三种有机酸在不同 pH 条件下酸沉处理对米糠蛋白结构的影响

吴 伟，吴晓娟, 杨滔滔
（中南林业科技大学食品科学与工程学院，稻谷及副产物深加工国家工程实验室，湖南 长沙 410004）

摘 要：以传统碱溶酸沉制备米糠蛋白所用的盐酸为对照，采用酒石酸、苹果酸、柠檬酸三种有机酸分别在 pH 4.0、3.5、3.0、2.0 条件下酸沉制备米糠蛋白，研究有机酸酸沉对米糠蛋白结构的影响。结果表明，同种有机酸在不同 pH 条件下酸沉，当酸沉 pH 值下降时，米糠蛋白总巯基和 α-螺旋含量无显著变化，游离巯基和无规卷曲含量上升，β-折叠和 β-转角含量下降，内源荧光强度和表面疏水性先增加后下降。相比盐酸酸沉，有机酸在相同 pH 条件下酸沉制备米糠蛋白的总巯基、二级结构组成和表面疏水性无显著差异，但游离巯基含量下降、内源荧光强度升高。分子质量分布、粒径分布及电泳结果表明，较低 pH 条件下的酸沉可导致米糠蛋白结构发生了部分解离和聚集，但没有形成新的亚基和高分子量聚集体。

关键词：米糠蛋白；有机酸；酸沉；结构特征

Effects of Acid-precipitation at Different pH by 3 Kind of Organic Acids on the Structure of Rice Bran Protein

WU Wei, WU Xiaojuan, YANG Taotao
(School of Food Science and Engineering, National Engineering Laboratory for Rice and By-product Deep Processing, Center South University of Forestry and Technology, Changsha, 410004, China)

Abstract: Compared with hydrochloric acid used in traditional alkaline-extraction and acid-precipitation method, rice bran protein was prepared by the acid-precipitation at condition of tartaric acid, malic acid, and citric acid at pH of 4.0, 3.5, 3.0, and 2.0, respectively. Effects of acid-precipitation by organic acids on structural characteristics of rice bran protein were investigated. The results indicated that when the same organic acid was used to acid-precipitate at different pH, as acid-precipitation pH value decreased, total sulphydryl and α-helix content of rice bran protein changed insignificantly, free sulphydryl and random coil content gradually increased, β-sheet and β-turn content decreased, intrinsic fluorescence intensity and surface hydrophobicity of rice bran protein firstly increased, then decreased. There was no significant difference in total sulphydryl, secondary structure composition, and surface hydrophobicity of rice bran protein between hydrochloric acid and organic acids acid-precipitation at the same pH. Compared with hydrochloric acid, rice bran protein which acid-precipitation by organic acids had lower free sulphydryl content and higher intrinsic fluorescence intensity. The results of molecular weight distribution, particle size distribution, and electrophoresis indicated that acid-precipitation at low pH resulted in partial dissociation and aggregation of rice bran protein, but not form new subunits and high molecular weight aggregates.

Key words: rice bran protein; organic acid; acid-precipitation; structural characteristics
中图分类号：TS210.9 文献标志码：A 文章编号：

收稿日期：2017-07-06
基金项目：国家自然科学基金面上项目（31771918）；公益性行业(农业)科研专项(201303071)
作者简介：吴伟（1981-），男，副教授，博士，研究方向为粮油加工。E-mail：foodwuwei@126.com

米糠是糙米加工成精米过程中碾下的种皮层、外胚乳层、糊粉层、胚芽和少量碎米的混合物。我国是稻谷生产大国，米糠年产量近 1 400 万吨[1]。米糠营养丰富，含有 14%~24%脂肪、12%~16%蛋白质、23%~30%膳食纤维和多种生理活性物质，极具开发利用价值[2]。在食品工业中，米糠主要用于提取米糠油和米糠蛋白[3]。米糠蛋白氨基酸种类齐全，组成平衡，接近氨基酸理想构成模式，还具有消化性能好、抗过敏性的特点，可作为婴幼儿食品的蛋白原料，是一种高附加值的植物蛋白资源[4]。

近年来，由于我国农业环境中镉污染现象突出，稻谷制品镉含量超标情况比较严重。在稻谷籽粒中，镉主要分布在蛋白含量高的米糠层，米糠平均镉含量约为稻谷的两倍，由此可见，米糠蛋白在开发利用之前需进行除镉处理[5]。一些天然的有机酸，如：酒石酸、苹果酸、柠檬酸等，能与金属离子形成可溶性络合物，常常作为除镉剂使用[6]。杨滔滔等[7]将传统“碱溶酸沉”提取米糠蛋白生产工艺的盐酸替换为有机酸，在不同 pH 条件下酸沉制备米糠蛋白，发现酒石酸、苹果酸、柠檬酸具有很好的除镉效果，但会引起米糠蛋白功能性质的改变。蛋白质的功能特性与其结构特征密切相关[8]，功能性质的改变必然是由结构特征的变化引起的[9-10]。目前还没有关于有机酸酸沉对蛋白质结构特征影响的研究报道。本文选用酒石酸、苹果酸、柠檬酸分别在不同 pH 条件下酸沉制备米糠蛋白，以盐酸为对照，研究有机酸酸沉对米糠蛋白结构特征的影响，以期为开发有机酸除镉技术和提高米糠蛋白附加值提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

脱脂米糠 湖南金霞九鼎农牧有限公司；5,5’-二硫代二硝基苯甲酸(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)，DNTB)、1-苯氨基萘-8-磺酸 美国 Sigma-Aldrich 公司；盐酸、酒石酸、柠檬酸、苹果酸、三羟甲基氨基甲烷、三氯乙酸、2,4-二硝基苯肼、丙烯酰胺、N,N-亚甲基双丙烯酰胺、β-巯基乙醇、十二烷基硫酸钠 国药集团化学试剂有限公司；所有试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

F7000 荧光分光光度计 日本日立公司；IRTracer-100 傅里叶红外光谱仪 日本岛津公司；Nano ZS 纳米粒度分析仪 英国 Malvern 公司；Healthcare SE260 电泳仪 美国 GE 公司；LC-20A 高效液相色谱仪 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 米糠蛋白的制备

参考杨滔滔[7]等酸沉处理的方法制备米糠蛋白，脱脂米糠粉碎过 60 目筛备用，取 100 g 脱脂米糠与 900 mL 去离子水混合，40 ℃下磁力搅拌 4 h，并用 2 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 9.0，之后在 4 ℃下 8 000 r/min 离心 20 min，取上清液酸沉，所用的酸分别为盐酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸，pH 值分别为 2.0、3.0、3.5、4.0，常温静置 2 h 后于 4 ℃下 8 000 r/min 离心 15 min，取沉淀水洗三次，分散于去离子水中并调 pH 至 7.0，随后透析 72 h 去除碱溶酸沉过程中形成的盐类物质，-20℃冷冻 24 h 以上，冷冻干燥得到米糠蛋白。

1.3.2 米糠蛋白游离巯基、总巯基含量的测定

参考 Huang 等[11]方法。称取 120 mg 米糠蛋白，分散于 20 mL 0.1 mol/L 含有 l mmol/L 乙二胺四乙酸和 1% 十二烷基硫酸钠 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液，常温条件下磁力搅拌 2 h 后 10 000 r/min 离心 10 min，采取考马斯亮蓝 G-250 法测定上清液中蛋白质的质量浓度，采取 DNTB 比色法在 412nm 波长处测定吸光度，以 13 600 mol/（L·cm）消光系数计算米糠蛋白游离巯基和总巯基含量。

1.3.3 米糠蛋白傅里叶红外光谱的测定

取 2 mg 米糠蛋白样品和 200 mg 干燥的溴化钾混合，研磨混匀后制成透明薄片。室温干燥环境下进行傅里叶红外扫描，扫描条件：扫描范围 400～4 000 cm^{-1}，分辨率 4 cm^{-1}，样品扫描 128 次。

1.3.4 米糠蛋白粒径的测定

将米糠蛋白溶解于 0.01 mol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲液中，磁力搅拌 2 h 后室温 10 000 r/min 离心 20 min 收集上清液并稀释，取上清液 1 mL，采用 Nano ZS 纳米粒度分析仪测定米糠蛋白粒径分布。

1.3.5 米糠蛋白内源荧光光谱的测定

参考 Liu[12]等方法。将米糠蛋白溶解于 pH 7.0 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液中，室温下磁力搅拌 2 h 后 10 000 r/min 离心 20 min，收集上清液。以考马斯亮蓝 G-250 法测定上清液中蛋白质的质量浓度，通过稀释使蛋白质的质量浓度达到 0.1 mg/mL。采用 F-4600 型荧光光谱仪在激发波长 280 nm 下扫描 300～500 nm 之间的发射光谱，以 pH 7.0、0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液为空白。

1.3.6 米糠蛋白表面疏水性的测定

采用荧光探针法[13]测定表面疏水性。以 1-苯氨基萘-8-磺酸为外源荧光探针，测定不同质量浓度的米糠蛋白在 370 nm 激发波长和 490 nm 发射波长下的荧光强度。以荧光强度对蛋白质质量浓度作图，曲线斜率即为蛋白质表面疏水性指数。

1.3.7 凝胶色谱测定米糠蛋白的相对分子质量分布

参考 Fang[14]等方法。将米糠蛋白分散于 0.05 mol/L 含有 0.05 mol/L 氯化钠 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液中，配制成浓度为 10 mg/mL 的蛋白溶液，室温下磁力搅拌 2 h 后 10 000 r/min 离心 30 min，取上清液用孔径 0.45 μm 的醋酸纤维素膜过滤，收集滤液，采用 LC-20A 高效液相色谱系统进行分析。色谱柱：TSKgel SW G4000 SWXL；检测器：Waters 996 光电二极管阵列检测器；流动相：0.05 mol/L 含 0.05 mol/L 氯化钠 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液；紫外检测波长：280 nm；流速：1 mL/min；柱温：25 ℃。

1.3.8 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

参考 Wu[15]等的不连续电泳方法。分离胶浓度 12.5%，浓缩胶浓度 4%，pH 8.3 的电极缓冲液含 0.1%十二烷基硫酸钠，0.05 mol/L 三羟甲基氨基甲烷，0.384 mol/L 甘氨酸，用样品溶解液（内含 5% β-巯基乙醇，2%十二烷基硫酸钠，0.02%溴酚蓝，10%甘油，0.01 mol/L pH 8.0 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液）配制蛋白质量浓度为 2.0 mg/mL 的样品。电泳采用 0.75 mm 的凝胶板；上样量为 12 μL；样品在浓缩胶时电流为 10 mA，待样品进入分离胶后电流升至 25 mA，采用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.4 数据处理与统计分析

所有实验平行测定 3 次。数据采用 Microsoft excel 2003 和 Origin 7.5 进行处理，结果用平均值±标准差的形式表示。指标比较采用最小显著差异法，取 95%置信度（P＜0.05）。

2 结果与分析

2.1 酸沉处理对米糠蛋白巯基含量的影响

如表 1 所示，采用同种有机酸在不同 pH 条件下酸沉时，随着酸沉 pH 值下降，米糠蛋白的游离巯基含量逐渐上升，总巯基含量无显著变化。游离巯基的增加一方面可能是因为蛋白质结构展开导致内部巯基暴露，另一方面可能是二硫键断裂生成新巯基，但新巯基生成必然导致总巯基增加[16-17]，表 1 中米糠蛋白总巯基含量无显著变化，从侧面说明酸沉 pH 值下降没有造成米糠蛋白二硫键的断裂，而是米糠蛋白结构逐渐展开，导致巯基暴露程度不断增加。Liu[18]等在研究 pH 偏移处理对大豆分离蛋白结构的影响时发现，酸处理（pH 1.5，3 h）后大豆分离蛋白的总巯基含量没有显著变化，而游离巯基含量增加，并提出二硫键在酸性环境中较稳定，不易断裂。相比于盐酸，采用有机酸在相同 pH 条件下酸沉制备的米糠蛋白游离巯基含量显著减小，这可能是因为三种有机酸的酸性较弱，对米糠蛋白结构的影响较小。

表 1 不同有机酸酸沉对米糠蛋白总巯基、游离巯基含量的影响

Table 1 Effect of acid-precipitation by different organic acids on the contents of total sulphydryl and free sulphydryl of rice bran protein

pH	不同酸酸沉制备米糠蛋白的总巯基、游离巯基含量（nmol/mg）			
	盐酸	酒石酸	苹果酸	柠檬酸

	总巯基	游离巯基	总巯基	游离巯基	总巯基	游离巯基	总巯基	游离巯基
2.0	50.65±0.86[a]	21.61±0.96[a]	50.56±1.78[a]	20.09±0.56[a]	51.02±1.83[a]	17.56±0.86[a]	51.54±3.03[a]	17.84±0.57[a]
3.0	49.66±1.91[a]	20.09±0.56[b]	49.37±1.27[a]	19.10±0.41[b]	51.53±2.33[a]	15.44±0.47[b]	50.69±1.18[a]	15.24±0.51[b]
3.5	50.35±2.37[a]	18.75±0.86[b]	52.49±1.74[a]	17.78±0.13[c]	51.84±1.02[a]	14.31±0.33[c]	51.63±1.20[a]	13.65±0.41[c]
4.0	50.80±1.75[a]	16.59±0.68[c]	50.67±2.90[a]	13.45±0.46[d]	50.19±3.19[a]	11.83±0.41[d]	51.04±1.76[a]	11.90±0.22[d]

注：同一列中不同肩标小写字母表示在 P<0.05 水平上差异显著。

2.2 酸沉处理对米糠蛋白二级结构的影响

参考王长远等[19]方法对米糠蛋白去卷积酰胺 I 带图谱（图 1）进行鉴定，β-折叠结构：1617～1618、1626～1627、1637～1638、1695～1696 cm^{-1}；α-螺旋结构：1646、1651～1653 cm^{-1}；无规卷曲结构：1 660～1661 cm^{-1}；β-转角结构：1670～1672、1681～1683 cm^{-1}。运用 Peak Fit 4.12 软件对酰胺 I 带图谱进行分峰拟合，得到米糠蛋白的二级结构组成（图 2）。采用同种有机酸在不同 pH 条件下酸沉时，随着酸沉 pH 值的下降，米糠蛋白二级结构中的 β-折叠和 β-转角含量下降，无规卷曲含量上升，α-螺旋含量则几乎无显著变化。出现上述现象可能是因为，在酸性环境中米糠蛋白二级结构中的 β-折叠和 β-转角会向 α-螺旋和无规卷曲转化，且随着 pH 值下降，转化程度增加，而将 pH 再调回 7.0 时米糠蛋白发生聚集，α-螺旋和无规卷曲向 β-折叠和 β-转角转化，但是蛋白结构在展开又聚集的过程中，米糠蛋白二级结构难以完全按照之前的方式重组，整体趋向于向无规卷曲转变，且随着酸沉 pH 值下降，米糠蛋白二级结构的变化程度越大，无规卷曲含量越高。赵谋明[20]等采用圆二光谱仪分析酸性条件对大豆分离蛋白二级结构的影响时发现，酸处理导致蛋白解离程度增加，二级结构中无规卷曲含量上升。采用不同有机酸和盐酸在相同 pH 条件下酸沉时，米糠蛋白的二级结构组成没有显著差异。

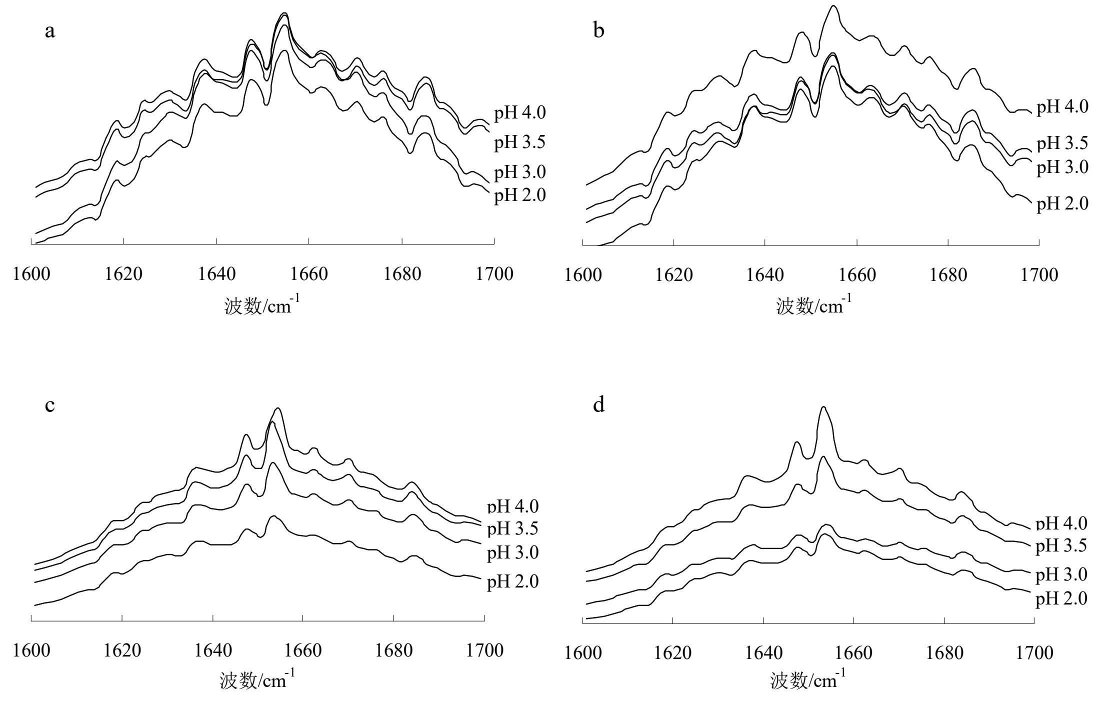

图 1 不同有机酸酸沉制备米糠蛋白的傅里叶变换红外光谱酰胺 I 带（a、b、c、d 分别表示盐酸、酒石酸、苹果酸和柠檬酸酸沉米糠蛋白）

Fig.1 Amide I band of Fourier transform infrared spectra of rice bran protein which precipitated by different organic acids

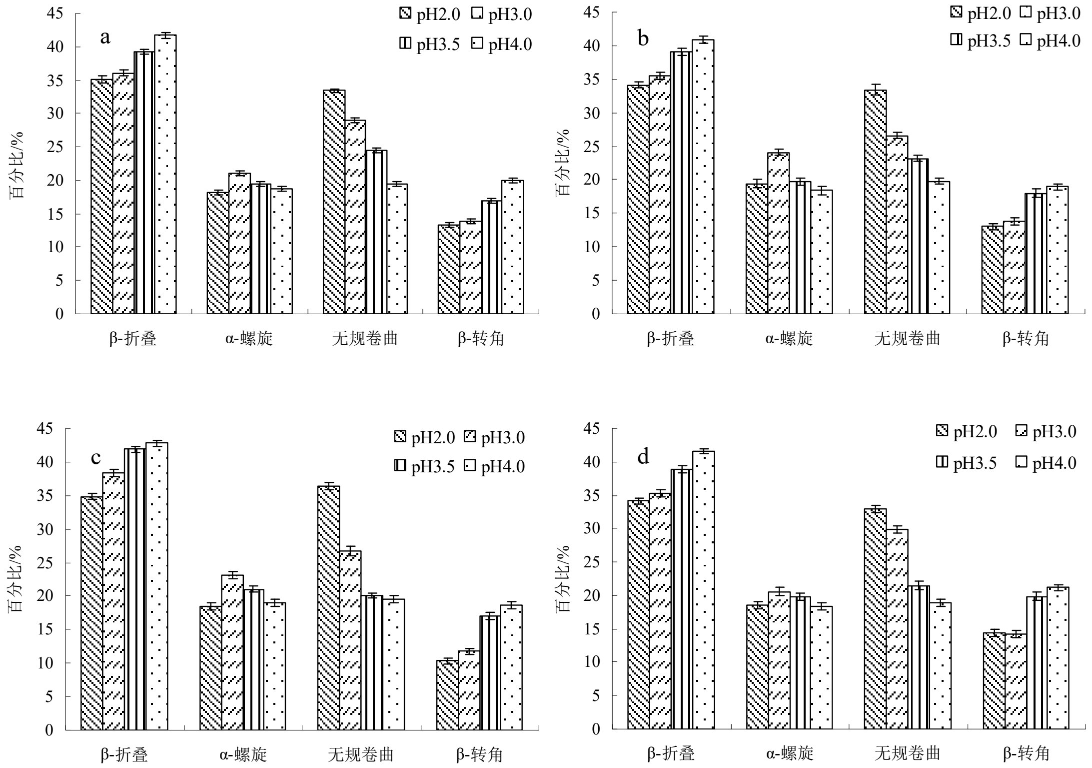

图 2　不同有机酸酸沉对米糠蛋白二级结构组成的影响（a、b、c、d 依次代表：盐酸、酒石酸、苹果酸和柠檬酸酸沉米糠蛋白）

Fig.2　Effect of acid-precipitation by different organic acids on secondary structure contents of rice bran protein

2.3　酸沉处理对米糠蛋白内源荧光光谱的影响

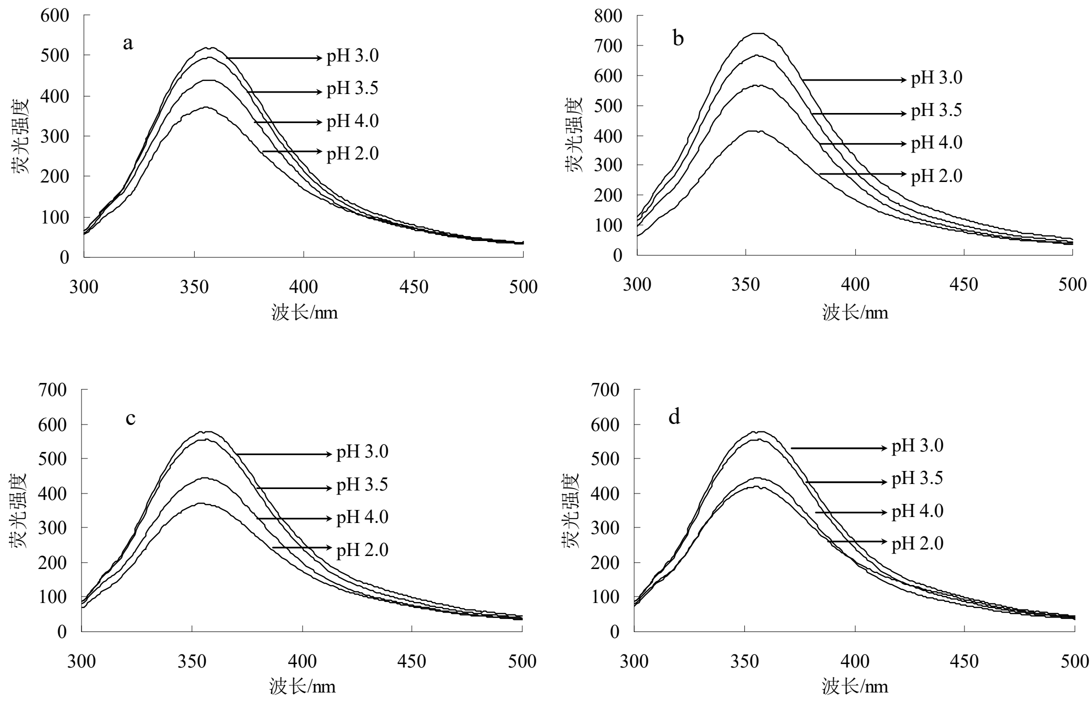

图 3　不同有机酸酸沉制备米糠蛋白的荧光光谱（a、b、c、d 分别代表：盐酸、酒石酸、苹果酸和柠檬酸酸沉米糠蛋白）

Fig.3　Intrinsic emission fluorescence spectra of rice bran protein which precipitated by different organic acids

如图 3 所示，采用同种有机酸在不同 pH 条件下酸沉时，随着酸沉 pH 值的下降，米糠蛋白的荧光强度先增加后下降，当酸沉 pH 值为 3.0 时，米糠蛋白的荧光强度最高；相应的，米糠蛋白的最大荧光峰位移也先向长波长方向移动（红移），然后再向短波长方向移动（蓝移）。Jiang[21]等在研究 pH 偏移处理对大豆蛋白结构的影响时发现，酸处理后大豆蛋白表面的色氨酸残基暴露程度增加，导致蛋白荧光强度增加，最大吸收波长发生红移。此外，Dong[22]等在研究酸性条件下花生分离蛋白亚基结构的变化时发现，在极端酸性条件下（pH＜3.0），蛋白分子间的静电斥力因离子静电屏蔽而减弱，蛋白质发生聚集而使结构变得紧密，暴露于亲水环境中色氨酸残基减少。因此，米糠蛋白的酸沉 pH 值由 4.0 下降至 3.0 时，米糠蛋白结构逐渐展开，内部色氨酸残基暴露程度不断增强，导致荧光强度不断增加，最大荧光峰位发生红移；而当酸沉 pH 值为 2.0 时，蛋白质之间的静电斥力减少而发生聚集，导致米糠蛋白荧光强度降低，最大荧光峰位反而发生蓝移。相比盐酸酸沉，采用 3 种有机酸在相同 pH 条件下酸沉时，米糠蛋白的荧光强度明显增强，原因可能是相比盐酸酸沉，相同 pH 条件下 3 种有机酸酸沉使得米糠蛋白表面的色氨酸残基暴露程度增加。

2.4 酸沉处理对米糠蛋白表面疏水性的影响

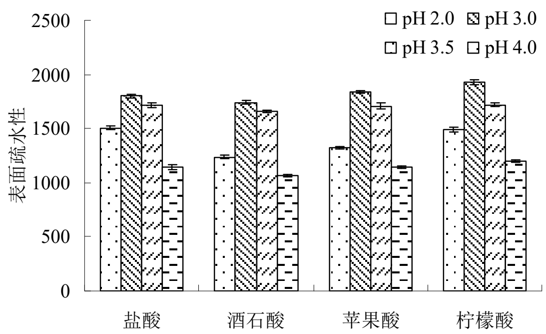

图 4 不同有机酸酸沉对米糠蛋白表面疏水性的影响

Fig.4 Effect of acid-precipitation by different organic acids on surface hydrophobicity of rice bran protein

如图 4 所示，采用同种有机酸在不同 pH 条件下酸沉时，随着酸沉 pH 的下降，米糠蛋白的表面疏水性先增加后下降，当酸沉 pH 值为 3.0 时，米糠蛋白的表面疏水性达到最高。这可能是因为当 pH 酸沉值由 4.0 下降至 3.0 时，米糠蛋白的结构展开程度不断增加，更多的疏水性氨基酸残基暴露出来[23-24]，导致米糠蛋白表面疏水性增加；而酸沉 pH 值继续下降至 2.0 时，蛋白质之间的静电斥力减少，部分米糠蛋白发生了聚集反应[25]，降低了米糠蛋白疏水基团整体的暴露程度。3 种有机酸在 pH 2.0 条件下酸沉时，制备米糠蛋白的表面疏水性显著小于（P<0.05）相同条件下盐酸酸沉制备的米糠蛋白表面疏水性，3 种有机酸和盐酸在 pH 3.0、3.5 和 4.0 条件下酸沉时，米糠蛋白的表面疏水性没有显著差异（P>0.05）。

2.5 酸沉处理对米糠蛋白分子质量分布的影响

表 2 米糠蛋白的分子质量分布图中峰面积百分比

Table 2 Peak area percentage in molecular weight distribution of rice bran protein

pH	不同有机酸酸沉制备米糠蛋白的分子质量分布图中峰面积百分比（%）											
	盐酸			酒石酸			苹果酸			柠檬酸		
	保留时间（min）											
	5.58	10.62	11.65	5.58	10.62	11.65	5.58	10.62	11.65	5.58	10.62	11.65
2.0	0.48	99.52	0	0.48	99.52	0	0.81	99.19	0	0.43	99.57	0
3.0	0.61	65.86	33.53	0.56	65.13	34.32	0.86	64.52	34.63	0.31	66.99	32.70
3.5	0.60	64.12	35.28	0.51	60.95	38.54	0.38	61.86	37.76	0.48	63.45	36.08
4.0	0.73	55.22	44.06	0.72	51.21	48.07	0.91	52.47	46.63	0.93	53.34	45.73

如表 2 所示，采用 3 种有机酸和盐酸在不同 pH 条件下酸沉时，当酸沉 pH 为 4.0、3.5、3.0 时，

米糠蛋白分子质量分布图中出现三个峰，保留时间依次为 5.58、10.62、11.65 min，对应的蛋白质分子质量依次减小。采用同种酸酸沉时，随着酸沉 pH 值的下降，保留时间 5.58 min 处的峰面积百分比没有明显变化，保留时间 10.62 min 处的峰面积百分比逐渐增加，保留时间 11.65min 处的峰面积百分比逐渐减少，表明酸沉没有导致米糠蛋白形成高分子量聚集体，但是小分子质量蛋白逐渐形成大分子质量蛋白。当酸沉 pH 为 2.0 时，3 种有机酸和盐酸酸沉制备米糠蛋白分子质量分布图中都只出现两个峰，保留时间依次为 5.58、10.62 min，而保留时间 11.65 min 处的峰消失，表明较低 pH 条件下的酸沉可导致米糠蛋白结构发生了部分解离和聚集。在相同酸沉 pH 条件下，3 种有机酸和盐酸酸沉制备米糠蛋白分子量分布图非常接近，表明 3 种有机酸酸沉基本不影响米糠蛋白的分子量分布。Lakemond[26]等研究 pH 值对大豆分离蛋白分子结构的影响时发现，酸处理（pH 2.0）导致大豆蛋白部分酸性亚基和碱性亚基解离，而解离出来的亚基在 pH 调回 7.0 的过程中发生了重组装，导致蛋白分子质量分布发生了变化。因此，可推测当酸沉 pH 为 2.0 时，米糠蛋白发生了亚基解离，小分子质量的蛋白质在调回中性时形成大分子质量的蛋白分子，导致保留时间 11.65 min 处的峰消失[27]。

2.6 酸沉处理对米糠蛋白粒径的影响

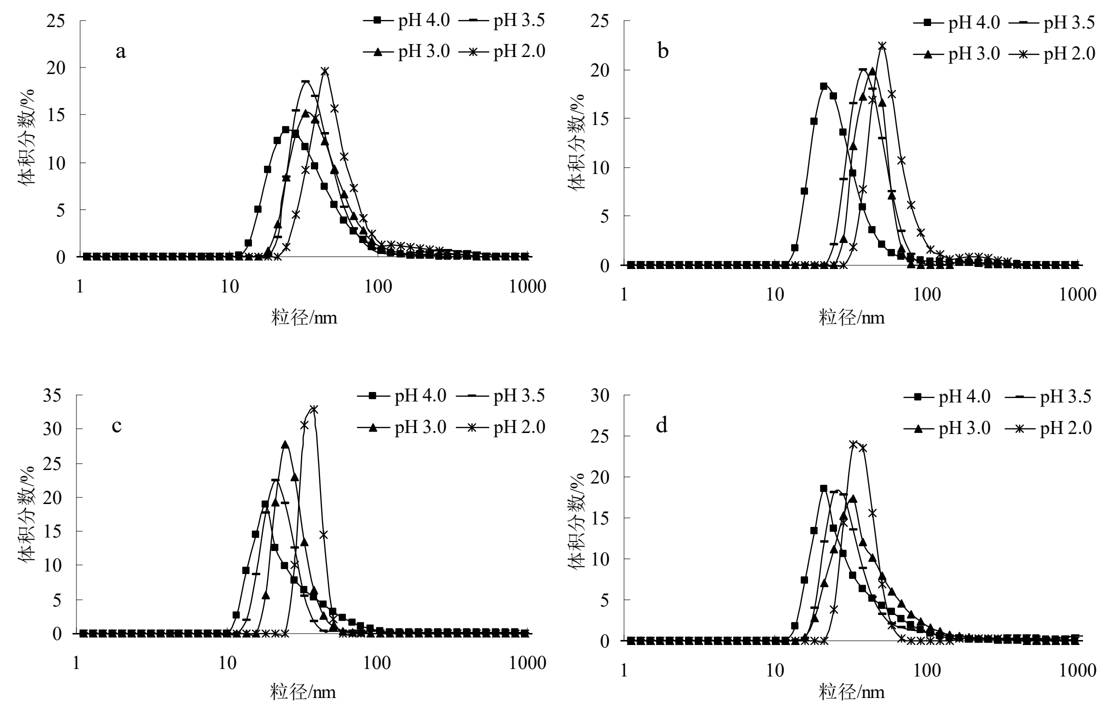

图 5 不同有机酸酸沉对米糠蛋白粒径分布的影响（a、b、c、d 依次代表：盐酸、酒石酸、苹果酸和柠檬酸酸沉米糠蛋白）

Fig. 5 Effect of acid-precipitation by different organic acids on particle size distribution of rice bran protein

如图 5 所示，采用同种酸在不同 pH 条件下酸沉时，随着酸沉 pH 值的下降，米糠蛋白的平均水平粒径不断增大。这可能是因为随着酸沉 pH 值的下降，米糠蛋白结构松散程度增加，肽链不断展开，在重新调回中性（pH 7.0）的时候，蛋白虽然会发生聚集，但难以恢复到天然的紧密球状结构，因此导致粒径相对增大[28]。采用不同酸酸沉，当 pH 值为 2.0 时，由四种酸酸沉制备米糠蛋白的粒径分布之间没有差异；当酸沉 pH 值为 3.0、3.5 时，由苹果酸、柠檬酸酸沉制备的米糠蛋白粒径小于盐酸、酒石酸酸沉米糠蛋白。此外，米糠蛋白的粒径分布均只有一个峰，表明有机酸酸沉制备的米糠蛋白没有解离出新的亚基或形成聚集体。

2.7 酸沉处理对米糠蛋白亚基结构的影响

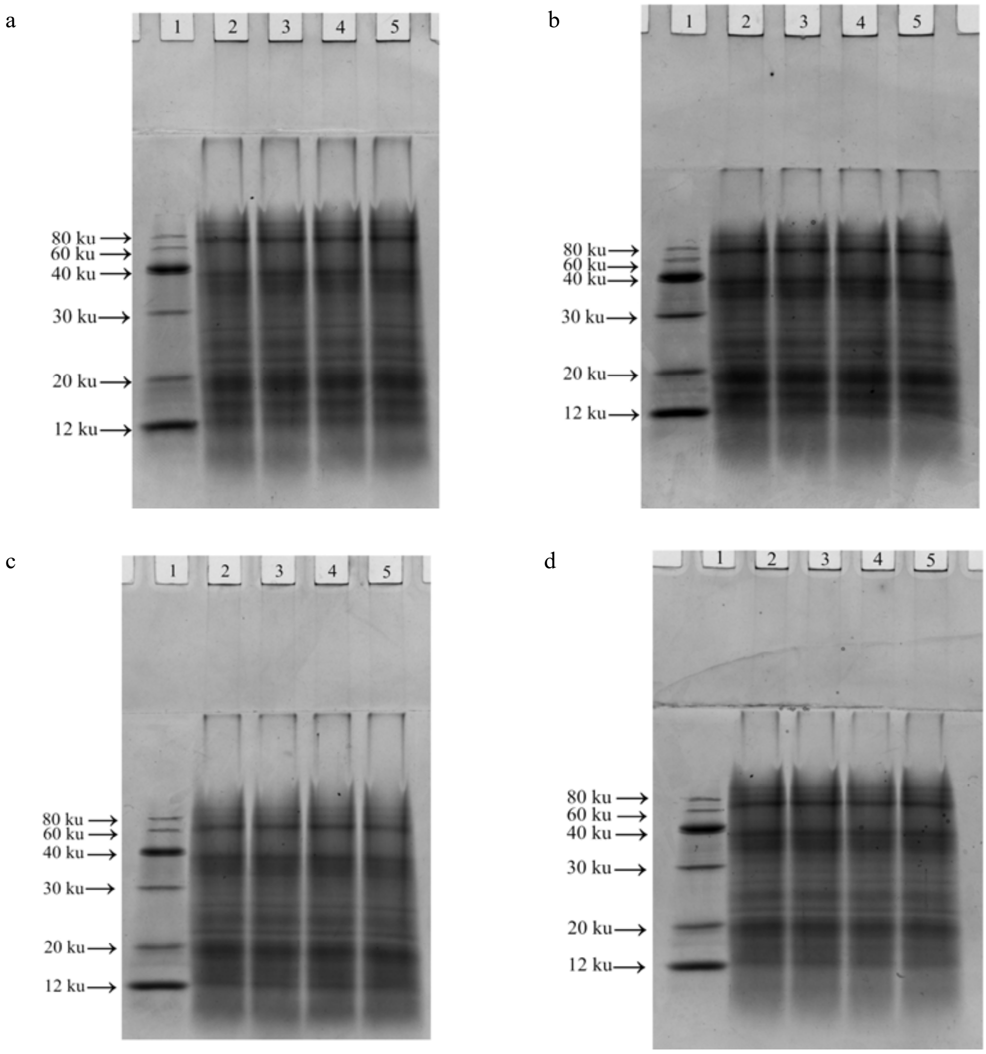

图 6 不同有机酸酸沉对米糠蛋白亚基结构的影响（a、b、c、d 依次代表：盐酸、酒石酸、苹果酸和柠檬酸酸沉米糠蛋白；1、2、3、4、5 泳道依次代表：Maker 以及酸沉 pH 值为 2.0、3.0、3.5、4.0 的米糠蛋白）

Fig.6 Effect of acid-precipitation by different organic acids on subunit structure of rice bran protein

如图 6 所示，采用同种酸在不同 pH 条件下酸沉时，随着酸沉 pH 值的下降，米糠蛋白电泳图中条带颜色深浅无显著变化，也没有出现条带增加或消失的现象，说明米糠蛋白的亚基结构没有变化。在酸性环境中，蛋白分子间静电排斥力较强，蛋白会发生亚基解离，但是解离的亚基在 pH 调回中性时发生聚集，不再以解离状态单独存在[29-30]。所以，米糠蛋白的酸沉 pH 值下降，只是促使米糠蛋白的亚基解离，并没有对亚基进一步破坏，形成新的亚基。采用不同酸在相同 pH 条件下酸沉时，米糠蛋白的亚基结构变化没有显著差异。

3 结论

采用酒石酸、苹果酸、柠檬酸分别在 pH 4.0、3.5、3.0、2.0 条件下酸沉制备米糠蛋白，通过测定可表征蛋白结构的指标，探索有机酸酸沉处理对米糠蛋白结构特征的影响。结果发现，采用同种有机酸在不同 pH 条件下酸沉时，随着酸沉 pH 值的下降，米糠蛋白游离巯基含量上升，总巯基含量无显著变化；无规卷曲含量上升，β-折叠和 β-转角含量下降，α-螺旋含量无显著变化；内源荧光强度和表面疏水性均先增加后下降，在 pH 3.0 时达到最大值。这表明有机酸酸沉处理没有造成米糠蛋白二硫键的断裂，但使蛋白结构逐渐展开，当 pH 再调回 7.0 时发生聚集，米糠蛋白的二级结构在这一过程

中发生了变化。相比于传统的盐酸酸沉，在相同 pH 条件下采用有机酸酸沉制备的米糠蛋白，其总巯基含量无显著差别，游离巯基含量较低；二级结构和表面疏水性无显著差异，内源荧光强度增强。分子质量分布、粒径分布及电泳分析结果表明，有机酸酸沉处理过程中，米糠蛋白结构发生了部分解离和聚集，但没有形成新的亚基和高分子量聚集体。本文关于酒石酸、苹果酸、柠檬酸在不同 pH 条件下酸沉对米糠蛋白结构的研究结果为开发和应用除镉米糠蛋白提供了的理论参考。

参考文献：

[1] 吕飞, 许宙, 程云辉. 米糠蛋白提取及其应用研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 234-238. DOI:10.3969/j.issn. 1003-5788. 2014.03.056.

[2] GUL A, YOUSUF B, SINGH A K，et al. Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food-A review[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2015, 6(1):24-30. DOI:10.1016/j.bcdf.2015.06.002.

[3] 肖信锦, 李阳洋, 钟盛华. 米糠中油脂与蛋白提取技术研究进展[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(3): 1-4.

[4] 张敏, 周梅, 王长远. 米糠 4 种蛋白质的提取与功能性质[J]. 食品科学, 2013, 34(1):18-21.

[5] 田阳, 魏帅, 魏益民,等. 稻谷加工产物的镉含量及累积量分析[J]. 中国食品学报, 2014, 14(5): 186-191. DOI: 10.16429/j.1009-7848.2014.05.032

[6] 丁竹红, 胡忻, 尹大强. 螯合剂在重金属污染土壤修复中应用研究进展[J]. 生态环境学报, 2009, 18(2): 777-782.

[7] 杨滔滔, 李青, 阴开瑞, 等. 酸沉条件对米糠蛋白镉含量和功能性质的影响[J]. 中国油脂, 2016, 41(8): 18-22.

[8] UTSUMI S, MARUYAMA N, SATOH R, et al. Structure-function relationships of soybean proteins revealed by using recombinant systems[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2002, 30(3): 284-288. DOI: org/10.1016/S0141-0229(01)00507-5

[9] CHANDI G K, SOGI D S. Functional properties of rice bran protein concentrates[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 79(2): 592-597. DOI: org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.018

[10] ZHANG H J, ZHANG H, WANG L, et al. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran[J]. Food Research International, 2012, 47(2): 359-363. DOI: org/10.1016/j.foodres.2011.08.014

[11] HUANG Y R, HUA Y F, QIU A Y. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation [J]. Food Research International, 2006, 39(2): 240-249. DOI:10.1016/j.foodres.2005.07.012

[12] LIU Y, ZHAO G L, ZHAO M M, et al. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction[J]. Journal of Food Chemistry, 2012, 131(3): 901-906. DOI: org/10.1016/j.foodchem.2011.09.074

[13] PUPPO M C, ANON M C. Soybean protein dispersions at acid pH.Thermal and rheological properties[J]. Journal of Food Science, 1999, 64(1): 50-56. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1999.tb09859.x

[14] FANG Y Q, ZHANG B, WEI Y M, et al. Effects of specific mechanical energy on soy protein aggregation during extrusion process studied by size exclusion chromatography coupled with multiangle laser light scattering[J]. Journal of Food Engineering, 2013, 115: 220-225. DOI: org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.017

[15] WU W, WU X J, HUA Y F. Structural modification of soy protein by the lipid peroxidation product acrolein[J]. LWT-Food Science and Technology, 2010, 43(1):133-140. DOI: 10.1002/jsfa.3606

[16] JIANG J, CHEN J, XIONG Y L. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(16):7576-83. DOI: 10.1021/jf901585n

[17] JIANG J, XIONG Y L, CHEN J. Role of β-conglycinin and glycinin subunits in the pH-shifting induced structural and physicochemical changes of soy protein isolate[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(2): 293-302. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.02035.x

[18] LIU Q, GENG R, ZHAO J, et al. Structural and gel textural properties of soy protein isolate when subjected to extreme acid pH-Shifting and mild heating processes[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(19): 4853–4861. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01331

[19] 王长远，郝天舒，张敏. 干热处理对米糠蛋白结构与功能特性的影响[J]. 食品科学，2015, 36(7): 13-18. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201507003

[20] 赵谋明, 源博恩, 罗东辉, 等. 酸性条件下大豆分离蛋白的亚基解离[J]. 华南理工大学学报(自然科学版): 2011, 39(9): 22-27. DOI: 10.3969/j.issn.1000-565X.2011.09.005

[21] JIANG J, XIONG Y L. Extreme pH treatments enhance the structure-reinforcement role of soy protein isolate and its emulsions in pork myofibrillar protein gels in the presence of microbial transglutaminase[J]. Meat Science, 2013, 93(3): 469-476. DOI: org/10.1016/j.meatsci.2012.11.002

[22] DONG X, ZHAO M, YANG B, et al. Effect of high-pressure homogenization on the functional property of peanut protein[J]. Journal of Food Process Engineering, 2011, 34(34):2191-2204. DOI: 10.1111/j.1745-4530.2009.00546.x

[23] KRISTINSSON H G, HULTIN H O. Changes in conformation and subunit assembly of cod myosin at low and high pH and after subsequent refolding [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(24): 7187-7196. DOI: 10.1021/jf026193m

[24] 赵谋明，辛佩贤，赵强忠,等. 酸性条件下花生分离蛋白亚基结构的变化规律[J]. 现代食品科技，2014,30(12):37-42. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.007

[25] AROGUNDADE L A, TSHAY M, SHUMEY D, et al. Effect of ionic strength and/or pH on extractability and physico functional characterization of broad bean (Vicia faba L.) protein concentrate [J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20 (8): 1124-1134. DOI: org/10.1016/j.foodhyd.2005.12.010

[26] LAKEMOND C M M, JONGH H H J D, HESSING M, et al. Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2000, 48(6): 1985-90. DOI: 10.1021/jf9908695

[27] 魏冬旭，江连洲，王辰，等. pH 值对大豆 11S 球蛋白结构和表面疏水性的影响[J]. 食品科学，2015, 36(11): 1-5. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201511001

[28] 源博恩，赵强忠，赵谋明. 酸性条件下高压均质对大豆蛋白结构与功能特性的影响[J]. 食品工业科技, 2012, 33(8):117-120.

[29] WAGNER J R, D A SORGENTINI, M CAñón. Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity, and Some functional properties of acid-treated soy isolates[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1996, 44(7): 1881-1889. DOI: 10.1021/jf950444s

[30] ZHANG Y H, HUANG L H. Effect of heat-induced formation of rice bran protein fibrils on morphological structure and physicochemical properties in solutions and gels[J]. Food Science and Biotechnology, 2014, 23(5): 1417-1423. DOI: 10.1007/s10068-014-0194-1