

# 酶法脱酰胺对米谷蛋白分子微观结构的影响

刘永乐, 王发祥, 周小玲, 李向红, 俞 健, 王建辉

(长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南 长沙 410114)

**摘 要:** 大米蛋白经酶法脱酰胺后功能性质的显著改善与其分子微观结构的变化有关。通过扫描电镜(SEM)分析、二硫键含量测定和差示扫描量热分析(DSC)研究脱酰胺后米谷蛋白分子超微结构、分子间作用力和聚合度的变化。结果表明: 米谷蛋白颗粒超微结构随着脱酰胺度的增加逐渐松散; 脱酰胺后分子内部分二硫键被迅速还原, 但酶法脱酰胺不会影响到其肽链内二硫键; DSC 图谱分析表明脱酰胺后蛋白质热稳定性和聚合度均有降低。

**关键词:** 米谷蛋白; 谷氨酰胺酶; 超微结构; 二硫键; 差示扫描量热分析

## Effect of Glutaminase-induced Deamidation on Microstructure of Rice Protein

LIU Yong-le, WANG Fa-xiang, ZHOU Xiao-ling, LI Xiang-hong, YU Jian, WANG Jian-hui

(College of Chemical and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114, China)

**Abstract:** The change in functional properties of glutaminase-deamidated rice protein is correlated with its microstructure change. In this paper, scanning electron microscope (SEM), disulfide bond determination and differential scanning calorimetry (DSC) were used to analyze the ultra-microstructure, disulfide bond content and thermal properties of glutaminase-deamidated rice protein. The results showed that the ultra-microstructure of glutaminase-deamidated rice protein revealed gradually loose and well dispersed structure as well as rapidly reduced disulfide bond content due to the increased deamidation degree. Moreover, declined thermal stability and polymerization degree of rice protein were determined by DSC.

**Key words:** rice protein; glutaminase; ultra-microstructure; disulfide bond; DSC

中图分类号: TS213.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0069-03

米谷蛋白是一种过敏性低、营养价值高的植物蛋白,但由于其水溶性差而影响其乳化性与乳化稳定性、起泡性与起泡稳定性及持水持油性等加工性能,从而影响其在食品中进一步应用。研究表明,对米谷蛋白脱酰胺处理能将其分子中的酰胺基转变成羧基,这种羧化作用导致负电荷增加,从而使其分子内氢键减少,静电排斥作用增强,因此可显著改善米谷蛋白在水中的溶解性和其他功能性质<sup>[1-2]</sup>。

蛋白功能性质的变化与其分子结构的变化密不可分。Mataudomi 等<sup>[3]</sup>研究了酸法脱酰胺对大豆蛋白分子结构与表面性质的影响,表明随着脱酰胺度的增加,蛋白质的螺旋结构与表面张力减小;易翠平等<sup>[4]</sup>研究了酸法脱酰胺作用对大米蛋白超微结构与分子结构的影响,表明随着脱酰胺度的增加,蛋白质的聚集程度减小。然而对于酶法脱酰胺对蛋白质分子结构的影响则鲜见报道。以前的研究中,以谷氨酰胺酶作用于米谷蛋白的

谷氨酰胺基团,对其进行酶法脱酰胺改性,获得了功能特性和营养价值均明显改善的大米蛋白质<sup>[5]</sup>。本研究通过检测不同脱酰胺度米谷蛋白的超微结构、分子间作用力和热变性特性,旨在阐明酶法脱酰胺对大米蛋白分子微观结构影响,为更深入研究大米蛋白的酶法改性及其推广应用提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

粳米碎米由湖南省霞凝粮库提供。

谷氨酰胺酶(Glutaminase)、 $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -Mercaptoethanol) 美国 Sigma 公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

JSM-6700F 扫描电子显微镜 日本电子公司;  
UV2800SPC 紫外-可见分光光度计 上海舜宇恒平科学

收稿日期: 2011-04-01

基金项目: 国家“863”计划重点项目(2008AA100801); 湖南省科技厅科技支撑计划项目(2010NK3003);

湖南省教育厅科研项目(10C0400)

作者简介: 刘永乐(1962—),男,教授,博士,研究方向为食品生物技术与农产品深加工。E-mail: lyle19@163.com

仪器有限公司; STA449 PC 综合热分析仪(TG-DSC) 德国耐驰公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品制备

原米谷蛋白及不同脱酰胺度的改性米谷蛋白样品按参考文献[5]条件制备, 冷冻干燥备用。

#### 1.3.2 蛋白质的超微结构分析

取少许冻干的不同脱酰胺度的蛋白样品进行喷金处理, 以扫描电子显微镜观察其超微结构。

#### 1.3.3 脱酰胺度的计算

脱酰胺度以酶处理后释放的酰胺基数目与原蛋白总酰胺基数目的比值来表示, 以文献[6]方法检测。

#### 1.3.4 巯基与二硫键的分析

参考文献[7]略作修改: 15mg 样品用 1mL Tris- 甘氨酸缓冲液混匀后加 4.7g 盐酸胍, 用 Tris- 甘氨酸缓冲液定溶至 10mL。测定巯基, 取 1mL 该液加 4mL 脲- 盐酸胍溶液和 0.05mL 5,5'-二硫代-2-硝基苯甲酸, 于 412nm 波长处测取吸光度。测定二硫键, 取 1mL 溶液, 加 0.05mL 巯基乙醇和 4mL 脲- 盐酸胍溶液, 于 25℃保温 1h, 然后加入 10mL 12% 的三氯乙酸, 继续于 25℃保温 1h, 3000r/min 离心 10min, 用 5mL 12% 的三氯乙酸清洗沉淀物 2 次, 将沉淀物溶于 10mL 8mol/L 脲中, 加 0.04mL 5,5'-二硫代-2-硝基苯甲酸, 于 412nm 波长处测取吸光度。

$$\text{巯基含量}(\mu\text{mol/g}) = 73.53 \times A_{412\text{nm}} \times D / \rho \quad (1)$$

$$\text{二硫键含量}(\mu\text{mol/g}) = (\text{总巯基含量} - \text{游离巯基含量}) / 2 \quad (2)$$

式中:  $A_{412\text{nm}}$  为波长 412nm 处的吸光度;  $\rho$  为样品质量浓度/(mg/mL);  $D$  为稀释因子, 计算游离巯基含量时取 5.02  $\mu\text{mol/L}$ , 计算总巯基含量(游离巯基含量 + 二硫键还原的巯基含量)时取 10  $\mu\text{mol/L}$ 。

#### 1.3.5 差示扫描量热分析

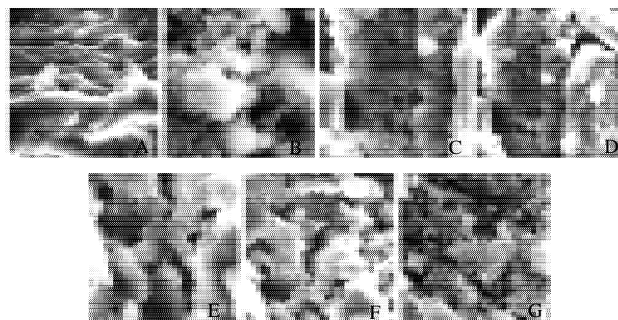
取约 10mg 冻干的不同脱酰胺度的蛋白样品, 置于综合热分析仪的样品池, 测定其 TG-DSC 曲线, 温度扫描范围 30~120℃, 扫描速率 5℃/min。

## 2 结果与分析

### 2.1 脱酰胺后米谷蛋白的超微结构分析

米谷蛋白分子的链内或链间通过氢键及疏水作用等聚集成致密分子, 形成一种大分子的蛋白质聚集体<sup>[6]</sup>。以扫描电子显微镜观察不同脱酰胺程度米谷蛋白的超显微结构, 结果如图 1 所示。未酶解脱酰胺米谷蛋白明显聚集抱团, 结构紧密, 没有疏松的孔隙结构。酶解 1h, 脱酰胺度达到 26.69%, 蛋白结构聚集体开始松散, 出现孔隙; 随着酶解时间的延长, 蛋白分子聚集体逐渐解聚, 开始分散; 当酶解时间达到 24h, 脱酰胺度达到

41.37%, 蛋白分子聚集体已基本分散成小片状单元结构; 继续酶解至 48h, 脱酰胺度达到 52.29%, 蛋白质聚集体结构完全展开, 形成均匀的分散体。由此可见随着脱酰胺度的增加, 蛋白质分子聚集体逐渐展开, 孔隙增多, 结构变得越来越松散。



A~G. 分别为酶解 0、1、3、5、12、24、48h 的蛋白样品。

图 1 不同酶解米谷蛋白的超微结构图(×3000)

Fig.1 Ultra-microstructure of glutaminase-deamidated rice protein (×3000)

### 2.2 脱酰胺后米谷蛋白的二硫键变化分析

二硫键是连接不同肽链或同一肽链不同部位的化学键, 是一种较稳定的共价键。二硫键的形成使蛋白质肽链的三维结构更为紧密, 从而稳定其空间构象, 因此在蛋白质立体结构中形成和稳定中具有重要作用。二硫键具有不同的空间构型, 因此形成二硫键的两个半胱氨酸残基所在肽段的相对位置也会因为二硫键构型不同而改变<sup>[8]</sup>。

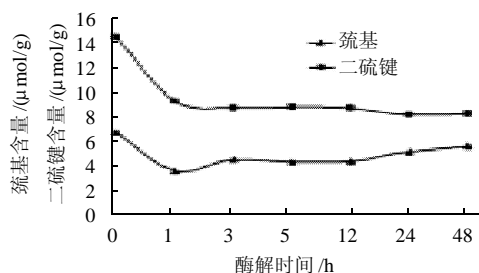


图 2 不同酶解时间的米谷蛋白的巯基与二硫键含量

Fig. 2 Content changes in sulfhydryl and disulfide bonds of glutaminase-deamidated rice protein at different time points

由图 2 可知, 未脱酰胺的米谷蛋白二硫键含量较高, 谷氨酰胺酶脱酰胺 1h 内二硫键含量迅速降低, 可能是因为形成二硫键的部分半胱氨酸被转化成为巯基化合物, 挥发性物质等<sup>[9]</sup>。但酶解 1h 后, 二硫键的含量变化不再明显, 而且酶解时间延长不会引起二硫键含量一直下降, 说明谷氨酰胺酶酶解不会导致蛋白质肽链内全部二硫键的打开, 可能只是还原了部分肽链间和分子

表面的二硫键,使蛋白质由聚集状态解体,利于其在溶液中分散,这与Liao等<sup>[10]</sup>的研究结果一致。

### 2.3 米谷蛋白脱酰胺后的聚合度变化分析

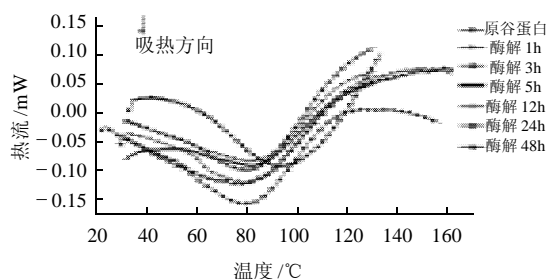


图3 不同酶解时间米谷蛋白的DSC图谱

Fig. 3 DSC maps of glutaminase-deamidated rice protein at different time points

表1 不同酶解时间米谷蛋白的热变性特性

Table 1 Thermal characteristics of glutaminase-deamidated rice protein at different time points

样品	起始温度 $t_0/^\circ\text{C}$	峰值温度 $t_p/^\circ\text{C}$	结束温度 $t_e/^\circ\text{C}$	吸热量 $Q/(\text{J/g})$
原米谷蛋白	62.8	85.2	112.3	31.2
酶解 1h	53.1	77.4	105.8	32.3
米 酶解 3h	50.2	76.3	104.1	33.5
谷 酶解 5h	49.8	77.3	104.5	32.1
蛋 酶解 12h	47.7	74.1	101.2	38.6
白 酶解 24h	45.3	71.3	103.5	38.3
酶解 48h	46.7	73.8	102.4	47.8

差示扫描量热法(DSC)是在程序控制温度下测量输入到试样和参比物的能量差与温度关系的一种技术。可用于测量蛋白质的玻璃化转变温度、熔融温度、结晶度、比热容等物性和聚合、交联、氧化、分解,反应温度或温区等反应性。图3和表1分别为不同脱酰胺程度米谷蛋白的DSC曲线和热力学特性,可见其热变性吸热峰和热特性明显不同。原米谷蛋白的峰值温度( $t_p$ )为85.2℃,酶解脱酰胺后米谷蛋白变性起始温度( $t_0$ )、峰值温度( $t_p$ )和结束温度( $t_e$ )均有所下降,可能是因为脱酰胺反应及加热导致蛋白质分子结构的无序化,产生不同于原米谷蛋白结构的中间体<sup>[11]</sup>,从而降低了热稳定性。此外,从DSC曲线分析,脱酰胺后样品的半峰宽明显增加,而且随着脱酰胺处理时间的延长,半峰宽和吸热值( $Q$ )逐渐增加,表明所需吸热逐渐增加,而聚合物热变性吸热与其聚合度成正比,说明酶解脱酰胺时

间越长,米谷蛋白分子内多肽链交联减少,聚合度降低,这可能与脱酰胺度越大,米谷蛋白分子中氢键、二硫键等作用力的破坏越剧烈<sup>[12]</sup>有关。

### 3 结 论

随着谷氨酰胺酶作用于米谷蛋白的时间延长,蛋白质分子聚合体逐渐解开,孔隙增多,变得越来越松散;原米谷蛋白分子中二硫键含量较高,谷氨酰胺酶酶解使其肽链间二硫键在1h内被迅速破坏,但随着酶解时间的延长,二硫键含量几乎不再下降;酶法脱酰胺后米谷蛋白的热稳定性下降、变性吸热增加,说明脱酰胺后米谷蛋白的聚合度降低。

### 参考文献:

- [1] MATSUDOMI N, SASAKI T, KATO A, et al. Conformational changes and functional properties of acid-modified soy protein[J]. *Agricultural Biological Chemistry*, 1985, 49: 1251-1256.
- [2] YONG Yiehui, YAMAGUCHI S, MATSUMURA Y. Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(16): 6034-6040.
- [3] MATAUDOMI N, KATO A, KOBAYASHI K. Conformation and surface properties of deaminated gluten[J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1982, 46(6): 1583-1586.
- [4] 易翠平, 姚惠源. 酸法脱酰胺对大米蛋白超微结构和相对分子质量的影响[J]. *中国粮油学报*, 2007, 22(2): 1-4.
- [5] 李向红, 周小玲, 刘永乐, 等. 蛋白质谷氨酰胺酶对米谷蛋白功能性质的影响[J]. *食品科学*, 2010, 31(17): 192-196.
- [6] 周小玲, 刘永乐, 李向红, 等. 蛋白质谷氨酰胺酶对米谷蛋白的分子结构及功能性质的影响[J]. *中国食品学报*, 2010, 10(5): 98-105.
- [7] BEVERIDGE T, TOMA S J, NAKAI S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using ELLMAN'S reagent[J]. *Journal of Food Science*, 1974, 39(1): 49-51.
- [8] 冯慧星, 黄力勤, 龚睿, 等. 分子内二硫键对HERV囊膜蛋白融合核心结构的影响[J]. *中国病毒学*, 2005, 21(5): 437-442.
- [9] ANDERSON L A K, NG P K W. Changes in disulfide and sulfhydryl contents and electrophoretic patterns of extruded wheat flour proteins[J]. *Cereal Chemistry*, 2000, 77(3): 354-359.
- [10] LIAO Lan, ZHAO Mouming, REN Jiaoyan, et al. Effect of acetic acid deamidation-induced modification on functional and nutritional properties and conformation of wheat gluten[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90: 409-417.
- [11] GORINSTEIN S, ZEMSER M, FRIEDMAN M. Physicochemical characterization of the structural stability of some plant globulins[J]. *Food Chemistry*, 1996, 56(2): 131-138.
- [12] HARWALKAR V R, MA C Y. Study of thermal properties of oat globulin by differential scanning calorimetry[J]. *Journal of Food Science*, 1987, 52: 394-398.