

# 小麦面筋蛋白分子聚集态对脱酰胺程度的影响

廖兰<sup>1</sup>, 韩雪跃<sup>1</sup>, 李章发<sup>1</sup>, 赵谋明<sup>2</sup>

(1. 福州大学生物科学与工程学院, 福建福州 350108) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广州广东 510640)

**摘要:** 本研究以从稀到浓的小麦面筋蛋白溶液为对象, 对其进行湿热脱酰胺处理, 分析了湿热脱酰胺改性过程中当蛋白浓度从极稀到亚浓变化时, 小麦面筋蛋白分子结构和聚集态变化对脱酰胺程度的影响。实验结果表明: 小麦面筋蛋白脱酰胺程度、水解度和 Zeta 电位随着蛋白原始聚集态的增大而显著降低, 且脱酰胺程度和水解度随小麦面筋蛋白原始聚集态变化呈现线性相关性。小麦面筋蛋白分子内作用力随着蛋白原始聚集态的增强而显著增大, 红移程度则减小。小麦面筋蛋白分子内部非共价键包括疏水键和氢键在蛋白分子中起主导作用, 二硫键作用微小。以上结果说明小麦面筋蛋白聚集形态与湿热有机弱酸脱酰胺速率具有较强的相互关系, 蛋白原始的聚集形态是决定分子结构伸展程度和脱酰胺改变趋势的最重要因素。

**关键词:** 小麦面筋蛋白; 脱酰胺改性; 聚集态; 浓度

文章编号: 1673-9078(2015)10-80-85

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.014

## Effect of the Aggregation State of Wheat Gluten on the Degree of Deamidation as a Function of Concentration

LIAO Lan<sup>1</sup>, HAN Xue-yue<sup>1</sup>, LI Zhang-fa<sup>1</sup>, ZHAO Mou-ming<sup>2</sup>

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract** A series of diluted and concentrated wheat gluten solutions were used in this experiment to carry out deamidation under moist heat. During the moist-heat-induced denaturation, the effect of molecular structure and aggregation state of wheat gluten on the degree of deamidation was analyzed. The results showed that the degree of deamidation, degree of hydrolysis, and zeta potential significantly decreased with increasing aggregation of native wheat gluten. Additionally, both degree of deamidation and hydrolysis had a good linear relationship with the changes in the aggregation state of wheat gluten. The intermolecular force of wheat gluten significantly increased with increasing aggregation of native wheat gluten, and the red shift became smaller. The intermolecular noncovalent bonds, including hydrogen bonding and hydrophobic interaction, were the main molecular forces for the aggregated wheat gluten; disulfide bonds had a minimal effect. These results demonstrated that the aggregation state of native wheat gluten is closely related to the rate of wheat gluten deamidation via moist heat treatment using food-grade organic acid. The aggregation state of native wheat gluten is the most important factor for the unfolding degree of protein molecules and aggregation trends of wheat gluten.

**Key words:** wheat gluten; deamidation; aggregation state; concentration

有机酸脱酰胺是脱酰胺改性蛋白质中较为新的方法之一<sup>[1-2]</sup>, 也是近年本领域的研究热点。其原理是在湿热条件下利用有机酸缓慢释放出的 H<sup>+</sup>催化蛋白质中酰胺基转化为羧基<sup>[3]</sup>, 增多了蛋白表面负电荷, 增强了蛋白静电排斥力, 减少了蛋白内氢键, 伸展了蛋白分子空间结构, 进而对其进行分子修饰和适度变性, 改变其功能特性。有效的脱酰胺改性可改变谷物蛋白分子结构和改善功能特性, 拓宽其在蛋白饮料、

收稿日期: 2014-10-30

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目资助 (31201287)

作者简介: 廖兰 (1982-), 女, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 食品生物技术

风味增强剂等食品领域中的应用范围。目前, 国内外研究蛋白脱酰胺改性的酸原料仍局限于盐酸, 仍存在肽键水解程度难控制、部分氨基酸异构化、氯丙醇的产生以及蛋白部分功能特性缺失等难以解决的问题。可食性有机弱酸, 如醋酸、琥珀酸、柠檬酸等, 含有 -COOH 可电离出 H<sup>+</sup>, 且作为酸味调节剂广泛使用于食品加工中, 在食品加工中不可避免会对食品蛋白进行脱酰胺改性。特别是有机酸脱酰胺改性的小麦面筋蛋白对肠胃抗醇溶免疫球蛋白抗体的免疫活性方面研究已逐渐引起学术界重视, 并取得了突破性的进展。酰胺基团与 H<sup>+</sup>接触能力与影响因素是研究脱酰胺改性蛋白的关键。蛋白中酰胺基团的暴露程度是影响其

与 H<sup>+</sup>接触的最直接因素,而蛋白质的结构特性和聚集态则是影响蛋白酰胺基团的暴露程度的重要因素。对于原始小麦面筋蛋白,当它与水接触时,快速形成的网络状结构<sup>[4]</sup>。从分子微观的层面来看,该网络状结构形成包括分子内部和分子间巯基和二硫键相互变化,以及蛋白质分子与水分子形成大量氢键的过程,所以,该网络状形成是一典型的分子聚集过程。本研究以具有典型分子结构特征的小麦面筋蛋白为研究对象,控制其蛋白溶液从稀到浓变化,用以调控蛋白分子间间距和原始分子聚集态,研究原始小麦面筋蛋白聚集形态与湿热有机弱酸脱酰胺速率相互关系,系统地揭示食品加工中有机酸脱酰胺改性的作用意义,以期对以后指导改性小麦面筋蛋白的研究和利用提供理论指导。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与设备

小麦面筋蛋白:购于河南莲花集团,质量分数为 79.95% (干基)蛋白。设备:电动搅拌机 (AM300S-P, 上海昂尼仪器仪表有限公司, 中国); 高速冷冻离心机 (TGL-20MB, 长沙湘智离心机有限公司, 中国); 电泳仪 (DYCZ-24DN, 北京六一仪器厂, 中国); pH 计 (PHS-3C, 上海仪电科学仪器股份有限公司, 中国); 氨氮分析仪 (DWS-296, 上海精科有限公司, 中国); 激光粒度分布测定仪 (Zetasizer Nano ZSP, 马尔文仪器有限公司, 英国); 荧光分光光度计 (FluoroMax-4, HORIBA Jobin Yvon, 法国); 实验所用化学试剂均为分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 脱酰胺过程<sup>[5]</sup>

配置含柠檬酸 (0.04 mol/L) 的小麦面筋蛋白 (质量分数 10%) 悬浮液, 常温水化 8 h 后, 9,000 r/min、4 °C 下离心 10 min, 收集上清液, 并将其逐步稀释配置成从浓到稀的四种浓度 (10 mg/mL、1 mg/mL、0.1 mg/mL、0.01 mg/mL), 后放入杀菌锅 (121 °C) 加热 10 min (待杀菌锅预热到 100 °C 时放入样品, 处理完毕后快速放气取出), 于冰浴中快速冷却, 后 9,000 ×g、4 °C 下离心 10 min 得上清液。得到的上清液于 -4 °C 透析 24 h 除去盐离子后, 冷冻干燥, 得到样品。其中 0.1 mg/mL、0.01 mg/mL, 为了保护此状态的蛋白聚集态, 准备有效浓度的冻干蛋白样品, 采取低温 (40 °C) 旋转蒸发浓缩样品蛋白溶液, 浓缩至蛋白浓度约 1 mg/mL 时, 结束浓缩后, 再冷冻干燥。

#### 1.2.2 脱酰胺程度的测定

脱酰胺程度表示为样品脱酰胺产生的氨与样品完全脱酰胺产生的氨的百分比。样品脱酰胺产生的氨是通过氨氮分析仪测定在脱酰胺过程中氨的释放量。完全脱酰胺产生的氨是将 1 g 蛋白样品密封于装有 5 mL 6 mol/L 盐酸的安培管中, 于杀菌锅 (121 °C) 湿热处理 90 min 后, 用康散皿测定其氨的释放量。

#### 1.2.3 水解度的测定<sup>[6]</sup>

改性蛋白溶液水解度的测定参考 pH-Stat 法。水解开始时, 调节反应体系的 pH 为 8.0, 在反应过程中用 0.01 mol/L NaOH 调节体系 pH 始终保持在 8.00 ± 0.02。反应结束后, 记录消耗的 NaOH 量。按下式计算蛋白的水解度:

$$DH(\%) = 100(C \times V) / (\alpha \times m \times h)$$

式中: C 为消耗碱液的浓度 (mol/L); V 为消耗碱液的体积 (mL);  $\alpha$  为  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> 的平均解离度; m 为样液中蛋白质量 (g); h 为每克底物蛋白中肽键的毫摩尔数 (mmol)。

#### 1.2.4 Zeta 电位的测定<sup>[7]</sup>

各冻干样品配置成 1 mg/mL 溶液用于进行 Zeta 电位测定。测定前用水滤膜 (450 nm) 过滤除杂。测定条件如下: 比色池规格为 1 cm 聚苯乙烯池, 采用一对 0.45 cm<sup>2</sup> 铂电极, 间距为 0.4 cm。测定温度为 25 °C, 温度平衡时间为 2 min, 测定时取 1 mL 样品液于比色池中。数据测三次取平均值。

#### 1.2.5 凝胶电泳分析 (SDS-PAGE)

配置浓度为 10% 丙烯酰胺分离胶, 浓度为 2.5%、交联度为 2.6% 浓缩胶。配置样品提取液为 0.0625 mol/L Tris-HCl, 5% (体积分数)  $\beta$ -巯基乙醇, 2% (质量分数) SDS, 10% (体积分数) 丙三醇, 0.002% (体积分数) 溴酚蓝, pH 6.8。将不同浓度的冻干样品溶于样品提取液配制成 2 mg/mL 蛋白溶液。电泳上样量为 15  $\mu$ L, 开始电泳时电流为 40 mA, 待样品进入分离胶后改为 80 mA, 当染料前沿距橡胶框底边 1.5 cm 时, 停止电泳, 用考马斯亮兰 R250 染色 2 h 后, 脱色 2 h<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.6 分子力作用的测定<sup>[9]</sup>

通过测量样品蛋白在不同还原性溶剂的溶解性差异间接对改性前后小麦面筋蛋白的分子力变化进行测定。所用的还原溶剂包括: 0.05 mol/L, pH 4.4 的 PBS(S1); 0.05 mol/L, pH 4.4 含 1% (m/V) SDS 的磷酸盐缓冲液 (PBS)(S2); 0.05 mol/L, pH 4.4 含 6 mol/L 尿素 (urea) 的 PBS(S3); 0.05 mol/L, pH 4.4 含 2% (V/V)  $\beta$ -巯基乙醇的 PBS(S4); 0.05 mol/L, pH 4.4 含 1% (m/V) SDS 和 2% (V/V)  $\beta$ -巯基乙醇的 PBS(S5); 0.05 mol/L, pH 4.4 含 1% (m/V) SDS 和 6 mol/L urea 的 PBS (S6)。

将 2 mg/mL 的蛋白样品分别加到 5 mL 的上述溶剂中, 室温下用磁力搅拌器搅拌 2 h。S4 同 S5 搅拌前于 100 °C 水浴 20 min。此后, 全部样品于 10,000×g 离心 20 min。取 4 mL 的上清液加 20% (m/V) TCA 至最后浓度为 10%。样品于 0~3 °C 保存 18 h, 然后再于 10,000×g 离心 20 min。将沉淀用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶解。溶解蛋白含量的测定用双缩尿法。溶解度以 0.5 mol/L 的 NaOH 提取的蛋白百分比表示。

### 1.2.7 内源性荧光扫描<sup>[10]</sup>

用 0.01 mol/L pH 4.4 的磷酸盐缓冲液配置以下测定样品(0.2 mg/mL, 30 mL), 分别为: 未经任何处理的原始小麦面筋蛋白和四个浓度分为 0.01 mg/mL、0.1 mg/mL、1 mg/mL、10 mg/mL 的改性小麦面筋蛋白。荧光分光光度计测定条件为: 激发波长为 295 nm, 发射与激发狭缝宽均为 5 nm, PMT Voltage 为 500 V, 在 300~400 nm 波长范围内记录发射光谱。荧光发射光谱的背景散射用缓冲溶液校正。

### 1.2.8 数据处理

所有实验均进行平行实验, 重复 2~3 次; 样品的测定均重复 3~5 次, 结果应用 SPSS(version13.0)软件中 LSD 多维分析法进行方差和显著性分析 ( $p < 0.05$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 小麦面筋蛋白原始聚集态对改性脱酰胺

程度的影响

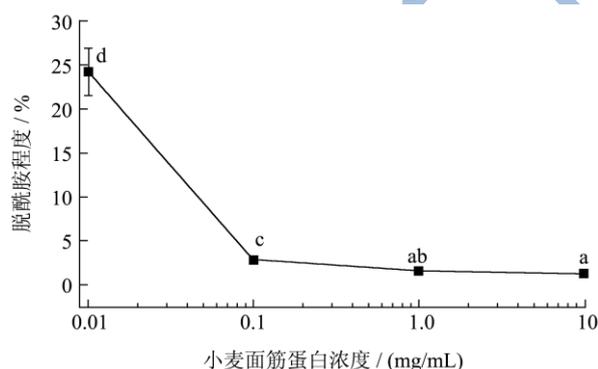


图1 浓度对湿热脱酰胺处理过程中小麦面筋蛋白脱酰胺程度的影响

Fig.1 Effect of wheat gluten concentration on the degree of deamidation by moist heat treatment

注: 图中标注不同字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

由图 1 可知湿热条件下小麦面筋蛋白原始聚集态对其脱酰胺程度影响显著, 小麦面筋蛋白脱酰胺程度随着蛋白浓度的增大而显著降低 ( $p < 0.05$ )。当蛋白浓度为 10 mg/mL 时, 其脱酰胺程度为 1.26%, 而当蛋

白浓度为 0.01 mg/mL 时, 其脱酰胺程度明显高于其他样品的脱酰胺程度, 至 24.25%, 是前者的 19 倍。Schih<sup>[11]</sup>指出在酸性条件下, 脱酰胺程度与 H<sup>+</sup>和隐藏在蛋白内部的谷氨酰胺和天冬酰胺残基接触机会有关。因此, 由以上结果可以推断得知, 当小麦面筋蛋白溶液为 10 mg/mL 和 1 mg/mL 较高浓度时, 蛋白分子内部巯基和二硫键相互作用较强, 发生了一定程度的交缠聚集, 因而与水分子形成氢键较少, 蛋白分子结构伸展程度较小, 导致柠檬酸在溶液体系中释放的 H<sup>+</sup>不易与蛋白分子中的谷氨酰胺和天冬酰胺残基接触产生脱酰胺作用。当蛋白浓度为 0.1 mg/mL 时, 由于此时蛋白浓度不高, 随着浓度降低分子间距逐渐增大, 蛋白分子间/内相互作用得到减弱, 蛋白分子与水分子之间的作用增强, 原始蛋白的聚集程度减小, 蛋白分子在溶液体系中能够更好的展开, 从柠檬酸电离出的 H<sup>+</sup>可以与蛋白分子中的 Asn 和 Glu 残基更好的接触, 因此脱酰胺程度增加。当小麦面筋蛋白浓度为 0.01 mg/mL 时, 此时随着浓度降低分子间距进一步增大, 蛋白分子间或分子内相互作用力显著减小, 在水溶液中可以较好地展开, 暴露出了更多的酰胺残基与 H<sup>+</sup>接触, 因此, 蛋白脱酰胺程度显著增加。值得讨论的是, 当蛋白浓度为 0.01 mg/mL 时, 虽然其脱酰胺程度达到 24%, 但脱酰胺程度并不是很高, 可能有两种原因: 此时蛋白分子间的作用力以疏水相互作用占主导, 也有可能是当量体积氢离子浓度最低, 故小麦面筋蛋白的脱酰胺程度并未达到 100%。

### 2.2 小麦面筋蛋白原始聚集态对其水解度的影响

影响

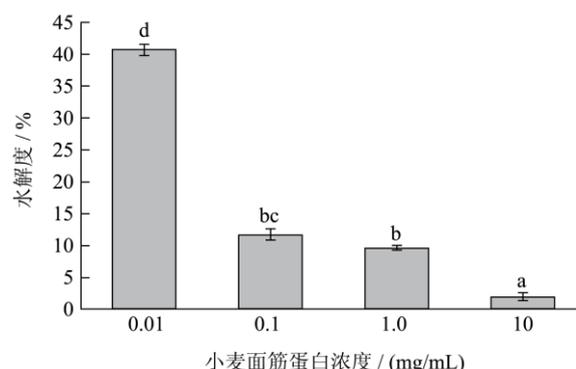


图2 浓度对湿热脱酰胺处理过程中小麦面筋蛋白水解度的影响

Fig.2 Effect of wheat gluten concentration on the degree of hydrolysis during deamidation by moist heat treatment

注: 图中标注不同字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

由图 2 可以看到, 在湿热脱酰胺的过程中, 小麦

面筋蛋白分子发生了水解。当小麦面筋蛋白的浓度由 0.01 mg/mL 增大至 10 mg/mL 时, 其水解度则逐渐从 40.64% 降低到 1.99%。通过分析改性过程中脱酰胺程度和水解度的相关性, 得到  $R^2=0.96$ 。以上结果说明小麦面筋蛋白原始聚集态显著影响了分子结构展开程度和酰胺基团暴露程度, 进而影响了小麦面筋蛋白在脱酰胺改性过程中脱酰胺能力。前人的研究<sup>[12]</sup>以及本课题组前期的研究<sup>[13-14]</sup>发现当盐酸等无机强酸遇水后立刻电离成活性强大的  $H^+$ , 立刻参与催化肽键的断裂反应, 在湿热改性中, 直接导致了蛋白水解, 其脱酰胺反应是伴随效应。通过挑选不同的有机酸作为研究对象, 结合根据 Shih<sup>[15]</sup>和 Kato<sup>[16]</sup>报道来自于有机羧酸的  $H^+$ , 因羧基电离出  $COO^-$  阴离子基团结合于蛋白带正电酰胺基团减小了整个酰胺基团与  $H^+$  离子结合的静电斥力, 本课题组前期研究发现有机酸脱酰胺作用更专一, 能较好地对蛋白侧链酰胺基团进行脱酰胺改性, 对肽键水解作用微弱。相关蛋白构效关系的研究报道, 但凡涉及水解度, 均推理认为是分子肽链减小主导了分子官能团改变的趋势, 是蛋白功能特性改变的主导因素之一。通过以上两组实验, 证明了小麦面筋蛋白聚集形态与湿热有机弱酸脱酰胺速率具有较强的相互关系, 也证明了在此条件下, 蛋白原始的聚集形态才是决定分子结构伸展程度和脱酰胺改变趋势的最重要因素。

### 2.3 小麦面筋蛋白原始聚集态对其 Zeta 电位的影响

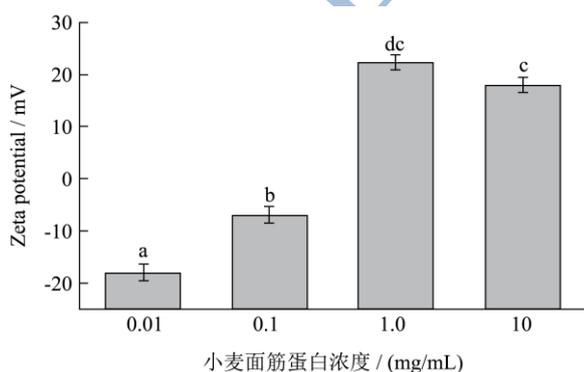


图3 浓度对改性小麦面筋蛋白 Zeta 电位的影响  
**Fig.3 Effect of wheat gluten concentration on Zeta potential of modified wheat gluten**

注: 图中标注不同字母表示差异显著 ( $p<0.05$ )。

如图3所示, 蛋白分子的表面电荷随着蛋白浓度的增加大致呈现上升的趋势。当蛋白浓度为 0.01 mg/mL 和 0.1 mg/mL 时, 体系蛋白分子的表面电荷为负电荷, 而当蛋白浓度为 1 mg/mL 和 10 mg/mL 时,

小麦面筋蛋白分子的表面所带电荷为正电荷。这是由于当蛋白浓度为 0.01 mg/mL 时, 其脱酰胺程度较高, 体系蛋白大量的天冬氨酸残基和谷氨酰胺残基中的酰胺基转变羧基。而当蛋白浓度为 1 mg/mL 和 10 mg/mL 时, 虽然此时蛋白分子经过柠檬酸湿热脱酰胺处理, 由于蛋白溶液浓度较高, 原始蛋白分子间相互作用力强, 到交缠在一起而聚集程度较高, 酰胺基团暴露程度低, 其脱酰胺程度也就较低, 产生的负电荷也较少。同时, 在蛋白脱酰胺的过程中, 会伴随着羧基质子化过程, 故使蛋白浓度为 1 mg/mL 和 10 mg/mL 的蛋白分子的表面电荷为正电荷。而蛋白浓度为 1 mg/mL 时的蛋白分子表面所带正电荷高于 10 mg/mL 浓度的蛋白分子表面所带正电荷, 但差距并不显著, 可能是因为这两种浓度的脱酰胺程度接近 (图1), 当蛋白浓度为 1 mg/mL 时羧基质子化的作用强于 10 mg/mL 的蛋白溶液中的羧基质子化作用, 因此导致 1 mg/mL 蛋白分子表面所带正电荷最高。该结果说明, 原始蛋白聚集态直接影响了蛋白中  $COOH$ -含量, 进一步验证了小麦面筋蛋白原始聚集态显著影响了分子结构展开程度和酰胺基团暴露程度, 进而影响了酰胺基团与  $H^+$  接触能力。

### 2.4 小麦面筋蛋白原始聚集态对其亚基条带分布的影响

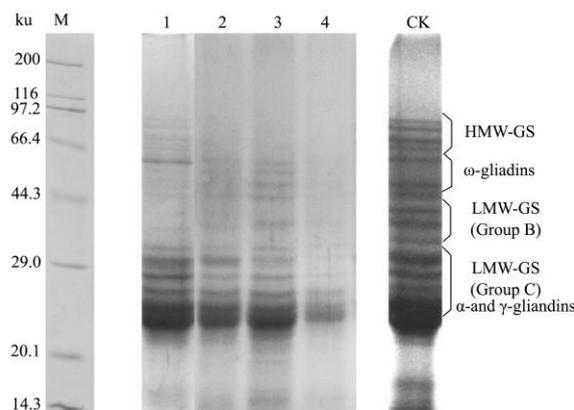


图4 浓度对改性小麦面筋蛋白凝胶电泳图谱

**Fig.4 Effect of wheat gluten concentration on SDS-PAGE; results of modified wheat gluten**

注: 相同热处理, 不同浓度的湿热脱酰胺的小麦面筋蛋白还原电泳图 (M: 标准蛋白; CK: 未经湿热处理的原始小麦面筋蛋白; 条带 1:10 mg/mL 预脱酰胺改性小麦面筋蛋白; 条带 2: 1 mg/mL 预脱酰胺改性小麦面筋蛋白; 条带 3: 0.1 mg/mL 预脱酰胺改性小麦面筋蛋白; 条带 4: 0.01 mg/mL 预脱酰胺改性小麦面筋蛋白)。

小麦面筋蛋白主要是由麦醇溶蛋白和麦谷蛋白

组成, 含量约占小麦面筋蛋白总量 90%, 其谱带归属见图 4 中 CK 样品条带右侧标注所示。麦谷蛋白是多链三维网络状蛋白, 属于非均质的大分子聚合物, 相对分子量大, 一般为 40 ku~300 ku, 由 17~20 种不同的多肽亚基组成。其亚基分为高分子量谷蛋白亚基 (HMW-GS) 和低分子量谷蛋白亚基 (LMW-GS)。在 SDS-PAGE 中, HMW-GS 的分子量约为 90~147 ku。LMW-GS 分子量大约为 34~54 ku, 并根据迁移率可分为 B、C、D 三个部分。麦醇溶蛋白是单体蛋白, 其分子量较小约为 30~80 ku。在 SDS-PAGE 中, 根据迁移率可将醇溶蛋白分成  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\omega$  四种类型, 其分别占醇溶蛋白总量的 25%、30%、30% 和 15%<sup>[17]</sup>。从图 4 中可以看出, 湿热条件下小麦面筋蛋白原始聚集态显著影响高分子麦谷蛋白和低分子麦谷蛋白 B、C 组分, 以及  $\omega$ -醇溶蛋白亚基条带的变化, 并且除 0.1 mg/mL 的样品外, 随浓度从浓到稀基本逐渐消失。该结果基本验证了图一和二的研究结论原始蛋白聚集态显著影响其脱酰胺程度和水解程度, 说明随着浓度的减小, 改性后蛋白分子羧基含量增加, 蛋白分子结构展开, 溶液体系柠檬酸电离出的氢离子和蛋白分子中的肽键接触机会增多, 蛋白分子发生水解几率增大。值得注意的是 1 mg/mL 和 0.1 mg/mL 的 60 ku~70 ku 分子量范围内出现了新的亚基条带, 特别是 1 mg/mL 较为明显, 说明可能经过柠檬酸湿热脱酰胺改性后, 脱酰胺和水解产生的小分子肽段重新聚集形成了新的聚集体。该聚集体可能是高分子量的麦谷蛋白亚基弱解离成该分子量蛋白亚基相互聚集, 也有可能是小麦面筋的蛋白中的醇溶蛋白与低分子量麦谷蛋白亚基经过分子间作用力, 聚集形成了该分子量的蛋白亚基。Schofield 等<sup>[17]</sup>指出小麦面筋蛋白在一定温度处理时其分子量将向高分子量转移, 特别是当处理温度为 75 °C 以上时麦谷蛋白和醇溶的蛋白分子将相互或者各自发生交联反应。而此次脱酰胺的处理温度为 121 °C, 会使蛋白分子内氢键和二硫键发生重排, 使蛋白分子重新聚集在一起。

### 2.5 小麦面筋蛋白原始聚集态对其内部分子力作用的影响

如图 5 所示, 有如下发现: (1) 随着浓度的增大, 蛋白质分子间作用力不断增大, 说明小麦面筋蛋白随浓度其聚集程度增加而增大, 通过浓度变化条件其聚集程度可行有效; (2) 对同一浓度的蛋白, 大致变化趋势如下: SDS and Urea(S6)>SDS(S2)>Urea(S3)> ME (S4)>PBS(S1)>SDS and ME(S5), 该结果说明经柠檬酸

湿热脱酰胺后小麦面筋蛋白分子内和分子间的分子间作用力以氢键和疏水键为主; (3) 比较 S2、S3 和 S6, 可以得出经脱酰胺后小麦蛋白分子内部, 疏水键占主导作用; (4) 比较 S4 和 S5, 其打断的是二硫键, 所对应的蛋白浓度比较低, 说明二硫键在脱酰胺后的对维持小麦面筋蛋白分子结构的作用较低, 这可能是因为湿热柠檬酸脱酰胺后分子间/内静电斥力增强, 小麦面筋蛋白分子展开, 疏水性基团暴露出来, 因此疏水相互作用和氢键作用增强。而此次实验是在 121 °C 的高温下进行, 而高温有助于氢键, 使二硫键发生重排, 使其在蛋白分子中作用减弱; (5) 当蛋白浓度为 0.1 mg/mL 和 1 mg/mL 时, 其样品 S2 含量基本相等, 这可能与经柠檬酸湿热脱酰胺后小麦面筋蛋白分子会在浓度为 0.1 mg/mL 时发生聚集有关, 而聚集体中的主要作用力是氢键和疏水键, 这与电泳图电泳条带一致。

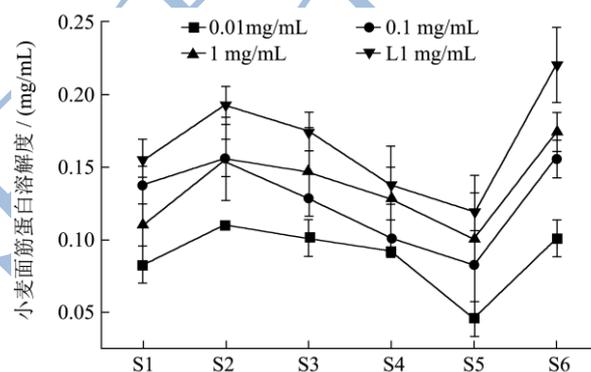


图 5 浓度对改性小麦面筋蛋白分子作用力的影响

Fig.5 Effect of wheat gluten concentration on the intermolecular forces of modified wheat gluten

### 2.6 内源性荧光扫描

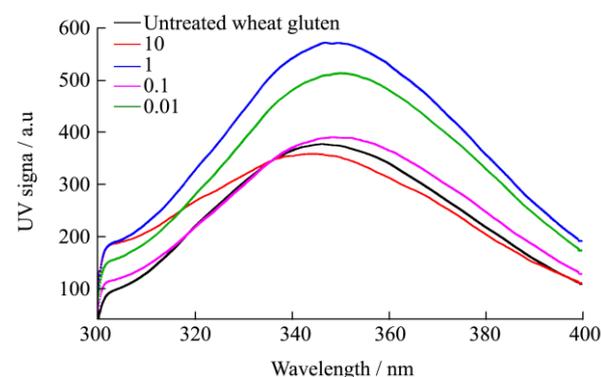


图 6 浓度对改性小麦面筋蛋白内源性荧光扫描图的影响

Fig.6 Effect of wheat gluten concentration on the endogenous fluorescence spectra of modified wheat gluten

从图 6 和表 2 可以看出: (1) 对比未经处理的小麦面筋蛋白, 当蛋白浓度为 10 mg/mL 时, 出峰波长从 346.2 nm 变到 344.6 nm, 荧光光谱发生了蓝移, 说

明在此浓度时色氨酸周围的微环境非极性增强,色氨酸暴露程度减少,蛋白发生较强烈地聚集。这可能有两方面原因:一是因为蛋白分子进行了脱酰胺反应使酰胺基变成了羧基,但因为脱酰胺程度低,故生成的羧基数量少,而此时的蛋白的 Zeta 电位为正电荷,两者之间有较强静电相吸。二、当蛋白浓度为 10 mg/mL 时,原始蛋白分子间发生重叠缠绕,分子间相互作用力较大(图 5),蛋白原始聚集程度较大;(2)当蛋白浓度为 1 mg/mL、0.1 mg/mL 和 0.01 mg/mL 时,蛋白分子的荧光光谱发生了明显红移,从表 2 中可以看到,蛋白浓度为 0.1 mg/mL 的蛋白分子的荧光光谱红移程度低于 1 mg/mL,这个可能是因为在蛋白浓度为 0.1mg/mL 时,蛋白分子间又发生了聚集,致使色氨酸残基暴露减少,这与蛋白还原电泳图中的条带相对应;(3)蛋白浓度为 0.01 mg/mL 时,其蛋白分子的荧光光谱红移程度最高,这与其脱酰胺程度最高有关。

表 1 浓度对改性小麦面筋蛋白内源性荧光扫描峰值和峰高的影响

Table 1 Effect of wheat gluten concentration on emission maximum and peak height of modified wheat gluten

样品	出峰处/nm	峰高
原始小麦面筋蛋白	346.2	378.2
10 mg/mL	344.6	359.3
1 mg/mL	349.7	572.8
0.1 mg/mL	348.2	391.9
0.01 mg/mL	350.0	514.9

### 3 结论

本文通过调节小麦面筋蛋白原始浓度(蛋白浓度从极稀到亚浓变化)调控其聚集程度,研究了在柠檬酸湿热脱酰胺处理 10 min 后,小麦面筋蛋白的分子结构及聚集行为的变化,主要有以下结论:小麦面筋蛋白原始聚集态显著影响其脱酰胺程度、水解度、Zeta 电位(负电荷)、分子内作用力和蛋白三级结构,小麦面筋蛋白脱酰胺程度、水解度和 Zeta 电位(负电荷)随着蛋白原始聚集态的增大而显著降低,且脱酰胺程度和水解度随小麦面筋蛋白原始聚集态变化呈现线性相关性。小麦面筋蛋白分子内作用力随着蛋白原始聚集态的增强而显著增大,红移程度则减小。小麦面筋蛋白分子内部非共价键包括疏水键和氢键在蛋白分子中起主导作用,二硫键作用微小。以上结果说明小麦面筋蛋白聚集形态与湿热有机弱酸脱酰胺速率具有较强的相互关系,蛋白原始的聚集形态才是决定分子结构伸展程度和脱酰胺改变趋势的最重要因素。

### 参考文献

- [1] Day L, Augustin MA, Batey IL, et al. Wheat gluten uses and industry needs [J]. Trends Food Science Technology, 2006, 17: 82-90
- [2] Wong HW, Choi SM, Phillips DL, et al. Raman spectroscopic study of deamidated food proteins [J]. Food Chemistry, 2009, 113: 362-370
- [3] Belton P S. On the elasticity of wheat gluten [J]. Journal of Cereal Science, 1999, 29(2): 103-107
- [4] CHAN WM, MA CY. Acid modification of proteins from soymilk residue (okara) [J]. Food Research International, 1999, 32(2): 119-127
- [5] LIAO, L, LIU TX, ZHAO MM, et al. Functional, nutritional and conformational changes from deamidation of wheat gluten with succinic acid and citric acid [J]. Food Chemistry, 2010, 123: 123-130
- [6] Paraman I, Hettiarachchy NS, Schaefer C. Glycosylation and deamidation of rice endosperm protein for improved solubility and emulsifying properties [J]. Cereal Chemistry, 2007, 84(6): 593-599
- [7] Chen L, Subirade M. Elaboration and characterization of soy/zein protein microspheres for controlled nutraceutical delivery [J]. Biomacromolecules, 2009, 10(12): 3327-3334
- [8] Islas-Rubio AR, Singh H, Chittrakorn S, et al. Stability of wheat proteins in solution [J]. Journal Cereal Science, 2006, 43: 169-174
- [9] Roussel H, Cheftel JC. Mechanisms of gelation of sardine proteins: influence of thermal processing and of various additives on the texture and protein solubility of kamaboko gels [J]. International Journal of Food Science & Technology, 1990, 25(3): 260-280
- [10] WU HH, LIU ZY, ZHAO YH, et al. Enzymatic preparation and characterization of iron-chelating peptides from anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle protein [J]. Food Research International, 2012, 48: 435-441
- [11] Shih FF. Modification of food proteins by non-enzymatic methods [M]. Ch. 7 in Biochemistry of Food Proteins, ed, by Hudson B J F, Elsevier Applied Science, London pp. 235-248(1992)
- [12] Wright HT, Urry DW. Nonenzymatic deamidation of asparaginylyl and glutaminyl residues in proteins [J]. Critic Review on Biochemistry and Molecular Biology, 1991, 26: 41-52

- [13] LIAO L, LIU TX, ZHAO MM, et al. Aggregation behavior of wheat gluten during carboxylic acid deamidation upon hydrothermal treatment [J]. *Journal of Cereal Science*, 2011, 54: 129-136
- [14] LIAO L, ZHAO MM, REN JY, et al. Effect of acetic acid deamidation-induced modification in functional and nutritional properties and conformation of wheat gluten [J]. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 2010, 90: 409-417
- [15] Shih FF, Kalmar A.D. SDS-catalyzed deamidation of oilseed proteins [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1987, 35(5): 671-675
- [16] Kato A, Tanaka A, Matsudomi N, et al. Deamidation of food proteins by protease in alkaline pH [J]. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry*, 1987, 35(2): 224-227
- [17] Schofield JD, Bottomley RC, Timms MF, et al. The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphhydryl-disulphide interchange reactions [J]. *Journal of Cereal Science*. 1983, 1(4): 241-253
- [18] LIAO L, ZHAO MM, REN JY, et al. Effect of acetic acid deamidation-induced modification in functional and nutritional properties and conformation of wheat gluten [J]. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*, 2009, 90: 409-417