长范围为 190~800 nm, 分辨率为 0.2 nm, 扫描速率为 60 nm · min<sup>-1</sup>。所得的紫外光谱经 origin 软件微分化得到紫外光谱二级导数光谱[图 4(b)]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 巯基二硫键含量分析

在 pH 7 时, 汉麻蛋白(HPI)游离巯基和二硫键含量如表 1 所示, 与 SPI 相比, HPI 的游离巯基、二硫键和总巯基含量均显著( $p < 0.01$ )高于大豆分离蛋白(SPI)中游离巯基、二硫键和总巯基含量, 分别为 10.06, 12.14 和 32.26  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。HPI 中麻仁球蛋白含量约为 65%, 而 SPI 中大豆球蛋

白含量约为 50%~60%, 即 HPI 中 11S 球蛋白含量比 SPI 中 11S 球蛋白含量高, 11S 球蛋白是由碱性亚基和酸性亚基通过二硫键维持的六聚体, 因而由此也可以推测出 HPI 中二硫键含量高于 SPI 中二硫键的含量。此外, HPI 的游离巯基/总巯基比值显著( $p < 0.05$ )小于 SPI 中游离巯基/总巯基比值, 表明 HPI 三级结构紧凑程度高于 SPI 的三级结构。

### 2.2 粒径电位分析

在 25 °C、pH 7.2 条件下 HPI 和 SPI 粒径分布如图 2(a) 所示, HPI 和 SPI 粒子数量主要分布范围集中在 10 nm 左右, 该部分粒子主要为 HPI 和 SPI 的天然态, 与文献[9-10]报道 SPI 中 11S 球蛋白(9.5 nm × 9.5 nm × 4.0 nm)和 7S 球蛋白(9.6 nm × 9.6 nm × 4.4 nm)的大小基本一致; 由此推测, HPI 中白蛋白和麻仁球蛋白的粒子大小约为 10 nm 左右, 由于 HPI 三级结构比 SPI 紧凑(表 1), 导致 HPI 粒子大小相比 SPI 小一些。还有一部分粒径分布在 100~1000 nm 范围内的粒子, 这主要是天然态 HPI 交联形成的可溶性聚集集体或者微小杂质造成的; 由此得到的 HPI 平均粒径为 167.4 nm, SPI 平均粒径为 83.5 nm, HPI 平均粒径大于 SPI, 可能是因为 HPI 具有较大的表面疏水性(HPI: 374, SPI: 173), HPI 之间通过疏水相互作用形成较大的聚集集体。

表 1 HPI 和 SPI 中游离巯基、总巯基和二硫键含量及游离巯基/总巯基比值  
Table 1 Free sulfhydryl, total sulfhydryl and disulfide bond content in HPI and SPI, as well as the value of Free sulfhydryl/total sulfhydryl

Protein	Free sulfhydryl / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Total free sulfhydryl / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Disulfide bond / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Free sulfhydryl/Total free sulfhydryl
HPI	12.14 ± 0.56 <sup>a</sup>	32.26 ± 1.45 <sup>a</sup>	10.06 ± 0.34 <sup>a</sup>	0.38 <sup>b</sup>
SPI	4.21 ± 0.25 <sup>b</sup>	9.51 ± 0.45 <sup>b</sup>	2.66 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.44 <sup>a</sup>

注: a, b 表示差异显著( $p < 0.05$ )

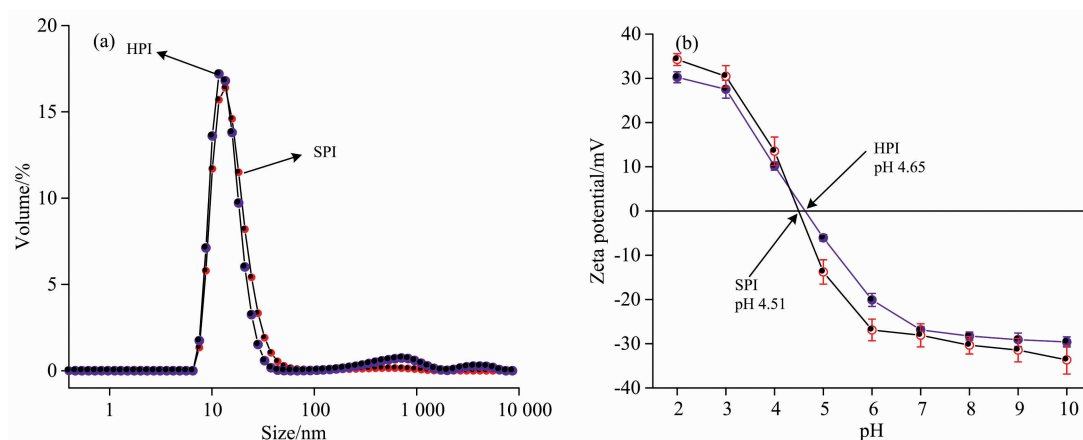


图 2 HPI 和 SPI 的粒径(a)和表面电位(b)曲线

Fig. 2 Size (a) and zeta-potential profiles (b) of HPI and SPI

HPI 和 SPI 表面电荷曲线分布如图 2(b)所示, 在 pH 从 10 到 2 过程中, HPI 和 SPI 的表面电荷由负值变成正值, 也即蛋白质分子逐渐质子化过程; 且 SPI 的表面电荷变化程度大于 HPI, SPI 等电点(4.51)比 HPI 等电点(4.65)小, 这个差异主要是由于 SPI 中酸性氨基酸含量大于 HPI, 这些氨基

酸使得 SPI 具有酸性特征。而本研究中 HPI 等电点(4.7)比现有文献记载( $pI=5$ )略低, 可能是由蛋白品种差异造成<sup>[4]</sup>。

### 2.3 HPI 构象分析

#### 2.3.1 二级结构分析

HPI 和 SPI 二级结构表征如图 3 所示, 由图 3(a)可知,

与 SPI 相比, HPI 在 208 和 222 nm 处有显著的负吸收双峰, 表明 HPI 二级构象中  $\alpha$ -螺旋含量高于 SPI; HPI 和 SPI 在 195 nm 处具有显著正吸收峰, 表明 HPI 和 SPI 均含有  $\beta$ -折叠结构<sup>[11]</sup>。经 dichroweb 拟合得出 HPI 和 SPI 二级结构分别

为:  $\alpha$ -螺旋 39.1% 和 11.7%、 $\beta$ -折叠 13.1% 和 34.4%、 $\beta$ -转角 21.9% 和 22.9%、无规则卷曲 25.9% 和 31.9%。此外, HPI 的摩尔椭圆率大于 SPI, 也证实了 HPI 具有紧密的结构特征<sup>[2]</sup>。

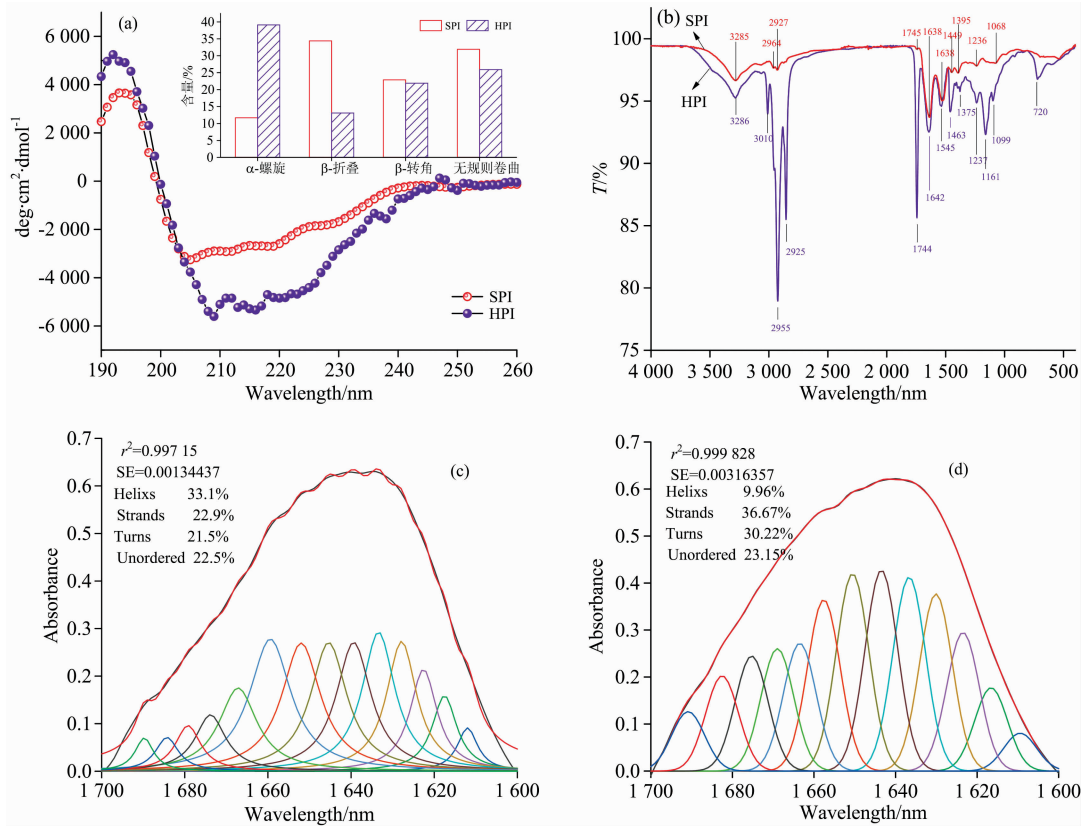


图 3 HPI 和 SPI 的圆二色谱图 (a)、傅里叶红外光谱 (b) 及其酰胺 I 带分峰拟合结果 (c: HPI, d: SPI) 图

Fig. 3 Circular dichroism (a), FTIR (b) and curve-fitting results of amide I band (c: HPI, d: SPI) of HPI and SPI

由图 3(b) 可知, HPI 和 SPI 均在  $2\ 800\ \text{cm}^{-1}$  附近有一 NH 和 OH 的伸缩振动峰; 在  $3\ 010\sim 2\ 700\ \text{cm}^{-1}$  范围内有烷烃或烯烃类 (脂肪) 的碳碳键或氢键伸缩振动峰, 在  $1\ 744\ \text{cm}^{-1}$  附近具有脂基 C=O 键典型的伸缩振动峰<sup>[12]</sup>, 其中 HPI 吸收峰强度远大于 SPI, 表明 HPI 中油脂残留含量高于 SPI, 这与原料信息结果一致。在  $1\ 650\sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$  范围内的吸收峰是蛋白质典型的肽键 (O=C-N-H) 振动峰。在  $1\ 150\sim 1\ 000\ \text{cm}^{-1}$  范围内吸收峰是由碳水化合物引起的,  $1\ 237\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰则是由 C-O 或 O-H 弯曲振动产生的<sup>[12]</sup>; 由 HPI 的 FTIR 图谱可知 HPI 中结合油脂含量较高。由图 3(c) 和 (d) 可知, HPI 和 SPI 酰胺 I 带经 peakfit 分峰拟合后得到的二级结构含量基本与 CD 得到的二级结构含量一致, HPI 含有较多的  $\alpha$ -螺旋结构, 而 SPI 含有较多的  $\beta$ -折叠。

### 2.3.2 三级构象分析

由图 4(a) 可知, HPI 和 SPI 均在  $330\sim 340\ \text{nm}$  附近具有典型的色氨酸残基最大荧光吸收峰, 与 SPI 相比 ( $\lambda_{\text{max}}\ 336.9$ ), HPI 最大吸收波长为  $\lambda_{\text{max}}\ 334.4$ , 说明 HPI 的亲水性比 SPI 要差, 也即 HPI 结构更紧凑, 这与现有文献记载 HPI 溶解性低于 SPI 的结果相符<sup>[13]</sup>。与 SPI 相比, 在  $300\sim$

$310\ \text{nm}$  处, HPI 出现一个小的吸收峰, 可能是为 HPI 中酪氨酸高于 SPI, 因而暴露于亲水环境的酪氨酸比 SPI 更多, 导致吸收峰比 SPI 更明显<sup>[6]</sup>, 此外, 该处的吸收峰还可能有苯丙氨酸残基的荧光贡献。而 SPI 最大荧光吸收比 HPI 要强, 可能是因为 HPI 结构紧密, 导致芳香族氨基酸残基暴露的程度比 SPI 差。

同理, 由图 4(b) 可知, HPI 和 SPI 在  $190\sim 400\ \text{nm}$  范围内出现两个蛋白特征吸收峰在  $200\sim 230$  和  $260\sim 280\ \text{nm}$ ; 在  $260\sim 280\ \text{nm}$  处 HPI 吸收峰强度比 SPI 弱, 也说明 HPI 暴露的芳香族氨基酸残基含量较少, 具有紧凑的三级结构特征。这两个特征吸收峰是由芳香族氨基酸残基  $\pi\rightarrow\pi^*$  跃迁产生, 常规紫外光谱难以分辨酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸残基对局部微环境影响的贡献, 而二阶导数光谱能很好得分辨以上三个发色基团的贡献率; 由 HPI 紫外二阶导数光谱可知, HPI 和 SPI 在  $280\sim 300\ \text{nm}$  内有两个正吸收峰, 分别为  $288, 294\ \text{nm}$  和  $289, 296\ \text{nm}$ , 两个负吸收峰  $285, 289\ \text{nm}$  和  $285, 291\ \text{nm}$ ; 与 SPI 相比, HPI 发生蓝移, 这与内源荧光结果一致。此外, 两正负吸收峰距离的比例 ( $r=a/b$ ) 可用来推测酪氨酸对构象变化的影响,  $r$  值越大, 蛋白结构伸展程度越大, 由图 4(b) 得到的  $r_{\text{HPI}}$  和  $r_{\text{SPI}}$  分别为  $0.441$  和  $0.589$ , 即 SPI 伸展程



度大于 HPI。

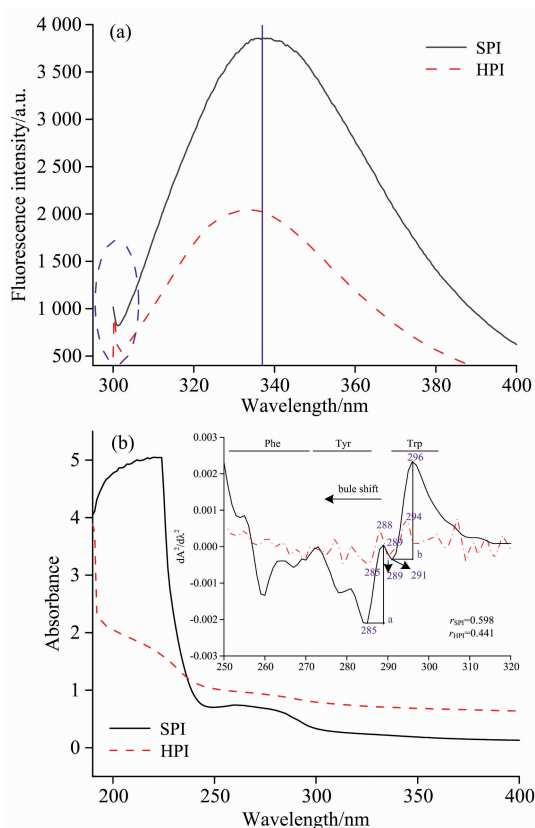


图 4 HPI 和 SPI 内源荧光 (a) 和紫外光谱插图为其二阶导数谱 (b)

Fig. 4 Intrinsic fluorescence (a) and Ultraviolet spectrum (b). The illustration is ultraviolet second derivative spectrum of HPI and SPI

#### 2.4 pH 对汉麻分离蛋白构象的影响

基于以上得出的 HPI 结构信息, 为改善 HPI 溶解特性等功能特性, 探究不同 pH 条件对 HPI 构象的影响。

图 5 可知, 在 pH 7→3 过程中荧光强度先下降后增大, 并伴随着红移; 当 pH 7→10 时, 荧光强度先增大后降低, 伴随着蓝移。HPI 中含有 Phe, Tyr 和 Trp 3 个发色基团, 且能量转移由 Phe 到 Tyr 和 Trp 是非常有效的, 因而含有这些基团的蛋白质的吸收性质并不是这些基团的简单加和, 通常认为当发射波长大于 290 nm 时, 可认为荧光都来自 Trp 残基<sup>[14]</sup>。在 pH 3.0 时, 大部分 Trp 暴露在亲水环境中, 且红移至 335.4 nm, 表明此时 HPI 结构比较松散<sup>[2]</sup>。在 pH 6.0 时, 荧光强度下降, 最大发射波长发生微小红移至 334.6 nm, 表明 pH 6.0 条件下, 酸诱导 HPI 蛋白分子展开, 降低了 Phe 到 Tyr 和 Trp 的能量传递效率, 使得 Trp 的荧光强度下降<sup>[14]</sup>。在 pH 8.0 时, 荧光强度增强, 表明蛋白分子结构发生了重排, Trp 和 Trp 的相互作用增强, 同时蛋白分子表面的芳香族氨基酸由表面转移至疏水核心, 从而导致荧光强度增大<sup>[2, 6]</sup>。而在 pH 10.0 时, HPI 荧光强度显著下降, 最大吸收峰波长微小蓝移, 表面 Trp 微环境变得更疏水, 荧光强度显著下降可能归因于: (1) 解离的 Tyr 残基荧光消失,

且 Trp 残基的荧光可能被阴离子状态的 Tyr 残基猝灭; (2) 溶剂猝灭效应; (3) 也可能是 Lys 和 Arg 残基的正电荷被中和<sup>[2, 14]</sup>。本试验在高 pH 值条件下荧光峰出现蓝移, 在低 pH 条件下荧光峰出现红移, 并暴露出更多芳香族氨基酸残基于亲水环境中, 与藜麦蛋白质分离<sup>[14]</sup> 和麻仁球蛋白的行为类似<sup>[6]</sup>。

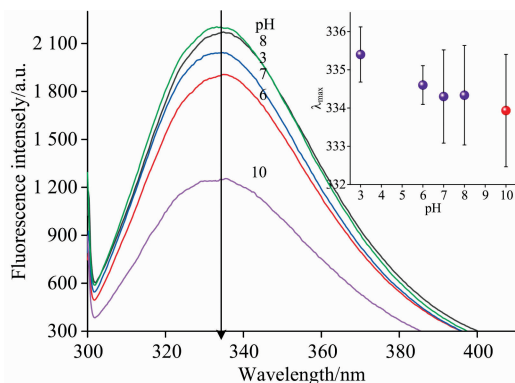


图 5 不同 pH 条件对 HPI 内源荧光吸收的影响  
Fig. 5 Effects of different pH on the intrinsic fluorescence of HPI

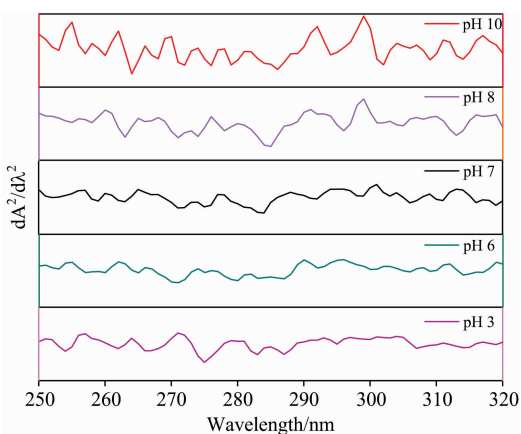


图 6 不同 pH 条件对 HPI 紫外吸收的影响  
Fig. 6 Effects of different pH on the ultraviolet spectrum of HPI

由图 6 可知, pH 值由 7.0 到 3.0 时, 紫外吸收强度先减小后增大, 在 250, 270 和 285 nm 附近出现新的吸收峰, 并伴随着红移, 且 290 nm 以后的吸收峰逐渐削弱; 该变化趋势与荧光光谱反映出的现象基本一致。在 pH 3.0 时, 紫外二阶导数光谱峰信号和峰型与 pH 7.0 现象相比变化显著, 峰吸收强度增大, 且发生红移, 表明低 pH 条件下 HPI 结构得到适当舒展, Phe 和 Tyr 残基的微环境变得更亲水, 在 270 nm 出现的峰是 Tyr 残基特征峰, 可能与 Tyr 上的酚羟基电离后酚氧原子与苯环的大  $\pi$  键的共轭效应有关; 在 250 nm 附近出现新的峰是 Phe 的特征峰, 这可能是由于 Phe 残基之间的相互作用被减弱, 同时 Tyr 残基的吸收红移, 使得原本被掩盖的 Phe 残基特征峰显露出来。由此推测酸诱导 HPI 变性时, HPI 分子结构得到适当舒展, 使得更多疏水性

氨基酸残基暴露于微环境中。

在 pH 由 7.0 到 10.0 时, 紫外二阶导数光谱峰型也发生显著变化, 紫外吸收增强且伴随着蓝移, 而研究认为在三种发色氨基酸中, Phe 是疏水性最强的, pH 变化基本不会引起其电离度和质子化的变化; 引起这一变化主要可能是强碱条件下蛋白结构打开, Phe 残基之间的相互作用减弱, 导致  $\pi \rightarrow \pi^*$  能级差下降, 由此推测碱性条件下含有 Phe 残基的侧链柔性增强。

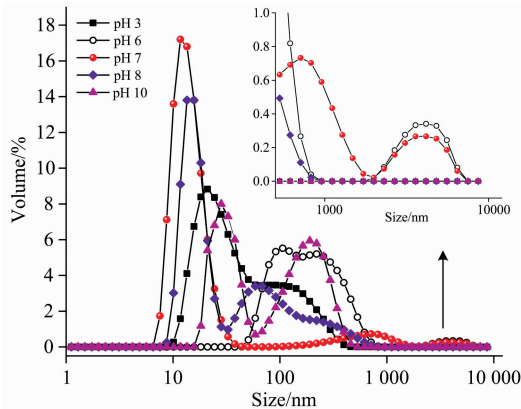


图 7 不同 pH 条件对 HPI 粒径的影响

Fig. 7 Effects of different pH on the size of HPI

由图 7 可知, 在不同 pH 条件下, HPI 粒径与天然态 (pH 7.0) 相比均增大, 天然态的 HPI 主要以单体形式存在 [图 2(a)], 在 pH 降低过程中, HPI 粒径不断增大, pH 6.0 时有最大平均粒径, 这是因为 pH 6.0 条件最靠近等电点, HPI 表面电荷绝对值较低, 分子之间的排斥力减弱, 容易发生聚集形成大的聚集体。pH 3.0 条件下 HPI 粒径增大是因为强酸条件蛋白结构变得松散, 肽链展开 (图 5 和图 6), 且蛋白表面正电势增大, 分子间的排斥力增大, 抑制了分子之

间的聚集, 但一定程度上促进了线性多聚体的产生, 从而提高蛋白溶解度<sup>[15]</sup>。在 pH 增大过程中, 蛋白粒径逐渐增大; pH 8.0 时, 粒径主要分布在 10~11 和 50~60 nm 范围, 保持了大部分单体。在 pH 10.0 时, 粒径进一步增大, 可能是因为蛋白结构舒展后, 形成更多的单体分子形成线性聚集体。

由图 5—图 7 可知, 在强酸强碱条件下, 能使 HPI 分子结构得到适当伸展, 粒径变大, 使得芳香族氨基酸残基之间的距离增大, 降低了 Phe 到 Tyr 和 Trp 的能量传递效率, 最终导致 Try 残基荧光强度减弱, Phe 和 Tyr 残基的荧光部分被显示, 表明在强酸强碱 pH 条件下 HPI 溶解度得到改善。从荧光光谱和紫外光谱的变化趋势可知, 在酸性条件下 HPI 的构象稳定性相对较差, 蛋白亚基容易发生解离缩合反应; 而在碱性条件下, HPI 构象则相对稳定, 且 HPI 构象具有更大柔性, 这与大豆球蛋白的构象类似<sup>[15]</sup>。因此借助荧光光谱和紫外二阶导数光谱, 可以推测 HPI 氨基酸残基微环境的变化, 从而了解蛋白质分子三维结构的变化信息。

### 3 结 论

汉麻分离蛋白与大豆分离蛋白相比, 其分子构象存在很大差异, 分子内含有更多的二硫键, 圆二色谱和傅里叶红外光谱检测结果显示 HPI 含有更多的  $\alpha$ -螺旋结构; 荧光光谱和紫外光谱结果显示 HPI 分子表面分布更多的芳香族氨基酸, 增大表面疏水性, 具有紧凑的三级结构。在强酸强碱条件下, 能使 HPI 分子结构得到适当伸展, 粒径变大, 使得芳香族氨基酸残基之间的距离增大, 降低了 Phe 到 Tyr 和 Trp 的能量传递效率, 导致 Try 残基荧光被屏蔽强度减弱, Phe 和 Tyr 残基的荧光部分被显示。相对而言, 在酸性条件下 HPI 的构象稳定性相对较差, 蛋白亚基容易发生解离缩合反应; 而在碱性条件下, HPI 构象则相对稳定, 且构象灵活性更大。

### References

- [1] Aluko R. Sustainable Protein Sources. Boston, Academic Press, 2017. 121.
- [2] Malomo S A, Aluko R E. Food Hydrocolloids, 2015, 43: 743.
- [3] Teh S S, Bekhit A E A, Carne A, et al. Food Chem., 2016, 203: 199.
- [4] Hadnađev M, Dapčević-Hadnađev T, Lazaridou A, et al. Food Hydrocolloids, 2018, 79: 526.
- [5] Malomo S A, Onuh J O, Girgih A T, et al. Nutrients, 2015, 7(9): 7616.
- [6] Malomo S A, He R, Aluko R E. J. Food Sci., 2014, 79(8): C1512.
- [7] ZHANG Tao, LU Rong-rong, QIAN Ping, et al (张涛, 卢蓉蓉, 钱平, 等). Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业), 2008, 34(8): 173.
- [8] Tang C H, Wang X S, Yang X Q. Food Chem., 2009, 114(4): 1484.
- [9] Beveridge T, Toma S, Nakai S. J. Food Sci., 1974, 39(1): 49.
- [10] Maruyama N, Adachi M, Takahashi K, et al. Eur. J. Biochem., 2010, 268(12): 3595.
- [11] Kundu A, Kundu S, Chattopadhyay K. Protein. Sci., 2017, 26(3): 536.
- [12] Siano F, Sorrentino G, Riccardi M, et al. Eur. Food Res. Technol., 2018, 244(5): 795.
- [13] Tang C H, Ten Z, Wang X S, et al. J. Agr. Food. Chem., 2006, 54(23): 8945.
- [14] Abugoch L E, Romero N, Tapia C A, et al. J. Agr. Food Chem., 2008, 56(12): 4745.
- [15] ZENG Jian-hua, YANG Yang, LIU Lin-lin, et al (曾剑华, 杨杨, 刘琳琳, 等). Food Science (食品科学), 2019, 40(11): 303.

# Characterization and Effects of pH on the Conformation of Hemp Protein Isolate Based on Multi-Spectroscopic Technique

ZENG Jian-hua, MENG Yan, LIU Lin-lin, YANG Yang, LI Mei-ying, WANG Zi-yue, ZHU Xiu-qing<sup>\*</sup>, SHI Yan-guo<sup>\*</sup>  
Key Laboratory of Grain Food and Comprehensive Processing of Heilongjiang Province, College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

**Abstract** Hemp seeds are the important resource of high-quality vegetable oil, while the numerous high-quality protein in the hemp seed meal has not been fully exploited. Hemp protein isolates (HPI) are the resource of the high-quality protein, containing 20 kinds of amino acids with a relative equilibrium of the content of 8 essential amino acid and a high content of Arg. However, the application of HPI in food processing was severely hindered by the poor protein solubility. At present, there was a few pieces of literature on the conformation of HPI, and the effect of pH change on its conformation during processing has not been reported. In this study, the conformation of hemp protein isolate (HPI) was characterized by Circular dichroism (CD) spectrum, Fourier transforms infrared (FTIR) spectroscopy, Fluorescence spectrum and Ultraviolet (UV) spectrum, which compared with soybean protein isolate (SPI). The effects of different pH conditions on the conformation of HPI were investigated. Conformation results showed that comparing with SPI, there was more  $\alpha$ -helix content in HPI, determined by CD and FTIR, which was 39.1% and 33.1%, respectively, while SPI contained  $\beta$ -sheet. The exposure of aromatic amino acid residues from HPI was lower than SPI, revealed by intrinsic fluorescence and UV spectroscopy. Moreover, the content of disulfide bond of HPI ( $10.06 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) was more than SPI, as was as higher surface hydrophobicity (374), but the value of free sulfydryl/total free sulfydryl of HPI was significantly lower than that of SPI. These results suggested that the tertiary structure of HPI was more compact than SPI, leading to a smaller particle size of nature HPI. The structure characteristics of HPI were changed in strong acid and strong alkaline conditions, which induced the structure of HPI to unfold and increased the size. As a result, the distance between aromatic amino acid residues was increased, and the energy transfer efficiency of Phe to Tyr and Trp was decreased. Finally, the fluorescence intensity of Trp residues was decreased, and the fluorescence of Phe and Tyr residues was partly showed. Comparatively speaking, under acidic conditions, the conformation stability of HPI was relatively poor, and dissociation-association reactions were prone to the protein subunits. However, the conformation of HPI was relatively stable and with more flexibility. Therefore, with the help of fluorescence spectrum and UV second derivative spectrum, changes in the microenvironment of amino acid residues of HPI could be predicted, so as to understand changes in the three-dimensional structure of protein molecules. In conclusion, further understanding of HPI conformation and clarifying the influence of pH changes on HPI conformation are conducive to providing a theoretical reference for specific modification of HPI to prepare high-quality HPI and active physiological polypeptides.

**Keywords** Hemp protein isolate; Conformation characterization; Spectrum technology; pH

(Received Oct. 31, 2019; accepted Feb. 25, 2020)

\* Corresponding authors