文章编号：1000-5773(2013)04-0609-07

高压处理对大米蛋白溶解性及分子结构特征的影响*

王章存，田卫环，崔胜文，赵学伟，郑坚强，李昌文，袁道强

（郑州轻工业学院食品与生物工程学院，河南郑州 450002）

摘要：研究了在 pH 值均为 8.0 的两种溶剂（溶剂 A：氢氧化钠溶液，溶剂 B：6 mol/L 尿素＋1％巯基乙醇（ME）水溶液）条件下，100～500 MPa、10～30 min 的高压处理对热变性大米蛋白溶解性和分子特征的影响。结果表明，溶剂 B 条件下，高压处理可以显著提高大米蛋白的溶解性能，其中 100 MPa 处理 20 min 时，效果最明显，蛋白质溶解性由常压时的 6.89％增加到 18.13％；而相同压力条件下，溶剂 A 中蛋白质溶解性仅由常压时的 4.37％增加到 9.60％。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析表明：高压处理前、后，溶剂 A 条件下可溶性蛋白的亚基组成基本相同，沉淀部分也有类似现象；溶剂 B 条件下，可溶性蛋白的分子亚基比例变化明显。通过扫描电子显微镜（SEM）观察到，高压处理可以改变热变性大米蛋白颗粒的表面结构和聚集状态。

关键词：高压；大米蛋白；溶解性；分子结构；电泳

中图分类号：O521.9 **文献标识码**：A

1 引 言

液态静高压处理具有传压速度快、压力均匀、处理与控制过程较为方便等特点，多年来在天然蛋白质结构[1-3]、食品加工及灭菌方法研究中应用广泛，相应的工业规模设备也日趋成熟[4-5]。大量研究表明：高压处理可以改变蛋白质的高级结构，进而影响其溶解性、发泡性等功能特性[6-7]，在某些压力条件下还会影响蛋白质中—S—S—的存在状态，如发生断裂或重排等[8-11]。高压处理的效果与蛋白质溶液浓度、pH 值、溶剂成分等密切相关，并且经高压处理的蛋白质在常压下重新折叠时，只有极少部分恢复原来的状态[12]。因此，经高压处理后，蛋白质的酶解特性或酶解模式将发生一定的变化，例如：β-乳球蛋白（β-Lg）在常压下可以抵抗胃蛋白酶水解，但是经 200 MPa 以上高压处理后就易被该酶水解[13-14]；卵清蛋白[15-16]和大豆乳清蛋白[17]经不同高压处理后将被胃蛋白酶、胰蛋白酶水解，与未经高压处理情况明显不同。

在以大米为原料的淀粉糖和有机酸发酵工业生产过程中，会产生大量的副产品——大米蛋白（其蛋白质含量在 45％以上）。以我国为例，每年约有 100 万吨大米蛋白产生。由于大米蛋白经历了高温处理，因而其在水中的溶解性很差。很多科研人员尝试通过酶改性方法，改善大米蛋白的溶解、乳化和发泡性能，但到目前为止未取得令人满意的效果。常规的酶解方法只能使这种热变性大米蛋白部分（约 50％）溶解，与其它蛋白质的酶解情况大不一样，其原因尚不清楚。有关这类米蛋白分子组成及结构特征的研究，仅见少量报道[18-19]。

* **收稿日期**：2011-10-23；**修回日期**：2012-05-08

基金项目：国家自然科学基金（31071517）

作者简介：王章存（1963－），男，博士，教授，主要从事蛋白质深加工研究. E-mail：dwzhc@163.com

本工作基于高压对蛋白质结构的影响特点，提出结合高压手段研究大米蛋白酶解规律的新思路，研究不同高压处理条件下大米蛋白的溶解性能及其分子结构的特征变化，为今后大米蛋白酶解规律研究提供必要的理论和技术基础。

2 材料与方法

2.1 实验材料与试剂

大米分离蛋白(其中粗蛋白含量为75.6%)由汉科生物工程公司的大米蛋白粉精制而成；5,5′-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、三羟甲基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、β-巯基乙醇(β-ME)均由Sigma公司生产；N,N,N′,N′-四甲基乙二胺(TEMED)、考马斯亮蓝R250由FLUKA公司生产，丙烯酰胺(Acr)及N,N′-亚甲基双丙烯酰胺(Bis)产自Amresco公司；低分子量标准蛋白(Mr. 14400-97400)由上海生物化学研究所监制。

2.2 实验仪器与设备

实验所用仪器和设备包括：UHP900×2-Z超高压处理装置(包头文天科技有限责任公司)、DYY-7C型电泳仪、DYCZ-24DN型电泳槽(北京六一仪器厂)、JSM-6490LV扫描电子显微镜(日本电子公司)、UV 8100 B紫外-可见分光光度计(北京LabTech仪器有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 高压处理方法

分别采用pH值均为8.0的溶剂A(NaOH水溶液)和溶剂B(6 mol/L尿素+1%(体积分数)β-ME的水溶液)，配制浓度为50 g/L的大米蛋白液各50 mL，装入双层聚乙烯塑料袋中，抽真空密封，得到两种大米蛋白液(样品A和样品B)。将两种大米蛋白液样品置于压力内腔中，控制腔内油温为40 ℃，分别采用不同压力(100～500 MPa，以100 MPa为间隔)和时间(10、20和30 min)处理样品。

2.3.2 蛋白含量及溶解性的测定

取10 mL大米蛋白液离心(1 500 r/min，10 min)，取出上清液，测上清液体积，并采用双缩脲法测定上清液中蛋白质的含量，其与蛋白液中总蛋白含量的比值即为大米蛋白的溶解性。

2.3.3 —SH含量的测定

采用改进的Ellman法[20]，测量—SH含量。

2.3.4 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

采用Leamina电泳系统[21]，进行SDS-PAGE分析。其中，对不溶性的蛋白质沉淀物先用pH值为12的NaOH溶液溶解，在30 ℃水浴中保温0.5 h，再用还原性样品缓冲液处理。电泳条件：浓缩胶浓度为5%，分离胶浓度为12%；稳压电泳；初始电压为80 V，当电泳前沿进入分离胶时改用110 V。采用低分子量的标准蛋白(Mr. 14400-97400)，电泳结束后用考马斯亮蓝R250染色。电泳结果用BandScan软件处理。

2.3.5 扫描电镜(SEM)分析

将经高压及未经高压处理的大米蛋白液干燥，经离子溅射喷金后，进行SEM分析。

3 结果与讨论

3.1 不同压力条件对大米蛋白溶解性的影响

两种大米蛋白液(样品A和样品B)经不同高压条件处理后的溶解性能测定结果如图1所示。可以看出：在常压条件下，溶剂A只能使4.37%的大米蛋白溶解，而溶剂B则可溶解6.89%的大米蛋白，比溶剂A提高50%以上，说明溶剂B中的β-ME和尿素改变了热变性大米蛋白的结构，可能涉及蛋白质—S—S—的断裂及其网络结构的破坏。与常压条件相比，经高压处理后的两种大米蛋白液，其大米蛋白溶解性能均有提高，且溶剂B中高压处理的增溶效果显著，例如：经100 MPa处理20 min后，溶剂B

中的蛋白溶解性由常压时的 6.89%增加到 18.13%;而溶剂 A 中蛋白质溶解性增加相对较少,由常压时的 4.37%增加到 9.60%,说明高压处理改善蛋白质溶解性的效果与蛋白质所在溶液的性质有关,与文献[11]中的报道一致。其原因可能是,在溶剂 B 条件下,大米蛋白更易伸展,—S—S—暴露更多,从而对高压处理更敏感,另外其间也许还发生二硫键的断裂、被 β-ME 还原等。

从图 1 还可以看出,在保压时间相同的条件下,提高压力并未使蛋白质的溶解性能持续增加,例如:保压 20 min 时,100 MPa 处理的两种样品的蛋白质溶解性最大,增加压力后,蛋白溶解性呈先下降后上升的趋势,其间可能发生二硫键存在状态的变化以及蛋白质颗粒的聚集、解聚现象,影响蛋白质的溶解性能。样品 A 上清液中游离—SH 含量的测定结果(见表 1,其中因溶剂 B 中含有 β-ME,因此未测定样品 B 中游离—SH 的含量)也支持这种推断。另外,在相同压力条件下,保压时间对大米蛋白溶解性能的影响也未呈现单调增加的趋势。在对小麦面筋蛋白[8]、大豆球蛋白[7,9,12]及 β-乳球蛋白[17]的研究中,也出现类似现象。相关机制有待于进一步研究。

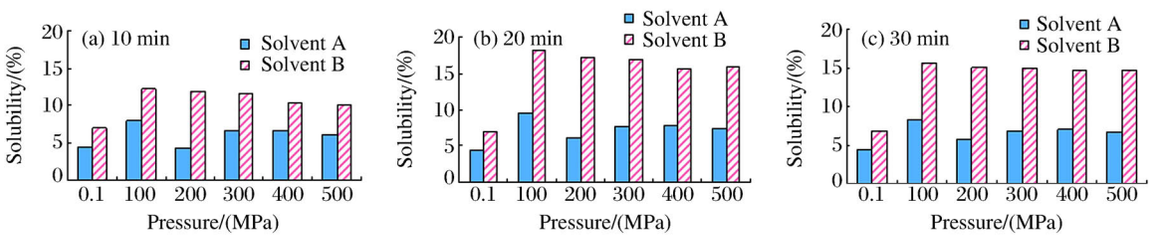


图 1　不同压力条件下大米蛋白的溶解性比较

Fig. 1　Solubility of rice protein under different pressure conditions

表 1　不同压力处理后可溶性蛋白中游离—SH 的含量

Table 1　Free —SH contents in soluble protein after different high-pressure processing

Pressure/(MPa)	—SH content/(μmol/g)	Pressure/(MPa)	—SH content/(μmol/g)
0.1	3.95	300	4.78
100	5.34	400	4.85
200	3.89	500	4.59

3.2　SDS-PAGE 图谱

对经不同高压条件处理的样品 A,用 SDS-PAGE 分析可溶性和不溶性(离心后的沉淀部分)蛋白质的亚基组成,结果如图 2、图 3 所示。

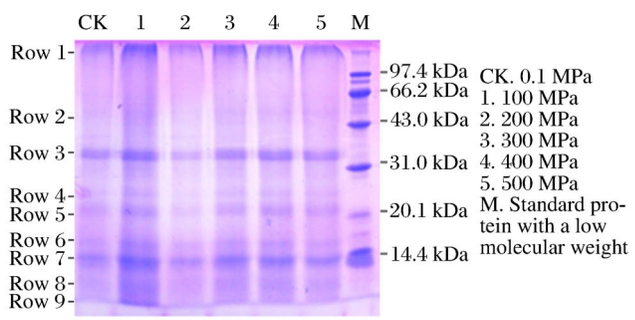


图 2　溶剂 A 中可溶性大米蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2　SDS-PAGE of soluble protein in solvent A

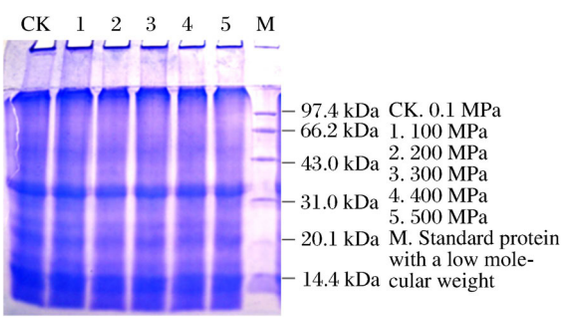


图 3　溶剂 A 中沉淀部分大米蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3　SDS-PAGE of insoluble protein in solvent A

从图 2 可以看出，高压处理后样品 A 可溶性部分的蛋白质亚基组成基本相同，包括含量较高的 12 kDa、33 kDa 以及含量较低的 21 kDa、16 kDa、10 kDa、23 kDa 和 57 kDa，与未经高压处理样品相比，未显示明显差异。由 BandScan 软件分析(见表 2)可知，对于不同压力处理的样品，其相同分子质量亚基的相对含量明显不同，且变化趋势与图 1 中的结果吻合，反映了不同压力条件影响蛋白溶解性能的效果。

图 3 显示出样品 A 中不溶性沉淀物的 SDS-PAGE 分析结果。从图 3 中至少可以分辨出 7 条清晰的谱带，按照谱带的相对密度大小，依次为 10～12 kDa、14 kDa、35 kDa、22 kDa、26 kDa、17 kDa、50 kDa，并且经高压处理与未经高压处理样品的亚基组成没有明显差异，只是亚基含量有所不同(BandScan 软件分析，表 2 中未显示)，表明高压处理并没有改变蛋白质的亚基成分，但可能改变其聚集状态，从而影响大米蛋白的溶解性能。

表 2 不同压力处理后样品 A 中不同亚基含量所占比例

Table 2 The proportion of subunit content in sample A after different high-pressure processing

Row	Proportion/(%)					
	0.1 MPa	100 MPa	200 MPa	300 MPa	400 MPa	500 MPa
1	25.3	28.8	31.4	34.8	25.6	24.9
2	2.9	1.4	1.5	1.4	1.8	2.1
3	21.8	19.9	21.3	22.3	32.0	25.0
4	6.6	3.2	1.2	2.1	3.4	2.4
5	12.9	10.9	8.5	8.0	12.1	9.7
6	3.3	2.0	1.6	2.1	4.7	4.1
7	14.6	14.7	25.3	18.1	16.8	16.6
8	1.2	1.2	1.3	2.5	2.5	3.6
9	11.4	17.9	8.0	8.7	1.1	11.6

为了得到蛋白质完整分子的电泳图谱，反复用非还原性样品溶解液(即不含 β-ME)处理样品 A 中的可溶性和不溶性大米蛋白，进行 SDS-PAGE 分析。然而由于蛋白质样品不溶，甚至无法进入电泳的浓缩胶或分离胶，因此无法获得满意的结果。图 3 显示，即使是采用 β-ME 处理过的样品，仍有部分滞留在浓缩胶顶端。因此，对高压处理前、后大米蛋白的分子结构及组成变化，有待于用其它方法进一步研究。

溶剂 B(pH 值 8.0，6 mol/L 尿素＋1%的 β-ME 水溶液)中含有蛋白质的变性剂。高压处理后，样品 B 中可溶性蛋白的 SDS-PAGE 分析结果如图 4 所示。可以看出，高压处理后的谱带颜色普遍加深，而未经高压处理样品的颜色较浅，二者间的差异远比样品 A 的差异大，该现象与图 1 中的溶解性能测定结果一致。

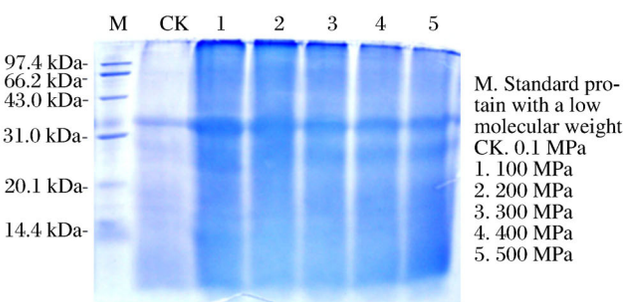


图 4 溶剂 B 中可溶性大米蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 4 SDS-PAGE of soluble protein in solvent B

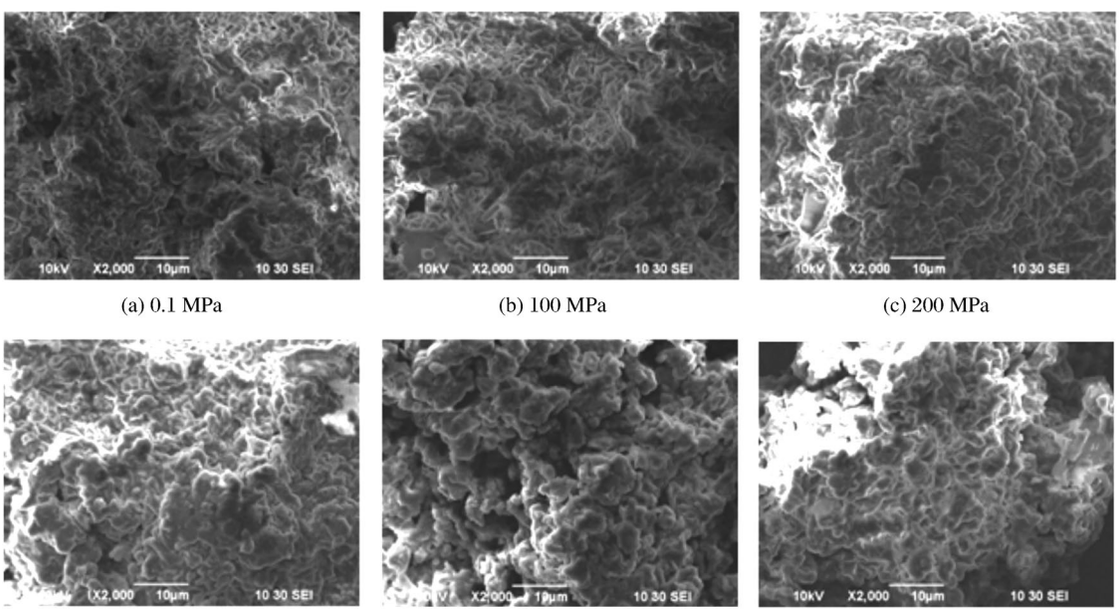
与样品 A 相比，样品 B 经高压处理后的电泳谱带较模糊，即此时亚基大小较连续，表明主谱带间有新的亚基分子存在。这可能是由于溶剂 B 中的尿素和 β-ME 与高压处理产生协同作用，有效改变大米蛋白的分子结构或存在状态，影响其溶解性能[13]。

另外，采用 BandScan 软件分析不同压力处理后各样品中不同亚基的相对含量时发现：随着压力的

增加,小分子亚基的比例发生变化,如 500 MPa 处理后(泳道 5),可溶性小分子亚基的比例明显提高,尤其是 10 kDa 以下的亚基,表明在溶剂 B 条件下高压处理会导致大米蛋白分子的进一步解聚,影响蛋白质的分子结构;但是,500 MPa 处理后的蛋白质溶解性却不如 100 MPa 的高,进一步表明,大米蛋白的溶解性能与其分子大小并不呈对应关系[19]。大米蛋白这种结构的改变可能有利于其酶解,从而为高压处理后大米蛋白的酶解研究提供重要依据。

3.3　SEM 分析

高压对蛋白质的颗粒大小、形状和聚集状态有一定影响。图 5 为不同压力处理 20 min 后大米蛋白的 SEM 图像。可以看出:常压(0.1 MPa)下,大米蛋白表面呈连续的片层结构;100 MPa 处理后,表面变得疏松,且片层结构的连续性有所减弱;200 MPa 时,表面紧密性又有所增强;压力继续增大(300～500 MPa)时,大米蛋白表面开始出现球状小颗粒。这些形态的变化可能与高压时二硫键的断开与重建有一定关系,而与其在水中溶解性能的变化关系尚无法直接推断。不过可以想象,这些形态不一的蛋白质在酶水解时可能表现出不同的特点,这正是我们将要进一步研究的内容。



(a) 0.1 MPa　(b) 100 MPa　(c) 200 MPa

(d) 300 MPa　(e) 400 MPa　(f) 500 MPa

图 5　不同压力处理的大米蛋白 SEM 图像

Fig. 5　SEM images of rice protein treated under different pressures

4　结　论

(1) 热变性大米蛋白在 pH 值均为 8.0 的 NaOH 溶液(溶剂 A)和含有尿素、β-ME 的水溶液(溶剂 B)中的溶解性能明显不同,并且经高压处理后大米蛋白在两种溶剂中的溶解性差异更大,表明高压改善大米蛋白溶解性能的效果与溶解成分有很大关系,尿素、β-ME 与高压处理有一定的协同作用。在相同保压时间条件下,并非压力越高大米蛋白的溶解性越好,压力为 100 MPa 时,溶解效果最明显。

(2) SDS-PAGE 分析表明:当溶剂为 NaOH 溶液(pH 值为 8.0)时,在经高压处理与未经高压处理的大米蛋白可溶性部分中,含有相同的蛋白亚基组成,但亚基含量比例不同,二者的不溶性沉淀物中也有类似现象;当溶剂为含有尿素、β-ME 的水溶液(pH 值为 8.0)时,大米蛋白经高压处理后可溶性部分中小分子亚基的比例发生明显变化,表明此时的大米蛋白分子对高压处理更敏感。通过 SEM 观察发现,高压处理可以改变大米蛋白颗粒的表面结构和聚集状态。

研究结果对借助高压处理研究热变性大米蛋白的酶解规律提供了一定的理论和技术基础。

References:

[1] Boonchai B B, Chan B P, Douglas S C. Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1595(1/2): 235-249.

[2] Marchal S, Torrent J, Masson P, et al. The powerful high pressure tool for protein conformational studies [J]. Braz J Med Biol Res, 2005, 38(8): 1175-1183.

[3] Delgado A, Rauh C, Kowalczyk W, et al. Review of modelling and simulation of high pressure treatment of materials of biological origin [J]. Trends Food Sci Tech, 2008, 19(6): 329-336.

[4] Balny C. What lies in the future of high-pressure bioscience? [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1764(3): 632-639.

[5] Yaldagard M, Mortazavi S A, Tabatabaie F. The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects [J]. Afr J Biotechnol, 2008, 7: 2739-2767.

[6] Lim S Y, Swanson B G, Clark S. High hydrostatic pressure modification of whey protein concentrate for improved functional properties [J]. J Dairy Sci, 2008, 91(4): 1299-1307.

[7] Molina E, Papadopoulou A, Ledward D A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins [J]. Food Hydrocolloid, 2001, 15(3): 263-269.

[8] Kieffer R, Schurer F, Köhler P, et al. Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten: Studies on gluten, gliadin and glutenin [J]. J Cereal Sci, 2007, 45(3): 285-292.

[9] Li B S, Zeng Q X, Peng Z Y, et al. Changes of solubility and rheological property of the isolated soybean protein after high pressure treatment and its mechanism [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 1999, 13(1): 22-29. (in Chinese)
李汴生, 曾庆孝, 彭志英, 等. 高压处理后大豆分离蛋白溶解性和流变特性的变化及其机理 [J]. 高压物理学报, 1999, 13(1): 22-29.

[10] Patel H A, Singh H, Anema S G, et al. Effects of heat and high hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(9): 3409-3420.

[11] Tang C He, Ma C Y. Effect of high pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate [J]. LWT-Food Sci Tech, 2009, 42(2): 606-611.

[12] Lee S H, Carpenter J F, Chang B S, et al. Effects of solutes on solubilization and refolding of proteins from inclusion bodies with high hydrostatic pressure [J]. Protein Sci, 2006, 15(2): 304-313.

[13] Izquierdo F J, Alli I, Gomez R, et al. Effects of high pressure and microwave on pronase and α-chymotrypsin hydrolysis of β-lactoglobulin [J]. Food Chem, 2005, 92(2): 713-719.

[14] Zeece M, Huppertz T, Kelly A. Effect of high-pressure treatment on *in-vitro* digestibility of β-lactoglobulin [J]. Innovat Food Sci Emerg Tech, 2008, 9(1): 62-69.

[15] van der Plancken I, Delattre M, Indrawati I, et al. Kinetic study on the changes in the susceptibility of egg white proteins to enzymatic hydrolysis induced by heat and high hydrostatic pressure pretreatment [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(18): 5621-5626.

[16] Quiros A, Chichon R, Recio I, et al. The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin [J]. Food Chem, 2007, 104(4): 1734-1739.

[17] Penas E, Prestamo G, Rosario G. High pressure and the enzymatic hydrolysis of soybean whey proteins [J]. Food Chem, 2004, 85(4): 641-648.

[18] Wang Z C, Dong J L, Zheng J Q, et al. Characteristics and structure of thermo-denatured rice proteins—Ⅱ. Characterization of rice protein fractions [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2008, 23(4): 1-4. (in Chinese)
王章存, 董吉林, 郑坚强, 等. 热变性米蛋白的性质与结构研究——Ⅱ米蛋白组分特征 [J]. 中国粮油学报, 2008, 23(4): 1-4.

[19] Wang Z C, Liu W D, Shen R L, et al. Mechanism of enzymetic hydrolysis of rice protein (Ⅱ): Change of protein components during hydrolysis [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2007, 22(4): 5-8. (in

Chinese)
王章存,刘卫东,申瑞玲,等. 大米蛋白的酶水解机制研究——Ⅱ酶水解过程中蛋白质的组分变化 [J]. 中国粮油学报,2007,22(4):5-8.
[20] Beveridge T, Toma S J, Nakai S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent [J]. J Food Sci, 1974, 39(1): 49-51.
[21] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.

Effects of High Hydrostatic Pressure on the Solubility and Molecular Structure of Rice Protein

WANG Zhang-Cun, TIAN Wei-Huan, CUI Sheng-Wen, ZHAO Xue-Wei, ZHENG Jian-Qiang, LI Chang-Wen, YUAN Dao-Qiang

(*School of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou* 450002, *China*)

Abstract: The effects of high hydrostatic pressure (HHP) treatment at 100-500 MPa for 10-30 min on the solubility and molecular structure characteristics of thermal denatured rice protein dissolved in solvent A (water solution, pH 8.0) and solvent B (containing 6 mol/L urea and 1% mercaptoethanol, pH 8.0) were researched. The results showed that the solubility of rice protein in solvent B was notably improved after HHP treatment, especially at 100 MPa for 20 min, which was from 6.89% at 0.1 MPa up to 18.13%, while in solvent A, it was from 4.37% to 9.60% at the same pressure condition. SDS-PAGE analysis showed that the subunit composition of soluble protein treated under HHP in solvent A had few differences from that of untreated. The similar phenomena could be seen in insoluble protein. However in solvent B, the relative contents of the subunits in soluble changed obviously. The observation of SEM (Scanning Electron Microscope) showed that the surface structure and aggregation state of rice protein could be changed by HHP treatment.

Key words: high pressure; rice protein; solubility; molecular structure; electrophoresis