

还原性青刺果果实蛋白生物化学特性的研究

张瑞琳¹, 吴文惠^{2,3}, 张静怡¹, 欧爱宁¹, 郭锐华¹, 包斌^{1,2*}

¹上海海洋大学食品学院; ²上海水产品加工与贮藏工程技术研究中心;

³上海海洋大学海洋科学研究院, 上海 201306

摘要: 分离还原性青刺果果实蛋白, 研究其生物化学特性。使用改良的铁氰化钾还原法评价青刺果果实蛋白的还原能力, 酸溶醇沉法提取青刺果果实蛋白。基于青刺果果实蛋白 PSP₄ 最强的还原能力, 通过 SDS-PAGE、氨基酸自动分析、红外光谱分析、圆二色光谱分析、差示扫描量热分析, 测定 PSP₄ 的氨基酸构成、纯度及分子大小、二级结构和变性温度等生物化学特性。结果显示 75% 乙醇沉淀青刺果果实蛋白 PSP₄ 还原力半数有效浓度为 24.7 mg/mL, SDS-PAGE 电泳呈现清晰的 3 条谱带, 相对分子质量分别为 11 KDa, 14 KDa 和 34 KDa, 热变性温度为 69.83 °C, 还原性青刺果果实蛋白 PSP₄ 具有典型的酰胺 I (1690 ~ 1650 cm⁻¹)、酰胺 II (1610 ~ 1370 cm⁻¹)、酰胺 III (1100 ~ 1030 cm⁻¹)、酰胺 A (3400 ~ 3230 cm⁻¹) 和酰胺 B (3000 ~ 2800 cm⁻¹) 的吸收谱带, 二级结构包含有 α -螺旋 (5.2%)、 β -折叠 (43.1%) 和无规卷曲 (27.6%)。研究表明, 以 PSP₄ 为代表的还原性青刺果果实蛋白由多条肽链构成, β -折叠占优势、较高的热变性温度是其重要生物化学特性, 具有作为生物功能物质的优良特征。

关键词: 青刺果果实蛋白 PSP₄; 还原性; 红外光谱; 二级结构; 热变性温度

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.9.024

Biochemical Characteristics of Reductive *Prinsepiautilis* Fruit Protein

ZHANG Rui-lin¹, WU Wen-hui^{2,3}, ZHANG Jing-yi¹, OU Ai-ning¹, GUO Rui-hua¹, BAO Bin^{1,2*}

¹College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University;

²Aquatic product processing and Storage Engineering Technology Research Centre;

³Institutes of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Reducing proteins were separated from *Prinsepiautilis* Royle fruit and the excellent biochemical properties were investigated. Improved reducing power evaluation method with Potassium Ferricyanide was used. *P. utilis* fruit proteins were extracted and purified by acid dissolution and ethanol precipitation. Because of the strongest reducing power of *P. utilis* fruit special protein 4, SDS-PAGE, amino acids automatic analysis, infrared spectroscopy, circular dichroism spectroscopy and differential scanning calorimeter were applied to determine composition, purity, molecular size, secondary structure, denaturation temperature and other biochemical characteristics of amino acids in *P. utilis* fruit special protein 4, respectively. The reducing power of *P. utilis* fruit special protein 4 precipitated by 75% ethanol was observed. Its half effective concentration of reducing power was 24.7 mg/mL. The extracted *P. utilis* fruit special protein 4 presented as three distinct bands by SDS-PAGE, and the relative molecular mass were 11, 14 and 34 KDa respectively. The denatured temperature of *P. utilis* fruit special protein 4 was 69.83 °C. The secondary structure of *P. utilis* fruit special protein 4 was primarily presented as β -sheet (43.1%) and the random structure (27.6%), whereas alpha-helix (5.2%) occupies the minority. Research showed that the representative of *P. utilis* fruit special protein 4 was composed of several peptide chains, β -sheet in a dominant position, higher thermal denaturation temperature. These were important biochemical characteristics. *P. utilis* fruit special protein 4 with reducing capability was revealed as potential functional substances with excellent characteristics.

Key words: *Prinsepiautilis* Royle Fruit Special Protein 4; reducibility; infrared spectroscopy; secondary structure; denatured temperature

收稿日期: 2017-03-28

接受日期: 2017-05-15

基金项目: 上海市科技创新行动计划 (15410722500); 国家自然科学基金 (81502955)

随着营养免疫学的逐渐发展, 具有保健功效的木本油料植物受到关注。木本油料植物作为蛋白

* 通信作者 Tel: 86-21-61900380; E-mail: bbao@shou.edu.cn

质、多不饱和脂肪酸及其他营养素的重要来源,常常具有调节内分泌、清除体内自由基和提高免疫力等功能。还原性物质或抗氧化活性物质在预防疾病、抗辐射损伤及延缓衰老等方面的重要作用使得还原性蛋白质成为热点研究领域。

青刺果(*Prinsepiautilis*Royle)为蔷薇科扁核木属植物,青刺果果实是木本油料,果实含有13种脂肪酸,以油酸和亚油酸为主的不饱和脂肪酸含量占脂肪酸总量的78.35%,富含亚油酸、 α -亚麻酸、 γ -亚麻酸等成分,饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸组成比例为0.8:1.0:1.0,是品质优良的植物油^[1],具有防治高血压、降低血脂、防止心脑血管疾病、治疗糖尿病等功效^[2-4]。果实还富含蛋白质,总含量达46.97%,以及多种常量和微量元素、维生素、多糖、黄酮、萜类等,具有降血糖、降血脂、抗肿瘤、延缓衰老、增强免疫力等生物活性^[5]。作为青刺果果实重要成分的蛋白质,关于其生物化学特性的研究报道却较少。

青刺果果实蛋白被酸溶醇沉法分离,从氨基酸构成、分子结构特征、二级结构和变性温度等指标研究了其生物化学特性。

1 材料与方法

1.1 材料

青刺果果实由云南省文山合丰生物科技有限公司提供,室温保藏。尿激酶惠赠自上海天士力药业有限公司。溶菌酶购自上海源聚生物科技有限公司。无水乙醇、乙酸乙酯等试剂均为分析纯,购自上海基免生物科技有限公司。

1.2 青刺果果实蛋白提取与分离

取100 g青刺果果实,在500 mL浓度为100 mM的PBS(pH 7.4)缓冲液中,37 °C水浴12 h,去皮去胚芽得到胚乳。吸水涨润的青刺果胚乳加入500 mL 100 mM PBS(100 mMNaCl, pH 7.4)匀浆。用6 M HCl调节匀浆液的pH至3~4,8000 rpm离心20 min,收集上清液,用乙酸乙酯萃取3次,保留水相。调节水相pH值分别至pH 4.5和pH 5.6,分别离心后收集沉淀,分别为样品1(*Prinsepiautilis*Royle Fruit Special Protein 1, PSP₁)和样品2(*Prinsepiautilis*Royle Fruit Special Protein 2, PSP₂)。离心上清液与无水乙醇按1:1的比例混合,离心,取沉淀为样品3(*Prinsepiautilis*Royle Fruit Special Protein 3, PSP₃)。上清液继续加入等体积无水乙醇,离心收集沉淀为样品4

(*Prinsepiautilis*Royle Fruit Special Protein 4, PSP₄)。样品1和样品2为拟等电点沉淀蛋白质,样品3和样品4分别为50%乙醇沉淀蛋白质和75%乙醇沉淀蛋白质。

1.3 SDS-PAGE 分析

将青刺果果实蛋白样品溶解于SDS-PAGE上样缓冲液,100 °C煮沸5 min,上样量5 μ L。5%浓缩胶和15%分离胶电泳至终点。考马斯亮蓝R-250染色0.5 h后脱色完全,电泳自动成像仪成像^[6],运用Quality one软件分析蛋白质电泳谱带。

1.4 还原能力测定

采用修改的铁氰化钾还原法^[7]检测PSP₁、PSP₂、PSP₃、PSP₄的还原能力。配制初浓度50 mg/mL的PSP₄,稀释成浓度为10、20、30、40 mg/mL,分别加入0.2 mol/L的PBS(pH 6.6),加入25 μ L 0.1%的铁氰化钾,于50 °C恒温箱中20 min,冷却至室温,加入25 μ L 10%的三氯乙酸,加入100 μ L水,加入40 μ L 0.1%的氯化铁,静置10 min,蒸馏水做参比,在700 nm波长下测定吸光度值A。同时,以适宜浓度的Vc做阳性对照。

1.5 青刺果果实蛋白氨基酸构成分析

参考GB/T 5009.124-2003方法分析青刺果果实蛋白氨基酸构成。准确称取青刺果果实蛋白样品20 mg于带盖水解瓶中,加入4 mL 6 mol/L盐酸,迅速将瓶盖旋紧,将水解瓶放在110 °C恒温箱中水解24 h,水解结束后用6 mol/L NaOH调节pH至7,定性滤纸过滤,滤液用去离子水稀释至20 mL,作为样品液。取样品液400 μ L,用0.02 mol/L的优级纯盐酸稀释到2 mL,经0.45 μ m滤膜过滤得到氨基酸分析样品,氨基酸分析仪测定氨基酸含量。

1.6 青刺果果实蛋白色氨酸测定

取0.5 g样品于塑料离心管中,加入4.5 mol/L氢氧化钠溶液和0.5%氯化亚锡溶液,吹入氮气,封管后,放入110 °C烘箱中消化24 h,然后将消化好的样液用1 mol/L HCl调pH至中性,定容至25 mL,用0.45 μ m膜过滤,用HPLC检测^[8]。采用XDB-C18色谱柱,检测波长280 nm,流速为1.0 mL/min的甲醇/水流动相。

1.7 红外光谱分析

采用傅里叶变换红外光谱仪采集PSP₄光谱数据,测量范围4000~500 cm^{-1} ,分辨率4 cm^{-1} 。溴化钾粉末在105 °C温度下烘干4 h^[9],将样品粉末10 mg与溴化钾100 mg在石英研钵中研磨至细,压片

装置压片。样品红外光谱是三次测量的平均值。

1.8 圆二色谱分析

用 10 mM PBS(pH 7.4) 配制浓度为 10 mg/mL 的样品待测液。待测液用重蒸水稀释至 1.0 mg/mL, 在光径 0.5 mm、温度 26 °C、扫描速度 100 nm/min、扫描范围 190 ~ 240 nm 的条件下扫描^[10]。以溶菌酶、尿激酶为对照。

1.9 热稳定性分析

准确称取样品 2.000 mg, 放在铝坩埚中, 压片机封口, 以密封空铝盒作参比, 起始温度 20 °C, 终止温度 130 °C, 5 °C/min 升温程序中扫描。用 STARe

软件进行数据记录和处理后得到差示量热扫描 (Differential scanning calorimetry, DSC) 曲线, 峰值点对应的温度是变性温度, 曲线形成的峰所包括的面积为蛋白质变性所吸收的热量^[11]。以相同条件下的溶菌酶和尿激酶为对照。

2 结果与分析

2.1 分离青刺果果实蛋白的外观和溶解性

采用酸溶醇沉的方法分离得到青刺果果实蛋白 PSP₁、PSP₂、PSP₃、PSP₄, 其简单理化特性见表 1。

表 1 PSP₁、PSP₂、PSP₃、PSP₄ 的简单理化特性

Table 1 Physicochemical properties of PSP₁, PSP₂, PSP₃ and PSP₄

样品编号 Sample number	得率 Yield(g/100g)	外观 Presence	溶解性 Solubility	拟等电点 Isoelectric point
样品 1 (PSP ₁) Sample 1 (PSP ₁)	2.9381	白色粉末 White powder	可溶于水 Soluble	pH 4.5
样品 2 (PSP ₂) Sample 2 (PSP ₂)	1.9274	白色粉末 White powder	可溶于水 Soluble	pH 5.6
样品 3 (PSP ₃) Sample 3 (PSP ₃)	3.9200	白色粉末 White powder	易溶于水 Freely soluble	-
样品 4 (PSP ₄) Sample 4 (PSP ₄)	4.9354	白色粉末 White powder	易溶于水 Freely soluble	-

表 1 显示, 在 100 g 青刺果果实样品中提取出 PSP₁、PSP₂、PSP₃、PSP₄ 4 种蛋白质。PSP₁、PSP₂ 为拟等电点沉淀, 分别为 pH 4.5、pH 5.6。PSP₁ 和 PSP₂ 的溶解度在拟等电点附近是较低的, 当 pH 4.5 或 pH 5.6, PSP₁ 和 PSP₂ 的分子净电荷近于零, 分子间吸引力增大, 相互聚集而沉淀析出。冷冻干燥后得到 PSP₁ 和 PSP₂ 的粉末样品, 沉淀析出的蛋白质能再度溶解。

PSP₃、PSP₄ 为乙醇沉淀的青刺果果实蛋白, 乙醇浓度分别为 50%、75%。乙醇将青刺果果实蛋白的

结合水脱除而沉淀出 PSP₃, 继续增加乙醇浓度, 青刺果果实另外的蛋白颗粒上的水化膜被破坏, 沉淀得到 PSP₄。冷冻干燥后得到 PSP₃ 和 PSP₄ 的粉末样品, 沉淀析出的蛋白质易于再度溶解。

从结合水保持能力上分析, 按照 PSP₁、PSP₂、PSP₃、PSP₄ 的顺序逐渐增强, 暗示着同样顺序的蛋白质稳定性。

2.2 4 种青刺果果实蛋白质的还原能力

4 种青刺果果实蛋白质 PSP₁、PSP₂、PSP₃、PSP₄ 还原力测定结果如图 1 所示。

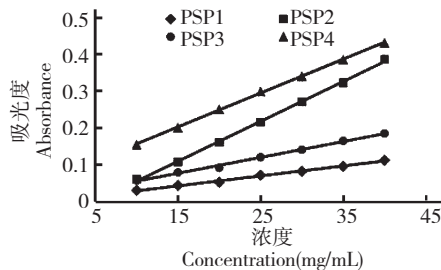
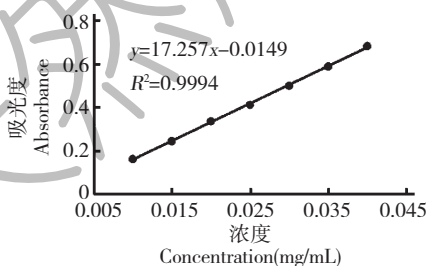


图 1 青刺果果实蛋白质 PSP₁、PSP₂、PSP₃、PSP₄ 和 V_c 的还原力

Fig. 1 The reducing power of V_c, PSP₁, PSP₂, PSP₃ and PSP₄

注: 左图为 V_c 的还原力, 右图为 PSP₁、PSP₂、PSP₃、PSP₄ 的还原力。

Note: The left figure was the reducing power of V_c; The right figure was the reducing power of PSP₁, PSP₂, PSP₃ and PSP₄

吸光度值表示青刺果果实蛋白的还原性, 吸光度和还原性呈正相关。阳性对照 V_c (图 1, 右) 在

0.01 ~ 0.04 mg/mL 的范围内显示的半数有效浓度为 0.025 mg/mL, 浓度和吸光度值 A 线性关系良好

($R^2 = 0.9994$)。图 1(右)显示,在一定的浓度范围内, PSP_1 、 PSP_2 、 PSP_3 、 PSP_4 的还原力都随着浓度的增加而增强,在 10 ~ 40 mg/mL 的浓度范围内均与吸光度值 A 呈现出良好的线性关系,半数有效浓度分别为 25.6、25.574、25.3、24.7 mg/mL。 PSP_4 的半数有效浓度最低,显示最强的还原能力。

2.3 青刺果果实蛋白 PSP_4 的相对分子质量分析

PSP_4 及标准蛋白质的 SDS-PAGE 如图 2 所示。

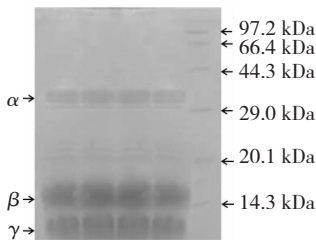


图 2 PSP_4 的 SDS-PAGE 谱图

Fig. 2 SDS-PAGE of PSP_4

图 2 显示,相同浓度、相同加样量,重复加样四次,结果显示 PSP_4 是由三条多肽链构成。相对分子质量最大的肽链为 34 KDa,两条相对分子质量相近的较小肽链在 11 KDa,14 KDa。具有还原能力 PSP_4 青刺果果实蛋白由三条肽链构成被确认。

2.4 PSP_4 的氨基酸构成特点

PSP_4 的氨基酸构成及含量如表 2 所示。

表 2 PSP_4 的氨基酸构成残基数(残基数/1000)

Table 2 Amino acids residues of PSP_4 (residues/1000)

氨基酸 Amino acid	青刺果果实蛋白 PSP_4	氨基酸 Amino acid	青刺果果实蛋白 PSP_4
Asp 天冬氨酸	85	Tyr 酪氨酸	29
Thr 苏氨酸	69	Phe 苯丙氨酸	38
Ser 丝氨酸	32	Lys 赖氨酸	87
Glu 谷氨酸	238	His 组氨酸	43
Gly 甘氨酸	20	Arg 精氨酸	158
Ala 丙氨酸	21	Trp 色氨酸	20
Cys 半胱氨酸	6	Pro 脯氨酸	-
Val 缬氨酸	45	总氨基酸	1000
Met 蛋氨酸	38	必需氨基酸	368
Ile 异亮氨酸	37	酸性氨基酸	323
Leu 亮氨酸	34	碱性氨基酸	288

表 2 显示, PSP_4 氨基酸含量丰富,检测出 17 中

氨基酸其中必需氨基酸 8 种,包括赖氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和色氨酸。 PSP_4 谷氨酸残基占氨基酸残基总数的 20% 以上,精氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基,分别占氨基酸残基总量的 15.8%、8.7%、8.5%。色氨酸(2.0%)、半胱氨酸(0.6%)含量相对较低。组氨酸(4.3%)、蛋氨酸(3.8%)和芳香族氨基酸(8.7%)与食品多肽的抗氧化性有关,其含量相对较高。食用抗氧化性蛋白质可以帮助体内的酶解与非酶解抗氧化系统抵抗外界氧化。大量的肽类氨基酸残基可以在生理 pH 条件下把电子转移到自由基上,有助于提高人体自身的抗氧化特性。同时,食用具有抗氧化性的蛋白质有降压、降脂、治疗肝病、消炎、抗菌、抗癌以及增强免疫力的作用。此外,氨基酸分析过程中并没有检测出脯氨酸。 PSP_4 各氨基酸残基在组成比例上有独特性, PSP_4 的独特性体现在谷氨酸、精氨酸、赖氨酸等氨基酸残基的数量相对常见的其他植物蛋白^[12,13]较多。

与植物蛋白苦杏仁蛋白、大豆蛋白相比, PSP_4 、苦杏仁蛋白^[12]、大豆蛋白^[13]必需氨基酸的含量分别为 36.8%、24.3%、30.7%。氨基酸的含量与氨基酸的比例决定蛋白质营养程度高低,在人体新陈代谢过程中有重要作用,赖氨酸是食物中最容易缺乏的氨基酸,能促进钙的吸收,缓解疲劳。 PSP_4 赖氨酸含量相对较高,占 8.7%,苦杏仁蛋白^[12]中赖氨酸的含量为 1.9%,大豆蛋白^[13]中为 4.2%。同时,碱性氨基酸(Lys, Arg)可与不饱和脂肪酸反应生成盐,因而可抑制不饱和脂肪酸的氧化反应的发生,具有一定的还原性, PSP_4 、苦杏仁蛋白^[12]、大豆蛋白^[13]中碱性氨基酸的比例分别为 28.8%、9.9%、12.6%。表明 PSP_4 营养价值较高,并且其蛋白质具有一定的还原性。综合以上分析, PSP_4 具有较高的营养价值,同时是具有还原特性的蛋白质。

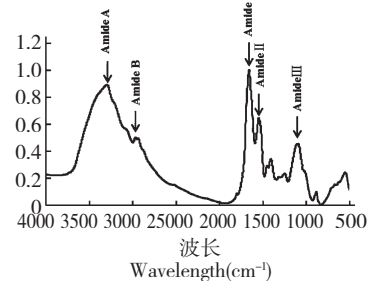


图 3 PSP_4 红外光谱

Fig. 3 IR spectra of PSP_4

2.5 PSP₄ 的红外光谱特征

PSP₄ 红外光谱扫描结果如图 3 所示。

图 3 显示, PSP₄ 最主要的吸收带在酰胺带处, 包括酰胺 I (1690-1650 cm⁻¹)、酰胺 II (1610-1370 cm⁻¹)、酰胺 III (1100-1030 cm⁻¹)、酰胺 A (3400-3230 cm⁻¹) 和酰胺 B (3000-2800 cm⁻¹)。

波数范围为 1600-1690 cm⁻¹ 的酰胺 I 带和酰胺 II 带是对于蛋白质的二级结构指认最常用的酰胺带。根据肽键的红外特征谱带分析^[14], Amide A 在近似 3000 cm⁻¹ 处谱峰, 近似于 NH 伸缩。Amide B 在近似 3100 cm⁻¹ 处谱峰, 同样可能是 N-H 伸缩振动产生的变形峰。蛋白质二级结构典型的标志区域是酰胺 I, 其主要与 C=O 键的伸缩振动有关, 或由氢键和 COO-共同产生。Amide II 主要与 C=N 键和 N-H 的伸缩振动有关, 但是在吡啶或含 C=N 双键的杂环芳香族化合物中, 由于共轭效应, 使 C=N 和 C=C 伸缩振动频率都向低频移动, 都位于 1610-1370 cm⁻¹。在这类化合物的红外光谱中, 在 1610-1370 cm⁻¹ 出现的谱带很难归属哪个谱带是属于 C=N 伸缩振动。Amide III 在应有肽键红外光谱谱带的基础上, 其峰数偏向低波数一侧, 这是其他蛋白质所没有的红外光谱特征, 可能是由于 PSP₄ 的还原性氨基酸的含量较高导致, 其中 1050 cm⁻¹ 为

Amide III 带 N-H 伸缩振动的变形峰。

2.6 PSP₄ 的圆二色谱特征

以溶菌酶和尿激酶为对照的 PSP₄ 圆二色谱扫描结果如图 4 所示。

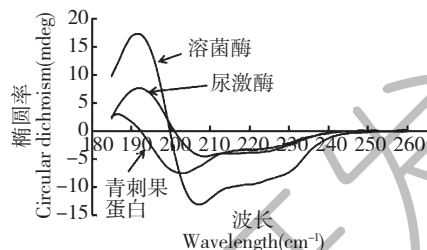


图 4 PSP₄、溶菌酶、尿激酶的圆二色谱图

Fig. 4 The CD of PSP₄, lysozyme and urokinase

图 4 显示, PSP₄ 在 192 nm 附近有正谱带, 表明 PSP₄ 中存在 α -螺旋结构, 但是特征不明显, 可能是由于其含量较低。在 208 nm 和 222 nm 附近出现的谷, 是分子内 β -折叠的 216 nm 谷和 β -转角的 206 nm 谷的蓝移^[15]。同时, PSP₄ 在波长 198 nm 处出现谷, 是无规则卷曲结构的典型特征, 而尿激酶和溶菌酶在 198 nm 处, 为正谱带, 说明也可能存在无规则卷曲结构。由于肽键 π - π^* 和 n - π^* 跃迁, 溶菌酶的圆二色谱在 208 nm 和 222 nm 附近出现负峰, 它们是蛋白质二级结构中 α -螺旋结构的特征光谱, 表明溶菌酶以 α -螺旋结构为主。

表 3 PSP₄、溶菌酶、尿激酶 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角及无规卷曲的含量

Table 3 The percentage α -Helix, β -Sheet, β -Turns, Random coil of PSP₄, lysozyme and urokinase

名称 Name	α -螺旋 α -Helix	β -折叠 β -Sheet	β -转角 β -Turns	无规卷曲 Random coil
青刺果果实蛋白 PSP ₄	5.20%	43.10%	24.10%	27.60%
溶菌酶 Lysozyme	65.20%	9.60%	11.40%	13.70%
尿激酶 Urokinase	4.00%	41.70%	21.50%	32.80%

基于圆二色谱特征值, 给出样品 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角及无规卷曲在蛋白质溶液中所占的比例。 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角及无规则卷曲的相对含量如表 3 所示, PSP₄ 二级结构主要是 β -折叠 (43.1%)、 β -转角 (24.1%) 和无规则卷曲 (27.6%)。

2.7 PSP₄ 热稳定性特征

以溶菌酶和尿激酶为对照的 PSP₄ DSC 检测结果显示为图 5 和表 4。

图 5 显示 PSP₄、溶菌酶、尿激酶的 DSC 曲线, 表 4 显示不同温度加热处理的 PSP₄、溶菌酶、尿激酶中

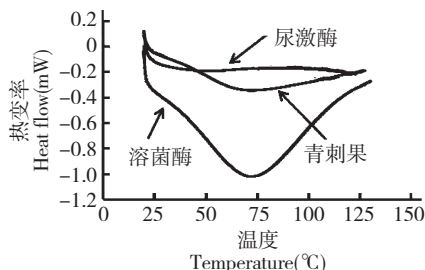


图 5 不同温度加热处理 PSP₄、溶菌酶、尿激酶的 DSC 曲线

Fig. 5 The DSC curves of different heating temperatures of PSP₄, lysozyme and urokinase

表4 不同温度加热处理蛋白的变性温度和吸热量

Table 4 Thermal denaturation temperature and Heat absorption of different protein

序号 Number	蛋白质 Protein	起始变性温度 Initial denaturation temperature (°C)	变性温度 Denaturation temperature (°C)	终止变性温度 Terminated denaturation (°C)	吸热量 Heat absorption (J/g)
1	青刺果果实蛋白 PSP ₄	66.42	69.83	73.24	79.41
2	溶菌酶 Lysozyme	25.24	71.94	126.31	183.5
3	尿激酶 Urokinase	40.14	46.41	52.68	7.478

蛋白质的变性温度和吸热量。

表4显示,PSP₄的热变性温度为69.83℃,较尿激酶的热变性温度40.14℃较高,吸热量为79.41J/g,较尿激酶的吸热量7.478J/g高,这可能是由于青刺果果实蛋白的精氨酸含量较高,精氨酸更容易形成离子对,并在升高的温度下维持净正电荷,精氨酸残基和其他氨基酸残基相比,精氨酸残基具有较高pKa值和共振稳定性,这两个性质表明它能更好地适应高温环境,因此在PSP₄蛋白部分结构区域增加精氨酸的含量可以增加蛋白的稳定性^[16]。

表4显示,PSP₄的起始变性温度远远高于溶菌酶的起始变性温度,但是PSP₄较溶菌酶的吸热量反而较低,原因可能是溶菌酶蛋白变性后,暴露的活性基团间形成了聚集体,这种聚集体的形成可能需要吸收热量,又能促进蛋白质的变性^[17]。但是仍然说明温度升高到一定的程度,才会导致PSP₄变性。相比之下,溶菌酶在较低的温度下就开始变性。

与分子量近似的短肽链溶菌酶或长肽链尿激酶相比较,PSP₄具有较好的热稳定性。

3 结论

以青刺果果实为原料,采用酸溶醇沉法得到不同水结合能力的青刺果果实蛋白PSP₁、PSP₂、PSP₃、PSP₄。

铁氰化钾还原性实验表明,在10~40 mg/mL的浓度范围内,PSP₄还原力呈线性量效关系。半数有效浓度为24.7 mg/mL,与其他青刺果果实蛋白相比,PSP₄具有最强的还原能力。

PSP₄由11 kDa、14 kDa和34 kDa三条肽链构成,含有17种氨基酸,8种必需氨基酸占氨基酸总量的36.8%,碱性氨基酸占氨基酸总量的28.8%,与抗氧化性有关的组氨酸(4.3%)、蛋氨酸(3.8%)和芳香族氨基酸(8.7%)含量较高。从必需氨基酸、碱性氨基酸、抗氧化性氨基酸的构成分析,PSP₄是营养价值高的还原性蛋白质。

PSP₄具有蛋白质二级结构的酰胺带波数,特别是Amide III(1100~1030 cm⁻¹)出现红移,这是PSP₄特有的红外光谱特征,可能是PSP₄还原性氨基酸的含量较高所致。PSP₄的二级结构还体现在其以β-结构和无规则卷曲为主,特别是PSP₄保持热焓的酸性氨基酸(32.3%)和碱性氨基酸(28.8%)比例较高,PSP₄具有高的热变性温度(66.42℃),热稳定性优良。

青刺果果实蛋白PSP₄的分子结构特征、氨基酸构成、红外光谱和二级结构特征等体现出对应的还原能力,以及优良的热稳定性,具有作为优良生物功能物质的特性。

参考文献

- Du P(杜萍), Dan Y(单云), Sun H(孙卉), et al. Nutritional composition analysis of the essential oil of wild *Prinsepia utilis* Royle seed kernel from Lijiang. *Food Sci* (食品科学), 2011, 32: 217-220.
- Chen R(陈瑞), Li XM(黎晓敏), Yin ZQ(殷中琼). Effect of polysaccharide from *Prinsepia utilis* Royle on Glycemia and Serum Lipo protein levels in diabetes mellitus mice. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2007, 8: 2967-2969.
- Lv C(吕城), Li ZW(李正文), Yin ZQ(殷中琼), et al. Effect of *Prinsepia utilis* polysaccharide on the morphology of renal tissue in diabetic mice. *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 2014, 29: 469-471.
- Piccinelli AL, Arana S, Caceres A, et al. New lignans from the roots of *Valeriana prionophylla* with antioxidative and vasorelaxant activities. *J Nat Prod*, 2004, 67: 1135-1140.
- Zhou F(周帆), Guo WM(郭伟民), Lin QH(林华庆). Research progress on pharmacological activities of *Prinsepia utilis*. *China Pharm* (中国药房), 2014, 25: 670-672.
- Li YY(李莹莹), Wu CE(吴彩娥), Yang JT(杨剑婷), et al. Extraction and SDS-PAGE analysis of proteins from *Ginkgo biloba* seed. *Food Sci* (食品科学), 2010, 31(22): 36-40.
- Jia JQ(贾俊强), Ma HL(马海乐), Qu WJ(曲文娟), et al. Ultrasonic pretreatment for preparation of antioxidant pep-

- tides from rice protein. *Trans Chin Soc Agric Eng* (农业工程学报), 2008, 24: 288-293.
- 8 Zhang YH (张艳红), Chen ZH (陈兆慧), Wang DP (王德萍). Determination of amino acids and mineral elements content in *Zizyphus jujuba*. *Food Sci* (食品科学), 2008, 29(1): 263-266.
 - 9 Zhu ZY (朱哲燕), Liu F (刘飞), Zhang C (张初), et al. Protein content determination of shiitake mushroom (*Lentinusedodes*) using mid-infrared spectroscopy and chemometrics. *Spectrosc Spectral Anal* (光谱学与光谱分析), 2014, 34: 1844-1848.
 - 10 Duan R (段蕊), Ye C (叶超), Xing FF (邢芳芳). Comparison on stability of scale collagens from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by circular dichroism. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2010, 36(1): 73-76.
 - 11 Jiang Y (姜燕), Tang CH (唐传核), Wen QB (温其标). DSC analysis of soy protein isolate films. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2008, 34(1): 28-30.
 - 12 Zheng YJ (郑亚军), Hao LP (郝利平), Li Y (李艳). Research and advances of almond protein. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2006, 27: 208-211.
 - 13 Li CY (李春燕), Chi CC (迟翠翠), Zhai EL (翟二林), et al. Nutritional assessment of apple seed protein and soy bean protein. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2011, 27(20): 119-122.
 - 14 Shen XC (沈星灿), Liang H (梁宏), He XW (何锡文), et al. Recent trends and spectroscopic methods for analysis of the protein conformation with circular dichroism. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2004, 32: 388-394.
 - 15 Lu XQ (陆雪芹), Xu SY (许时婴), Cao H (曹慧). Extraction of type II collagen from chicken sternal cartilage powder and its structural analysis. *Food Sci* (食品科学), 2009, 30(4): 47-51.
 - 16 Ausili A, Pennacchio A, Staiano M, et al. Amino acid transport in thermophiles: characterization of an arginine-binding protein from *Thermotogamaritima*. 3. Conformational dynamics and stability. *J Photochem Photobiol B*, 2013, 118(1): 66-73.
 - 17 Wang LJ (汪立君), Li LT (李里特), Zhang XF (张晓峰), et al. Study on soybean protein heating denaturation by DSC. *J China Agric Univ* (中国农业大学学报), 2001, 6(6): 93-96.
-
- (上接第 1550 页)
- 12 Yu XF (于小凤), Li YZ (李韵竹), Zhang WWQ (张魏琬麒), et al. Mulberry leaves harvested before and after frost: correlation between phenylalanine ammonia lyase activity and total flavonoid content as well as air temperature. *Food Sci* (食品科学), 2016, 37(21): 21-25.
 - 13 Xu SY (徐淑云), Bian RL (卞如濂), Chen X (陈修). Pharmacology experimental methodology (药理学实验方法学). Beijing: People's Medical Publishing House, 2002, 1363-1364.
 - 14 Yang LJ (杨利娟), Wang Z (王张), Meng XL (孟宪丽), et al. Methodological study on establishment of mouse cough sensitive elimination standard based on concentrated ammonia water coughing. *Chin Med Pharmacol Clin* (中药药理与临床), 2010, 26: 150-151.
 - 15 Zhou SJ (周绍坚), Su XM (苏湘敏), Chen HJ (陈华俊), et al. A laboratory study of anti-cough effects of *Morus alba* leaves on white mice. *J Youjiang Med Coll National* (右江民族医学院学报), 2007, 29: 697-698.
 - 16 Chen Q (陈奇). Pharmacology experiment of traditional Chinese medicine (中药药理学实验). Shanghai: Shang Hai Scientific & Technical Publishers, 2001, 96-98.
 - 17 Liu B (刘宾), Jiang N (江南). Sequential study on the anti-tussive effect of diammonium glycyrrhizinate on mice. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2009, 29: 820-822.
 - 18 Liu JH (刘晋华), Li YP (李玉萍), You GP (尤光甫). Experimental studies on antitussive expectorant and antiasthmatic effects of Qingfeixiaoke Granule. *Pharm J Chin People's Liberation Army* (解放军药学学报), 2008, 24: 482-485.
 - 19 Wu JG (吴健广), Guo SJ (郭思佳), Hao ZH (郝正华), et al. The effect of Qinghou Liyan granules and Yangyin Qingfei Syrup on the cough caused by ammonia water and SO₂ in mice. *World Chin Med* (世界中医药), 2015, 10: 1760-1763.
 - 20 Lu SW (陆赛卫), Xuan ZY (玄振玉). Experimental studies on antitussive, antiasthmatic and expectorant effects of Fengye Zhike Oral Liquid. *Modern Chin Med* (中国现代中药), 2015, 17: 448-452.
 - 21 Mahsum E (麦合苏木·艾克木), Nurjan R (努尔江·肉孜), Abdiryim Y (阿不都热依木·玉苏甫). On anti-inflammatory, antitussive, expectorant, and anti-asthmatic effects of total flavonoids from Uyghur Medicine Hyssopus of ficinalis L. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2014, 37: 403-406.
 - 22 Pan HX (潘华新), Liang RY (梁瑞燕), Cao LY (曹柳英), et al. Study on expectorant and antitussive effects of citrus flavonoids. *Chin Med Mat* (中药材), 2007, 30(1): 80-82.