

小角 X-射线法解析恒温冻藏过程对面筋蛋白分子链结构的影响

赵雷¹, 汪星星¹, 胡卓炎¹, 李冰², 刘国琴², 李琳²

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510641)

摘要: 冷冻面制品在食品行业发展迅速, 但在冻藏过程中对面制品品质影响的关键性问题仍未明朗。本研究采用小角 X 射线散射仪 (SAXS) 探讨了恒温冻藏 (-18 °C) 对小麦面筋蛋白分子链构形、均方根旋转半径 (R_g) 及分子量的影响。实验发现, 冻藏前, 面筋蛋白分子在 500 mM 乙酸溶液中链结构较疏松, 属于质量分形 (分形维数 D_m : 2.05), 呈现网络状的结构。随着冻藏时间的延长, D_m 值呈现下降的趋势, 表明面筋蛋白高聚物的链结构逐渐疏松, 同时发现在冻藏过程中面筋蛋白平均分子量和 R_g 都随着冻藏时间的增加也呈现下降趋势, 并且 R_g 与 D_m 的变化正相关, 说明在冻藏过程中由于冰晶的重结晶等作用使得高聚物发生了解聚现象, 造成了面筋蛋白分子链的断裂, 从而使得其网络结构的疏松。

关键词: 冻藏; 面筋蛋白; SAXS; 分子链结构

文章篇号: 1673-9078(2016)1-95-99

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.015

Effect of Frozen Storage at Constant Temperature on the Molecular Chain Structure of Hydrated Gluten by Small-angle X-ray Scattering (SAXS)

ZHAO Lei¹, WANG Xing-xing¹, HU Zhuo-yan¹, LI Bing², LIU Guo-qin², LI Lin²

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: Frozen flour products have been rapidly developed in the food industry, while some key scientific issues on the effects of the frozen storage process on the quality of flour products remain unclear. In this study, the effects of frozen storage (-18 °C) on the molecular chain configuration, root mean square radius of gyration (R_g), and molecular weight of hydrated gluten were studied by small-angle X-ray scattering (SAXS). The results showed that before frozen storage, gluten molecules had a relatively loose chain structure in a 500 mM acetic acid solution, possessed a mass fractal structure (mass fractal dimension (D_m): 2.05), and a network structure. With elongated storage time, D_m value tended to decrease, indicating a gradually loose chain structure of gluten protein polymers. The R_g value and average molecular weight of gluten also tended to decrease with increasing frozen storage time and the change of R_g was positively correlated with that of D_m . These results demonstrated that depolymerization occurred during the frozen storage process due to the ice recrystallization, resulting in breaks in gluten molecule chains and a loose network structure.

Key words: gluten; frozen storage; small-angle X-ray scattering (SAXS); molecular chain structure

随着生活节奏的加快, 方便、营养的冷冻食品越来越受到消费者青睐。因此, 目前市面上冷冻食品销量越来越大, 其中冷冻面制品在冷冻食品中的比例达到 40% 以上。冷冻面制品的质量很大程度上取决于冷冻面团的品质。研究表明, 构成面团的主要成分面筋

收稿日期: 2015-01-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31301412、31130042); 国家科技支撑计划 (2012BAD37B01); 广东省自然科学基金资助项目 (S2013040014403); 大学生省级创新训练项目 (1056413084)

作者简介: 赵雷 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然高分子改性

通讯作者: 李琳 (1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品与生物化工

蛋白的分子链结构影响着面团的品质, 如: 在面包的焙烤中发现面包的体积和延伸性能与面筋蛋白分子量的大小以及分布存在着一定的联系^[1]; 在面团的加工过程中, 面筋蛋白分子量分布决定着面团的物理性能, Southan 等人报导了面团拉伸强度的大小与分子量高于临界值 (1×10^6 u) 的面筋蛋白含量正相关^[2]。因此, 研究在冻藏过程中面筋蛋白分子链结构的变化对研究冻藏过程中最终产品的品质变化有着十分重要的指导意义。

近年来, 小角 X 射线散射 (SAXS) 在检测高分子在溶液中结构信息变化的应用越来越多。这些信息

包括了高分子的分子量的大小与分布、分子链的构象以及分子结构等。Nakagawa 等人采用 SAXS 研究酪蛋白纳米粒子在冷冻体系中自组合及蛋白与多糖的络合作用,发现不同的冷冻条件和 pH 值对蛋白质的聚集有明显的影响^[3]。Watanabe 等人采用凝胶渗透色谱 (SEC)和 SAXS 联用的仪器研究牛下颚中的粘蛋白,结果发现 SAXS 中当散射角度为 0 的时候,其散射值与蛋白质的分子量大小呈正相关^[4],说明了 SEC-SAXS 是一种有效确定蛋白质分子量的仪器。Egelhaaf 等人采用 SAXS 研究具有重复单元的高分子量面筋蛋白,发现具有重复单元的 *dB1* 和 *dB4* 的蛋白质构象为具有相当大柔性的圆筒状,而非推测的硬棒状^[5]。这些研究成果说明了 SAXS 可以有效的表征蛋白分子量及其分布、分子链及聚集体构象等。

目前为止,鲜有用 SAXS 表征在冻藏过程中面筋蛋白分子链结构变化的研究。因此,本实验采用 SAXS 研究恒温冻藏过程对面筋蛋白分子链结构变化的影响,进而为冷冻面制品品质的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

材料:高筋粉,广州南方面粉厂(加拿大硬红冬麦);牛血清白蛋白(BSA),美国 Sigma 公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 面筋蛋白的制备和冷冻处理

准确称取 10.0 g 小麦面粉缓慢倒入面筋洗涤仪(JJIM54S,上海嘉定粮油仪器有限公司)的洗涤杯中进行和面与洗涤。洗涤分为两次,第一次采用 5% 的氯化钠溶液去除淀粉和球蛋白,第二次采用蒸馏水去除氯化钠和清蛋白。整个和面以及洗涤过程在 10 min 内完成,洗涤完成后,小心取出面筋洗涤杯(不要让面筋遗留在搅拌轴上)。将湿面筋蛋白在 60000 r/min 的转速下离心 10 min,水分含量控制在 55~65% 之间,如果水分含量低于 55%,样品可能不均一,而水分含量高于 65% 会产生明显的缩水现象^[6]。

用镊子取出面筋放入超低温冰箱(ULT1386-5-V39, Revco., America)进行速冻,将速冻后的样品转移至特制的铝盒中放置于温度可控的冰箱(BCD-245, BOSCH., Germany)中冻藏,温度控制在 -18 ± 1 °C。以 30 d 作为一个冻藏的周期,在 0、30、60、90 和 120 d 分别取样。将取出的样品进行冷冻干燥(Wizard2.0, VirTis., American),最后将干燥后的

面筋在粉碎机里粉碎,过 120 目的筛,得到不同冻藏时间后的样品。

1.2.2 面筋蛋白溶液的制备

取 0.5 g 样品溶解于 50 mL 500 mM 的乙酸溶液中,整个过程采用磁力搅拌器搅拌 24 h。将溶解后的样品超声处理 15 s 后在 12500 r/min 的转速下离心 30 min,将离心后的上清液采用凯氏定氮测定蛋白质含量,然后配置为 8 mg/mL 的蛋白溶液。

1.2.3 SAXS 实验

制得的样品在光源 X 射线散射站进行测试,采用 SAXSess 型号的照相机(Anton-Paar, Graz, Austria)。X 射线的发射器包含了 X 射线管(PANalytical),其电子能量为 40 kV,平均电子束强度为 50 mA。X 射线管引出的辐射光源经过多层光学仪器的聚焦,单色化及准直后形成了单一的原始光源(Cu-K α),入射 X 射线的波长为 $\lambda=0.1542$ nm。样品置于真空半透明毛细管状的样品器中,将这种样品器放置于可控温的样品槽中进行测试。在测定过程中温度保持为 26.0 °C,样品到成像板的距离为 261.2 nm,测定时间为 30 min。当光源照射在样品上,通过二维成像板探测器测量散射光强度随散射角度的变化,得到样品的 SAXS 空间分布谱。由读出器读出成像板上的小角散射信号灰度图像,再利用 SAXS 数据分析软件(Perkin Elmer, USA),根据 X 射线强度与灰度信息的对应关系,将灰度信息转换为初始散射曲线数据。根据散射几何关系,将初始散射曲线转换为相应的散射强度 q ($q=4\pi\sin\theta/\lambda$, 2θ 为散射角)与散射矢量的关系曲线 $I(q)$ 。所有的散射数据都经过扣除背景、归一化处理。

1.2.4 分型理论

分形理论是利用数理统计的概念来描述研究对象的不规则构形,如弯曲状、网络状、粗糙的和碎片状等。分形是一类无特征长度、自相似的结构,其不规则程度的定量表征参数是分形维数,分形维数往往与其结构及性能参量有一定的关联,而且还在一定程度上反映分形的形成机理。

分形分为质量分形和表面分形。质量分形维数表示的是质量与对象尺寸之间的关系,如公式(1)所示^[7]:

$$M \sim r^{D_m} \quad (1)$$

公式(1)可以用来描述高分子的构形,其中 D_m 为质量分形维数; M 为高聚物的聚集形态(relates the mass); r 为高聚物的大小(size)。

D_m 值为 1、2、3 时分别代表高分子的构形符合欧几里德几何学中的棒状、圆盘状和球状。如果研究对象不是这三种标准形状的话,那么, D_m 值就不是整数。

一般情况下, 利用分形理论表述的一些具有分支的复杂结构的高分子时, 其 D_m 值的范围在 1~3 之间。

表面分形是反映高分子物质表面的粗糙程度, 即高分子的表观和形状之间一定的关系, 如公式 (2) 所示:

$$S \sim r^{D_s} \quad (2)$$

其中, D_s 为表观分形维数; S 为高聚物的表面区域 (surface area)。对于光滑的高分子表面来讲, 其 D_s 值为 2; 对于一些表观粗糙的高分子, D_s 值在 2~3 之间。因此, 可以用 D_s 来表述高分子表观形态。

面筋蛋白也是一种典型的高分子物质。因此, 在小角 X-射线散射实验中, 也可以将分形理论引入进来。散射曲线直线部分的散射强度可以用散射矢量的指数形式来表示, 这个指数与分形维数相关^[8], 如公式 (3) 所示:

$$I(q) \propto q^{-\alpha} \quad (3)$$

其中, q 和 I 分别表示散射矢量和强度; α 表示散射结构中的分形维数。

以对数坐标作图, 所得斜率为 α 。当 $3 < \alpha < 4$ 时, 散射体是表面分形, 此时, 物体本身致密, 表面粗糙, 其分形维数 $D_s = 6 - \alpha$; D_s 值一般介于 2 和 3 之间, 越接近 2 表面越光滑, 越接近 3 表面越粗糙。当 $0 < \alpha < 3$ 时, 散射体是质量分形, 物体本身疏松, 其分形维数 $D_m = \alpha$ 。

1.2.5 数据分析

取 3 次测定结果的平均值, 所得数据采用 OriginPro 8.0 作图。利用 Duncan's 新复极差检验 ($p < 0.05$), 评价样品平均值之间的差异显著性。

2 结果与讨论

2.1 恒温冻藏对面筋蛋白溶液散射曲线和散射强度的影响

将冻藏处理后的小麦面筋蛋白溶解于 500 mM 乙酸溶液中后, 进行 SAXS 的实验。Jin 等^[9]研究表明, 采用 SAXS 测定蛋白溶液时, 最佳的溶液浓度为 8~15 mg/mL, 因此, 本实验采用的面筋蛋白溶液浓度为 8 mg/mL。图 1 显示了恒温冻藏后不同的冻藏下面筋蛋白的散射曲线。从图 1 上可以明显的看出, 当 q 值在 0.09 nm^{-1} 左右的时候, 所有样品的散射曲线都有一个尖锐的峰值出现, 这说明, 蛋白质在溶液中完全伸展开, 没有蛋白质分子之间的相互作用的影响, 可以忽略溶剂对面筋蛋白分子链的影响。如果有一个相对较宽的峰出现的话, 说明蛋白质之间会有相互作用从而影响到散射曲线。虽然也有研究表明, 当 q 值大

于 0.8 nm^{-1} 的时候浓度变化对蛋白溶液的散射曲线没有明显的影响^[10]。但是, 为了得到面筋蛋白的分子量等数据, 本研究选择在低 q 值下可以提供较为准确信息的溶液浓度。

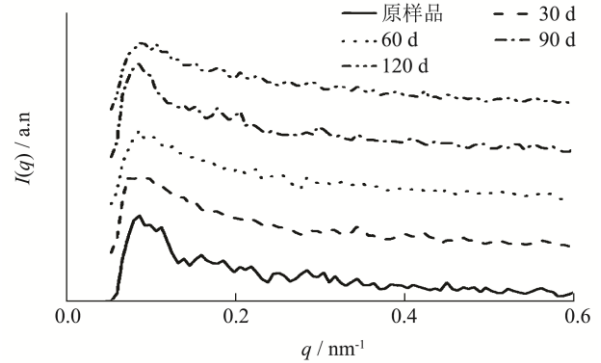


图 1 恒温冻藏后面筋蛋白在 26 °C、500 mM 的乙酸溶液中的散射曲线 ($I(q)/q$)

Fig.1 Scattering curve ($I(q)/q$) of gluten in a 500 mM acetic acid solution at 26 °C after frozen storage at constant temperature

注: 冻藏时间: 0 d~120 d, 面筋蛋白溶液浓度: 8 mg/mL。

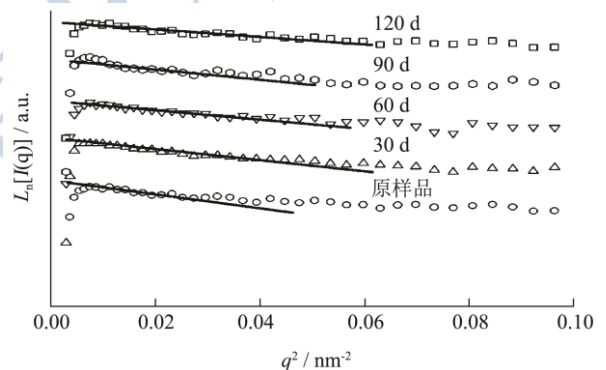


图 2 恒温冻藏时间对小麦面筋蛋白 Guinier 散射曲线的影响

Fig.2 Effect of frozen storage time on Guinier plots for gluten

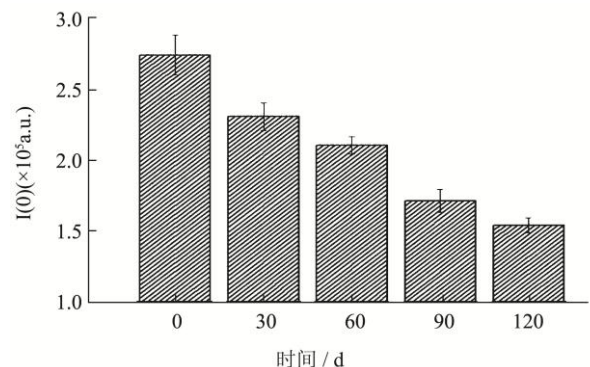


图 3 冻藏时间对 $I(0)$ (散射角度为 0 时散射强度) 的影响

Fig.3 Effect of frozen storage time on $I(0)$ (the scattering intensity at zero scattering angle)

图 2 显示的是恒温冻藏条件下不同冻藏时间的面筋蛋白 Guinier 散射曲线。其中, 横纵坐标 q 和 I 分别表示散射矢量和强度。Guinier 散射曲线反映了蛋白质

在溶液中的构象。从图 2 可以看出, 在小角范围内, 原蛋白和经过冻藏后的蛋白满足线性关系, 表明, 面筋蛋白在乙酸溶液中呈现相对单一的尺寸, 有比较相近的构象。对于不同样品的 Guinier 散射曲线来讲, 这种线性区间所反映的信息是可以通过计算而得到的。如, $I(0)$ 是指当散射角度为 0 的时候散射强度, 文献表明^[4], $I(0)$ 与溶液中的蛋白质分子量呈正相关, 而 $I(0)$ 可以通过公式 $\ln I(q) = \ln I(0) - R_g^2 q^2 / 3$, 在线性范围内计算其 Guinier 曲线得到。

图 3 是通过 Guinier 曲线计算得到的冻藏时间对面筋蛋白溶液 $I(0)$ 的影响。并且从图 3 可以明显的发现, 在恒温冻藏过程中, 其 $I(0)$ 值都随着冻藏时间的增加而下降。这种定性分析说明了, 面筋蛋白的分子量随着冻藏时间的增加而呈现下降的趋势, 并且可以明显的发现, 当冻藏时间从 60 d 到达 90 d 时, 其 $I(0)$ 值下降的最为明显, 而从 90 d 到 120 d 的过程中 $I(0)$ 值也会下降, 但不是很明显。这种现象与 Ribotta^[11] 等人的研究结果相类似, 说明在恒温冻藏过程中, 仍会出现冰晶体的重结晶和水分的迁移, 在这个过程中对面筋蛋白的结构造成了一定的影响, 从分子量上反映在冻藏过程中面筋蛋白的分子量会发生下降^[12]。值得一提的是, 因为面筋蛋白的分子量分布比较宽, 而 SAXS 测定出的 $I(0)$ 值只是反映了其分子量的平均值变化, 因此这种平均值变化主要集中在分子量的哪一段范围内, 还有待进一步的研究。

2.2 恒温冻藏对面筋蛋白分形维数的影响

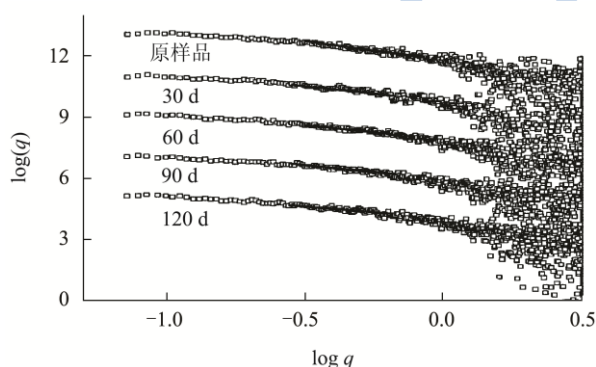


图 4 恒温冻藏后面筋蛋白在 26 °C, 500 mM 的乙酸溶液中的 SAXS 散射双对数曲线 ($\log I(q) / \log q$)

Fig.4 Double logarithmic plot of the SAXS curve ($\log I(q) / \log q$) of gluten in a 500 mM acetic acid solution at 26 °C after frozen storage

图 4 表示面筋蛋白经过恒温冻藏后小角 X 射线散射后图谱。对其横纵坐标分别取对数, 当 $\log q$ 的值在 -0.5~0 之间的时候, $\log I \propto -a \log q$ 曲线有比较好的线性区域, 在较低的 q 值范围内有线性区域说明, 面

筋蛋白在溶液中主要以聚合物形式存在, 因此, 可以通过计算得到其斜率, 如表 1 所示。

表 1 SAXS 中各个曲线 D_m 值 (质量分析维数) 的确定

Table 1 Determination of mass fractal dimension (D_m) values in each curve by SAXS

样品名称	斜率 α	D_m
原样品	-2.05	2.05
恒温冻藏 30 d	-1.97	1.97
恒温冻藏 60 d	-1.95	1.95
恒温冻藏 90 d	-1.73	1.73
恒温冻藏 120 d	-1.68	1.68

从表 1 可以看出, 首先, 原面筋蛋白 D_m 值为 2.05, 说明, 面筋蛋白分子链本身比较疏松属于质量分形。也有研究报道, 面筋蛋白分子链在溶液中呈现网络状结构^[13], 同样, 根据 Schaefer 的研究发现, 在陶瓷类材料中 ($n\text{Si}(\text{OH})_4$), 当 D_m 值为 2.09 时, 其分子链也呈现一种接近于网络状的结构^[14], 因此, 原面筋蛋白在 500 mM 乙酸溶液中其 D_m 值为 2.05, 可以判断, 其分子链在溶液中呈现网络状结构。

但是, 随着冻藏时间的增加, D_m 值呈现下降的趋势。当冻藏时间达到 90 d 时, D_m 值从原样品的 2.05 下降到 1.73, 120 d 后, D_m 值仅有 1.68, 因为对于理想状态的欧几里德几何学中的棒状、圆盘状和球状的 D_m 值分别为 1、2 和 3, 说明了随着冻藏时间的增加面筋蛋白高聚物的链结构逐渐疏松。结合 $I(0)$ 值的结果可以发现, 由于在冻藏过程中, 冰晶的重结晶等作用使得高聚物发生了解聚现象, 造成了面筋蛋白分子链的断裂从而使得其网络结构的疏松, 造成了 D_m 值的下降。

2.3 恒温冻藏对面筋蛋白分子链尺寸的影响

图 5 分别表示在恒温冻藏过程中面筋蛋白的 R_g 和 D_m 随着冻藏时间的变化图。对于面筋蛋白分子尺寸的变化可以通过 SAXS 来得到, 如对于不同样品的 Guinier 散射曲线来讲, 这种线性区间所反映的信息是可以通过计算而得到的。在线性范围内, 通过计算公式 $\ln I(q) = \ln I(0) - R_g^2 q^2 / 3$ 的斜率可以得到面筋蛋白在溶液中 R_g 的均值。在本研究中可以根据图 2 Guinier 散射曲线来计算其 R_g 在冻藏中的变化, 但是, 计算 R_g 的前提是要满足 $qR_g < 1$ ^[4]。为满足 $qR_g < 1$, 可以根据测定对照样品和冻藏后面筋蛋白的 R_g 推出, $q^2 < 0.007-0.024 \text{ nm}^{-2}$ 时, 计算出的 R_g 才是有意义的。并且, 从图 2 可以明显的观察到, 当 $q^2 < 0.04 \text{ nm}^{-2}$, 样品在 Guinier 曲线中都处在线性范围内, 满足了本研究对 q 值的要求, 因此, 计算出的 R_g 是有意义的。

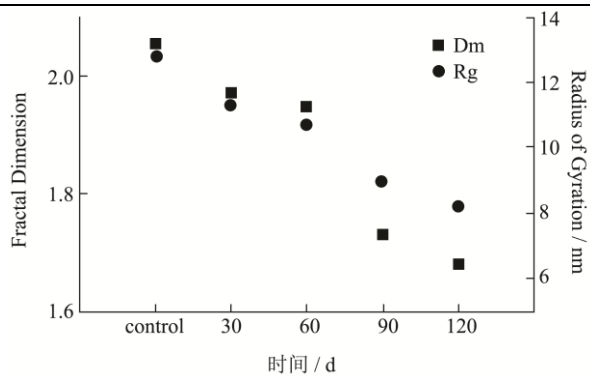


图5 恒温冻藏过程中 R_g (均方根旋转半径) 和 D_m 的变化

Fig.5 Changes in the root mean square radius of gyration (R_g) and D_m during frozen storage

从图5中可以明显看出,随着冻藏时间的增加,其面筋蛋白的 R_g 明显呈现下降趋势。在恒温冻藏过程中,从对照样品的 12.84 nm 下降到冻藏 120 d 的 8.01 nm。此外,还有一个明显的现象,当冻藏时间从 0 d 到 90 d 的过程中,面筋蛋白下降的程度相对较大,而到 120 d 时下降相对不是很明显。在本研究中,同时对比了在冻藏过程中 R_g 的变化与 D_m 的变化,结果发现,两者的变化具有一定的关联,在冻藏过程中,都经历了一个先下降而后趋于不变的状态。这表明,随着冻藏时间的增加,由于大量水分的迁移和冰晶的重结晶,在这个过程中造成了面筋蛋白的破坏,而这个破坏在分子量上表现为解聚现象,而在分子链上应表现为链的断裂,这些断裂后的支链可能造成了面筋蛋白分子 R_g 的下降,而同时对其分形维数也会产生明显的影响,使其分子链的结构发生疏松,会在一定程度上影响其在加工过程中的作用。

3 结论

将面筋蛋白溶解于 500 mM 乙酸溶液,配置为 8 mg/mL 的溶液浓度,其分子链在乙酸溶液中呈现相对单一的尺寸,有比较相近的构象。随着冻藏时间的延长,面筋蛋白的分子量和 R_g 有着明显的下降,说明在此过程中,由于大量水分的迁移和冰晶的重结晶,造成了面筋蛋白的破坏,而这个破坏在分子量上表现为解聚现象,而在分子链上应表现为链的断裂,这些断裂后的支链可能造成了面筋蛋白分子 R_g 的下降。同时发现 R_g 与 D_m 的变化正相关,说明由于面筋蛋白分子 R_g 的下降,同时对其分形维数也会产生明显的影响,使其分子链的结构发生疏松,分形维数下降。

参考文献

[1] Curti E, Carini E, Tribuzio G, et al. Bread staling: Effect of gluten on physico-chemical properties and molecular

mobility [J]. LWT - Food Science and Technology, 2014, 59 (1): 418-425

[2] Southan M, MacRitchie F. Molecular weight distribution of wheat proteins [J]. Cereal Chemistry, 1999, 76 (6): 827-836

[3] Nakagawa K, Kagemoto M. Characterization of casein-based nanoparticles formed upon freezing by in situ SAXS measurement [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 103: 366-374

[4] Watanabe Y, Inoko Y. Size-exclusion chromatography combined with small-angle X-ray scattering optics [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216, 44: 7461-7465

[5] Robillard G T, Dijk A A V, Boef E, et al. Size and shape of the repetitive domain of high molecular weight wheat gluten proteins. I [J]. Small-Angle Neutron Scattering, 2003, 69: 311-324

[6] Zhao L, Li L, Liu G Q, et al. Effect of freeze-thaw cycles on the molecular weight and size distribution of gluten [J]. Food Research International, 2013, 53 (1): 409-416

[7] Schmidt P W. Small-angle scattering studies of disordered, porous and fractal systems [J]. Journal of Applied Crystallography, 1991, 24 (5): 414-435

[8] Neves S, Polo Fonseca C. Determination of fractal dimension of polyaniline composites by SAXS and electrochemical techniques [J]. Electrochemistry Communications, 2001, 3, (1): 36-43

[9] Jin K S, Kim D Y, Rho Y, et al. Solution structures of RseA and its complex with RseB [J]. Journal of Synchrotron Radiation, 2008, 15 (3): 219-222

[10] Kathuria S V, Kayatekin C, Barrea R, et al. Microsecond barrier-limited chain collapse observed by Time-Resolved FRET and SAXS [J]. Journal of Molecular Biology, 2014, 426 (9): 1980-1994

[11] Ribotta P, León A, Anon M. Effect of freezing and frozen storage of doughs on bread quality [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49 (2): 913-918

[12] Zounis S, Quail K, Wootton M, et al. Studying frozen dough structure using low-temperature scanning electron microscopy [J]. Journal of Cereal Science, 2002, 35, (2): 135-147

[13] Zhao L, Li L, Liu G Q, et al. Effect of frozen storage on molecular weight, size distribution and conformation of gluten by SAXS and SEC-MALLS [J]. Molecules, 2012, 17 (6): 7169-7182

[14] Schaefer D W, Keefer K D. Structure of random porous materials: silica aerogel [J]. Physical Review Letters, 1986,

现代食品科技