

## 大豆分离蛋白与低浓度尿素相互作用的红外光谱分析

张忠慧, 华欲飞

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:**大豆蛋白在食品工业中有很重要的应用,随着地球可再生资源的日益匮乏,大豆蛋白在非食品工业中的应用也越来越受到人们的关注,尿素是常用的化学变性剂,在蛋白质变性中有广泛的应用。为研究尿素变性对大豆蛋白结构的影响,对大豆分离蛋白(SPI)与低浓度尿素溶液相互作用的红外光谱进行了酰胺Ⅲ带研究。结果表明,溶解在不同浓度尿素溶液中的大豆分离蛋白的二级结构与大豆分离蛋白的水溶液相比发生了很大的变化,在 $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ 尿素溶液中大豆分离蛋白中的 $\beta$ -折叠的含量最小,随着尿素浓度的增加, $\beta$ -折叠的含量增加,无规卷曲的含量在 $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ 尿素溶液中达到最大,之后随尿素浓度增加而降低, $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -转角随着尿素浓度的增加,其含量都是呈现先增加后下降的趋势,在 $1 \text{ mol L}^{-1}$ 尿素溶液中两者的含量与大豆分离蛋白水溶液中的含量相比变化不大。因此,低浓度尿素可以明显影响大豆分离蛋白的二级结构。

**关键词:**大豆分离蛋白;尿素;红外光谱

## Determination of Interaction of Urea and Soybean Protein Isolate by Fourier Transform Infrared Spectroscopy

ZHANG Zhong-hui, and HUA Yu-fei

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

**Abstract:** Soy protein is attractive because they are environmentally friendly, biodegradable and renewable. Thus, more and more attention has been given to the development of soy protein's application in non-food industry. Urea is a common chemical denaturant, which is used widely to denature protein. To study the effect of urea modification on soy protein, FTIR spectroscopy was applied to investigate the interaction of urea and soybean protein isolates (SPI). Amide band III of SPI was analyzed to obtain the change in secondary structure of SPI when different concentrations of urea were added. At  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  concentration of urea, the content of  $\beta$ -sheet decreased and the content of random coil increased. With the increasing of urea concentration, the  $\beta$ -sheet increased and the random coil decreased. The contents of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -turn increased at first and then decreased with the increment of urea concentration. These results indicated that lower concentration of urea has obvious effects on the secondary structure of soy protein isolates.

**Key words:** Soy protein isolate; Urea; Fourier transform infrared spectroscopy

大豆蛋白由于具有丰富的营养一直以来被广泛使用在食品行业中,近年来,随着人们环境保护和可持续发展意识的增加,可再生和来源丰富的大豆蛋白开始重新被人们使用在非食品行业中,例如:使用大豆蛋白来制作胶粘剂(Kalapathy et al., 1995),制作大豆蛋白塑料(Kumar et al., 2002)和大豆蛋白膜(Ou et al., 2005)等。大豆蛋白主要是球蛋白,为了改善大豆蛋白的相容性,增加大豆蛋白的功能性,需要根据应用的具体要求对蛋白进行改性。蛋白质改性的方法有物理法,化学法,酶法和基因工程法。蛋

白质改性后需要对其结构进行表征,因为蛋白质的结构决定了蛋白质的功能性质,通过表征蛋白质的结构可以了解是否达到了改性的要求。

傅立叶变换红外光谱(FT-IR)技术近年来在蛋白质结构研究中的发展迅猛,在蛋白质的二级结构研究中常用酰胺I带进行分析,酰胺Ⅲ带的发展也很迅速和日趋成熟。运用FT-IR技术在蛋白质结构研究中具有:需要的材料少、不受分子量大小的影响;适合各种状态的样品;容易测定蛋白质的瞬间结构特征,说明蛋白质在生理状态下结构与功能的关

收稿日期(Received): 2007-11-02; 接受日期(Accepted): 2007-12-11

作者简介: 张忠慧(1977-), 女, 在读博士, 主要从事植物蛋白资源与利用的研究工作。

通讯作者(Corresponding author): 华欲飞, 博士, 教授。Tel: 0510-85917812; Fax: 0510-85917812; E-mail: yfhua@jiangnan.edu.cn

系;操作简便,测量速度快等的优点(王建华等,2004)。

有机溶剂尿素诱导的蛋白质变性是值得注意的,因为尿素的分子结构中含有两个酰胺键,它和其它分子形成氢键时,既可以作为质子供体,又可以作为质子受体。具体来说尿素分子中的四个氢原子可作为质子供体,一个氧原子可作为质子受体(萨楚尔夫等,2004)。尿素诱导蛋白质的变性主要发生在  $4 \sim 6 \text{ mol L}^{-1}$  浓度下,而对低浓度尿素中蛋白质的结构变化研究很少,本文利用 FT-IR 技术研究了低浓度尿素对大豆分离蛋白(SPI)二级结构的影响,以分析和了解蛋白质与尿素之间的相互作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器装置

傅里叶变换红外光谱仪,美国 Nicolet Nexus-470,检测器 Thermo Electron Corporation。

### 1.2 试剂

大豆分离蛋白(山东谷神集团),尿素是分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.3 样品制备

在室温下配置尿素溶液(0.1,0.3,0.5,0.8,1.0  $\text{mol L}^{-1}$ ),大豆分离蛋白以 1:10 的比例加入尿素溶液中,搅拌状态下室温反应 6 h,以没有添加尿素的大豆分离蛋白水溶液(0  $\text{mol L}^{-1}$ )作为对照。

### 1.4 测定方法

利用红外附件 ATR(衰减全发射)将蛋白质溶液在傅立叶红外光谱仪上做全波段( $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ )扫描,扫描次数为 64 次,分辨率为  $4 \text{ cm}^{-1}$ 。以相应的尿素溶液为背景,扣除背景后得到红外光谱图。

### 1.5 谱图处理

取酰胺 III 带( $1330 \sim 1220 \text{ cm}^{-1}$ )谱图,用 PeakFit v4.12 软件进行分析。先进行基线校正,然后用 Gaussian 去卷积,再由二阶导数拟合(高体玉等,2000),根据子峰面积计算各部分二级结构的比率。

## 2 结果与分析

从尿素的红外吸收谱图可以(图 1)看到尿素在酰胺 I 带( $1700 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ )的吸收很强,尿素的吸收与蛋白的吸收重叠,同时水在  $3700 \sim 2800 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1800 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$  及  $1000 \text{ cm}^{-1}$  以下区域有强吸收

(王建华等,2004;Zhang and Hua,2007)。从溶解到不同浓度尿素溶液中的蛋白质溶液的红外光谱图(图 2)可以看到,0.5,0.8 和  $1 \text{ mol L}^{-1}$  尿素浓度的蛋白质溶液在酰胺 I 带处出现负峰(见图中划圈处),这是因为溶剂水和尿素都在酰胺 I 带处有很强的吸收,当尿素浓度增大时,扣除溶剂背景会导致背景扣除的过多而出现负峰,从而干扰不同尿素溶液中的蛋白质样品的二级结构指认。

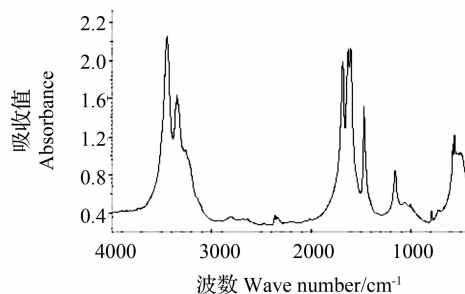
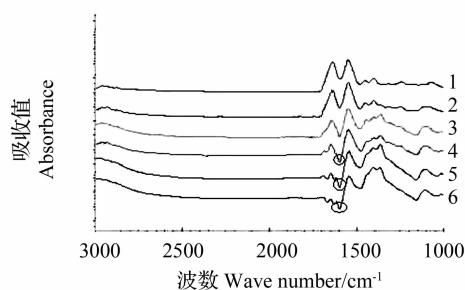


图 1 尿素的红外光谱图

Fig. 1 FTIR spectra for the urea



1~6 分别表示 0、0.1、0.3、0.5、0.8、1.0  $\text{mol L}^{-1}$  尿素变性大豆分离蛋白溶液

1~6:Soy protein isolates solutions modified with 0、0.1、0.3、0.5、0.8、1.0  $\text{mol L}^{-1}$  urea, respectively

图 2 不同浓度尿素溶液中大豆分离蛋白的红外光谱

Fig. 2 FTIR spectra for the SPI dissolved in different concentrations of urea solutions

从图 1 还可以看出,尿素在酰胺 III 带( $1330 \sim 1220 \text{ cm}^{-1}$ )的吸收不强,几乎没有吸收,而水在此波段也没有吸收峰,所以可以使用酰胺 III 带来进行蛋白质尿素变性后的二级结构指认。目前蛋白质二级结构的酰胺 III 带结构指认日趋成熟,根据相关资料(谢孟峡和刘媛,2003)得到的酰胺 III 带二级结构的归属见表 1,经过图谱拟合处理,从酰胺 III 带的拟合结果得到的溶解于不同浓度尿素溶液中的蛋白质的二级结构的含量见表 2,可以看出,低浓度尿素溶液的加入对蛋白质的二级结构的影响是明显的,大豆分离蛋白水溶液中  $\beta$ -折叠含量为 51.23%,无规卷曲

含量为 27.24%,  $\alpha$ -螺旋含量为 15.84%,  $\beta$ -转角为 5.68%, 而 0.1 mol L<sup>-1</sup> 尿素的加入使得蛋白质溶液中  $\beta$ -折叠的含量迅速下降, 从 51.23% 下降到了 22.51%, 而无规卷曲和  $\beta$ -转角的含量迅速上升, 无规卷曲为 42.67%,  $\beta$ -转角为 14.07%,  $\alpha$ -螺旋的含量也增加为 20.76%, 之后随着尿素浓度的增加,  $\beta$ -折叠的含量反而升高, 无规卷曲的含量迅速下降直至下降到小于天然蛋白溶液中的无规卷曲含量。在 1 mol L<sup>-1</sup> 尿素浓度时,  $\beta$ -折叠的含量达到了 73.48%; 无规卷曲的含量为 7.11%。 $\alpha$ -螺旋含量随尿素的浓度增加而呈现先增加后下降的趋势, 在 0.5 mol L<sup>-1</sup> 尿素溶液中其含量达到最大为 30.77%,  $\beta$ -转角含量的变化趋势与  $\alpha$ -螺旋含量的变化趋势相似,  $\beta$ -转角的含量在 0.3 mol L<sup>-1</sup> 尿素中达到最大为 16.84%, 之后随尿素浓度增加而下降, 在 1 mol L<sup>-1</sup> 尿素溶液中  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角的含量与 0 mol L<sup>-1</sup> 相比相差不多, 分别为 12.58%, 6.84%。

表 1 蛋白质酰胺Ⅲ带中峰的位置与二级结构的对应关系  
Table 1 FTIR frequencies of protein amide Ⅲ bands and their assignments to different secondary structures

二级结构 Secondary structures	$\beta$ -折叠 $\beta$ -Sheet/%	无规卷曲 Random coil/%	$\alpha$ -螺旋 $\alpha$ -Helix/%	$\beta$ -转角 $\beta$ -Turn/%
波数 Wave number/cm <sup>-1</sup>	1250 – 1220	1270 – 1250	1330 – 1295	1295 – 1270

表 2 不同蛋白质溶液中的二级结构含量

Table 2 Secondary structure contents of different protein solutions

蛋白质溶液 Protein solutions /mol L <sup>-1</sup>	$\beta$ -折叠 $\beta$ -sheet /%	无规卷曲 Random coil /%	$\alpha$ -螺旋 $\alpha$ -helix /%	$\beta$ -转角 $\beta$ -turn /%
SPI/0 <sup>a</sup>	51.23	27.24	15.84	5.68
SPI/0.1	22.51	42.67	20.76	14.07
SPI/0.3	44.84	10.84	27.47	16.84
SPI/0.5	46.36	9.70	30.77	13.17
SPI/0.8	55.20	6.04	27.42	11.35
SPI/1.0	73.48	7.11	12.58	6.84

<sup>a</sup>代表尿素的摩尔浓度。<sup>a</sup>Molar concentration of solution for urea.

### 3 讨论

在对蛋白质进行的过程中, 常常需要对蛋白质的二级结构进行分析, 红外光谱近年来常用于蛋白质二级结构的分析 (Van de Weert et al., 2001; Zhang et al., 2003; Zhang and Hua, 2007; Zhao et al., 2007)。在蛋白质的二级结构研究中常用酰胺 I 带

(1700 ~ 1600 cm<sup>-1</sup>) 谱峰进行指认, 酰胺 I 带的谱峰指认目前已比较成熟, 其中 1610 ~ 1640 cm<sup>-1</sup> 为  $\beta$ -折叠; 1640 ~ 1650 cm<sup>-1</sup> 为无规卷曲; 1650 ~ 1658 cm<sup>-1</sup> 为  $\alpha$ -螺旋; 1660 ~ 1700 cm<sup>-1</sup> 为  $\beta$ -转角 (Zhang et al., 2003)。但是在本研究中, 由于溶剂性质的特殊性, 溶剂在酰胺 I 带有强吸收, 干扰分析, 所以使用酰胺Ⅲ带进行研究。

尿素是极性分子, 当少量尿素加入蛋白溶液中时, 尿素分子能与水分子迅速形成分子间氢键, 导致水的结构的破坏从而使得蛋白质分子周围的环境极性发生变化, 影响了蛋白质分子之间的疏水相互作用, 导致蛋白质分子的展开, 非极性基团暴露出来, 表现为  $\beta$ -折叠含量的降低, 无规卷曲含量的增加; 随着尿素浓度的逐渐增加, 溶液的极性降低程度变大, 溶液的介电常数降低, 而低介电常数环境能促进肽氢键的形成和稳定, 从而导致蛋白质中非极性基团之间氢键的重新形成, 表现为  $\beta$ -折叠含量的升高, 无规卷曲含量的降低; 低浓度尿素对  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角的影响较小, 可能是由于没有添加尿素的蛋白中  $\beta$ -折叠比  $\alpha$ -螺旋的含量高很多同时可能也与  $\alpha$ -螺旋,  $\beta$ -转角的结构有关。

### 4 结论

利用红外光谱仪测定了低浓度尿素与大豆分离蛋白相互作用后的酰胺Ⅲ带光谱, 得到了不同浓度尿素作用后的大豆蛋白质溶液的二级结构变化, 为研究大豆蛋白在化学工业上的应用提供一定的依据。

### References

- Gao T Y, Li J, and Ci Y X. 2000. FTIR assessment of the secondary structure of proteins in human breast carcinoma tissues. *Journal of Analytical Science*, 16(5): 353-357 (高体玉, 李俊, 慈云祥. 2000. 乳腺癌组织中蛋白质二级结构的 Fourier 变换红外光谱研究. *分析科学学报*, 16(5): 353-357)
- Kalapathy U, Hettiarachchy N S, Myers D, and Hanna M A. 1995. Modification of soy proteins and their adhesive properties on woods. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 72(5): 507-510
- Kumar R, Choudhary V, Mishra S, Varma I K, and Mattiason B. 2002. Adhesives and plastics based on soy protein products. *Industrial Crops and Products*, 16: 155-172
- Ou S Y, Wang Y, Tang S Z, Huang C H, and Jackson M G. 2005. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 70(2): 205-210

(下转 144 页)

## References

- Chen C S, Dong Y M, and Zhao H. 2003. Study on apple dietary fiber modification. *Science and Technology of Food Industry*, (6):34-35 (陈存社,董银卯,赵华. 2003. 苹果膳食纤维改性实验研究. *食品工业科技*, (6):34-35)
- Chen C S, and Liu Y F. 2004. Effect of super micro-milling on physical and chemical property of wheat germ dietary fiber. *Food Science and Technology*, (9):88-94 (陈存社,刘玉峰. 2004. 超微粉碎对小麦胚芽膳食纤维物化性质的影响. *食品科技*, 2004, (9):88-94)
- Gong R. 2004. Studies on extracting dietary fiber of sugar beet pulp and carboxymethylation. Thesis for M S, Xingjiang Agricultural University, Supervisor: Yang H Y, pp. 39-53 (龚冉. 2004. 甜菜废粕中膳食纤维的提取及其改性的研究. 硕士学位论文, 新疆农业大学食品学院, 导师: 杨海燕. pp. 39-53)
- Hong J, and Zhang S Y. 2005. Effect of ultra-fine pulverization by wet processing on particle structure and physical properties of soybean dietary fiber. *Journal of China Agricultural University*, 10(3):90-94 (洪杰, 张绍英. 2005. 湿法超微粉碎对大豆膳食纤维素微粒结构及物性的影响. *中国农业大学学报*, 10(3):90-94)
- Jin Y Q, Li Z H, Li J, and Zhang S J. 2004. Experimental study on preparation of water-soluble food cellulose with enzyme. *Journal of Beijing Polytechnic University*, (1):45-48 (金毓荃, 李兆辉, 李坚, 张书景. 2004. 酶法制取水溶性膳食纤维的实验研究. *北京工业大学学报*, (1):45-48)
- Li A P, Hu C S, and Xie B X. 1999. Study on the preparation of bamboo dietary fiber by fermented lactic bacteria. *Science and Technology of Food Industry*, (1):38-39 (李安平, 胡春水, 谢碧霞. 1999. 乳酸菌发酵制备竹笋膳食纤维的研究. *食品工业科技*, (1):38-39)
- Li J R, and Xia D Z. 2002. Application of ultra-high pressure technology in food industry. *Science and Technology of Food Industry*, 23(7):79-81 (励建荣, 夏道宗. 2002. 超高压技术在食品工业中的应用. *食品工业科技*, 23(7):79-81)
- Li S F, Duan X C, Liu S W, and Yang G M. 2005. Effects of ultra-high pressure treatment on physical properties of fresh claret. *Liquor-making Science & Technology*, 8:61-64 (李绍峰, 段旭昌, 刘树文, 杨公明. 2005. 超高压处理新鲜干红葡萄酒理化性质的影响. *酿酒科技*, 8:61-64)
- Liu C M, Liu W and Lin X Y. 2004. Effect of Micro fluidizer on physical properties of dietary fiber solution. *Food Science*, (2):72-75 (刘成梅, 刘伟, 林向阳. 2004. 对膳食纤维溶液物理性质的影响. *食品科学*, 2004, (2):72-75)
- Liu C M, Liu W, and Lin X Y. 2005. On the possibility of using instantaneous high pressure treatment to modify physical properties of dietary fiber in soybean dregs. *Food Science*, 26(9):112-115 (刘成梅, 刘伟, 林向阳. 2005. IHP 处理对豆渣膳食纤维的改性研究. *食品科学*, 26(9):112-115)
- Zheng J X, ed. 1999. *Functional Food*. Light Industry Press, China, Beijing, pp. 6-49 (郑建仙, 著. 1999. 功能性食品. 中国轻工业出版社, 中国, 北京, pp. 6-49)
- (上接 136 页)
- Sachurfu, Luo L F, and Li Q Z. 2004. Research on urea-induced protein denaturation. *Journal of Inner Mongolia University (Acta Scientiarum Naturalium Universitatis NeiMongol)*, 35(2):183-190 (萨楚尔夫, 罗辽复, 李前忠. 2004. 尿素诱导的蛋白质变性现象的研究. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 35(2):183-190)
- van de Weert M, Haris P I, Hennink W E, and Crommelin D J A. 2001. Fourier transform infrared spectrometric analysis of protein conformation: effect of sampling method and stress factors. *Analytical Biochemistry*, 297:160-169
- Wang J H, Wei Y L, Wen Z H, and He J C. 2004. Advances in application of FT-IR to the research of protein structure. *Chemistry*, (7):482-486 (王建华, 卫亚丽, 文宗河, 何建川. 2004. 蛋白质结构的 FT-IR 研究进展. *化学通报*, 7:482-486)
- Xie M X, and Liu Y. 2003. Studies on amide III infrared bands for the secondary structure determination of proteins. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 24(2):226-231 (谢孟峡, 刘媛. 2003. 红外光谱酰胺 III 带用于蛋白质二级结构的测定研究. *高等学校化学学报*, 24(2):226-231)
- Zhang X, Huang L X, and Nie S Q. 2003. FTIR characteristic of the secondary structure of insulin encapsulated within liposome. *Journal of Chinese Pharmaceutical Science*, 12(1):11-14
- Zhang Z H, and Hua Y F. 2007. Urea-modified soy globulin proteins (7S and 11S): effect of wettability and secondary structure on adhesion. *Journal of the American oil chemists' society*, 84(9):853-857
- Zhao X Y, Chen F S, Xue W T, Lee L T. 2007. FTIR spectra studies on the secondary structures of 7S and 11S globulins from soybean proteins using AOT reverse micellar extraction. *Food Hydrocolloids*. DOI 10.1016/j.foodhyd.2007.01.019