

米谷蛋白淀粉样纤维聚集体自组装过程中蛋白质结构演变、 功能性质及体外消化性研究

彭 圆^{1,2}, 翟月滢^{1,2}, 刘采怡^{1,2}, 刘永乐^{1,2}, 王发祥^{1,2}, 李向红^{1,2*}

¹长沙理工大学食品与生物工程学院 长沙 410114

²湖南省水生资源食品加工工程技术研究中心 长沙 410114

摘要 蛋白质自组装形成淀粉样纤维聚集体,是改善和拓宽食品蛋白质功能性质的重要手段。本文研究了 pH 2.0 和 85 °C 加热不同时间形成的米谷蛋白淀粉样纤维聚集体(RAFA)自组装过程中蛋白质结构演变、黏度和热力学等功能性质,以及 RAFA 在模拟胃液和小肠液中的消化行为。结果显示,在 pH 2.0、85 °C 条件下,天然米谷蛋白高分子量亚基逐渐水解成 12 ku 以下的小分子肽。随着加热时间的延长,RAFA 的 β -折叠构含量从 0 h 的(22.76 ± 0.49)% 增至峰值 6 h 时的(32.11 ± 0.52)%,表明 RAFA 的形成是蛋白质先水解后多肽重组聚集的过程。另外,RAFA 表现出较高的热稳定性,其放热峰的 T_{max} 值从 0 h 的(70.34 ± 0.51)°C 增至峰值 4 h 时的(174.55 ± 0.34)°C。体外消化的透射电镜结果显示,热处理 6 h 和 10 h 的纤维消化趋势一致,胃蛋白酶消化 60 min 后,一部分具有分枝状的长纤维被酶解成短小纤维,同时观察到较大的聚集体颗粒。胰酶作用后纤维结构减少,大的聚集体颗粒被酶解为小聚集体颗粒,即 RAFA 表现出胃蛋白酶抗性。本研究结果为利用蛋白质纤维聚集体构建新型食品提供了理论参考。

关键词 米谷蛋白; 淀粉样纤维聚集体; 结构演变; 体外消化性

文章编号 1009-7848(2023)03-0030-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.004

近年来,蛋白质自组装纤维引起食品工作者的广泛关注,蛋白质(多肽)在远离等电点、低离子强度和变性温度的条件下可通过疏水相互作用、氢键和静电相互作用等分子间相互作用力自组装形成长 0.1~10 μm ,宽几纳米,高度有序的纤维状聚集体^[1]。由于其极端的长径比(可达 500:1,甚至更大)、较好的表面活性和稳定性等特性,因此蛋白质淀粉样纤维可作为增稠剂和胶凝剂、乳化和发泡稳定剂、高效吸附剂、输送载体等。蛋白质淀粉样纤维化被认为是改善和拓宽食品蛋白质功能的一种潜在的新方法^[2-3]。各种类型的食物蛋白质,包括大豆蛋白^[1]、芸豆蛋白^[3]、 β -乳球蛋白^[4]等,可以通过非共价键进行组装得到纤维状结构。米谷蛋白作为大米蛋白的主要成分仅能分散在酸性(pH<3.0)和碱性(pH>10.0)溶液中,加热后不能形成黏弹性凝胶网络结构,限制了米谷蛋白在食品

生产中的应用^[5]。米谷蛋白中 α -亚基中含有较多的谷氨酸, β -亚基中含有较多的天冬氨酸,为谷蛋白酸水解提供了切割位点。Li 等^[6]研究发现在酸性条件下加热形成的米谷蛋白纤维的发泡和乳化性能得到改善。课题组前期研究发现,米谷蛋白在 pH 2.0 和 85 °C 下处理 4 h 以上,形成的淀粉样纤维聚集体能显著降低大米淀粉的体外消化速率,并且该纤维聚集体表现出无体外细胞毒性^[7]。而米谷蛋白淀粉样纤维聚集体与淀粉混合加热后的体系中淀粉消化性减缓的具体原因还不够清楚,主要原因可能是由于淀粉样纤维聚集体的黏度增大限制了淀粉酶与底物的接触,亦或是淀粉样纤维聚集体本身表现出较高的热力学稳定性及胃-肠消化抗性,实现了对淀粉的物理包埋,从而减缓其消化。。本研究采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、远紫外圆二色性(CD)、流变仪、差示扫描量热仪(DSC)、硫磺素 T 荧光分析(ThT)、透射电镜(TEM)等研究在 pH 2.0、85 °C 加热不同时间形成的米谷蛋白淀粉样纤维聚集体(RAFA)自组装过程中蛋白质结构演变、黏度和热力学等功能性质,以及 RAFA 在模拟胃液和小肠液中的消化行为,以期揭示蛋白质淀粉样纤维聚

收稿日期: 2022-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(32072262);湖南省教育厅重点项目(19A027)

第一作者: 彭圆,女,硕士生

通信作者: 李向红 E-mail: xianghongl@163.com

集体对淀粉消化性的减缓机制,为利用其构建新型食品提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

市售大米,湖南省长沙市,保存在常温干燥条件下。体外消化试验用胃蛋白酶制品(250 U/mg)、胰酶制品(250 U/mg),Sigma 公司。试验用其它试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

电泳仪,美国伯乐;圆二色光谱仪,英国 Applied Photophysics 公司;流变仪(TA DISCOVERY HR-3 型),美国;差示扫描量热仪(TA Q2000 型),美国;场发射透射电镜(Tecnai G2 F20),美国 FEI 公司;荧光分光光度仪(F-7100 型),日立公司;万能粉碎机,长沙易达仪器有限公司;台式低速离心机(LD5-10 型),北京京立离心机有限公司;低速离心机(TDL-36C 型),上海安亭科学仪器厂;真空冷冻干燥机(LGJ-10 型),宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 米谷蛋白的提取 称取 5 kg 大米,用粉碎机粉碎,120 目筛过滤。将大米粉称重后倒入大塑料桶(自购)中,以 1 g:5 mL 的料液比向其中加入 70%乙醇溶液,搅拌。室温下用电动搅拌机搅拌 2 h,使蛋白充分溶解在溶液中,然后抽滤去乙醇,自然烘干 24 h。以 1 g:10 mL 的料液比向其中加入 5%的氯化钠溶液。室温下,用电动搅拌机搅拌 2 h,使球蛋白充分溶解在溶液中,将溶液以 3 500 r/min 转速离心 30 min,倒去上清液,将沉淀保留下来。以 1 g:10 mL 的料液比向其中加入蒸馏水。室温下用电动搅拌机搅拌 2 h,让清蛋白充分溶解在溶液中,将溶液以 3 500 r/min 转速离心 30 min,倒去上清液,将沉淀保留下来。将沉淀水洗,以 1 g:10 mL 的料液比向其中加入 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液。室温下用电动搅拌机搅拌 2 h 后将溶液以 3 500 r/min 转速离心 30 min,将上清液保留下来。用 12 %三氯乙酸溶液将上清液 pH 值调至 4.8,即蛋白质等电点,出现大量沉淀。再以 3 500 r/min 转速离心 30 min,取沉淀。用 8 000 或 14 000 的透析袋透析 1~2 d 后,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调料

液 pH 值到中性。将料液放入-60 ℃冰箱冻结,真空冷冻干燥机除去样品中的水分,成品为干粉,置于干燥器中备用。

1.3.2 米谷蛋白淀粉样纤维聚集体(RAFA)的制备 取制备好的米谷蛋白干粉 2 g,分散于超纯水中,得到质量分数 2.0%的蛋白溶液,用 2 mol/L HCl 调节 pH 值为 2.0,室温下搅拌 1 h。随后,将蛋白溶液离心(3 500 r/min,30 min),取出上清液,置 85 ℃水浴锅中搅拌,分别加热 2,4,6,8,10,15 h,取出,立即将样品放入冰水中冷却 20 min,终止纤维聚集体继续生成,将得到的样品溶液放入-60 ℃的超低温冰箱中冻结储存。最后将冻结的样品真空冷冻干燥,得到干粉,标记后置于干燥器中备用。

1.3.3 SDS-PAGE 电泳 SDS-PAGE 电泳分析,取 100 mg 样品直接用 20 mL 10% SDS 溶液分散,在 85 ℃水浴锅加热 30 min,8 000 r/min 离心 10 min,取 20 μL 上清液,加入 2 倍体积的还原样品缓冲液,混合置于 EP 管中,在 100 ℃水浴锅中加热 5 min,在 10 000 r/min 条件下离心 3 min。随后分别配制 5%的浓缩胶和 12%的分离胶,灌入电泳装置。将样品分别加入电泳槽,以恒定电流 40 mA 进行电泳,待样品至分离胶时,改变电流恒定 80 mA。最后凝胶用 0.25%的考马斯亮蓝(R250)染色 1 h,用脱色液(50 mL 甲醇,75 mL 冰乙酸,875 mL 蒸馏水)脱色 1~2 h 后更换脱色液,继续脱色,直至脱色完全。

1.3.4 圆二色谱 CD 使用去离子水(pH 2.0)稀释样品液至蛋白质量浓度为 0.1 mg/mL,采用圆二色光谱仪收集信号。扫描参数:样品池光程 1 mm,扫描波长为 190~260 nm。试验温度 25 ℃,分辨率 0.5 nm,灵敏度 100 mdeg/cm,扫描速度 100 nm/min,试验值为 4 次扫描均值。采用 CDNN 软件(Fort Collins,CO,USA)分析 CD 光谱的二级结构含量。

1.3.5 RAFA 的黏度测试 将加热时长 2,4,6,8,10 h 和 15 h 的 RAFA 溶解在 pH 2.0 溶液中,得到 5 mg/mL 的蛋白溶液,用流变仪对 RAFA 进行静态流动测试,使用配有 40 mm 平行板的流变仪。当剪切速率从 0.1 增到 100 r/s 时,记录 RAFA 的黏度。

1.3.6 RAFA 热力学性质测试 RAFA (约 5 mg) 转移到 DSC 仪的固体样品室(Q2000,TA,美国),以 10 °C/min 的速率升温,升温区间 30~200 °C,测量热转变温度曲线。

1.3.7 RAFA 的胃-胰消化性

1.3.7.1 体外消化模拟 为研究纤维聚集体在消化过程中的表现情况,根据 Bateman 等^[8]以及 Wei 等^[9]的方法对纤维聚集体进行体外消化,并做一些修改。纤维样品(3.3 mg/mL)与胃蛋白酶(10 mg/mL, ≥ 250 U/mg)在 pH 1.5, 37 °C 下恒温振荡 1 h,在 0, 30 min 和 60 min 时分别取出 1 mL (等量),立即在沸水浴中加热 1 min 停止消化。然后,用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0,与胰酶(10 mg/mL, ≥ 250 U/mg)在 37 °C 恒温振荡 3 h。分别在 0, 20, 60, 120 min 和 180 min 时取出 1 mL (等量),立即在沸水浴中加热 1 min 停止消化。将收集到的胃蛋白酶和胰酶水解样品保存在 4 °C 冰箱中,用于后续试验测定。

1.3.7.2 ThT 硫磺素荧光分析 ThT 荧光光谱分析参照 Nilsson^[10]的方法,将 16 mg ThT 溶解于 20 mL 磷酸缓冲溶液 (10 mmol/L, pH 7.0, 150 mmol/L NaCl) 中制得 ThT 浓缩液。待溶液充分溶解后用 0.22 μ m 的水相滤膜过滤去除不溶解的 ThT,滤液为 ThT 母液。将 ThT 母液用 4 °C 冰箱密封,避光保存,保存时间不能超过 1 周。在分析当天,用上述磷酸缓冲液将母液稀释 50 倍,所得溶液即 ThT 工作液。将 50 μ L 收集的待测样品与 5 mL ThT 工作液混合,震荡混匀后静置 1 min,用 F-7100 型荧光分光光度计测定试样的荧光强度。设定仪器的测量参数:激发波长 440 nm,发射波长 485 nm,激发和发射狭缝间隙 5 nm,电压 700 V,扫描范围 450~600 nm。

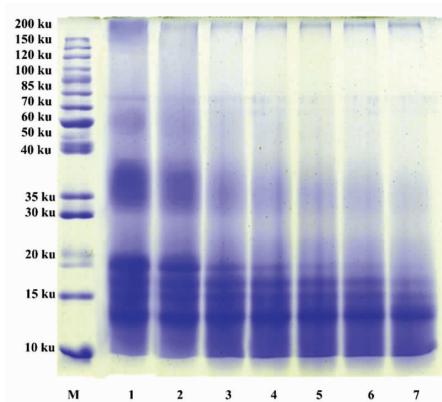
1.3.7.3 透射电镜 TEM 透射电镜 (TEM) 参考 Peng 等^[11]的方法,用 TEM 测定蛋白淀粉样纤维聚集体样品的微观结构。分别用 pH 1.5 盐酸-氯化钾缓冲液和 pH 7.0 磷酸缓冲溶液将收集的胃蛋白酶和胰酶水解样品稀释到质量浓度为 0.2 mg/mL,观察纤维聚集体的结构。取 10 μ L 样液滴至铜网上,吸附 2 min 后用滤纸条将铜网上多余的溶液吸干,将铜网放在滤纸上,待自然晾干后用透射电镜观察。

1.3.8 数据处理 所有数据以平均值 \pm 标准差表示,相关性分析($P < 0.05$)与差异性分析相结合,统计分析均采用 SPSS v.25.0 软件。

2 结果与讨论

2.1 米谷蛋白纤维化过程中分子质量的变化

采用 SDS-PAGE 检测蛋白质分子量组成。如图 1 所示,不同热处理时间形成的 RAFA,分子中存在两种分子质量较大(70 ku 和 50 ku)的米谷蛋白亚基,而 RAFA 的主要分子质量集中在 30~35 ku, 20 ku 和 12~15 ku 范围。Amagliani 等^[12]报道了米谷蛋白电泳条带的描述。将米谷蛋白在 pH 2.0 的溶液中加热,蛋白质发生酸热水解,亚基分子质量开始发生变化,电泳条带变得更宽、更模糊。有研究显示蛋白质在加热水解过程中,电泳条带呈现拉长模糊的现象^[13]。从图 1 可看出,泳道 1 的亚基分布与米谷蛋白亚基的分子质量分布是一致的。随着加热时间的延长,泳道 2~7 中的高分子质量亚基逐渐水解成 12 ku 以下的片段,并逐渐在电泳通道的底部累积,显示出一大片印迹。大豆蛋白亚基在酸热水解中也表现出分子质量降低,这是由于蛋白原本的结构展开,成为形成蛋白纤维聚集体的纤维单元^[14]。纤维单元含量的增加,也代表着纤维聚集体形成。从泳道 4 开始,条带顶端出现 1 条带痕,因聚集体的分子质量过大而无法通过电泳凝胶,被阻滞在电泳泳道顶端。类似的是,天然米谷蛋白也因较差的水溶性和复杂的大分子结构被阻滞在电泳带顶端。



注:1. 0 h; 2. 2 h; 3. 4 h; 4. 6 h; 5. 8 h; 6. 10 h; 7. 15 h。

图 1 RAFA 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 SDS-PAGE patterns of RAFA

2.2 米谷蛋白纤维化过程中二级结构含量的变化

淀粉样原纤维的共同结构元素是紧密结合的 β -折叠片层,因硫黄素 T (ThT)对蛋白淀粉样纤维聚集体中的 β -折叠结构具有高度选择性,故ThT荧光是定量检测纤维结构数量的灵敏方法。先前课题组Li等^[7]研究了pH 2.0条件下热处理不同时间的米谷蛋白的ThT荧光,结果发现,热处理时间增加到6 h,荧光强度达到最大值,继续加热时间至15 h,荧光强度趋至平稳。CD光谱是另一种研究纤维化过程中蛋白质二级结构的灵敏方法,用远紫外圆二色法检测RAFA的二级结构,结果如图2所示。圆二色分析结果与前期的ThT荧光分析结果一致。

RAFA在210~220 nm范围有明显的负峰带,与0 h未处理的米谷蛋白明显不同。0 h未处理的米谷蛋白二级结构的 β -折叠片层结构含量为 $(22.76 \pm 0.49)\%$ (见表1),加热时间2 h的RAFA中, β -折叠片层结构的含量为 $(31.80 \pm 0.25)\%$ $(P < 0.05)$,说明米谷蛋白纤维化过程中出现大量的 β -折叠片层结构,它是构成蛋白纤维聚集体的基础结构。将20 mg/mL米谷蛋白在pH 2.0和85

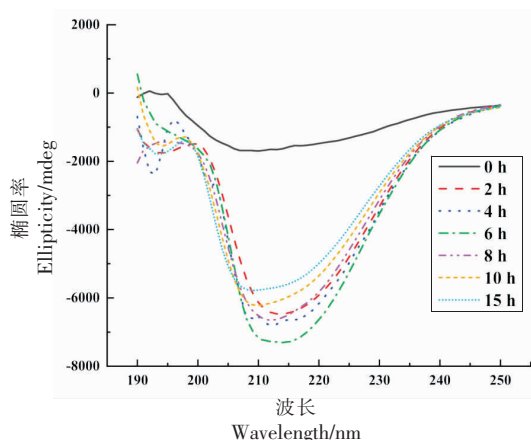


图2 RAFA(pH 2.0, 85 °C)的圆二色色谱
Fig.2 CD spectra of RAFA (pH 2.0, 85 °C)

°C的条件下加热0~15 h,在加热2 h时,米谷蛋白质部分展开,疏水基团暴露出来并自发完成聚集,这与Li等^[6]观察到的2 h谷蛋白结构一致。随着加热时长的不同, β -折叠片层结构含量先增加后下降,在加热6 h时出现峰值,表明米谷蛋白加热6 h后形成较多的纤维聚集体。加热时间超过6 h后RAFA中 β -折叠片层结构含量有所降低,这是因为长时间加热导致蛋白质水解。

表1 不同加热时间RAFA的二级结构含量

Table 1 The secondary structure of RAFA at different heating time

加热时间/h	α -螺旋/%	β -折叠/%	β -转角/%	无规卷曲/%
0	15.43 ± 0.91^c	22.76 ± 0.49^a	23.63 ± 0.14^d	38.16 ± 0.46^a
2	9.64 ± 0.02^a	31.80 ± 0.25^{dc}	19.37 ± 0.31^{ab}	39.18 ± 0.43^a
4	11.18 ± 0.67^{ab}	29.74 ± 0.54^{bc}	20.32 ± 0.36^{bc}	38.74 ± 0.44^a
6	10.20 ± 0.51^{ab}	32.11 ± 0.52^c	18.87 ± 0.82^a	38.80 ± 0.16^a
8	10.39 ± 0.89^{ab}	30.49 ± 0.88^{cd}	20.24 ± 0.64^b	38.85 ± 0.59^a
10	11.15 ± 0.05^{ab}	29.53 ± 0.11^{bc}	20.69 ± 0.54^{bc}	38.62 ± 0.29^a
15	11.38 ± 0.20^b	28.39 ± 0.80^b	21.60 ± 0.20^c	38.61 ± 0.80^a

注:同一样本中,同列中不同字母表示有显著性差异 $(P < 0.05)$ 。

2.3 米谷蛋白纤维化过程中黏度的变化

将不同加热时长的RAFA溶解在水溶液中,得到5 mg/mL蛋白溶液,随后通过流变仪测定黏度,结果如图3所示。4 h处理的RAFA静态黏度值显著高于2 h处理的样品黏度。加热时间短(2 h),由于米谷蛋白水溶性很差,受未溶解的蛋白大分子影响,蛋白纤维聚集体黏度随剪切速率的增加发生明显的波动。加热10 h和15 h的蛋白纤维

聚集体的黏度也发生波动,而加热4,6 h和8 h的蛋白纤维聚集体黏度没有波动。这种情况可能是米谷蛋白纤维化后水溶性性质得到改良,蛋白分子平均尺寸增加,溶解度提高,溶液中纤维聚集体的缠结导致黏度增加^[15]。而加热10 h和15 h的RAFA的分子尺寸较大,可能是溶液中蛋白分子还发生了非纤维化聚集,形成了大尺寸的聚集体,这与课题组前期的粒径分析结果保持一致^[7]。另外,也有

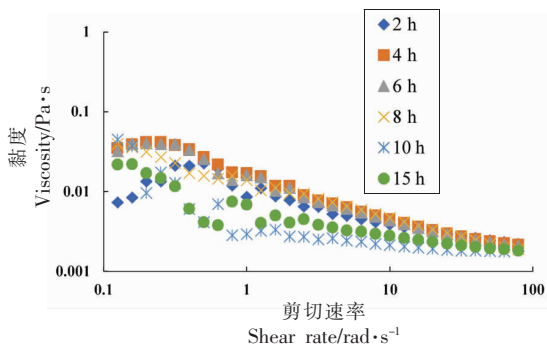


图3 RAFA的黏度变化

Fig.3 The change of viscosity of RAFA

研究表明水稻麸皮蛋白纤维聚集体的形成导致水稻麸皮蛋白溶液的黏度增加^[16]。

2.4 RAFA的热力学性质

RAFA的热力学性质采用DSC表征,结果显示,高温处理下纤维聚集体表现出放热现象,放热峰较宽且不对称(图略),这是因为在蛋白质热变

性过程中,蛋白质的聚集与构象的展开同时发生,蛋白质聚集通常是放热过程^[17]。DSC的具体分析数据见表2。除去0 h的样品,其中放热峰的开始温度最低为 $(138.95 \pm 0.34)^\circ\text{C}$,纤维的 T_{max} 值从0 h样品开始增加,热处理4 h时纤维样品的 T_{max} 值达到最大值 $(177.47 \pm 0.46)^\circ\text{C}$,说明经加热处理的米谷蛋白形成纤维聚集体,其耐热性高于天然米谷蛋白。之后,随样品处理时间的延长,RAFA的放热峰虽有小幅度的降低趋势,但仍然高于天然米谷蛋白。这说明随着热处理时间的延长,米谷蛋白纤维化形成的RAFA的结构和性质可能存在差异,然而,纤维化处理使得米谷蛋白的耐热性增加。有研究也证实蛋白质纤维聚集体中,蛋白肽链的交叉 β -折叠结构(立体拉链脊柱状)是一种稳定的结构,与由主链氢键稳定的单 β 折叠结构不同,它们具有很高的耐热性^[18]。

表2 RAFA的热力学特性指数

Table 2 Thermal dynamic characteristics of RAFA

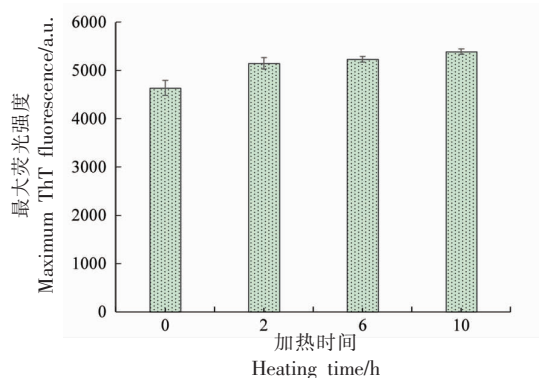
样品加热时间/h	开始温度/ $^\circ\text{C}$	结束温度/ $^\circ\text{C}$	$T_{\text{max}}/^\circ\text{C}$
0	45.26 ± 0.59	142.49 ± 0.27	70.34 ± 0.51
2	155.23 ± 0.25	197.64 ± 0.23	174.55 ± 0.34
4	148.56 ± 0.46	196.78 ± 0.24	177.47 ± 0.46
6	156.42 ± 0.32	215.36 ± 0.56	174.33 ± 0.21
8	138.95 ± 0.34	206.18 ± 0.39	174.32 ± 0.28
10	139.79 ± 0.39	198.27 ± 0.27	171.38 ± 0.56
15	150.57 ± 0.26	191.15 ± 0.31	169.58 ± 0.43

2.5 RAFA体外消化情况

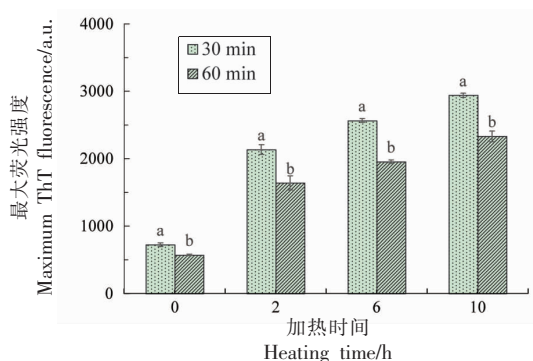
2.5.1 RAFA体外消化的ThT荧光分析 课题组前期研究发现热处理2,6,10 h的RAFA抑制淀粉消化作用最明显^[7]。选用0,2,6,10 h的样品进行体外消化模拟研究。经体外消化模拟的RAFA的ThT荧光分析结果见图4。在胃蛋白酶消化之前,0 min时热处理0,2,6,10 h的米谷蛋白纤维随热处理时间的增加,荧光强度增加(图4a)。加入胃蛋白酶后,随着消化时间的增加,所有纤维聚集体的荧光强度降低(图4b),这表明在体外胃消化过程中大量原纤维结构被破坏。胃蛋白酶水解可以将大的肽切割成较小的肽,而一些较小的肽可能不适合形成稳定的原纤维结构,这导致RAFA的崩解和塌陷^[9]。在胃蛋白酶作用60 min后,10 h

纤维的保留率为43.3%,说明部分纤维聚集体具有胃蛋白酶抗性,在胃蛋白酶作用下保持一定的稳定性。加入胰酶作用后,所有纤维聚集体的荧光强度显著减弱($P < 0.05$),表明与ThT结合的原纤维 β -折叠结构减少,胰酶的作用可能通过肽键的水解导致纤维聚集体大部分被消化^[8](图4c),以及可能与胃消化时纤维聚集体在低pH环境下更能保持稳定性的有关。目前关于蛋白纤维聚集体的体外消化模拟的研究较少,最早是Bateman等^[8]研究发现 β -乳球蛋白纤维在模拟胃液(pH 1.2)中被胃蛋白酶快速水解,同时产生一些适合进一步形成原纤维的新肽。然而,Wei等^[9]利用ThT荧光和原子力显微镜对卵转铁蛋白(OVT)纳米纤维的消化过程进行表征,同样发现大部分的OVT纳米

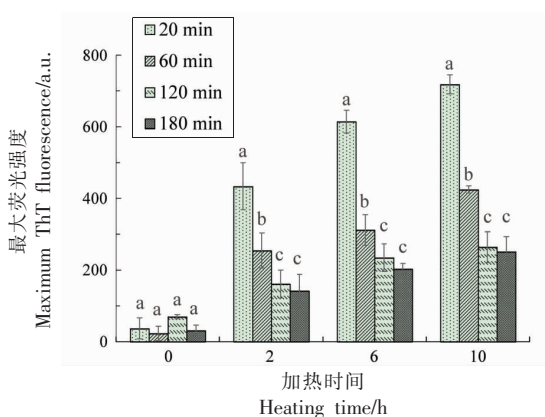
纤维在消化过程中被破坏,部分 OVT 纳米纤维在体外表现出对蛋白酶水解消化的抵抗性,这与本研究一致。在大豆蛋白原纤维中也发现类似的结果^[19]。



(a) 消化前 RAFA 的 ThT 荧光强度



(b) 胃蛋白酶水解不同阶段 RAFA 的 ThT 荧光强度变化



(c) 胰酶水解不同阶段 RAFA 的 ThT 荧光强度变化

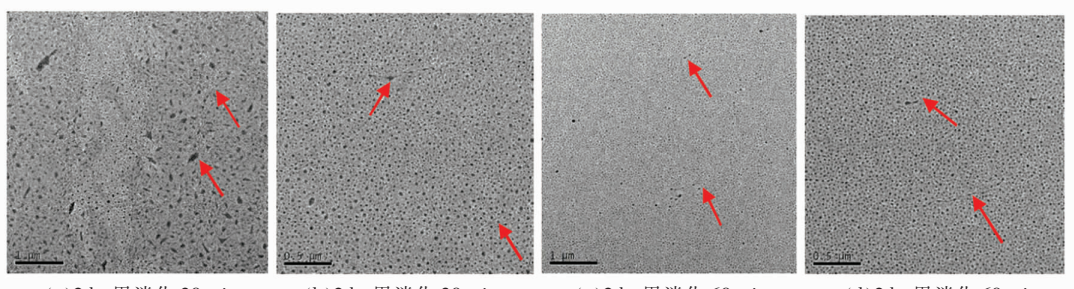
注:同一样本中,不同列的不同字母表示显著差异($P < 0.05$)。

图 4 体外模拟胃-胰消化过程中 RAFA 的 ThT 荧光强度的变化

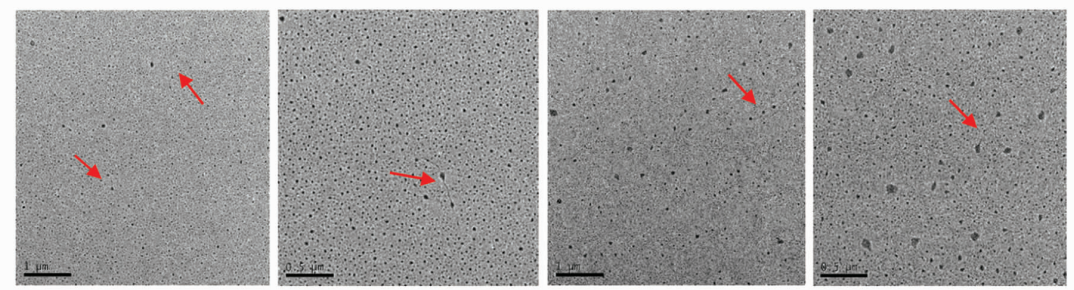
Fig.4 ThT fluorescence intensity changes of RAFA during gastro-pancreatic digestion *in vitro*

2.5.2 RAFA 消化过程的透射电镜 TEM 正如上述 ThT 荧光中表现的一样,透射电镜观察胃蛋白酶、胰酶水解后的 2,6,10 h 的 RAFA 结果见图 5 (部分结果未显示)。可以看出 2,6,10 h 的 RAFA 在体外消化时有明显的差异性,与上述 ThT 荧光结果相同,也与课题组前期试验吻合。2 h-RAFA 在胃蛋白酶水解 30 min 后有短小的纤维以及较大的颗粒,与课题组前期观察到的 2 h-RAFA 主要呈现出聚集体颗粒和短小的原纤维的结果吻合^[7]。随着胃蛋白酶水解 60 min,2 h-RAFA 的纤维保留率降低,短小纤维更少,大聚集体颗粒在胃蛋白酶的作用下变成小聚集体颗粒。另外发现 2 h-RAFA 样品中存在细长的纤维结构,说明虽然整体纤维的保留率下降,但是在消化的动态过程中,在酸性条件下出现重新自组装的现象。Bate-man 等^[8]也发现 β -乳球蛋白纤维在被胃蛋白酶水解中产生适合新组装原纤维的小分子肽,随着时间的增加(数小时到 2 d)可重新形成新的原纤维。胰酶消化后,较小的颗粒越来越少,短小的纤维几乎不存在。与胃蛋白酶相比,胰酶对 RAFA 的消化作用更有效。Ma 等^[20]在研究热诱导的 β -乳球蛋白聚集体的体外胃消化时,探讨二硫键和表面疏水性对其胃消化的影响,发现与胃蛋白酶相比,胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶对 β -乳球蛋白聚集体的消化更有效。

6 h-RAFA 和 10 h-RAFA 的体外消化趋势一致,10 h-RAFA 在胰酶消化 60 min 时的纤维结构多于 6 h-RAFA,这与 ThT 荧光测定结果中 10 h-RAFA 的纤维保留率最高保持一致。6 h-RAFA 经胃蛋白酶消化 30 min 后,存在较多的分枝状纤维;胃蛋白酶消化 60 min 时,纤维继续酶解并发生断裂,形成短小的纤维,然而仍可观察到较长的纤维和大的聚集体颗粒。胰酶作用后纤维结构减少,大的聚集体颗粒被酶解为小聚集体颗粒。6 h-RAFA 和 10 h-RAFA 在胃蛋白酶水解后仍保持较完整、可见的纤维,而热处理 0 h 和 2 h 的样品,蛋白质被胃蛋白酶水解而出现破裂,表明米谷蛋白是因蛋白纤维化才具有一定的对胃蛋白酶的抗性。López-Barón 等^[21]和 Chi 等^[22]研究了外源蛋白,如变性蛋白或小麦、大米、豌豆和大豆等的水解物,因蛋白质-淀粉的相互作用,故可以抑制纯化

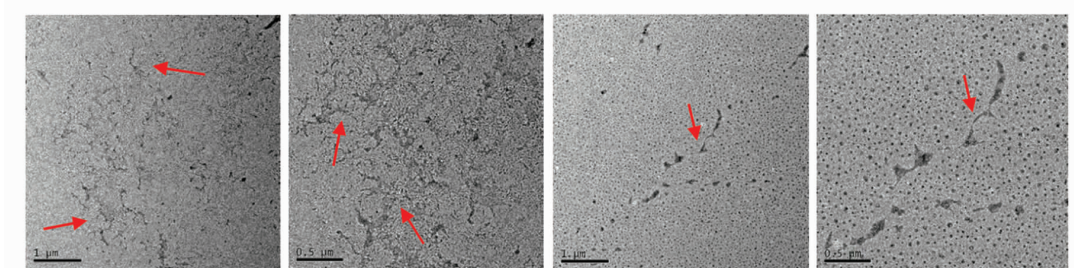


(a)2 h-胃消化 30 min (b)2 h-胃消化 30 min (c)2 h-胃消化 60 min (d)2 h-胃消化 60 min

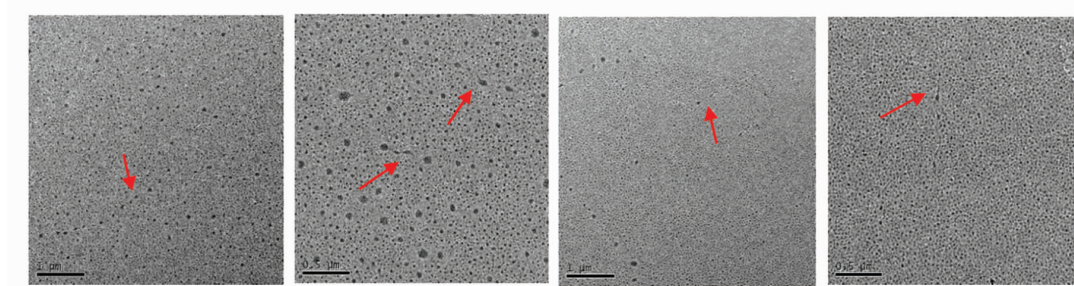


(e)2 h-胰消化 20 min (f)2 h-胰消化 20 min (g)2 h-胰消化 60 min (h)2 h-胰消化 60 min

(A)2 h-RAFA 的体外模拟胃-胰消化的各阶段

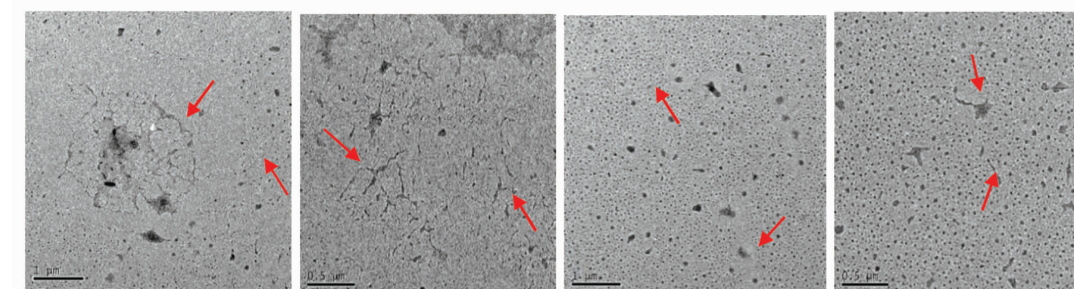


(a)6 h-胃消化 30 min (b)6 h-胃消化 30 min (c)6 h-胃消化 60 min (d)6 h-胃消化 60 min



(e)6 h-胰消化 20 min (f)6 h-胰消化 20 min (g)6 h-胰消化 60 min (h)6 h-胰消化 60 min

(B)6 h-RAFA 的体外模拟胃-胰消化的各阶段



(a)10 h-胃消化 30 min (b)10 h-胃消化 30 min (c)10 h-胃消化 60 min (d)10 h-胃消化 60 min

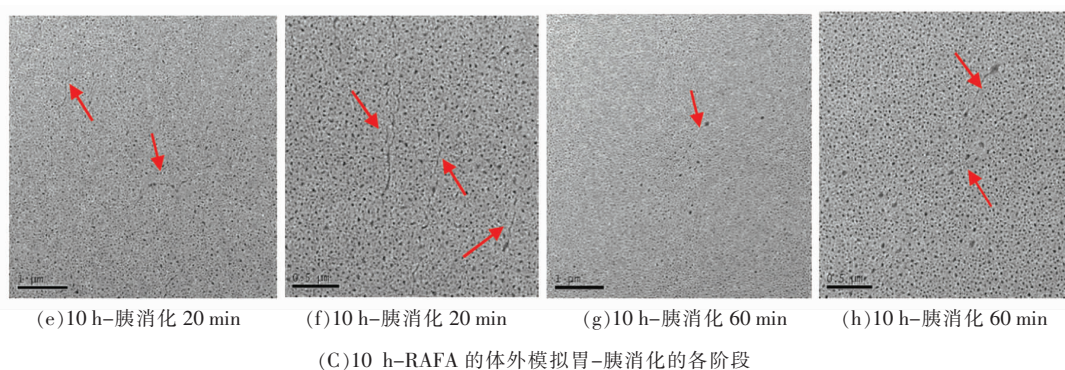


图 5 体外模拟胃-胰消化过程中 RAFA 的微观结构观察

Fig.5 Microstructure observation of RAFA during gastro-pancreatic digestion *in vitro*

小麦淀粉的淀粉水解。而 RAFA 具有的抗胃蛋白酶的消化特性，可为抑制消化率的食物原料开发提供思路。

3 结论

总的来说，在 pH 2.0, 85 °C 条件下形成的 RAFA，是蛋白质先水解后多肽重组聚集的过程，与 β -折叠结构的形成密切相关。随着热处理时间的增加，米谷蛋白形成纤维聚集体结构增加，同时 RAFA 的形成改善了米谷蛋白的难溶解性，具有较高的热稳定性。在体外消化模拟试验中，采用 ThT 荧光分析和透射电镜观察发现，6 h-RAFA 和 10 h-RAFA 在胃蛋白酶消化过程中仍能保持部分的原纤维结构，在胰酶消化过程中短小纤维和未形成纤维的蛋白聚集体较 2 h-RAFA 多，表明随热处理时间的延长，米谷蛋白在体外胃肠消化模拟中的消化性降低，且因形成蛋白淀粉样纤维聚集体结构而具有对胃蛋白酶和胰酶的抗性。本研究对 RAFA 的形成、结构和性质有了进一步的了解，对揭示蛋白质纤维聚集体对淀粉消化性的减缓机制具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] WANG J M, YANG X Q, YIN S W, et al. Growth kinetics of amyloid-like fibrils derived from individual subunits of soy β -conglycinin[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(20): 11270-11277.
- [2] CAO Y, MEZZENGA R. Food protein amyloid fibrils: Origin, structure, formation, characterization, applications and health implications[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2019, 269: 334-356.
- [3] TANG C H, ZHANG Y H, WEN Q B, et al. Formation of amyloid fibrils from kidney bean 7S globulin (Phaseolin) at pH 2.0[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(13): 8061-8068.
- [4] ARNAUDOV L N, VRIES R D, IPPEL H, et al. Multiple steps during the formation of β -lactoglobulin fibrils[J]. Biomacromolecules, 2003, 4(6): 1614-1622.
- [5] ZHENG X Q, WANG J T, LIU X L, et al. Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by protamex hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2015, 172: 407-415.
- [6] LI T, WANG L, GENG H, et al. Formation, structural characteristics, foaming and emulsifying properties of rice glutelin fibrils[J]. Food Chemistry, 2021, 354: 129544.
- [7] LI S, JIANG Z Y, WANG F X, et al. Characterization of rice glutelin fibrils and their effect on *in vitro* rice starch digestibility[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 106: 105918.
- [8] BATEMAN L, YE A, SINGH H. Re-formation of fibrils from hydrolysates of β -lactoglobulin fibrils during *in vitro* gastric digestion[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(17): 9605.
- [9] WEI Z, HUANG Q. *In vitro* digestion and stability under environmental stresses of ovotransferrin nanofibrils[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 99: 105343.
- [10] NILSSON M R. Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*[J]. Methods, 2004, 34(1): 151-160.

- [11] PENG J, CALABRESE V, VEEN S J, et al. Rheology and microstructure of dispersions of protein fibrils and cellulose microfibrils[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 82: 196–208.
- [12] AMAGLIANI L, O'REGAN J, KELLY A L, et al. The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 64: 1–12.
- [13] LOPEZ-BARON N, GU Y, VASANTHAN T, et al. Plant proteins mitigate *in vitro* wheat starch digestibility[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 69: 19–27.
- [14] MUNIALO C D, MARTIN A H, VAN DER LINDEN E, et al. Fibril formation from pea protein and subsequent gel formation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(11): 2418–2427.
- [15] LOVEDAY S M, WANG X L, RAO M A, et al. β -Lactoglobulin nanofibrils: Effect of temperature on fibril formation kinetics, fibril morphology and the rheological properties of fibril dispersions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 27(1): 242–249.
- [16] TEKIN E D. Molecular dynamics simulations of self-assembled peptide amphiphile based cylindrical nanofibers[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(82): 66582–66590.
- [17] LOHNER K, ESSER A F. Thermal unfolding and aggregation of human complement protein C9: a differential scanning calorimetry study[J]. *Biochemistry*, 1991, 30(26): 6620.
- [18] EISENBERG DS, SAWAVA MR. Structural studies of amyloid proteins at the molecular level[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2017, 86: 28125289.
- [19] LASSÉ M, ULLUWISHEWA D, HEALY J, et al. Evaluation of protease resistance and toxicity of amyloid-like food fibrils from whey, soy, kidney bean, and egg white[J]. *Food Chemistry*, 2016, 192: 491–498.
- [20] MA R, LIN Z, WU Y, et al. Modulating the *in vitro* gastric digestion of heat-induced beta-lactoglobulin aggregates: Incorporation with polysaccharide[J]. *Food Chemistry*, 2021, 354(6): 129506.
- [21] LOPEZ-BARON N, GU Y, VASANTHAN T, et al. Plant proteins mitigate *in vitro* wheat starch digestibility[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 69: 19–27.
- [22] CHI C, LI X, ZHANG Y, et al. Understanding the mechanism of starch digestion mitigation by rice protein and its enzymatic hydrolysates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 84: 473–480.

Studies on the Structural Evolution, Functional and *in Vitro* Digestive Properties of Rice Glutelin during the Self-assembly of the Amyloid Fibril Aggregates

Peng Yuan^{1,2}, Zhai Yueying^{1,2}, Liu Caiyi^{1,2}, Liu Yongle^{1,2}, Wang Faxiang^{1,2}, Li Xianghong^{1,2*}

¹School of Food & Biological Engineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha 410114

²Hunan Provincial Engineering Technology Research Center of Aquatic Food Resources Processing, Changsha 410114

Abstract Protein self-assembly to form amyloid fibril aggregates is an important means to improve and broaden the functional properties of food proteins. In this study, we investigated the functional properties of protein structure evolution, viscosity and thermal properties during the self-assembly of rice glutelin amyloid fibril aggregates (RAFA) formed by heating at pH 2.0 and 85 °C for different times, and their digestive behaviors *in vitro* digestion simulation. The results showed that at pH 2.0 and 85 °C, the high molecular weight subunits of natural rice glutelin were gradually hydrolyzed into small molecular peptides below 12 ku, and the β -sheet structure content of RAFA increased from (22.76 ± 0.49)% at 0 h to (32.11 ± 0.52)% at the peak 6 h with the extension of heating time, indicating that the formation of RAFA is a protein hydrolysis followed by peptide reorganization aggregation process. In addition, RAFA showed high thermal stability, with the Tmax value of the exothermic peak increasing from (70.34 ± 0.51)°C at 0 h to (174.55 ± 0.34)°C at 4 h of peak. The TEM results of *in vitro* digestion showed the same trend of fiber digestion for 6 h and 10 h of heat treatment. After 60 min of pepsin digestion, a part of long fibers with branched shape was enzymatically dissolved into short fibers, while larger aggregate particles were observed; with the reduction of fiber structure after pancreatic enzyme action, large aggregate particles were enzymatically dissolved into small aggregate particles, so RAFA exhibited pepsin resistance. This study provides a theoretical basis for the construction of novel foods using protein fiber aggregates.

Keywords rice glutelin; amyloid fibril aggregate; structural evolution; *in vitro* digestion