

# 膳食纤维和阿魏酸对面团醒发过程中麦谷蛋白大聚体聚集态的影响及其分子间相互作用

冯钰琳, 张慧娟\*, 王 静

(北京工商大学食品与健康学院 中国-加拿大食品营养与健康联合实验室(北京)  
国家市场监督管理总局食品特殊监管技术重点实验室 北京 100048)

**摘要** 本文通过测定蛋白质粒径分布、分子质量分布及亚基变化探究膳食纤维(DF)与阿魏酸(FA)在面团醒发过程中对麦谷蛋白大聚体(GMP)聚集态的影响;同时通过荧光光谱、紫外光谱及游离氨基含量的测定探究膳食纤维与阿魏酸与 GMP 蛋白质分子之间的相互作用。结果表明,在面团醒发过程中 GMP 由小粒径( $<11\ \mu\text{m}$ )聚集为大粒径( $>50\ \mu\text{m}$ )。FA 会使较高分子质量范围的谷蛋白亚基发生解聚,DF+FA 可以降低这种解聚作用对 GMP 分子质量分布的影响,将亚基比值维持在 0.25。荧光光谱与紫外光谱表明,FA 使含有色氨酸与酪氨酸残基的蛋白结构段暴露在极性更强的水相环境中。DF 与 FA 与 GMP 之间可能通过共价交联作用使蛋白质分子中游离氨基含量分别显著下降 ( $P<0.05$ )22.48%与 17.38%(面团醒发 90 min 时),导致蛋白质结构发生变化。结论:DF 与 FA 的添加会对 GMP 蛋白质的分子聚集产生影响,并且会与 GMP 蛋白质之间产生分子间相互作用,使 GMP 的结构产生变化。

**关键词** 膳食纤维;阿魏酸;麦谷蛋白大聚体;分子聚集;相互作用

**文章编号** 1009-7848(2023)06-0092-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.06.011

近年来,全谷物食品逐渐受到消费者的喜爱。全麦食品是全谷物食品的种类之一,通常由全麦面粉,即白面粉中加入小麦麸皮粉加工制作而成,通常具有较差的口感和风味<sup>[1]</sup>。

膳食纤维(Dietary fiber,DF)是麦麸中的主要物质<sup>[2]</sup>。有研究表明,麦麸中的膳食纤维对面团结构产生的不良影响主要是膳食纤维对面筋蛋白的稀释作用与水分竞争效应,并对气泡的扩展产生限制作用,降低面团的持气性<sup>[3-5]</sup>。另外,在麦麸粉碎的过程中释放出的阿魏酸(Ferulic acid,FA)等酚酸类物质可能会影响面筋网络中巯基/二硫键的交换反应,减少面筋网络中的二硫键含量<sup>[6]</sup>。

麦谷蛋白大聚体(gluten macropolymer,GMP)是一种不溶于十二烷基硫酸钠(SDS)的谷蛋白聚合物,是构成麦谷蛋白骨架的大分子蛋白质,与小麦面团的流变学特性呈正相关<sup>[7-8]</sup>。面团的混合搅拌和静置醒发等加工过程会影响麦谷蛋白网络的形成和 GMP 的聚合。在制备面团搅拌的过程中,

GMP 结构被破坏,发生解聚,使得 SDS 提取液中蛋白的浓度增大;而在面团醒发时,这些可提取的聚合物会重新聚合,从而增加 GMP 的含量<sup>[9]</sup>。然而,目前关于全麦体系中膳食纤维与阿魏酸以及两者的共同作用如何影响面团醒发过程 GMP 分子聚集的报道甚少,有待研究。

本文通过向高筋面粉中分别添加 DF、FA 以及复合添加 DF+FA,在面团的不同醒发时间提取其中的 GMP,对其粒径与分子质量分布、内源性色氨酸荧光光谱与紫外光谱、游离氨基与水解氨基酸进行测定,从而对 DF 与 FA 影响 GMP 面团醒发过程中分子聚集行为与相互作用机理进行解析,为全谷物食品的生产提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

高筋小麦粉,河北金沙河集团;膳食纤维,Intertfiber 公司;阿魏酸、十二烷基硫酸钠、丝氨酸、盐酸,上海麦克林生化科技有限公司;双色预染宽分子量蛋白 Mark-4x Laemmli Sample Buffer(含  $\beta$ -巯基乙醇)、氢氧化钠,北京索莱宝科技有限公司;2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS),美国 Sigma-Aldrich

收稿日期:2022-06-05

基金项目:北京市自然科学基金面上项目(6232001);山东省重点科技项目(2021CXGC010807)

第一作者:冯钰琳,女,博士生

通信作者:张慧娟 E-mail: zhanghuijuan@th.btbu.edu.cn

公司;苯酚、2,4-二硝基氟苯、醋酸铵,福晨(天津)化学试剂有限公司;乙腈,美国 MREDA 公司。

## 1.2 仪器与设备

JA5003 电子天平,上海精密科学仪器有限公司;CR22N 高速离心机,日本日立公司;FW-100 高速万能粉碎机,北京中兴伟业仪器有限公司;79600-70 真空冷冻干燥机,美国 LABCONCO 公司;Cary 100 紫外分光光度计,安捷伦科技(中国)有限公司;SC-05 荧光分光光度计,英国爱丁堡仪器公司;SALD-2300N 激光粒度分析仪、DGU-20A 高效液相色谱仪,日本岛津公司;凝胶成像系统,美国 Bio-Red 公司;小型垂直电泳系统,美国 Hoefer 公司;多用途恒温超声波提取仪,上海比朗仪器制造有限公司。

## 1.3 试验方法

1.3.1 DF、FA 及 DF+FA 混合粉的配制与面团的制备 将未添加任何物质的纯高筋小麦粉设置为 Flour 组。分别在高筋小麦粉中添加质量分数 12% 的 DF<sup>[2,10]</sup>,0.15% 的 FA<sup>[10-11]</sup>,充分混匀,制备成 DF 混合粉与 FA 混合粉;另外将质量分数 12% 的 DF 与 0.15% 的 FA 复配添加到高筋小麦面粉中,制备成 DF+FA 混合粉。

分别将高筋小麦粉与上述 3 种混合粉各 100 g 置于和面机中,水量根据 Mixolab 试验测定的吸水率结果添加,在 25 °C 环境中混合搅拌 5 min 后形成光滑完整的面团,30 °C 条件下分别静置醒发 0,30,60,90 min (分别设置为 R0 组、R30 组、R60 组与 R90 组),其余面团于-80 °C 下冷冻 12 h 后,冷冻干燥后磨粉,过筛备用。

1.3.2 GMP 的提取 将 1.3.1 节制得的面粉用正己烷脱脂后,根据 Don 等<sup>[12]</sup>描述的方法提取面团中的 GMP。将 1.4 g 冻干面粉样品置于离心管中,加入 28 mL 15 g/L 的 SDS 溶液混匀,待面粉充分在溶液中分散均匀后离心(25 °C,15 000 r/min,30 min),沉淀上层的蛋白质凝胶即为 GMP。部分新鲜 GMP 凝胶用于测定 GMP 的粒径分布,其余 GMP 于冷冻干燥后磨粉过筛备用。

1.3.3 GMP 粒径分布的测定 根据 Yan 等<sup>[13]</sup>的方法测定 GMP 的粒径分布。将约 1 g 新鲜制备的 GMP 样品置于 15 mL 离心管中,加入 15 g/L SDS 溶液 10 mL。低速磁力搅拌 2 h 后使 GMP 均匀地

悬浮在溶液中,GMP 的粒径分布使用激光粒度分析仪测定。

1.3.4 GMP 分子质量分布的测定 SDS-PAGE: 依照 Wang 等<sup>[14]</sup>描述的方法,进行轻微调整。采用 5% 的浓缩胶(pH 6.8)和 12% 的分离胶(pH 8.8)对 GMP 分子质量分布进行分析。使用提取液(0.5 mL 0.01 mol/L Tris-HCl,pH 6.8; 含体积分数 10%  $\beta$ -巯基乙醇的 4x Laemmli Sample Buffer)对 GMP 蛋白粉末进行提取后,取 10  $\mu$ L 上清液上样进行电泳试验。用凝胶成像系统对染色、脱色后的凝胶进行观察拍照。

SEC-HPLC: 参照 Morel 等<sup>[15]</sup>与 Larroque 等<sup>[16]</sup>的方法稍作修改。准确称取 10 mg 冷冻干燥的 GMP,加入提取液(0.05 mol/L PBS,pH 6.9,含 2 mol/L 尿素,15 g/L SDS),漩涡振荡混匀后使用超声波提取仪进行 GMP 提取(功率 30%,3 min)。之后 20 °C,17 000 $\times$ g 离心 15 min。使用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤上清液,取 50  $\mu$ L 提取液进样至高效液相色谱仪。选用 Shodex Protein KW-804 色谱柱,色谱条件为:流动相为乙腈与水 1:1(含 0.05% 三氟乙酸),流动相流速 1 mL/min,柱温 30 °C,检测波长 214 nm。

1.3.5 HMW/LMW 比值的测定 根据 Wieser 等<sup>[17]</sup>的方法,采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定 GMP 的 HMW/LMW 比值。使用 C8 键合相色谱柱,通过高效液相色谱仪测定。冷冻干燥的 GMP 粉末(100 mg)加入 1 mL 提取液[体积分数 50% 异丙醇,2 mol/L 尿素,10 g/L 二硫苏糖醇,0.05 mol/L 的 Tis-HCl(pH 7.5)],在氮气环境下 60 °C 振荡加热 20 min 进行提取。离心后(6 000 $\times$ g,4 °C,20 min)重复提取 3 次,合并上清液。流动相 A 为含体积分数 0.1% 三氟乙酸的超纯水,流动相 B 为含有体积分数 0.1% 三氟乙酸的乙腈(色谱级)。取 100  $\mu$ L 提取液进样,柱温 50 °C。洗脱流速为 1 mL/min,B 相从 28% 到 56% 进行梯度洗脱。

1.3.6 GMP 内源性色氨酸荧光光谱的测定 参照 Han 等<sup>[18]</sup>的方法,将 GMP 蛋白粉末 500 mg 于烧杯中,加入 20 mL 磷酸缓冲溶液(0.01 mol/L,pH 7.0)制得蛋白质溶液。取 3 mL 置于四面透光的荧光石英比色皿内,荧光分光光度计设置参数:激发波长 290 nm,波长扫描范围 300~400 nm,狭缝宽

度 5 min,扫描 GMP 的内源性色氨酸荧光光谱图。

1.3.7 GMP 紫外光谱分析 参照岳鑫等<sup>[19]</sup>的方法,取 1.3.6 节中的蛋白溶液 3 mL 于石英比色皿中,使用紫外分光光度计在 250~350 nm 范围内测定 GMP 蛋白的紫外光谱。

1.3.8 GMP 游离氨基的测定 参照 Swieca 等<sup>[20]</sup>的方法测定 GMP 中的游离氨基。将 1.3.6 节中制得的蛋白质的溶液取 1 mL 加入 100  $\mu$ L 1 g/L 的 TNBS 水溶液,50  $^{\circ}$ C 条件下避光反应 60 min 后,加入 1 mL 标准酸(0.1 mol/L),室温避光孵育 30 min 后测定 420 nm 处的吸光度。使用不同浓度的丝氨酸进行上述操作步骤,以丝氨酸浓度-吸光度为标准曲线,对 GMP 中的游离氨基进行定量计算。

1.3.9 数据处理 结果均设定 3 次平行试验,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。数据处理和分析通过 SPSS Statistics 22 进行, $P < 0.05$  设置为检验的显著性水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 DF 与 FA 对面团醒发过程 GMP 粒径分布的影响

按照不同的粒径范围,将 GMP 的粒径分布分为小粒径  $< 11 \mu\text{m}$ 、中粒径  $11 \sim 50 \mu\text{m}$  和大粒径  $> 50 \mu\text{m}$  3 个范围,各粒径范围 GMP 的体积分数如表 1 所示。由表可知,在 0~60 min 醒发时间的范围内,各组别小粒径 GMP 的体积分数随醒发时间的

延长而降低,而大粒径 GMP 的体积分数随醒发时间的延长而增加,如醒发 60 min 时 Flour 组大粒径(粒径  $> 50 \mu\text{m}$ )GMP 体积分数比醒发 0 min 时增加了 6.1%。Don 等<sup>[21]</sup>认为,在面团醒发过程中,部分面团中由于前期搅拌过程中机械力而发生解聚的 GMP 会由小粒径重新聚合逐渐变为大粒径,与本部分的试验结果相似。在 Han 等<sup>[18]</sup>的研究中,发现添加 DF 会使面筋蛋白的粒径分布发生明显的变化,面筋聚集也会由于 DF 的添加发生改变。而 FA 与蛋白之间存在的疏水作用力与氢键<sup>[22]</sup>可能会导致添加 FA 后 GMP 的粒径分布发生变化。这可能是本试验中 FA 组小粒径 GMP 所占的比例相比于 Flour 组显著增加,大粒径 GMP 的体积分数显著降低的原因。当同时添加 DF 与 FA 时,GMP 粒径的变化介于单独添加 DF 与 FA 之间,大粒径 GMP 含量降低程度小于单独添加 FA 的组别,这说明添加 DF+FA 会降低单独添加 DF 或 FA 对 GMP 粒径分布的影响。

当面团醒发时间达到 90 min 时,Flour 组小粒径 GMP 的体积分数有所升高,大粒径 GMP 的体积分数发生下降,但是添加了 DF 与 FA 的组别的小粒径 GMP 依然呈现下降的趋势,大粒径 GMP 的体积分数呈现上升的趋势,说明添加 DF 与 FA 同样会影响醒发过程中 GMP 粒径分布的动态变化趋势。

表 1 添加 DF、FA 及 DF+FA 对面团醒发过程中 GMP 粒径分布的影响

Table 1 Effects of DF, FA and FA+DF on the particle size distribution of GMP during resting process

组别	面团醒发时间/min	$< 11 \mu\text{m}/\%$	$11 \sim 50 \mu\text{m}/\%$	$> 50 \mu\text{m}/\%$
Flour	0	$38.52 \pm 0.72^{\text{cC}}$	$22.43 \pm 0.46^{\text{aA}}$	$38.26 \pm 1.12^{\text{bC}}$
	30	$38.34 \pm 1.41^{\text{cC}}$	$21.55 \pm 0.71^{\text{aA}}$	$39.64 \pm 0.70^{\text{bC}}$
	60	$35.02 \pm 0.10^{\text{cC}}$	$24.41 \pm 0.33^{\text{hA}}$	$40.57 \pm 0.38^{\text{cC}}$
	90	$37.81 \pm 0.51^{\text{bB}}$	$24.82 \pm 0.33^{\text{hA}}$	$37.92 \pm 0.82^{\text{aB}}$
DF	0	$29.72 \pm 0.58^{\text{hA}}$	$29.74 \pm 0.22^{\text{aB}}$	$39.48 \pm 0.86^{\text{cC}}$
	30	$29.51 \pm 0.06^{\text{abA}}$	$30.92 \pm 0.01^{\text{aC}}$	$39.57 \pm 0.05^{\text{bC}}$
	60	$28.53 \pm 0.27^{\text{abA}}$	$30.26 \pm 1.27^{\text{aB}}$	$40.37 \pm 1.38^{\text{bC}}$
	90	$28.18 \pm 1.00^{\text{aA}}$	$30.94 \pm 1.07^{\text{aB}}$	$40.88 \pm 1.02^{\text{cC}}$
FA	0	$45.53 \pm 0.89^{\text{cD}}$	$30.47 \pm 1.03^{\text{bB}}$	$23.99 \pm 1.87^{\text{aA}}$
	30	$41.71 \pm 0.65^{\text{bD}}$	$26.00 \pm 1.06^{\text{aB}}$	$29.67 \pm 0.44^{\text{hA}}$
	60	$40.81 \pm 0.43^{\text{abD}}$	$29.62 \pm 0.36^{\text{bB}}$	$29.86 \pm 0.63^{\text{hA}}$
	90	$39.57 \pm 0.34^{\text{aC}}$	$29.63 \pm 0.34^{\text{bB}}$	$30.79 \pm 0.21^{\text{cA}}$

(续表 1)

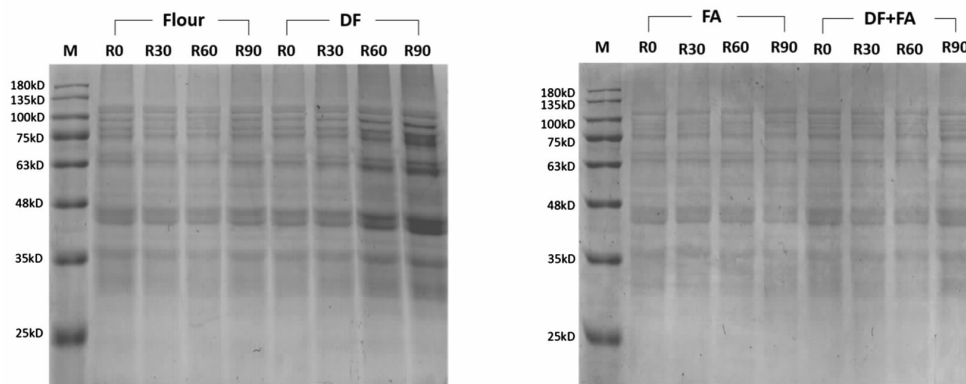
组别	面团醒发时间/min	<11 $\mu\text{m}/\%$	11~50 $\mu\text{m}/\%$	>50 $\mu\text{m}/\%$
DF+FA	0	31.68 $\pm$ 1.48 <sup>ab</sup>	35.42 $\pm$ 1.56 <sup>ac</sup>	33.40 $\pm$ 0.71 <sup>ab</sup>
	30	31.24 $\pm$ 0.22 <sup>abB</sup>	33.23 $\pm$ 0.45 <sup>ad</sup>	34.26 $\pm$ 0.48 <sup>abB</sup>
	60	30.27 $\pm$ 0.66 <sup>ab</sup>	34.71 $\pm$ 0.46 <sup>ac</sup>	35.59 $\pm$ 0.31 <sup>bcB</sup>
	90	29.16 $\pm$ 0.35 <sup>ba</sup>	33.29 $\pm$ 0.22 <sup>ac</sup>	37.55 $\pm$ 0.51 <sup>cb</sup>

注:同列肩标的小写字母不同表示添加相同物质的组别在不同醒发时间下具有显著差异( $P<0.05$ ),同列肩标的大写字母不同表示相同醒发时间下添加不同物质的组别间具有显著差异( $P<0.05$ )。

## 2.2 DF 与 FA 对面团醒发过程 GMP 分子质量分布的影响

图 1 为 GMP 的凝胶电泳成像图。由图可知, GMP 的分子质量较大, 主要分布在 35~135 ku 的范围内。DF 组与 Flour 组相比分子质量条带分布没有明显的变化, 表明添加 DF 不会对 GMP 的分子质量分布造成较大的影响。FA 组与 DF+FA 组在 75~100 ku 的范围内条带由原来的 2 个条带变为 3 个条带, 说明 FA 的加入会对较高分子质量的蛋白亚基产生影响。结合 110 ku 处条带强度变小且向低分子质量处方向偏移, 推测出现的新条

带可能是由该条带解聚产生的。说明 FA 的加入会导致 GMP 蛋白的高分子质量亚基发生解聚。添加 DF+FA 的组别同样也在该区域出现了新条带, 但 110 ku 处与泳道整体的蛋白强度与 FA 组相比有所增强, 说明 DF 能够平衡 FA 对 GMP 蛋白分子质量分布的影响。在 Wang 等<sup>[14]</sup>的研究中发现蛋白质的解聚与亚基的变化可能与 GMP 粒径变化有关。在 2.1 节中我们发现添加 FA 会使大粒径 GMP 体积分数减小, DF+FA 会降低单独添加 DF 或 FA 对 GMP 粒径分布影响, 与电泳试验的结果相似, 印证了 Wang 等<sup>[14]</sup>的观点。



注:R0、R30、R60、R90 表示面团醒发时间 0、30、60、90 min;M 表示 Mark。

图 1 GMP 的 SDS-PAGE 图

Fig.1 The SDS-PAGE analysis of GMP

各组 GMP 的 SEC-HPLC 图如图 2 所示。各组样品的色谱图按照分子质量的大小主要可以分为 3 个峰区, 分别为谷蛋白聚合物(F1,  $M_w \approx 91\ 000 \sim 688\ 000$  ku)、单体谷蛋白(F2,  $M_w \approx 16\ 000 \sim 91\ 000$  ku)与清蛋白、球蛋白、肽链及氨基酸(F3,  $M_w < 10\ 000$  ku)<sup>[23]</sup>。由于 GMP 是麦谷蛋白中的高分子聚合物, 因此其主要的峰响应集中在 F1 区。而 F2 区及 F3 区主要是一些与聚合物结合较紧密而未

被分离的单体蛋白与氨基酸等。由图可知, DF 组的色谱图与 Flour 组相比没有明显的区别, 说明添加 DF 不会对 GMP 的分子质量分布产生显著影响。FA 组在保留时间为 8.744 min 峰响应有所降低, 且在该峰的右侧, 即保留时间为 11~14 min 的范围内出现了响应, 说明 FA 的加入会使部分高分子质量亚基解聚, 导致分子质量分布向低分子质量的方向偏移, 这与 SDS-PAGE 中 FA 导致 GMP

高分子质量亚基发生解聚的结果是一致的。当同时添加 DF 与 FA 时,随着醒发时间的延长,F1 区的峰值逐渐升高伴随着其右侧的响应值逐渐降低,直至醒发 90 min 时,GMP 的谱图与 Flour 组相

比已无明显差异,说明在醒发的过程中,DF 与 FA 的共同作用可以逐渐平衡单独添加 FA 对 GMP 的解聚作用,减轻对 GMP 分子质量分布的影响,这与 SDS-PAGE 的结果也是一致的。

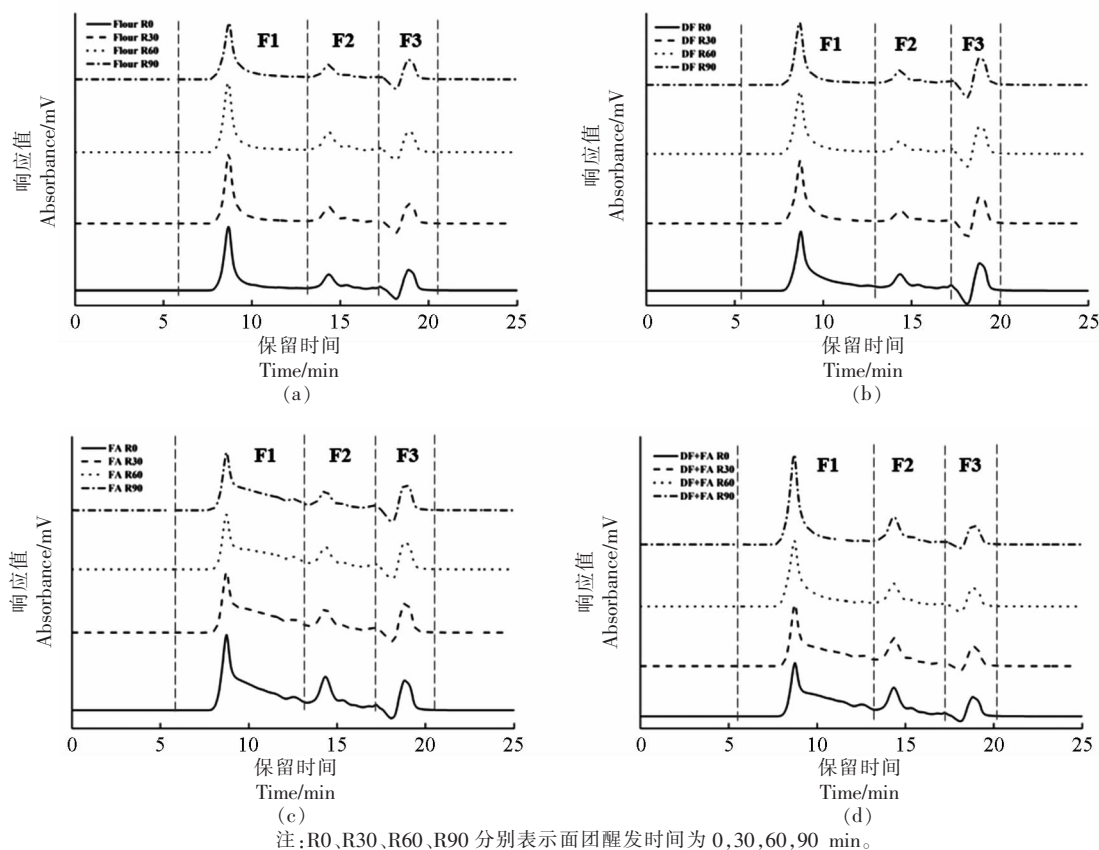


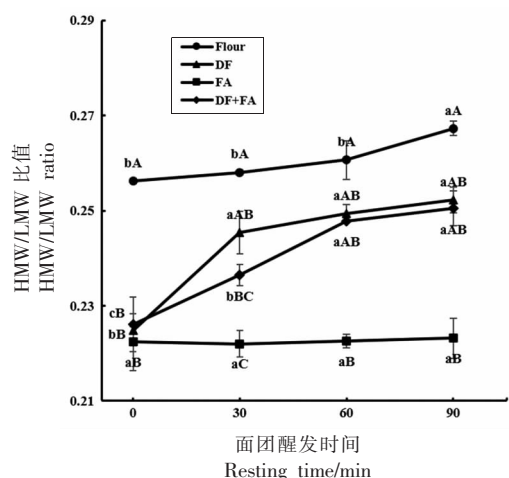
图 2 GMP 的 SEC-HPLC 图

Fig.2 The SEC-HPLC analysis of GMP

### 2.3 DF 与 FA 对面团醒发过程 GMP 亚基比值的影响

各组别 GMP 亚基比值如图 3 所示。由图可知,Flour 组与 FA 组在面团醒发过程中亚基比值没有发生显著的变化。在 Aussenen 等<sup>[24]</sup>探究面团加工过程 GMP 亚基比值变化的试验中,也发现醒发过程 GMP 亚基比值略有上升但总体变化不大,与本试验的结果相似。但 DF、DF+FA 的组别随醒发时间的延长亚基比值发生了显著的增加( $P<0.05$ ),这可能是由于 DF 的加入影响了醒发过程中面粉中蛋白的可萃取率,随着醒发时间的延长,不可萃取的麦谷蛋白大聚体中的 HMW-GS 含量增加,导致亚基比值的升高<sup>[25]</sup>。另外在相同醒发时间下,添加 DF、FA 均会使 GMP 的亚基比值下降,与醒发

90min 的 Flour 组亚基比值相比,DF 组下降了 7.4%,FA 组下降了 18.5%,DF+FA 组下降了 7.5%,DF 与 FA 的相互作用可以保持 GMP 中 HMW 与 LMW 的相对含量。前人的研究中提出谷蛋白聚合物具有层次结构,在面团加工的过程中麦谷蛋白亚基是以非随机顺序释放的<sup>[3]</sup>。因此推断 DF 与 FA 的加入会与 GMP 分子中的不同亚基间产生相互作用,导致 HMW-GS 释放,由聚合体蛋白转化为单体蛋白,更容易在提取面团中的 GMP 过程中被 SDS 提取溶液萃取,从 GMP 中脱离出来,导致 HMW/LMW-GS 发生降低的现象。同时推测,由于这两种物质与 GMP 的作用方式不同,所释放的 HMW-GS 的种类和数量之间的差异引起了添加 DF 与 FA 亚基比值降低程度的不同。



注：小写字母不同表示添加相同物质的组别在不同面团醒发时间下具有显著差异( $P<0.05$ ),大写字母不同表示相同面团醒发时间下添加不同物质的组别间具有显著差异( $P<0.05$ )。

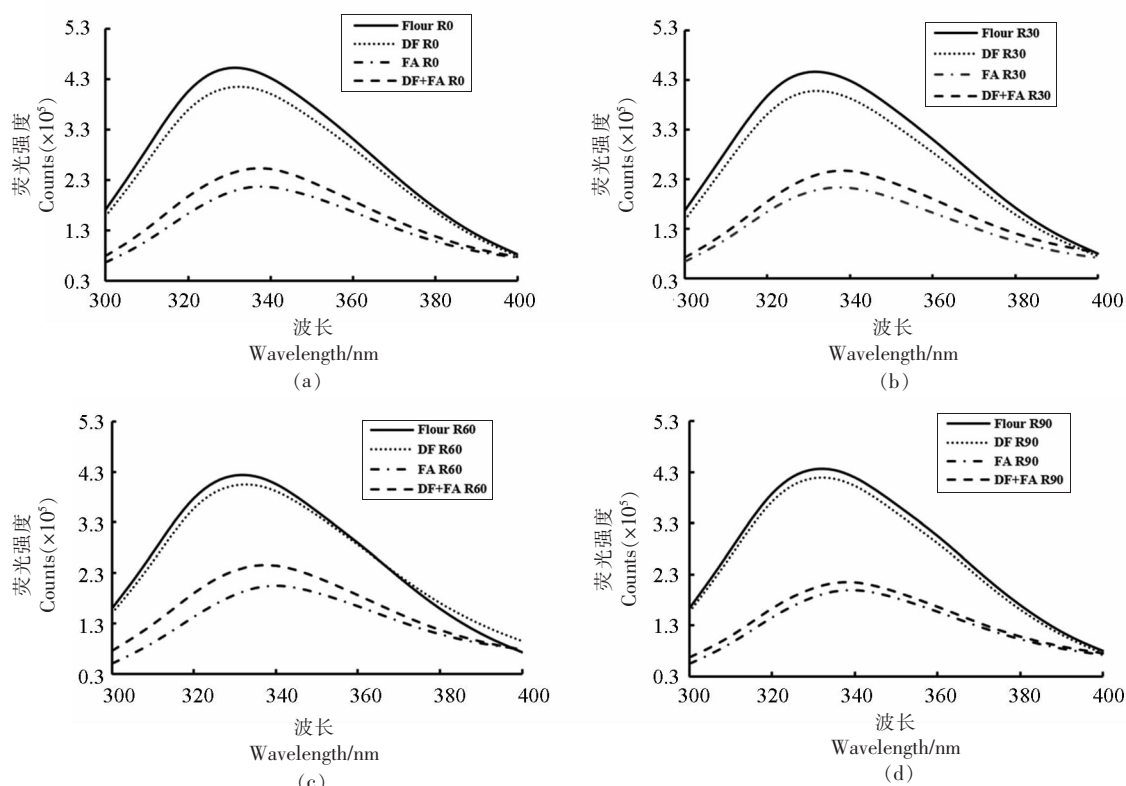
图 3 添加 DF、FA 及 DF+FA 对面团醒发过程中 GMP 亚基比值的影响

Fig.3 Effects of DF, FA and DF+FA on the HMW/LMW ratio of GMP during resting process

### 2.4 DF 与 FA 对面团醒发过程 GMP 内源性色氨酸荧光光谱的影响

各组 GMP 的内源性色氨酸荧光扫描光谱图如图 4 所示。由图可知,对于添加同种物质的组别,各组在醒发过程中出峰位置与峰高都较为集中,没有表现出明显的差异,这说明在醒发过程中色氨酸暴露的数量与程度、色氨酸周围极性微环境没有出现明显的变化。

与 Flour 组相比,添加了 DF 或 FA 后的色氨酸荧光光谱带强度都有所降低,但色氨酸荧光强度 DF 组大于 FA 组,这说明 DF 组蛋白中色氨酸残基的暴露程度要高于 FA 组。这可能是由于色氨酸也是疏水性氨基酸之一,会与酚酸中的疏水性基团产生疏水相互作用,使得蛋白分子含有色氨酸残基部分的结构发生变化,使色氨酸残基的暴露程度降低,导致蛋白质发生荧光淬灭,荧光带强度降低;另外 FA 等酚酸具有酚羟基等结构会与蛋白含有色氨酸残基的结构



注：R0、R30、R60、R90 分别表示面团醒发时间为 0、30、60、90 min。

图 4 添加 DF、FA 及 DF+FA 对面团醒发过程中 GMP 色氨酸荧光光谱的影响

Fig.4 Effects of DF, FA and DF+FA on the fluorescence characteristic of GMP during resting process

发生共价结合,使色氨酸的数目减少,使得色氨酸的荧光强度降低<sup>[26-28]</sup>。也有研究报道了植物酚酸的添加所产生的酚酸-蛋白质共价交联作用会导致蛋白质三级结构的改变<sup>[29]</sup>。而同时添加 DF 与 FA 的组别的色氨酸荧光强度介于单独添加 DF 与 FA 之间,这说明当 DF 与 FA 共同作用时,它们对含有色氨酸残基的蛋白结构产生了中和的效果,使这部分蛋白构象的变化程度降低。

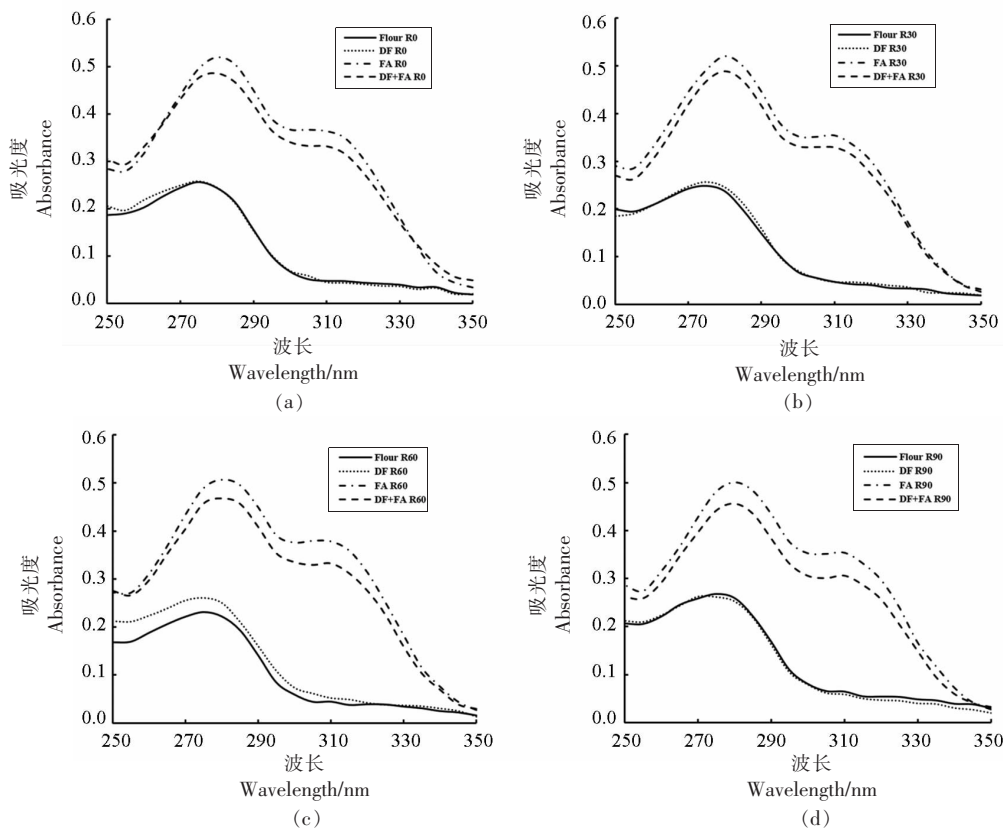
从图中还可以看出,含有 FA 组别的最高峰位置向长波方向移动,即发生了红移现象。这说明在添加了 FA 后色氨酸周围的极性微环境发生了变化。相比于其它组别,色氨酸暴露在了极性更强的微环境中。

## 2.5 DF 与 FA 对面团醒发过程 GMP 紫外吸收光谱的影响

图 5 为各组 GMP 蛋白质的紫外吸收光谱。由图可知,添加同种物质组别的出峰位置与峰高都

较为集中,没有表现出明显的差异,这说明在醒发的过程中色氨酸与酪氨酸的暴露程度与数量、周围极性微环境没有出现明显的变化。

DF 组与 Flour 组相比紫外吸收峰强度与峰位置没有明显的区别,说明 DF 的加入没有导致含有酪氨酸残基的结构发生显著的变化。添加 FA 对 GMP 紫外吸收光谱的强度的影响较大,说明 FA 作为配体分子与蛋白质相关氨基酸残基之间的相互作用更为强烈,它可能与蛋白质分子之间通过共价作用形成了蛋白质-酚酸复合物,对 GMP 的蛋白结构产生了影响,肽链的骨架结构发生改变,使得蛋白质分子中含有酪氨酸残基结构的暴露程度增加。而这种构象的变化有利于蛋白质分子中色氨酸残基和酪氨酸残基中芳香环的  $\pi-\pi^*$  跃迁,表现为紫外光谱的吸光度增强<sup>[30]</sup>。DF+FA 组的紫外吸收强度相比于单独添加 FA 的组别有所降低,这说明当 DF 与 FA 共同作用时,它们



注:R0、R30、R60、R90 分别表示面团醒发时间为 0、30、60、90 min。

图 5 添加 DF、FA 及 DF+FA 对面团醒发过程中 GMP 紫外吸收光谱的影响

Fig.5 Effects of DF, FA and DF+FA on the ultraviolet absorption spectrum of GMP during resting process

对含有色氨酸、酪氨酸残基的蛋白结构产生了中和的效果,使蛋白构象的变化程度降低。

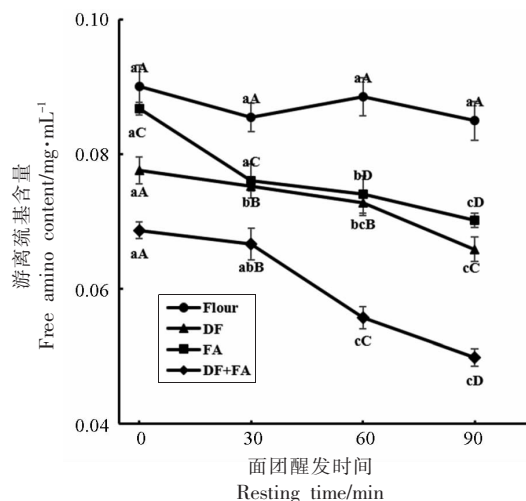
从图中还可以看出,含有 FA 的组别在 310 nm 附近出现了新的吸收峰,这是由于阿魏酸其自身酚酸的结构引起的。同时发现,含有 FA 组别的最高峰位置向长波方向移动,即发生了红移现象。这说明 FA 作为配体分子与蛋白质结合后使色氨酸与酪氨酸周围的极性微环境发生了变化。相比于其它组别,色氨酸与酪氨酸暴露在了极性更强的水相环境中,引起两种方式电子轨道跃迁能量减小,表现为吸收峰的红移。

## 2.6 DF 与 FA 对面团醒发过程 GMP 游离氨基的影响

图 6 为各组 GMP 中游离氨基含量变化。由图可知,添加 DF、FA 均会使 GMP 中的游离氨基含量下降。面团醒发 90 min 时,DF 与 FA 使 GMP 蛋白质分子中游离氨基含量分别显著下降( $P<0.05$ ) 22.48%与 17.38%。FA 作为一种具有酚羟基结构的物质,其所含有的酚羟基具有较高的交联活性,易与肽链上具有游离氨基侧链的氨基酸残基发生相互交联,导致 GMP 中的游离氨基含量下降。Zhang 等<sup>[31]</sup>的研究发现单宁酸的酚羟基与面筋蛋白中的游离氨基之间可能形成了非二硫键的其它化学键,单宁酸作用于蛋白质时所发生的相互作用引起了面筋蛋白中游离氨基含量的降低。DF 由于含有半缩醛羟基,也会与 GMP 分子中的游离氨基发生相互作用,导致了游离氨基含量的下降。同时,可以发现 Flour 组在醒发的过程中游离氨基含量没有显著性差异( $P>0.05$ ),但添加了 DF、FA 后各组游离氨基的含量均随着醒发时间的延长呈现下降的趋势,这说明在醒发的过程中,DF、FA 与 GMP 蛋白质分子的游离氨基之间的交联作用逐渐增强,更多的游离氨基与 FA、DF 结合,导致了游离氨基含量的显著下降( $P<0.05$ )。另外,蛋白中游离氨基含量的降低也说明膳食纤维与阿魏酸会和 GMP 蛋白分子中的游离氨基之间产生共价键<sup>[31]</sup>,而这也可能是导致蛋白质结构发生变化的原因之一<sup>[32]</sup>。

## 3 结论

DF 与 FA 的添加会对 GMP 蛋白质的分子聚



注:小写字母不同表示添加相同物质的组别在不同面团醒发时间下具有显著差异( $P<0.05$ ),大写字母不同表示相同面团醒发时间下添加不同物质的组别间具有显著差异( $P<0.05$ )。

图 6 添加 DF、FA 及 DF+FA 对面团醒发过程中 GMP 游离氨基含量的影响

Fig.6 Effects of DF, FA and DF+FA on the free amino groups of GMP during resting process

集产生影响,并且会与 GMP 蛋白质之间产生分子间相互作用,使 GMP 的结构产生变化。在 0~60 min 醒发的时间范围内,DF 使大粒径 GMP 的体积分数增加,FA 则增加了小粒径 GMP 的体积分数。FA 会导致较高分子质量范围的 GMP 发生解聚,DF+FA 能够平衡 FA 对 GMP 蛋白分子质量分布以及亚基比值的影响,也会降低单独添加 DF 或 FA 对 GMP 粒径分布的影响。添加 DF、FA 均会使 GMP 高分子谷蛋白亚基与低分子谷蛋白亚基的比值下降。DF 与 FA 使 GMP 分子中含有色氨酸、酪氨酸等蛋白结构的空空间结构发生改变,FA 使 GMP 的色氨酸荧光光谱与紫外吸收光谱发生红移,使色氨酸、酪氨酸残基的极性微环境发生变化。DF、FA 由于与 GMP 分子发生共价交联的相互作用,使 GMP 中的游离氨基含量发生显著下降。

## 参 考 文 献

- [1] 李云堂. 食用麦麸的加工方法[J]. 粮油食品科技, 1984, 20(3): 43.  
LI Y T. Processing method of edible wheat bran[J]. Food Science and Technology, 1984, 20(3): 43.
- [2] 蔺艳君, 刘丽娅, 钟葵, 等. 不同来源小麦麸皮营



- 营养成分及酚类物质含量的比较[J]. 现代食品科技, 2014, 30(12): 194-200.
- LIN Y J, LIU L Y, ZHONG K, et al. Comparison of nutritional and phenolic content of wheat bran obtained from different sources[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(12): 194-200.
- [3] FARDET A. How can both the health potential and sustainability of cereal products be improved? A French perspective [J]. *Journal of Cereal Science*, 2014, 60(3): 540-548.
- [4] BOCK J E, DAMODARAN S. Bran -induced changes in water structure and gluten conformation in model gluten dough studied by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 31(2): 146-155.
- [5] LI J, HOU G G, CHEN Z, et al. Studying the effects of whole-wheat flour on the rheological properties and the quality attributes of whole-wheat saltine cracker using SRC, alveograph, rheometer, and NMR technique[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 55(1): 43-50.
- [6] KOCK S D, TAYLOR J, TAYLOR J. Effect of heat treatment and particle size of different brans on loaf volume of brown bread[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 1999, 32(6): 349-356.
- [7] MARTI M, AUGST E, COX S, et al. Correlations between gluten aggregation properties defined by the GlutoPeak test and content of quality-related protein fractions of winter wheat flour[J]. *Journal of Cereal Science*, 2015, 66: 89-95.
- [8] WANG M, VLIET T V, HAMER R J. Evidence that pentosans and xylanase affect the re-agglomeration of the gluten network[J]. *Journal of Cereal Science*, 2004, 39(3): 341-349.
- [9] 王香玉. 馒头制作过程中蛋白交联行为及其对品质的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- WANG X Y. Cross-linking of protein during production of Chinese steamed bread and its effect on quality thereof[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.
- [10] 黄莲燕, 张小爽, 张君慧, 等. 不同谷物麸皮对面团流变学特性及面筋蛋白结构的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(23): 1-7.
- HUANG L Y, ZHANG X S, ZHANG J H, et al. Effect of different cereal brans on dough rheological properties and gluten secondary structure [J]. *Food Science*, 2017, 38(23): 1-7.
- [11] LADDOMADA B, CARETTO S, MITA G. Wheat bran phenolic acids: bioavailability and stability in whole wheat-based foods [J]. *Molecules*, 2015, 20(9): 15666-15685.
- [12] DON C, LICHTENDONK W, PLIJTER J J, et al. Glutenin macropolymer: a Gel formed by glutenin particles [J]. *Journal of Cereal Science*, 2003, 37(1): 1-7.
- [13] YAN S, DAI Z, CHEN X, et al. Effects of sulphur fertilizer on glutenin macropolymer content and particle size distribution in wheat grain[J]. *Plant Soil and Environment*, 2016, 62(1): 9-15.
- [14] WANG X Y, GUO X N, ZHU K X. Polymerization of wheat gluten and the changes of glutenin macropolymer (GMP) during the production of Chinese steamed bread[J]. *Food Chemistry*, 2016, 201: 275-283.
- [15] MOREL M H, REDL A, GUILBERT S. Mechanism of heat and shear mediated aggregation of wheat gluten protein upon mixing [J]. *Biomacromolecules*, 2002, 3(3): 488-497.
- [16] LARROQUE O R, GIANIBELLI M C, SANCHEZ M G, et al. Procedure for obtaining stable protein extracts of cereal flour and wholemeal for size-exclusion HPLC analysis[J]. *Cereal Chemistry*, 2000, 77(4): 448-450.
- [17] WIESER H, ANTES S, SEILMEIER W. Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. *Cereal Chemistry*, 1998, 75(5): 644-650.
- [18] HAN W, MA S, LI L, et al. Influence of wheat starch on the structural changes and size distribution of gluten induced by adding wheat bran dietary fiber [J]. *Starch Strke*, 2018, 70(9/10): 1700302.
- [19] 岳鑫, 包怡红. 基于荧光及紫外光谱法对红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的研究[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(7): 114-120.
- YUE X, BAO Y H. Interaction between the polyphenols from pinus koraiensis seeds scales and whey protein studied by fluorescence and ultraviolet spectroscopy[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(7): 114-120.
- [20] SWIECA M, SEZYK L, GAWLIK-DZIKI U, et al. Bread enriched with quinoa leaves - The influence of protein-phenolics interactions on the nutritional

- and antioxidant quality [J]. *Food Chemistry*, 2014, 162: 54–62.
- [21] DON C, LICHTENDONK W J, PLIJTER J J, et al. Understanding the link between GMP and dough: from glutenin particles in flour towards developed dough[J]. *Journal of Cereal Science*, 2003, 38(2): 157–165.
- [22] NAWROCKA A, SZYMAŃSKA-CHARGOT M, MIŚ A, et al. Effect of dietary fibre polysaccharides on structure and thermal properties of gluten proteins – A study on gluten dough with application of FT-Raman spectroscopy, TGA and DSC[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 69: 410–421.
- [23] 王沛. 冷冻面团中小麦面筋蛋白品质劣变机理及改良研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.  
WANG P. Gluten deterioration in frozen dough: mechanism and improvement study[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.
- [24] AUSSENAC T, CARCELLER J L, KLEIBER D. Changes in sds solubility of glutenin polymers during dough mixing and resting 1[J]. *Cereal Chemistry*, 2001, 78(1): 39–45.
- [25] WRIGLEY C W. Giant proteins with flour power[J]. *Nature*, 1996, 381(6585): 738–739.
- [26] 史春悦. 多酚对面筋蛋白流变特性的影响机制研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2016.  
SHI C Y. Mechanism research on effect of adding polyphenols on rheological properties of gluten [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016.
- [27] 廖兰, 韩雪跃, 李章发, 等. 小麦面筋蛋白分子聚集态对脱酰胺程度的影响[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(10): 62, 80–85.  
LIAO L, HAN X Y, LI Z F, et al. Effect of the aggregation state of wheat gluten on the degree of deamidation as a function of concentration[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(10): 62, 80–85.
- [28] 廖兰, 林维杰, 李章发, 等. 小麦面筋蛋白脱酰胺改性过程中分子的聚集态研究[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(9): 68–75.  
LIAO L, LIN W J, LI Z F, et al. Studies on aggregation of modified wheat gluten in the process of citric acid deamidation[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(9): 68–75.
- [29] XU J, WANG W, LI Y. Dough properties, bread quality, and associated interactions with added phenolic compounds: A review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 52: 629–639.
- [30] 申炳俊, 金丽虹, 田坚. 荧光与紫外光谱法研究柚皮素与人血清白蛋白的结合模式[J]. *分析试验室*, 2016, 35(1): 41–46.  
SHEN B J, JIN L H, TIAN J. Study of naringenin and its interaction with HSA by fluorescence and UV spectroscopies [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2016, 35(1): 41–46.
- [31] ZHANG L, CHENG L, JIANG L, et al. Effects of tannic acid on gluten protein structure, dough properties and bread quality of Chinese wheat[J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2010, 90(14): 2462–2468.
- [32] KROLL N G, RAWEL H M, ROHN S. Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds [J]. *Food Science and Technology Research*, 2003, 9(3): 205–218.

## The Effect of Dietary Fiber and Ferulic Acid on the Aggregation of Glutenin Macropolymer and Intermolecular Interactions during Dough Resting

Feng Yulin, Zhang Huijuan\*, Wang Jing

(School of Food and Health, Beijing Technology & Business University, China-Canada Joint Lab of Food Nutrition and Health (Beijing), Key Laboratory of Special Food Supervision Technology for State Market Regulation, Beijing 100048)

**Abstract** The effects of dietary fiber (DF) and ferulic acid (FA) on the aggregation of Glutenin macropolymer (GMP) were studied by measuring the protein particle size distribution, molecular weight distribution and subunit changes during dough resting; At the same time, the interactions between dietary fiber or/and ferulic acid and GMP protein molecules

were explored by fluorescence spectrum, ultraviolet spectrum and free amino content. The results showed that during the dough resting process, GMP aggregated from small particle size ( $<11\ \mu\text{m}$ ) into large particle sizes ( $>50\ \mu\text{m}$ ). FA depolymerized the glutenin subunits in the high molecular weight range. DF+FA reduced the impact of this depolymerization on the GMP molecular weight distribution and maintain the subunit ratio at 0.25. Fluorescence spectra and ultraviolet spectra showed that FA exposed the protein structure segments containing tryptophan and tyrosine residues to a more polar aqueous environment. The content of free amino groups in protein molecules might be significantly reduced ( $P<0.05$ ) by 22.48% and 17.38% respectively (when the dough resting for 90 min) through covalent cross-linking between DF/FA and GMP, resulting in changes in protein structure. Conclusion: The addition of DF and FA had an impact on the molecular aggregation of GMP proteins, and generated intermolecular interactions with GMP proteins, resulting in changes in the structure of GMP.

**Keywords** dietary fiber; ferulic acid; glutenin macropolymer; aggregation; interaction