

小米谷蛋白及醇溶蛋白结构特征

Structural characteristics of millet glutenin and gliadin

姬中伟^{1,2} 戴甜甜^{1,2} 毛健^{1,2}

Ji Zhong-wei^{1,2} DAI Tian-tian^{1,2} MAO Jian^{1,2}

(1. 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:采用碱提酸沉法提取小米谷蛋白,乙醇浸提小米醇溶蛋白,对 2 种蛋白的结构特征进行研究。结果表明,小米醇溶蛋白的组成较为简单,且分子量较小,而小米谷蛋白在高分子量和低分子量都有分布。XRD 分析发现二者皆为无定型结构。圆二色光谱测定结果表明,小米醇溶蛋白属于全 α 型结构,有序性优于小米谷蛋白。另外,通过原子力显微镜观测发现,小米醇溶蛋白呈球状结构,分散状态,而小米谷蛋白分布较为密集。

关键词:小米;谷蛋白;醇溶蛋白;结构特征

Abstract: Millet glutenin and gliadin was obtained by alkali extraction and acid precipitation and millet gliadin was distracted by ethanol. Then their structural characteristics were analyzed. SDS-PAGE electrophoresis results showed that the molecular weight of the millet gliadin was small, while millet glutenin was distributed from high molecular weight to low molecular weight. Furthermore, the XRD analysis showed that both the two kinds of proteins were amorphous structures. The secondary structure was measured by circular dichroism. Millet gliadin belonged to all alpha structure, and its order was better than that of millet alkali soluble protein. Moreover, by atomic force microscopy analysis, millet gliadin was spherical and its distribution was rather dispersed. In contrast, the distribution of millet glutenin was more concentrated.

Keywords: millet; glutenin; gliadin; structural characteristics

谷子是中国北方的主要粮食作物之一^[1],脱壳后为小米。小米的各种营养素比例适宜,是一种良好的营养源^[1]。相比稻米和小麦,小米中的碳水化合物含量比例不高,约为 60%~70%^[2],小米中蛋白质的消化率为 83.4%,生物价为 57,高于大米和大麦^[3],同时,小米蛋白也是一种优良蛋白质

的供应源,可应用于食用蛋白、营养强化剂及食品添加剂等多个食品领域^[4]。小米蛋白经酶解处理后得到的多肽具有抗氧化性等功效^[5-6]。古世禄等^[7]指出绝大多数谷子品种蛋白质含量为 10.00%~13.99%。小米中蛋白质具有低过敏性的优良特点,主要分布在小米的胚和胚乳中^[8],基本组成有以下四类蛋白:清蛋白、球蛋白、醇蛋白和谷蛋白^[9]。魏益民等^[10]采用 Osborne 法提取小米蛋白,结果显示醇溶蛋白和碱溶蛋白所占比例分别为 46.0%和 21.2%,相对而言,清蛋白和球蛋白含量较低,二者共占 5.5%。小米蛋白的提取有碱法和盐法^[11],杨桦等^[12]采用超声波辅助酶法提取小米蛋白,使得提取率明显提高。然而目前针对小米蛋白结构特性(如蛋白质二级结构组成、蛋白表面形态等)的研究较为缺乏,未见国内外相关文献报道。

本试验拟采用碱提酸沉法提取小米谷蛋白,并用乙醇提取小米醇溶蛋白^[13-14],然后对得到的 2 种蛋白的分子量分布及结构特征进行研究,为小米蛋白的进一步深加工利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

黄小米:沁黄 2 号沁州,山西沁州黄小米(集团)有限公司;无水乙醇、正己烷、氢氧化钠、盐酸、硫酸铵、氯化钡、氯化钠、硝酸银等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;凝胶制备试剂盒:北京白鲨易科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

电子天平:EL3002 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;低速大容量多管离心机:RJ-LDL-50G 型,无锡市瑞祥分析仪器有限公司;

pH 计:FiveEasy Plus 型,范围为 0.08~14.00,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

高速粉碎机:DFY-300 型,温岭市林大机器有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-2100 型,尤尼柯(上海)仪器

作者简介:姬中伟,男,江南大学实验师,硕士。

通信作者:毛健(1970—),男,江南大学教授,博士。

E-mail: maojian@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2018-03-19

有限公司;

胶体磨:MF-50型,杭州惠合机械设备有限公司;

高压均质机:NS2006L型,德国GEA集团;

圆二色光谱仪:MOS-450型,美国Biologic公司;

原子力显微镜:Demension ICON型,德国布鲁克科技有限公司;

冷冻干燥机:BETA 2-8-LD plus型,德国Christ公司;

X射线衍射仪:D2 PHASER型,德国布鲁克AXS有限公司;

电泳仪:Mini-PROTEAN® Tetra型,美国BIO-RAD公司。

1.2 方法

1.2.1 小米脱脂 称取500 g小米,用粉碎机充分粉碎后过50目筛,称量,室温下用1:2(g/mL)的正己烷搅拌浸泡4 h,用保鲜膜密封,脱去脂肪,重复1次。将脱脂后的小米在空气中干燥12 h,于4℃冰箱备用。

1.2.2 小米蛋白的提取

(1) 小米谷蛋白的提取:①取300 g脱脂后的小米按1:15(g/mL)比例加入蒸馏水,用胶体磨在2 800 r/min转速下处理2次,磨齿间隙为5 μm,然后在40 MPa压力下循环均质1 h;②用0.5 mol/L NaOH调节pH 8.5~8.8,搅拌30 min,静置4 h;③所得上清液用0.5 mol/L HCl调节pH 4.5,静置30 min后,于5 000 r/min离心15 min,沉淀水洗2次,冷冻干燥后-20℃保存备用。

(2) 小米醇溶蛋白的提取:将1.2.2(1)中第2步静置后所得的沉淀按1:6(g/mL)加入体积分数65%乙醇在35℃条件下搅拌浸提4 h,4 500 r/min离心20 min得上清液,向上清液中缓缓加入盐水,同时搅拌,直至体积达到原上清液的3倍,溶液中氯化钠浓度达到0.3 g/100 g。于0~4℃环境下放置1 d,使醇溶蛋白沉淀析出,并使用8~12 kDa透析袋将沉淀透析除盐,处理时间为1 d,透析液为去离子水。透析过程中经常更换透析液,直到向其中加入AgNO₃溶液后没有明显的白色沉淀物出现为止,蛋白沉淀经冷冻干燥后在-20℃保存待用。

(3) SDS-PAGE分析:参考Laemmli^[15]报道的方法并略做修改。采用BioSharp凝胶制备试剂盒,制备浓度为10%的分离胶和浓度为5%的浓缩胶,取1 g/L蛋白样品100 μL和SDS-PAGE样品缓冲液25 μL于500 μL离心管中,煮沸处理1 min,5 000 r/min离心1 min。吸取20 μL上清液开始进样,在室温下电泳处理,将浓缩胶中电压恒定为100 V,电泳过程中注意观察样品,当前端到达分离胶时,将电压增加为150 V。电泳结束后,采用考马斯亮蓝染色处理胶片,用去离子水脱色。

(4) 圆二色光谱分析(CD):参考赵小莉等^[16]的分析方法并稍加修改。称取一定量的谷蛋白和醇溶蛋白,用65%乙醇溶解醇溶蛋白配制成1 mg/mL蛋白溶液,谷蛋白加水溶解使其浓度为1 mg/mL,并调节pH 12.0。采用圆二色光谱仪在远紫外区域(190~250 nm)扫描,光谱间隔0.1 nm,扫描速度为50 nm/min。所得数据经Origin 8.0进行拟合,针对以上2种蛋白质的二级结构在分析网站(<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>)上做模拟和分析。

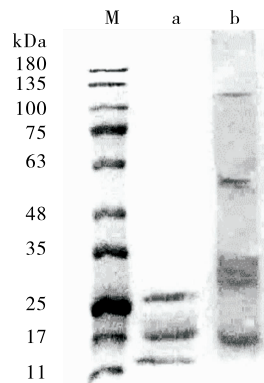
(5) X射线衍射分析(XRD):根据Guerrero等^[17]和Naidja等^[18]提供的方法稍作调整。利用D2 PHASER型X-衍射仪进行测定。相关参数:采用Cu Kα石墨单色器,电压40 kV,扫描速度0.05°/s,扫描范围3°~50°。

(6) 原子力显微镜分析(AFM):根据耿胜荣等^[19]报道的方法略微调整,将小米谷蛋白及醇溶蛋白分别溶于蒸馏水和65%乙醇中,配成50 μg/mL的蛋白溶液,搅拌过夜,静置待不溶性颗粒沉淀,各取1滴上清液滴于新剥离的云母片(长和宽均为1.0 cm)上,待液体挥发晾干后备用。在制备样品的过程中,应保证避免各种污染,同时确保扫描准确、探针清洁。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 分析

小米醇溶蛋白与谷蛋白的SDS-PAGE鉴定见图1。从图1可以看到,分离得到的小米醇溶蛋白在11~25 kDa有3条明显的条带,由此判断小米醇溶蛋白的分子量均在11~25 kDa;小米谷蛋白在11~180 kDa均有分布,且15~17 kDa及25~35 kDa的条带颜色较深,由此推断此分子量范围的小米谷蛋白含量较高。



a. 小米醇溶蛋白 b. 小米谷蛋白

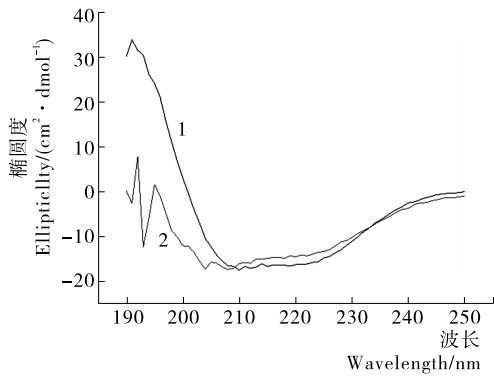
图1 小米醇溶蛋白及谷蛋白的SDS-PAGE电泳图

Figure 1 SDS-PAGE profiles of millet gliadin and glutenin

2.2 圆二色光谱分析

190~240 nm紫外波段的CD图谱能够映射出生物大分子(如蛋白质等)的主链结构特征,能反应出包括α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规则卷曲等二级结构的光谱叠加特性。据文献^[20]可知,在190 nm处存在正峰,同时在208, 220 nm处有负峰,则表明该分子具有α-螺旋构象;216 nm处呈负峰且185~200 nm存在正峰,表明有β-折叠构象;在206 nm处出现正峰意味着存在β-转角构象;另外,在198 nm附近有负峰,220 nm处有小且较平的正峰,表明存在无规则卷曲构象。醇溶蛋白和谷蛋白的CD拟合图见图2,利用分析软件运算得到2种蛋白二级结构的相关数据,见表1。

α-螺旋和β-折叠反映的是蛋白质分子的有序性,β-转角和无规则卷曲反映的是蛋白质分子松散程度。表1显示,小米醇溶蛋白中α-螺旋含量>40%而β-折叠几乎没有,由此可以判断小米醇溶蛋白属于全α型^[21]结构,相比于小米醇溶蛋白,小米谷蛋白的α-螺旋和β-折叠含量较少而β-转角及无规则卷曲含量较多,由此可见小米醇溶蛋白的有序性优于小米谷蛋白。



1. 小米醇溶蛋白 2. 小米谷蛋白

图 2 小米醇溶蛋白及谷蛋白的 CD 拟合图

Figure 2 CD fitting diagram of millet gliadin and glutenin

表 1 小米醇溶蛋白及谷蛋白的二级结构组成

Table 1 Secondary structure of millet gliadin and glutenin %

| 样品 | α -螺旋 | β -折叠 | β -转角 | 无规则卷曲 |
|--------|--------------|-------------|-------------|-------|
| 小米醇溶蛋白 | 102.5 | 0.0 | 0.0 | 13.9 |
| 小米谷蛋白 | 34.6 | 11.3 | 23.3 | 32.1 |

2.3 X 射线衍射分析(XRD)

采用 X 射线衍射技术研究小米醇溶蛋白与谷蛋白的晶体状态及差异,结果见图 3、4。从图 3、4 可以看到,醇溶蛋白与谷蛋白均没有明显增强的衍射峰,由此推断 2 种分离蛋白是无定型的。

2.4 原子力显微镜分析(AFM)

图5是小米醇溶蛋白及谷蛋白溶解液原子力显微镜的

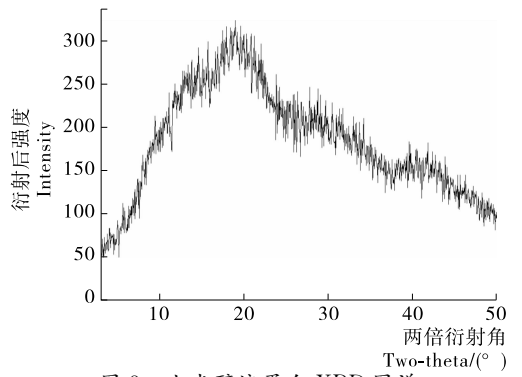


图 3 小米醇溶蛋白 XRD 图谱

Figure 3 XRD analysis of millet gliadin

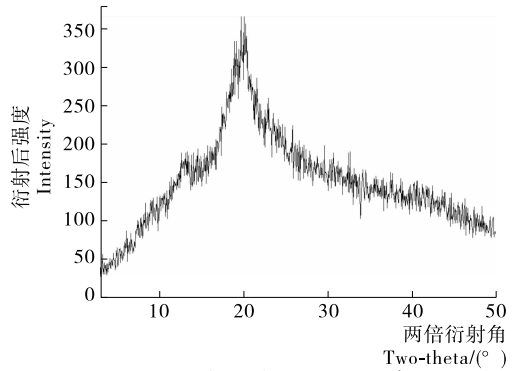
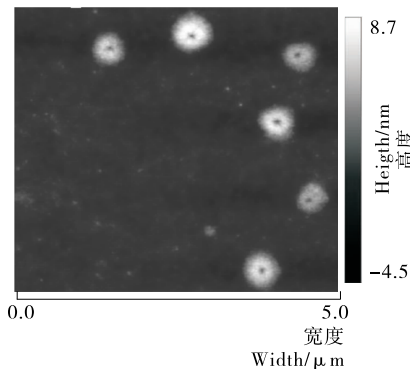


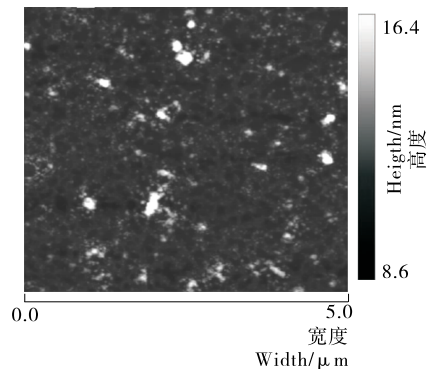
图 4 小米谷蛋白 XRD 图谱

Figure 4 XRD analysis of millet glutenin

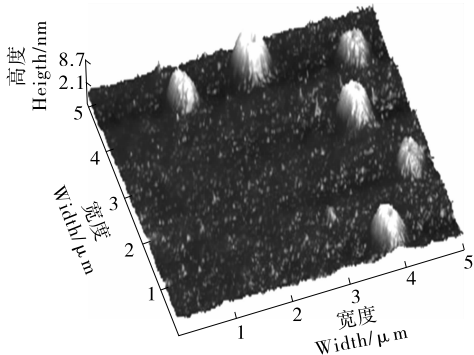
二维图和三维图。从图 5 中能够清晰地观察到 2 种蛋白的聚集度及表面形态。小米醇溶蛋白呈分散状态,颗粒大小较均匀,表面凸起平缓,直径多在 430~650 nm,最高高度只有



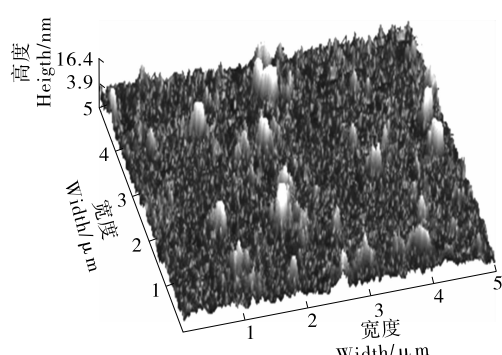
(a) 小米醇溶蛋白二维图



(b) 小米谷蛋白二维图



(c) 小米醇溶蛋白三维图



(d) 小米谷蛋白三维图

图 5 小米醇溶蛋白及谷蛋白的 AFM 图

Figure 5 AFM analysis of millet gliadin and glutenin

8 nm;小米谷蛋白颗粒大小参差不齐,聚集度高,且表面凸起较高,最高高度有16.4 nm。结果表明,小米醇溶蛋白分布均衡且尺寸较小,而小米谷蛋白的大小多样,且分布杂乱无序,与本试验 SDS-PAGE 分析和 CD 分析结果一致。

3 结论

小米醇溶蛋白和谷蛋白在结构上存在较大差异。SDS-PAGE 结果表明,小米醇溶蛋白在 11~25 kDa 有 3 条谱带,17 kDa 处谱带明显,而小米谷蛋白在高分子量和低分子范围都有谱带,由此可知小米醇溶蛋白的组成较为简单,且分子量较小,而小米谷蛋白在高分子量和低分子范围内均有分布,且分子量为 15~17 kDa 和 25~35 kDa 的蛋白质含量较高。经 XRD 分析,小米中的醇溶蛋白和谷蛋白皆为无定型结构。圆二色光谱法测定了 2 种蛋白质二级结构,结果表明小米醇溶蛋白属于全 α 型结构,有序性优于小米谷蛋白,此结果在原子力显微镜分析中也得以验证。

参考文献

[1] 杨春,田志芳,卢健鸣,等.小米蛋白质研究进展[J].中国粮油学报,2010,25(8):123-128.

[2] 王海滨,夏建新.小米的营养成分及产品研究开发进展[J].粮食科技与经济,2010(4):36-38.

[3] 杨春,栗红瑜,邓晓燕.小米蛋白质的氨基酸组成及品质评价分析[J].农产品加工:学刊,2008(12):10-12.

[4] 陈相艳.我国小米加工产业现状及发展趋势[J].农产品加工:学刊,2011(7):131-133.

[5] 刘剑利,曹向宇.小米多肽的制备及其抗氧化功能研究[J].食品科学,2009,30(8):64-67.

[6] 刘剑利,曹向宇,李其久,等.小米多肽对小鼠免疫调节作用[J].中国公共卫生,2012,28(1):44-45.

[7] 古世禄,刘厦.中国谷子蛋白质氨基酸组成的研究[J].华北学报,1989(1):8-15.

[8] 徐婧婷,刘思思,刘贺,等.小米蛋白的营养消化性研究[J].食品科学技术学报,2014,32(4):15-20.

[9] 张超,张晖,李冀新.小米的营养以及应用研究进展[J].中国粮油学报,2007,22(1):51-55,78.

[10] 魏益民,林双奎,赵学伟.食品挤压理论与技术:上卷[M].北京:中国轻工业出版社,2009:123-136.

[11] 刘剑利,曹向宇,李其久,等.小米蛋白提取方法比较研究[J].食品工业,2009(3):30-31.

[12] 杨桦,刘振春,刘想,等.响应面优化超声波辅助酶法提取小米蛋白工艺[J].吉林农业大学学报,2017,39(4):477-482.

[13] 李丽杰,王英利,赵一楠.响应面法优化玉米醇溶蛋白提取工艺[J].食品科学,2012,33(24):165-169.

[14] 张旭,于国萍.玉米蛋白粉中醇溶蛋白提取方法的研究[J].粮食加工,2007,32(2):41-45.

[15] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.

[16] 赵小莉,赵强.硫酸铵沉淀分离富硒大豆蛋白的初步研究[J].食品工业科技,2016,37(13):92-95.

[17] GUERRERO P, BEATTY E, KERRY J P, et al. Extrusion of soy protein with gela-tin and sugars at low moisture content[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 110(1): 53-59.

[18] NAIDJA A, LIU C, HUANG P M. Formation of protein-birnessite complex: X-RD, FTIR, and AFM analysis[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2002, 251(1): 46-56.

[19] 耿胜荣,李新.用 AFM 分析魔芋辐照接枝聚合物的构效关系[J].原子能科学技术,2010,44(8):1 019-1 024.

[20] VENKATESWARLU U, BOOPALAN K, MOHAN R, et al. Studies on chemically modified hen egg white and gelatin composites[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2006, 100(1): 318-322.

[21] 吴明和.圆二色光谱在蛋白质结构研究中的应用[J].氨基酸和生物资源,2010,32(4):77-80.

信息窗

韩国发布《食品添加剂法典》部分修改征求意见稿

5月30日,韩国食品药品安全处发布了拟修改《食品添加剂的标准及规格》部分内容:

1. 新设定 β -淀粉酶、珍珠色色素等 3 种添加剂的规格标准。

β -淀粉酶作为酶制剂,珍珠色色素作为着色剂,酪酸钾(Potassium Caseinate)作为增稠剂、稳定剂以往只允许申请人使用,修改后所有食品生产企业均可使用,以促进多种产品的开发。

2. 修改乳糖酶、蜜蜡等 6 种添加剂的成分规格。

(1) “乳糖酶”制造菌株增加“插入了 Bifidobacterium bifidum 乳糖酶基因的 Bacillus licheniformis”。

(2) 修改“蜜蜡”的性状及山梨糖醇的分子式。

(3) 增加“胡萝卜素”的 INS 号。

(4) 明确了“L-组氨酸”定量法中指示剂的颜色变化,删除透明质酸纯度试验中大肠杆菌检测方法中不必要的内容。

3. 修改一般试验方法及器具等杀菌消毒剂的试验方法。

(1) 为了准确分析食品添加剂等,需要对试验方法用语以及指示剂进行修改。

(2) 修改“香料试验方法”中醛类以及酮类含量测定法计算式内“空白试验”“本试验”用语。

(3) 修改过氧化氢制剂的残留试验所用的指示剂。

以上意见征集时间至 2018 年 7 月 30 日。

(来源: <http://news.foodmate.net>)