

# 水热糖基化大米蛋白质的结构以及溶解性研究

李灵诚,李兵兵,夏宁\*,滕建文,黄丽,韦保耀,董传志

(广西大学轻工与食品工程学院,广西南宁 530004)

**摘要:**以大米蛋白质(RP)与木糖为原料,采用水热糖基化的方法,研究在不同反应时间、pH、木糖与RP质量比条件下,糖基化产物接枝度与溶解度的关系,并对反应条件为:温度120℃,时间为20 min, pH为8,木糖与RP质量比为7:1的RP-木糖糖基化产物的溶解性与结构变化之间的关系进行探讨。得出RP-木糖糖基化产物溶解度由11.35%增加到27.62%,接枝度达到46.5%。氨基酸组成、电泳、荧光光谱、紫外光谱、红外光谱结果表明:RP的谷蛋白聚肽、球蛋白亚基和谷蛋白碱性亚基中精氨酸、赖氨酸可能与木糖发生共价结合生成了可溶性聚集体;二级结构中 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠减少,无规则卷曲增加。因此,水热糖基化反应使RP的溶解性质得到改善。

**关键词:**大米蛋白质,木糖,水热处理(HTC),糖基化改性,结构

## Structure and Solubility of Rice Protein by Hydrothermal Cooking with Glycosylation

LI Ling-cheng, LI Bing-bing, XIA Ning\*, TENG Jian-wen, HUANG Li, WEI Bao-yao, DONG Chuan-zhi

(College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** Rice protein (RP) and xylose were used as raw materials by hydrothermal cooking with glycosylation. The relationship between grafting degree and solubility of glycosylated products was studied under different reaction conditions. The structure of RP xylose glycosylated products was characterized under the conditions of reaction temperature 120 °C, reaction time 20 min, pH value 8 and mass ratio of xylose to RP 7:1. The relationship between solubility and structure change was discussed. The solubility of RP xylose glycosylated products increased from 11.35% to 27.62%, and the grafting degree was 46.5%. The results of amino acid composition, electrophoresis, fluorescence spectrum, UV spectrum and FTIR showed that the soluble aggregates might be formed by the covalent binding of arginine and lysine in glutelin polypeptide, globulin subunits and basic subunits of glutelin in RP with xylose. And the  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -fold in the secondary structure reduced, and the irregular curl increased. Therefore, the hydrothermal glycosylation improved the solubility of RP.

**Key words:** rice protein; xylose; hydrothermal cooking (HTC); glycosylation modification; structure

中图分类号: TS210.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)18-0038-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.18.006

**引文格式:** 李灵诚, 李兵兵, 夏宁, 等. 水热糖基化大米蛋白质的结构以及溶解性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(18): 38-44.

大米蛋白质(Rice protein, RP)是营养界所公认的优质植物蛋白,氨基酸组成合理、具有高生物价、低过敏性以及抗肿瘤活性等特性<sup>[1]</sup>,近年来受到广泛的关注与应用。大米蛋白质中含有不同类型的蛋白质,其中超过80%是谷蛋白,但由于大米蛋白质的溶解性等功能特性较差,在食品中的应用受到限制<sup>[2]</sup>。目前国内外对于提高蛋白质溶解性的改性方法主要集中在酶法、化学法、物理法和基因工程法,其中化学法改善蛋白质的功能特性较为显著,常用的化学

法有酸化、磷酸化、酯化、酰化和糖基化等<sup>[2-4]</sup>。其中糖基化改性由于反应可以自发进行的,无需要添加其他的化学物质,被认为是改善食品蛋白质功能特性的一种最为广泛的方法。它可将糖类物质的亲水基团以共价连接的方式接枝到蛋白质分子上,使修饰的糖基化产物一方面具有蛋白质的大分子特性,另一方面也具有糖类物质的亲水特性,能有效的提高大米蛋白质的功能性质<sup>[5]</sup>。

目前,国内外文献报道糖基化反应主要分为三

收稿日期: 2020-01-09

作者简介: 李灵诚(1995-),女,硕士研究生,研究方向:蛋白质工程, E-mail: LLC418212@163.com。

\* 通讯作者: 夏宁(1977-),女,博士,副教授,研究方向:粮食油脂植物蛋白工程, E-mail: xianing@gxu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760433)。

个阶段,即早期、中期和晚期,所有阶段同时发生且相互关联<sup>[6]</sup>。此外,糖基化反应的所有阶段都受反应参数的影响,包括水分活度、反应温度、反应时间、体系 pH、蛋白与糖的组成、结构与性质等,其中使用的糖主要是葡萄糖与蔗糖等<sup>[7]</sup>。糖基化反应方法主要分为两种,目前采用的糖基化方法主要包括干热法和湿热法。干热法的反应条件比较温和,产物功能特性较好,但是反应耗时长,反应条件较为严格;湿热法由于反应体系中水分活度和加热强度方面明显高于干热法,使得蛋白质分子和糖分子互相碰撞接触的机会增加,有利于反应的进行<sup>[8]</sup>。而本文使用的水热处理(HTC),又称喷射蒸煮技术,能使蛋白质生成可溶性聚集体<sup>[9]</sup>。通常使难溶或不溶的物质溶解和重结晶<sup>[10]</sup>。目前,国内外研究表明可利用水热处理提高蛋白质提取效率和改善蛋白质的功能特性<sup>[11]</sup>该技术已经有被应用到大豆蛋白糖基化的研究中,并且该技术相比于传统的干法和湿法糖基化改性方法,耗时更短,反应进程更快,接枝度更高,并且高级阶段产物更少<sup>[12]</sup>,高级阶段的终末产物(AGEs)在人体内累积会影响健康<sup>[13]</sup>,但水热技术在大米蛋白质与木糖糖基化改性的应用还未见报道。D-木糖是一种天然小分子还原糖,无毒,末端碳原子上的醛基易于与氨基发生美拉德反应,还能获得较高抗氧化活性的糖基化反应产物<sup>[14]</sup>。

基于此,本试验选择大米蛋白质与木糖进行水热糖基化处理(120℃),以期在促进大米蛋白质溶解性的基础上,增加 RP 与木糖的接枝度,并对不同反应时间、pH、蛋白质与糖的质量比的条件下,水热糖基化改性前后的大米蛋白质接枝度、结构及溶解性进行了初步的研究,以期功能性大米糖蛋白的加工生产提供理论依据拓展大米蛋白的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

大米(珍珠米) 市售;木糖(≥99%) 北京索莱宝科技有限公司;邻苯二甲醛(OPA) 源叶生物有限公司;酒石酸钾钠、四硼酸钠(分析纯) 天津市大茂化学试剂厂;氢氧化钠、溴化钾、盐酸(分析纯) 成都金山化学试剂有限公司;甲醇(分析纯) 成都市科隆化学品有限公司;无水碳酸钠(≥99.8%)、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾(分析纯) 天津博迪化工股份有限公司;Folin-酚、牛血清白蛋白、甘氨酸、SDS 北京索莱宝科技有限公司;β-巯基乙醇 Sigma-Aldrich 公司。

手提式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;TLE204E 分析天平、pH 计 上海梅特勒-托利多仪器有限公司;TECAN 酶标仪 上海勒菲生物科技有限公司;RW16 电子搅拌机 德国 IKA 公司;ST-16R 离心机 费默尔科技(中国)有限公司;S25 磁力搅拌机 德国 IKA 公司;真空冷冻干燥机 德国 CHRIST 仪器有限公司;L-8900 高速氨基酸分析仪 日本 HITACHI 公司;Nicolet iS10 傅立叶变换红外光谱仪 美国热电公司;RF-5301PC 荧光分光光度计、UV-1601 紫外可见分光光度计 日本岛津

公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 水热法制备 RP-木糖糖基化产物 大米与正己烷按照 1:3 (w/V) 采用索氏抽提法去除脂肪,30℃低温烘干。称取一定量脱脂大米与纯水按质量比 1:10 (w/w) 混合、浸泡、打浆,用 2 mol/L NaOH 调至 pH10,室温搅拌 2 h 后,4000 r/min 离心 20 min,取上清液,将上清液用 2 mol/L HCl 调至 pH4.8 进行酸沉,4℃静止 24 h,经 4000 r/min 离心 20 min,水洗沉淀,调至 pH 中性后进行透析、冻干。由凯氏定氮方法测得 RP 的蛋白质量分数为 90%。

称取一定量 RP 溶于浓度 50 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH11)至设定的蛋白质量浓度为 1%,50℃下磁力搅拌 30 min,经冷却,在 120℃的高温蒸汽下,固定体系 pH 为 8,木糖与 RP 质量比为 5:1,反应时间分别为 10、15、20、25、30 min,固定反应时间为 20 min,木糖与 RP 质量比为 5:1,调节体系 pH 为 6、7、8、9、10,固定反应时间为 20 min,体系 pH 为 8,加入一定质量比的木糖(木糖:RP=1:1、3:1、5:1、7:1、9:1),热处理后,样品冰浴冷却备用,考察对接枝度和溶解度的影响。其余指标使用上清液冻干粉末(RP-木糖糖基化产物)分析。

1.2.2 接枝度测定 OPA 试剂的配制:称取 40 mg 的 OPA 溶解于 1 mL 的甲醇中,依次加入 20% SDS 溶液 2.5 mL,0.1 mol/L 的硼砂溶液 25 mL,100 μL β-巯基乙醇,定容至 50 mL。

样品测定:吸取 200 μL RP-木糖糖基化产物溶液加入所配试剂 4 mL 于试管中,混匀,于 35℃水浴锅中反应 2 min,340 nm 测其吸光值  $A_1$ ,相同条件下 200 μL RP 溶液吸光值为空白样测定吸光值  $A_0$ ,二者之差  $\Delta A$  为自由氨基的净吸光值<sup>[15]</sup>,通过 OPA 测定获得反应前后的游离氨基酸含量的降低来表明糖基化反应的发生。

$$\text{接枝度(DG, \%)} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

1.2.3 溶解度测定 采用福林(Folin)-酚试剂法测定上清液中溶解的蛋白质含量<sup>[16]</sup>,凯氏定氮法测总蛋白质含量。

$$\text{溶解度(\%)} = \frac{\text{上清液中蛋白质含量}}{\text{溶液中总蛋白质含量}} \times 100$$

1.2.4 氨基酸分析 制备得到的 RP 和 RP-木糖糖基化产物的氨基酸组成与含量,采用国标 GB 5009.124-2016 进行测定<sup>[17]</sup>。

1.2.5 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 根据 Laemmli<sup>[18]</sup>报道的方法,采用不连续缓冲系统进行电泳,分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 2%。分别称取 2 mg 的 RP 和 RP-木糖糖基化产物,加入 500 μL 电泳缓冲液,沸水煮 5 min。上样量 10 μL,凝胶电泳于恒流下进行,样品在浓缩胶中时电压设定为 80 V,进入分离胶后电压调为 120 V。电泳完成后凝胶采用考马斯亮蓝法(R-250)染色 1 h,染色后于脱色液中脱色 2 d,脱色完成后胶片拍照分析。

1.2.6 紫外光谱分析 RP 和 RP-木糖糖基化产物

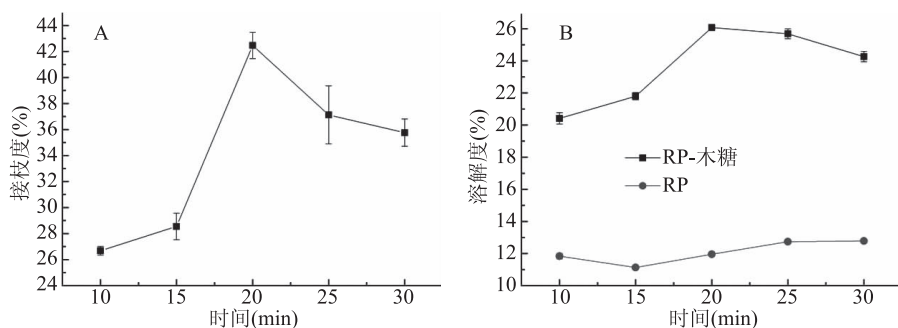


图1 不同反应时间对糖基化产物接枝度(A)及溶解度(B)的影响

Fig.1 Effect of different heating time on grafting degree(A) and solubility(B)

分散于 pbs (pH7.0, 50 mmol/L) 缓冲溶液中, 浓度为 1 mg/mL。在紫外-可见分光光度计进行扫描, 波长范围: 200~600 nm<sup>[19]</sup>。

**1.2.7 荧光光谱分析** 内源荧光光谱: RP 和 RP-木糖糖基化产物分散于 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中, 蛋白浓度为 0.2 mg/mL。取上清液 3 mL, 在扫描发射光谱为 300~500 nm, 激发波长 290 nm, 激发和发射狭缝宽均为 5 nm<sup>[9]</sup>, 磷酸缓冲液的荧光光谱作为空白对照。

糖荧光光谱 RP 和 RP-木糖糖基化产物分散于 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中, 蛋白浓度为 1 mg/mL。取上清液 3 mL, 荧光光谱在 334 nm 激发, 扫描发射光谱为 350~550 nm, 激发和发射狭缝宽均为 5 nm, 磷酸缓冲液的荧光光谱作为空白对照<sup>[9]</sup>。

**1.2.8 红外光谱分析** 分别取 1 mg RP, RP-木糖糖基化产物冻干样品粉末, 加入 100 mg 溴化钾, 共混、研细、压片, 采用红外光谱仪在 4000~400 cm<sup>-1</sup> 波数范围内扫描<sup>[20]</sup>。

### 1.3 数据处理

采用 IBM SPSS Statistics 22 进行数据处理, Origin 8.6 软件作图以及红外数据处理, OMNIC 软件进行红外数据处理, Design-Expert 8.0.6 软件进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同反应时间对糖基化产物接枝度及溶解度的影响

从图 1 可知, RP 在没有添加木糖的水热作用下, 溶解度均低于 13%, 这是由于在水热情况下, 蛋白发生热变形, 降低其表面亲水性, 使得溶解度一直

处于较低水平<sup>[21]</sup>。但随着反应时间的延长, 有利于糖基化反应的进行, 大米蛋白质与木糖发生糖基化反应, 其接枝度和溶解度逐渐增加, 反应 20 min 时达到最高值, 分别为 42.47% 与 26.07%, 随后均出现下降的趋势。这可能与反应初期暴露蛋白质表面的游离氨基可以较快的与木糖反应, 引入糖基, 增加蛋白的亲水性; 但随着加热时间继续增加, 蛋白更多的内部氨基来参与反应, 但此时已经糖基化的蛋白质有可能再次发生聚合, 从而使接枝度与溶解度在 20 min 后略有降低<sup>[22-23]</sup>。

### 2.2 不同 pH 对糖基化产物接枝度及溶解度的影响

由图 2B 看出, 随 pH 增大 RP 和 RP-木糖糖基化产物溶解度增大, pH10 时分别达到 28.3% 和 35.5%, 在 pH8 时溶解度由 11.35% 到 27.1% 增加了 15.7%, 增加值最大。可以看出 pH 对溶解度的影响 > 接枝度对溶解性的影响, 但在食品加工以及保存过程中, 极少使其 pH 高于 8。

pH6~8 接枝度随 pH 增加增加, 这是因为, 在酸性条件下氨基是离子化的铵离子, 反应活性低, 并且在酸性条件下蛋白的溶解度本身也比较低, 当 pH8 时达到最大 41.94%, pH 为 9 时接枝度有所下降, pH10 时接枝度又开始上升。糖基化反应本质上是碱催化反应, 因此 pH 偏向碱性有利于反应的进行。但是碱性过强, 蛋白质的一级结构可能发生变化, 如脱氨脱羧和肽键断裂, 引起的“脱赖反应”将氨基酸转化为有毒的化合物, 反而不利于接枝反应的进行<sup>[24]</sup>。

### 2.3 木糖与 RP 不同质量比对糖基化产物接枝度及溶解度的影响

由图 3, 随着木糖质量比的增加溶解度和接枝度都是呈现先上升至最大值后下降的趋势, 接枝度与

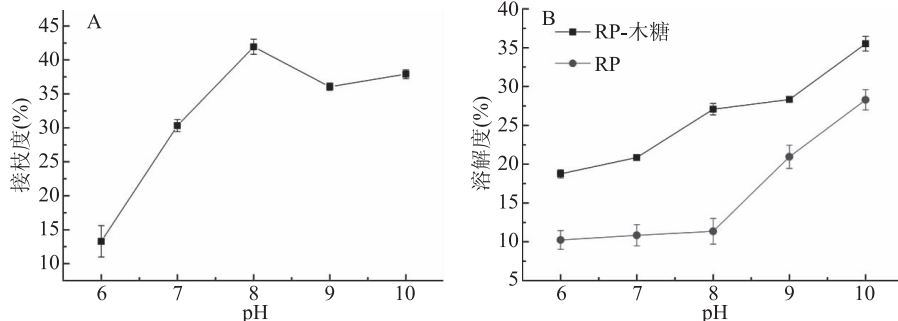


图2 不同 pH 对糖基化产物接枝度(A)及溶解度(B)的影响

Fig.2 Effect of different pH on grafting degree(A) and solubility(B)



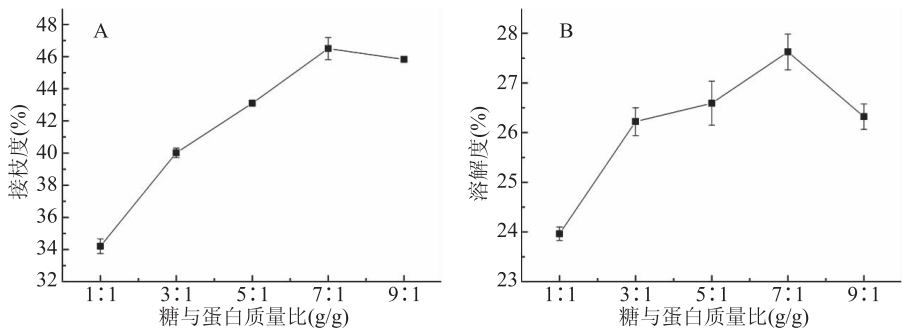


图3 木糖与 RP 不同质量比对糖基化产物接枝度(A)及溶解度(B)的影响

Fig.3 Effect of different ratios of xylose and protein on grafting(A) degree and solubility(B)

溶解度成正比,木糖与 RP 质量比为 7: 1 时溶解度到达最大 27.62% ,此时接枝度也达到最大值 46.50% 。这由于 RP 与木糖的比例在达到最佳值之后,如果继续增加木糖的量那么会使溶液的黏度上升,从而使得分子的流动性变差<sup>[25-26]</sup>。与此同时,由于大分子的空间稳定作用,使得反应位点不容易靠近,所以接枝度在上升达到最高值后反而呈现下降的趋势。

通过对水热反应的时间、温度、pH 及木糖与 RP 质量比的研究中,以接枝度为评判指标,得出 RP 与木糖的较优的反应条件为:水热温度 120 ℃,水热时间为 20 min,pH 为 8,木糖与蛋白质量比为 7: 1,接枝度达到最大 46.50% ,RP-木糖糖基化产物溶解度达到 27.62% 是 RP 的 2.38 倍,在此条件下制备糖基化产物,并进一步分析产物的结构变化。

2.4 氨基酸组成分析

对 RP、RP-木糖糖基化产物进行氨基酸分析,结果见表 1。通过对氨基酸含量进行分析,大米蛋白质

表1 RP、RP-木糖糖基化产物的氨基酸的组成(g/100 g 氨基酸)

Table 1 Amino acid compositions of RP, RP-xylose(g/100 g amino acid)

| 氨基酸   | RP    | RP-木糖 |
|-------|-------|-------|
| Asp   | 11.66 | 12.69 |
| Thr   | 3.99  | 4.1   |
| Ser   | 5.68  | 5.81  |
| Glu   | 21.58 | 24.38 |
| Gly   | 4.23  | 4.42  |
| Ala   | 4.37  | 4.45  |
| Cys * | 1.32  | 0.7   |
| Val   | 4.97  | 5.21  |
| Met   | 1.86  | 1.77  |
| Ile   | 4.98  | 5.22  |
| Leu   | 8.02  | 8.33  |
| Tyr   | 3.49  | 3.01  |
| Phe   | 5.79  | 6.68  |
| Lys * | 6.04  | 2.99  |
| NH3   | 1.47  | 1.57  |
| His   | 2.89  | 2.9   |
| Arg * | 7.66  | 5.77  |

注: \* 代表限制氨基酸。

中主要的氨基酸为谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)与亮氨酸(Leu)。在糖基化反应过程中,大米蛋白质氨基酸中主要是赖氨酸和精氨酸的相对含量减少,分别从 6.04 与 7.66 降低到 2.99 与 5.77,这是由于赖氨酸和精氨酸的侧链上存在自由氨基,参与了 RP 和木糖的糖基化反应。在表中也同时发现,酪氨酸、半胱氨酸与甲硫氨酸的相对含量也有较为明显的降低,这表明半胱氨酸也参与到接枝反应中,含量降低的原因则可能是由于其侧链中存在硫醇和羟基,其可与糖分子发生反应<sup>[27]</sup>。

2.5 SDS-PAGE 分析

利用 SDS-PAGE 是判断蛋白中以共价键结合糖的重要手段,也可以验证添加木糖对大米蛋白质的结构及组成产生的变化,对 RP 及 RP-木糖糖基化产物的反应产物进行考马斯亮蓝染色,其还原与非还原条件下的电泳图谱如图 4 所示。从图中可以看出 RP(1)的主要成分为谷蛋白,其中包括相对分子量为 51 kDa 的谷蛋白聚肽、34~37 kDa 与 21~22 kDa 的谷蛋白酸性亚基和碱性亚基以及 26 kDa 的球蛋白亚基<sup>[28]</sup>。在还原条件下,经过 β-巯基乙醇处理后,浓缩胶顶部高分子量的蛋白聚集体以及大部分谷蛋白聚肽会被还原成小分子量的肽,所以 RP 对应的谷蛋白的酸性亚基与碱性亚基条带的光密度明显增强,这与 RP 中的二硫键的断裂有关。而在非还原条件下 RP(泳道 3)在浓缩胶顶部富含以共价的二硫键结合的高分子量的蛋白聚集体、分离胶上有谷蛋白聚肽、球蛋白、谷蛋白酸性亚基及谷蛋白碱性亚基的形

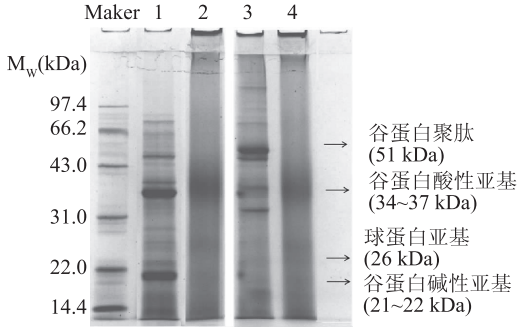


图4 RP 与 RP-木糖糖基化产物的 SDS-PAGE 图谱

Fig.4 SDS-PAGE mapping of RP and RP-xylose

注:其中泳道 1、泳道 2 为还原条件下 RP、RP-木糖糖基化产物;泳道 3、泳道 4 为非还原条件下 RP、RP-木糖糖基化产物;Maker 为标准蛋白质。

式<sup>[29]</sup>,且谷蛋白聚肽的含量明显高于还原条件下的含量。RP-木糖(泳道2与泳道4)糖基化产物在还原和非还原条件下都显示出比较连续的条带特征,缺乏明显的谷蛋白聚肽、球蛋白亚基和谷蛋白碱性亚基,说明这些亚基有可能参与到与木糖的糖基化反应中,生成分子量较大的结合物,在浓缩胶顶部显示出大量聚集体,与RP在 $\beta$ -巯基乙醇的作用下聚集体几乎降解不同,这种聚集体在 $\beta$ -巯基乙醇的作用下的还原电泳条带中,较难发生分解(泳道2),这说明RP与木糖发生糖基化反应生成了不同的RP-木糖高分子量聚集体<sup>[30-31]</sup>。

## 2.6 紫外光谱分析

从图5可知,由于RP中的芳香族氨基酸酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)以及苯丙氨酸(Phe)残基在225与280 nm波长下也能吸收一定波长的紫外光<sup>[32]</sup>,同时糖基化产物羟甲基糠醛在280 nm附近也有紫外吸收<sup>[33]</sup>。但是添加木糖进行糖基化反应后,这两个最大吸收峰没有明显的红移或蓝移,说明蛋白肽链中的酪氨酸和色氨酸微环境极性没有明显改变<sup>[12]</sup>,而水热糖基化后的RP-木糖在280 nm附近的紫外吸收值明显高于RP的紫外吸收<sup>[34]</sup>。这可能是由于水热糖基化使蛋白质的构象发生了变化,疏水基团暴露而使芳香族氨基酸的紫外吸收增大,结合氨基酸分析表1可知,酪氨酸(Tyr)的含量下降,苯丙氨酸(Phe)的含量增加,但增加量只有0.89%;同时糖基化产物的产生也是一个重要原因,说明糖基化产物羟甲基糠醛是导致紫外吸收增加的主要物质<sup>[33]</sup>。在280~320 nm之间新增了一个吸收峰,这可能是糖基化反应的过程中,一方面糖会发生异构和脱水,产生糠醛类物质,在290 nm左右有特征吸收;另一方面,用木糖糖基化修饰RP,生成了一些糖基化高级阶段产物,并在290 nm左右形成了具有显著吸光特性的生色团,增加了吸光值,这是美拉德反应的特征<sup>[35]</sup>。

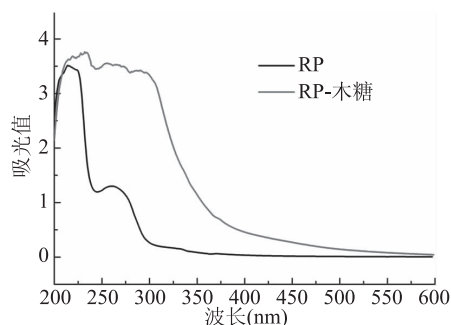


图5 RP与RP-木糖糖基化产物的紫外光谱

Fig.5 UV spectrum of RP and RP-xylose

## 2.7 荧光光谱分析

在290 nm的激发波长下,色氨酸为发射基团的荧光光谱,通过对蛋白中的色氨酸微环境的极性改变来反映蛋白质构象变化<sup>[36]</sup>。通常,如果色氨酸最大荧光发射峰( $\lambda_{\max}$ ) < 330 nm,则色氨酸被指定为埋藏在“非极性”环境中;如果 $\lambda_{\max}$  > 330 nm,则色氨酸被指定为处于“极性”环境中<sup>[37]</sup>,因此,从图6可见,本研究中的RP的色氨酸基团存在于“极性”环境中,

而随着木糖的加入,RP-木糖的荧光发射峰的峰形保持不变,但是荧光发射强度发生猝灭,这可能是由于糖链的产生对蛋白造成屏蔽效果<sup>[30]</sup>。此外,RP-木糖糖基化产物的 $\lambda_{\max}$ 从351 nm增加到362 nm,发生了红移,荧光波长红移及荧光强度猝灭结果表明木糖和大米蛋白质分子之间可能发生了相互作用。当最大荧光发射波长发生红移,表明蛋白内部的色氨酸发射基团位于更为亲水的微环境中<sup>[38]</sup>,这可能与RP-木糖在水热糖基化过程中,一方面由于受到高温高湿条件的影响,原来在热稳定过程中以二硫键形成的紧密的蛋白聚集体分子展开,暴露出更多的亲水基团<sup>[9]</sup>,另一方面由于糖分子中的羟基作为极性基团的引入。

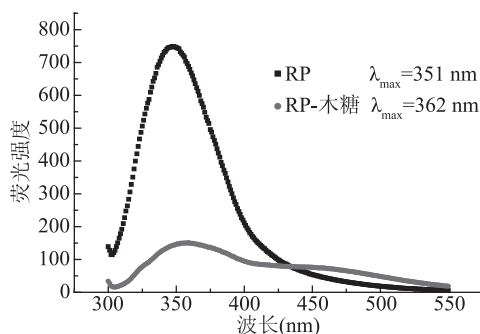


图6 RP和RP-木糖糖基化产物荧光扫描图谱

Fig.6 Fluorescence spectrum of complexes of RP and RP-xylose

蛋白质与糖发生糖基化反应会生成有色物质,而荧光物质是有色物质的前体物<sup>[39]</sup>,采用334 nm作为激发波长,通过对糖基化反应产物的荧光强度与荧光光谱扫描来判断糖基化反应的强度<sup>[9]</sup>,得到图7所示的糖荧光光谱扫描图,RP-木糖在419 nm处有最大荧光强度,RP在此波长下没有荧光发射峰,由此推断糖基化反应的发生,以及有色物质形成可能是由于低分子量化合物的形成和高分子量类黑精的存在<sup>[39]</sup>。

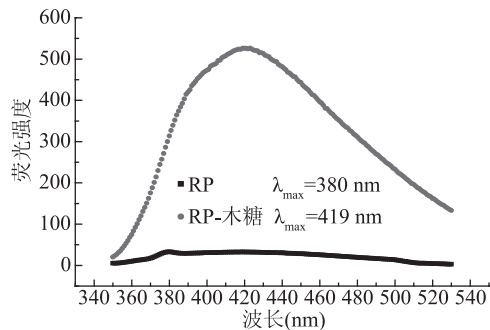


图7 RP和RP-木糖糖基化产物糖荧光扫描图谱

Fig.7 Fluorescence spectrum of complexes of RP and RP-xylose

## 2.8 红外光谱分析

红外光谱是一种常用的分析蛋白质结构的方法,能够通过蛋白在中红外区有若干特征吸收峰,灵敏地反映出肽链结构的变化<sup>[40]</sup>。图8是RP和RP-木糖糖基化产物的红外光谱图,从图可以发现RP-木糖糖基化产物在3700~3200  $\text{cm}^{-1}$ 波长范围内光谱强度增

表2 RP与RP-木糖糖基化产物的二级结构组成  
Table 2 Secondary structural contents of RP and RP-xylose

| 样品    | $\alpha$ -螺旋(%)               | $\beta$ -折叠(%)                | $\beta$ -转角(%)                | 无规则卷曲                         |
|-------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| RP    | 17.38 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup> | 33.27 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup> | 22.01 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> | 8.74 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>  |
| RP-木糖 | 15.23 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup> | 29.86 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup> | 21.76 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup> | 18.14 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup> |

注:同列上的标字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

强(即透光率下降),由于此波长范围内主要是由于游离-OH的伸缩振动引起透过率的减少,这表明RP发生糖基化反应后,糖分子以共价键形式接入RP中,使-OH的数量增多<sup>[20]</sup>。蛋白质的红外光谱图谱有几组特征吸收谱带:酰胺I带、酰胺II带,其波长分别对应于1600~1700、1530~1550  $\text{cm}^{-1}$ 波数范围<sup>[41]</sup>,红外光谱测定的酰胺I带里可以计算二级结构含量,取酰胺I带的范围进行计算,进行二阶导数处理,并运用高斯拟合,各二级结构的峰面积与酰胺I带总峰面积的比值为二级结构的含量见表2。其中特征吸收谱带酰胺I带(主要C=O为伸缩振动)能够反映蛋白质二级结构(包括 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角、无规卷曲等)的变化,其中 $\alpha$ -螺旋主要表现在1650~1660  $\text{cm}^{-1}$ 、 $\beta$ -折叠在1618~1640和1670~1690  $\text{cm}^{-1}$ 、 $\beta$ -转角在1660~1670和1690~1700  $\text{cm}^{-1}$ 、无规则卷曲结构在1640~1650  $\text{cm}^{-1}$ 区域内<sup>[42-43]</sup>。因此,表2中RP-木糖与RP相比, $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠有显著降低分别降低了2.15%和3.14%, $\alpha$ -螺旋主要在RP分子的内部,含量的减少说明蛋白质分子间氢键被破坏,使得蛋白中的游离氨基与糖类发生-接枝反应<sup>[42-43]</sup>。无规则卷曲含量显著增加,从8.74%到18.14%,说明部分 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠转化为了无规则卷曲, $\beta$ -转角无明显变化,进一步说明水热糖基化后的RP的结构更加松散<sup>[44]</sup>。由图8,酰胺谱II带能灵敏地反映分子间或分子内的氢键缔合作用,水热糖基化反应破坏了这些为蛋白分子提供稳定性的作用力,使蛋白质结构更为灵活<sup>[45]</sup>。1000~1070  $\text{cm}^{-1}$ 吸收峰是糖分子中C-O-C官能团的伸缩振动和糖环存在的典型特征<sup>[46]</sup>,从图中也可以看出RP-木糖糖基化产物的红外光谱在1050  $\text{cm}^{-1}$ 吸收峰处明显的吸收强度,表明木糖分子与RP发生了糖基化反应,引入了相应的功能性基团,导致蛋白分子侧链振动<sup>[20]</sup>。

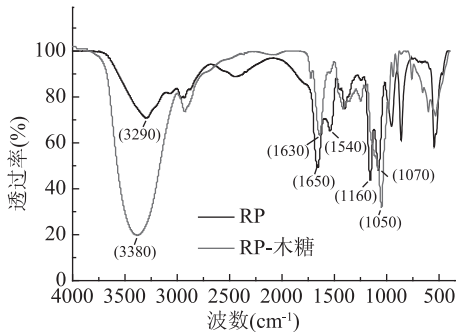


图8 RP与RP-木糖糖基化产物的FTIR图  
Fig.8 FTIR spectra of RP and RP-xylose

3 结论

通过研究水热糖基化改性对大米蛋白质的结构

及溶解性的影响,得到结论当反应温度为120℃,反应时间20 min, pH8,木糖与RP质量比7:1时,接枝度达到最大46.50%,RP-木糖糖基化产物溶解度是RP的2.38倍,水热糖基化反应生成的RP-木糖糖基化产物相比于RP的溶解性质得到部分改善。参与RP和木糖水热糖基化反应的主要氨基酸为精氨酸和赖氨酸,并且溶解度的改善与RP和木糖的共价结合密切相关;且亚基结构中谷蛋白聚肽、球蛋白亚基和谷蛋白碱性亚基可能参与到与木糖的糖基化反应中,生成了RP-木糖高分子量聚集体;此外,二级结构中 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠结构减少、无规则卷曲增加,这可能与热引起的氢键的缔合作用发生改变相关。由于改性后RP的溶解性仍然较低,且在糖基化过程中还有可能会产生糖基化的高级阶段产物有害的AGEs,因此,需要对继续采用合适的糖基化反应来改善溶解性和其他功能性质,并对糖基化中可能产生的有害产物的控制进行进一步的研究。

参考文献

[1] Phongthai S, Homthawornchoo W, Rawdkuen S, et al. Preparation, properties and application of rice bran protein: A review [J]. International Food Research Journal, 2017, 24 (1): 25-34.

[2] 管弢铭,何苗,熊双丽.超高压处理对大米蛋白功能特性及结构的影响[J].食品工业科技,2016,37(20):104-109.

[3] 高宇,梁盈,林亲录,等.糖基化反应改善大米蛋白功能特性的研究进展[J].农业机械,2012(30):62-65.

[4] 牛丽亚.小麦胚芽油超临界CO<sub>2</sub>萃取、评价及麦胚蛋白修饰改性的研究[D].合肥:合肥工业大学,2012.

[5] Lei L, Zhao Q, Selomulya C, et al. The effect of deamidation on the structural, functional, and rheological properties of glutelin prepared from *Akebia trifoliata* var. australis seed [J]. Food Chemistry, 2015, 178(23):96-105.

[6] 谷凤林.酪蛋白美拉德产物的制备、性质及在烟草中的应用研究[D].无锡:江南大学,2010.

[7] Silván J M, Assar S H, Srey C, et al. Control of the Maillard reaction by ferulic acid [J]. Food Chemistry, 2011, 128 (1): 208-213.

[8] 姚玉静,许彩虹,王金梅.食品中蛋白质糖基化接枝的研究进展[J].现代食品科技,2017,8(33):306-312.

[9] 夏宁.喷射蒸煮制备米糠、碎米蛋白及其功能性研究[D].广州:华南理工大学,2012.

[10] 施尔畏,夏长泰,王步国.水热法的应用与发展\_施尔畏[J].无机材料学报,1996,11(2):193-195.

[11] Ning X, Wang J, Yang X, et al. Preparation and characterization of protein from heat-stabilized rice bran using hydrothermal cooking combined with amylase pretreatment [J].



Journal of Food Engineering, 2012, 110(1): 95-101.

[12] 许彩虹. 大豆球蛋白糖基化接枝改性及其热聚集行为研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.

[13] 兰山, 郑宗平, 何志勇, 等. 食品体系中晚期糖基化终产物的研究进展[J]. 中成药, 2013, 35(9): 1997-2000.

[14] Decourcelle N, Sabourin C, Dauer G L, et al. Effect of the Maillard reaction with xylose on the emulsifying properties of a shrimp hydrolysate (*Pandalus borealis*) [J]. Food Research International, 2010, 43(8): 2155-2160.

[15] Laroque D, Inisan C, Berger C, et al. Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity [J]. Food Chemistry, 2008, 111(4): 1032-1042.

[16] Qi P X, Onwulata C I. Physical properties, molecular structures, and protein quality of texturized whey protein isolate: Effect of extrusion moisture content [J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(5): 2244.

[17] Mendez L A, Castro C A S, Casso R B, et al. Effect of substrate and harvest on the amino acid profile of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) [J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2005, 18(5): 447-450.

[18] Laemmli B U K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage - T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.

[19] 佟晨瑶. 鸡卵黄免疫球蛋白的糖基化与功能特性的机制规律研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.

[20] 张瑶. 不同糖化方法对提高大豆分离蛋白功能性质的对比研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.

[21] 王章存, 刘卫东, 姚惠源. 热变性大米蛋白的结构和性质研究, I 米蛋白加热前后的溶解特性和氨基酸变化[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(2): 10-12.

[22] 张蓓, 郭晓娜, 朱科学, 等. 燕麦蛋白糖基化改性研究[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(6): 41-46.

[23] Li Y, Lu F, Luo C, et al. Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar [J]. Food Chemistry, 2009, 117(1): 69-74.

[24] 刘娟, 卢蓉蓉. 酪蛋白湿法糖基化改性研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(10): 49-52.

[25] 那治国, 马永强, 韩春然. 米糠谷蛋白干法糖基化改性的研究[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 52-57.

[26] 李春林, 高彦祥, 袁芳. 亚临界水中反应参数对  $\epsilon$ -聚赖氨酸与葡聚糖美拉德反应的影响[J]. 食品工业科技, 2012, 33(2): 261-264.

[27] Cheng Y H, Tang W J, Xu Z, et al. Structure and functional properties of rice protein - dextran conjugates prepared by the Maillard reaction [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2018, 53(2): 372-380.

[28] Xia N, Wang J, Gong Q, et al. Characterization and *in vitro* digestibility of rice protein prepared by enzyme - assisted microfluidization: Comparison to alkaline extraction [J]. Journal of Cereal Science, 2012, 56(2): 482-489.

[29] 郑新雷, 李灵诚, 滕建文等. 双孢蘑菇蛋白的提取工艺优化及其功能性质[J]. 食品工业科技, 2019, 40(16): 126-132.

[30] 贾潇, 赵谋明, 贾春晓, 等. 漆酶催化大米蛋白与阿魏酸交联及其结构和抗氧化活性的变化[J]. 现代食品科技, 2016, 32(11): 98-105.

[31] 华静娴. 米蛋白-葡聚糖微波加热接枝耦联反应的研究[J]. 无锡: 江南大学, 2008: 31-32.

[32] 潘忠孝, 刘信安. 氨基酸混合体系的目标因子分析-紫外分光光度法测定[J]. 分析化学, 1991, 19(7): 826-830.

[33] 钟比真, 涂宗财, 王辉. 微波场中卵清蛋白糖基化产物不均匀性的光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(6): 1896-1901.

[34] 谢欢. 不同时空条件下微波对蛋清蛋白糖基化反应的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2017.

[35] Kim J, Lee Y. Effect of reaction pH on enolization and racemization reactions of glucose and fructose on heating with amino acid enantiomers and formation of melanoidins as result of the Maillard reaction [J]. Food Chemistry, 2008, 108(2): 582-592.

[36] Chen W, Wang W, Ma X, et al. Effect of pH - shifting treatment on structural and functional properties of whey protein isolate and its interaction with (-) - epigallocatechin - 3 - gallate [J]. Food Chemistry, 2019, 274: 234-241.

[37] Vivian J T, Callis P R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins [J]. Biophysical Journal, 2001, 80(5): 2093-2109.

[38] 卢薇, 丁简, 官燕华, 等. 酶辅助亚临界水提取高温豆粕蛋白及其性质研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(1): 126-130, 95.

[39] Morales F J, Jiménez - Pérez S. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence [J]. Food Chemistry, 2001, 72(1): 119-125.

[40] 李冰蟾. 磷酸化蛋清蛋白与茶多酚的相互作用及其复合物的抗氧化性研究[D]. 昆明: 云南大学, 2015.

[41] Surewicz W K M H H. New insight into protein secondary structure from resolution - enhanced infrared spectra [J]. Biochimica Et Biophysica Acta - Bioenergetics, 1988 (952): 115-130.

[42] Zhao X, Chen F, Xue W, et al. FTIR spectra studies on the secondary structures of 7S and 11S globulins from soybean proteins using AOT reverse micellar extraction [J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(4): 568-575.

[43] 臧艳妮, 赵妍嫣, 罗水忠. 超声波和糖基化复合改性对小麦面筋蛋白性质和结构的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(5): 122-128.

[44] 赵城彬, 张浩, 许秀颖, 等. 不同分子质量葡聚糖对玉米醇溶蛋白糖基化产物结构和功能性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(16): 68-73.

[45] 冯玉超, 王长远, 李玉琼, 等. 芸豆蛋白与糖基化芸豆蛋白结构与功能特性研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(7): 99-107.

[46] 朱小燕. TG酶与糖基化交联作用对米渣蛋白结构、功能及流变学特性的影响研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.