

精白保胚米发芽过程中米谷蛋白及其氨基酸的变化

李向红, 刘永乐*, 俞 健, 王发祥, 王建辉, 王满生

(长沙理工大学食品与生物工程系, 湖南省水生资源食品加工工程技术研究中心, 湖南 长沙 410114)

摘要: 研究精白保胚米发芽过程中米谷蛋白及其氨基酸组成的变化。精白保胚米在发芽过程中, 淀粉含量呈下降趋势, 蛋白质的含量略有上升; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和体积排阻色谱的结果显示: 发芽后米谷蛋白中含量较高的各亚基分子质量没有太大差别, 但其含量有所变化, 高分子质量亚基含量减少, 低分子质量亚基含量增多。米谷蛋白氨基酸分析结果发现: 发芽可以增加精白保胚米总氨基酸和必需氨基酸的含量, 必需氨基酸组成模式更加合理。分析结果表明发芽可以提高精白保胚米的食物品质和营养价值。

关键词: 精白保胚米; 发芽; 谷蛋白; 氨基酸分析

Changes in Protein and Amino Acids in Polished Rice with Intact Germ during Germination

LI Xianghong, LIU Yongle*, YU Jian, WANG Faxiang, WANG Jianhui, WANG Mansheng

(Hunan Provincial Engineering Technology Research Center of Aquatic Food Resources Processing, Department of Food and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114, China)

Abstract: Changes in protein and amino acids in polished rice with intact germ during germination were investigated. The results showed that the starch content of polished rice with intact germ left intact decreased, while the protein content increased slightly during germination. SDS-PAGE and SEC-HPLC analysis demonstrated that the subunit compositions of polished rice were not affected significantly by germination, but the subunit contents were changed. The fractions of high molecular weight decreased, and correspondingly, the contents of subunits with low molecular weight increased. The results of amino acid analysis showed that the contents of total amino acids and essential amino acids increased during germination, and the essential amino acid pattern became more reasonable, suggesting that germination can improve the eating quality and nutritional value of polished rice with intact germ.

Key words: polished rice with intact germ; germination; rice gluten; amino acid analysis

中图分类号: TS213.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)01-0037-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201501007

研究表明, 精白保胚发芽米食用品质优于精白保胚米、糙米和发芽糙米^[1], 其营养价值有所提高^[2]。精白保胚米发芽过程中, 所含的淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶等被激活和释放, 各种淀粉酶的作用使得精白保胚米中淀粉含量下降, 总糖和葡萄糖含量增加^[2]; 同时, 精白保胚米中的蛋白质也在蛋白酶的作用下发生了一系列的变化, 影响了精白保胚米的食物品质和营养价值。目前, 对于发芽糙米的研究较多, 对于精白保胚米发芽过程中蛋白质分子质量以及氨基酸组分的变化尚未见报道; 并且前人大都是对糙米米粉进行氨基酸组分分析^[3], 单独对米谷蛋白氨基酸分析的报道很少。由于精白保胚米的蛋白质

主要是米谷蛋白, 因此本实验对精白保胚米中米谷蛋白的亚基、氨基酸组成以及 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的含量变化进行了分析, 为精白保胚发芽米产品的开发以及综合利用提供了一定的数据支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

精白保胚米的原料为东北粳稻(空育131), 购自黑龙江北大荒种业集团有限公司。

收稿日期: 2014-02-16

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD31B08); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31101214; 31201427); 湖南省自然科学基金项目(13JJ4054; 12JJ6028); 湖南省教育厅优秀青年基金项目(14B009)

作者简介: 李向红(1979—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为农产品深加工与蛋白质工程。E-mail: xianghongl@163.com

*通信作者: 刘永乐(1962—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术与大宗农产品加工技术。E-mail: lyle19@163.com

氨基酸标准品(生化试剂纯)、 β -巯基乙醇 国药集团化学试剂有限公司; 溴酚蓝 汕头市西陇化工厂有限公司; 氢氧化钠、浓盐酸、十二烷基硫酸钠、标准牛血清白蛋白、丙烯酰胺、 N,N' -亚甲基双丙烯酰胺均为市售分析纯级。

1.2 仪器与设备

精白保胚米制米机组 湖南省湘粮机械制造有限公司; MJ-II 霉菌培养箱 上海一恒科技有限公司; UV2600 紫外-可见分光光度计 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; FW100型高速万能粉碎机 天津泰斯特仪器有限公司; DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器 巩义市予华仪器有限责任公司; DELTA 320 pH计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; SK-1型快速混匀器 金坛市医疗仪器厂; LG10-24A高速离心机 北京金立离心机有限公司; FD-1真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; 迷你型垂直电泳槽、YY-5型稳压稳流电泳仪 北京市六一仪器厂; 氨基酸自动分析仪 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 精白保胚米发芽工艺

精白保胚米发芽工艺参考文献[4]。

1.3.2 常规成分检测

蛋白质含量的测定: 参照GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》中凯氏定氮法, 氮换算为蛋白质的系数为5.95^[5]; 淀粉含量的测定: 硫酸-蒽酮法^[6]; 还原糖含量的测定: 直接滴定法^[7]; 脂肪含量的测定: GB/T 5512—2008《粮油检验 粮食中粗脂肪含量测定》中索氏抽提法^[8]; 水分含量的测定: GB 5009.3—2010《食品中水分的测定》中直接干燥法^[9]。

1.3.3 米谷蛋白的提取

采用分步法提取米谷蛋白, 工艺流程参考文献[10]。

1.3.4 米谷蛋白分子质量的测定

采用垂直板十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)蛋白电泳法测定米谷蛋白分子质量, 分离胶质量分数为12.5%和浓缩胶质量分数为4%。以相对分子质量 $64 \times 10^4 \sim 14 \times 10^4$ 的标准蛋白为标准, 样品用0.05 mol/L NaOH预处理。电泳同时用考马斯亮蓝R250染色5 h左右, 脱色至电泳带清晰即可。

1.3.5 米谷蛋白分子质量分布的测定

采用体积排阻色谱-高效液相色谱(size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography, SEC-HPLC)法测定米谷蛋白的相对分子质量分布。将米谷蛋白用磷酸盐缓冲液(2% SDS, pH 7.0)溶解配制成5 mg/mL的分散液, 8 000 r/min离心15 min后取上清液用0.45 μ m微孔滤膜过滤, 使用岛津LC-20A高效液相系统与Shodex KW-804蛋白柱分析米谷蛋白样品的分子质量分

布。流动相为200 mmol/L的磷酸盐缓冲溶液(2% SDS, pH 7.0), 洗脱速率1 mL/min, 在280 nm波长处检测洗脱液, 柱温为20 $^{\circ}$ C。

1.3.6 米谷蛋白氨基酸组分分析^[11]

精密称取样品0.05 g左右样品于20 mL安培瓶中, 加入10 mL 6 mol/L盐酸于酒精喷灯上封口, 于110 $^{\circ}$ C加热12 h。取出冷后过滤, 取0.2 mL于60 $^{\circ}$ C水浴吹干, 加入1.0 mL流动相溶解并转入1.5 mL离心管中, 于12 000 r/min离心3 min, 置于4 $^{\circ}$ C条件下避光保存。取5 μ L样品于1.5 mL离心管中, 加入50 μ L衍生试剂, 涡旋振荡1 min。取20 μ L注入氨基酸自动分析仪。记录色谱图, 计算峰面积, 以样品的峰面积与标准的峰面积比较定量, 以保留时间定性。

其中氨基酸评分(amino acid score, AAS)的计算公式为:

$$\text{AAS}/\% = \frac{\text{米谷蛋白中氨基酸含量}/(\text{mg/g pro})}{\text{鸡蛋蛋白质中氨基酸含量}/(\text{mg/g pro})} \times 100$$

必需氨基酸指数(essential amino acid index, EAAI)的计算方法为: 米谷蛋白的必需氨基酸含量与鸡蛋蛋白质中必需氨基酸含量比值的几何平均数。

1.3.7 γ -氨基丁酸含量的测定

色谱柱: Waters AccQ•TagTM氨基酸分析柱(3.9 mm \times 150 mm, 4 μ m)。流动相: 流动相A为140 mmol/L醋酸钠加17 mmol/L三乙胺, 用稀 H_3PO_4 调整pH值到5.02; 流动相B为乙腈; 流动相C为水。流速为1 mL/min, 紫外检测波长248.0 nm, 柱温37 $^{\circ}$ C, 进样量10 μ L。

2 结果与分析

2.1 常规成分分析

表1 大米主要成分含量分析

Table 1 Proximate composition of different rice samples

项目	水分	蛋白质	淀粉	还原糖
精白保胚米	8.28	7.64	91.32	0.50
发芽12 h	9.61	8.50	89.16	0.98
发芽24 h	9.78	8.78	86.72	3.07

注: 表中数据均以干基计。

由表1可知, 发芽可略微增加精白保胚米中蛋白质的含量, 大米蛋白中的氨基酸相比其他谷物蛋白来说较平衡, 易被消化吸收^[12], 说明发芽可以提高精白保胚米蛋白质的生物利用率^[13]。同时, 发芽过程中, 随着 α -淀粉酶和 β -淀粉酶活力的不断提高, 淀粉不断被降解为还原糖等物质, 淀粉含量有所减少, 还原糖含量增加。

2.2 米谷蛋白分子质量测定结果分析

2.2.1 SDS-PAGE

根据低分子质量标准蛋白曲线以及用Gel-Pro

Analyzer 4.5凝胶分析软件对电泳图进行分析,得到各个泳道中蛋白带的分子质量与其相应的积分光密度值,结果见表2。

表2 精白保胚米及发芽米中米谷蛋白各个蛋白带的积分光密度值分析
Table 2 Optical density of each protein band of rice gluten in polished rice with intact germ and germinated rice

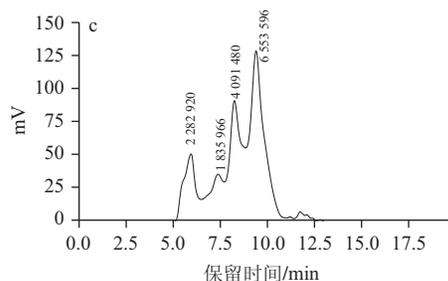
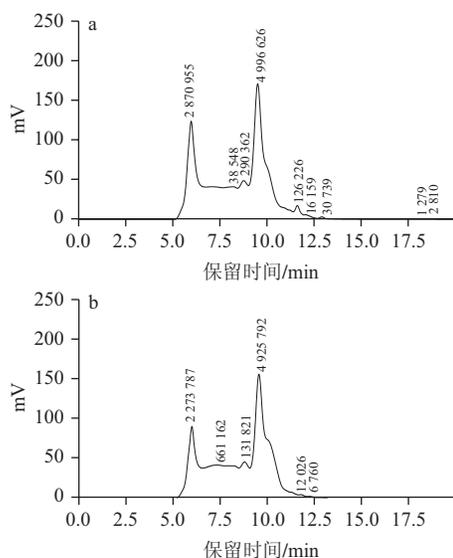
分子质量/kD	精白保胚米	发芽12 h	发芽24 h
64.4	218.15	163.16	157.55
47.7	186.98	179.37	175.49
34.5	315.15	342.51	347.58
17.3	279.72	314.96	320.27

注:表中积分光密度值为OD_{280nm}值与相应峰面积的乘积。

由表2可知,精白保胚米发芽后,米谷蛋白中含量较高的各亚基分子质量没有太大差别,而含量有所变化。其中分子质量为64.4 kD和47.7 kD的部分其含量有所降低,这部分对应的是米谷蛋白中 α 和 β 亚基的聚集体^[14-15],发芽过程中,蛋白酶活性增大,使得蛋白质聚集体分解为亚基,导致分子质量较小的亚基含量增加,甚至生成部分氨基酸。前人研究发现,大米中清蛋白、球蛋白和米谷蛋白在陈化过程中均表现出高分子质量部分含量增多,低分子质量亚基含量减少的趋势^[16],而大米陈化过程中其食用品质有所下降,主要表现在米饭黏性的下降,可能与高分子质量部分含量增多,低分子质量亚基含量减少有关,因此精白保胚米发芽后食用品质有所提高可能也与其高分子质量部分含量减少,低分子质量亚基含量增多有关。

2.2.2 SEC-HPLC

采用SEC-HPLC进一步测定了米谷蛋白的分子质量分布,见图1。图中所列数据为每个峰的相对峰面积。结果进一步验证了SDS-PAGE的结果,保留时间为6.0 min左右的大分子质量的部分随着发芽的进行逐级减少,伴随着小分子质量部分的增加,发芽24 h后,保留时间为9.0 min左右的部分增加较为明显。



a. 精白保胚米; b. 发芽12 h; c. 发芽24 h。

图1 精白保胚米及发芽米中米谷蛋白的体积排阻色谱

Fig.1 SEC-HPLC of rice gluten in polished rice with intact germ and germinated rice

2.3 米谷蛋白氨基酸组分变化分析

表3 精白保胚米及发芽米中米谷蛋白氨基酸含量变化

样品	g/100 g		
	精白保胚米	发芽12 h	发芽24 h
天冬氨酸 (Asp)	9.13	8.72	9.32
谷氨酸 (Glu)	17.20	15.04	16.13
组氨酸 (His)	4.33	3.98	4.27
丝氨酸 (Ser)	2.95	2.92	2.89
甘氨酸 (Gly)	4.21	3.89	4.08
苏氨酸 (Thr)	3.33	3.05	3.24
精氨酸 (Arg)	8.07	7.70	8.10
丙氨酸 (Ala)	5.07	4.72	4.98
酪氨酸 (Tyr)	4.54	4.29	4.47
蛋氨酸 (Met)	1.99	1.62	1.36
缬氨酸 (Val)	6.52	6.10	6.65
苯丙氨酸 (Phe)	5.93	5.47	5.81
异亮氨酸 (Ile)	4.55	4.38	4.52
亮氨酸 (Leu)	7.60	7.00	7.52
赖氨酸 (Lys)	3.31	3.34	3.37
γ -氨基丁酸 (GABA)	0.007 8	0.010 2	0.017 3

由表3可知,精白保胚米及其发芽米的Leu、Ile、Met、Thr、Lys和Ser含量随着发芽有所增加。由于谷蛋白中赖氨酸是第一限制氨基酸,因此通过发芽的方式可提高精白保胚米的蛋白质质量;同时,赖氨酸含量提高,有利于大米风味改善^[17]。Glu是精白保胚米及其发芽米的主要氨基酸,在发芽过程中谷氨酸脱羧酶被激活,以谷氨酸为底物脱去羧基生成GABA,其含量在发芽后大幅升高,由于每日补充微量的GABA有利于心脑血管的缓解,促进人体内氨基酸代谢的平衡,调节免疫功能^[18-19],因此精白保胚米在发芽后营养价值有显著提高;此外,精白保胚米内的蛋白酶会水解部分蛋白质生成一定量的谷氨酸。精白保胚米发芽过程中谷氨酸含量是下降的,可能原因是谷氨酸脱羧酶在发芽过程中占主导作用,强于蛋白酶的水解作用。

表4 精白保胚米及发芽米中米谷蛋白必需氨基酸组成
Table 4 Essential amino acid pattern of rice gluten in polished rice with intact germ and germinated rice

样品	g/100 g			
	精白保胚米	发芽12 h	发芽24 h	FAO/WHO模式
Lys	3.31	3.34	3.37	5.5
Ile	4.55	4.38	4.52	4.0
Leu	7.60	7.00	7.52	7.0
Phe+Tyr	10.47	9.76	10.28	6.0
Thr	3.33	3.05	3.24	4.0
Val	6.52	6.10	6.65	5.0

注：FAO/WHO. 联合国粮食及农业组织 (The Food and Agriculture Organization of the United Nations) / 世界卫生组织 (World Health Organization)。

精白保胚米中米谷蛋白的必需氨基酸组成 (表4) 与FAO/WHO模式相比较, Leu、Phe+Tyr和Val含量高于模式值, Lys和Thr含量均要低, Ile含量接近于FAO/WHO模式。发芽后, Lys含量略微增加, Leu、Phe+Tyr值略降低, Ile含量接近于FAO/WHO模式, 从而说明精白保胚米在发芽后必需氨基酸 (essential amino acid, EAA) 组成模式比发芽前稍趋合理。

表5 精白保胚米及发芽米中米谷蛋白氨基酸评分和必需氨基酸指数
Table 5 Amino acid scores and essential amino acid indexes of rice gluten in polished rice with intact germ and germinated rice

样品	AAS						EAAI
	Lys	Ile	Leu	Phe+Tyr	Thr	Val	
精白保胚米	60	114	109	175	83	130	61
发芽12 h	61	110	100	163	76	122	68
发芽24 h	61	113	109	171	83	133	73

由表5可知, 发芽后精白保胚米中Lys的AAS虽有增加, 但仍是限制性氨基酸。发芽米的EAAI高于未发芽米, EAAI越大, 表明蛋白质的质量和利用率越高, 因此, 发芽后精白保胚米的蛋白质营养品质得到较大改善。

蛋白质中氨基酸的组成特性对蛋白质的品质会产生很大的影响。精白保胚米发芽后, 限制性氨基酸如赖氨酸和苏氨酸含量增加, 部分氨基酸含量高于FAO/WHO推荐模式, 与发芽绿豆结果一致^[20], 表明发芽可以进一步改善精白保胚米氨基酸的组成特性, 显著提高其蛋白质品质。

3 结论

本实验从发芽过程中米谷蛋白的分子质量及氨基酸组成变化的角度初步阐明了发芽对精白保胚米食用品质及营养价值的影响。精白保胚米在发芽过程中, 淀粉含量呈下降趋势, 蛋白质的含量略有上升; 发芽后米谷蛋

白中含量较高的各亚基分子质量没有太大差别, 而含量有所变化, 高分子质量亚基含量减少, 低分子质量亚基含量增多; 发芽可以增加精白保胚米蛋白质、总氨基酸和必需氨基酸的含量, 必需氨基酸指数提高, 与FAO/WHO模式相比, 精白保胚发芽米的必需氨基酸组成模式稍趋合理, 说明通过发芽可以提高精白保胚米的食用品质和营养价值。因此, 发芽处理是改造精白保胚米风味、提高营养价值的有效途径, 为精白保胚米的开发和应用开辟了一条新的加工途径。

参考文献:

- 伍君妮, 刘永乐, 李向红, 等. 精白保胚发芽米食用品质[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 161-165.
- 李向红, 刘永乐, 俞健, 等. 精白保胚米发芽过程中淀粉酶及相关营养成分的变化[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 37-40.
- 郑艺梅, 李群, 华平. 发芽对糙米蛋白质及氨基酸组成特性的影响[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(5): 11-15.
- 张冬生, 刘永乐, 李向红, 等. 精白保胚发芽米淀粉的理化性质[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 177-181.
- 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.5—2010 食品中蛋白质的测定[S].
- 袁道强, 黄建华. 生物化学实验和技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 126-132.
- 阮满堂. 直接滴定法测定糖果中还原糖含量[J]. 轻工科技, 2012(7): 8-9.
- 中华人民共和国卫生部. GB/T 5512—2008 粮食中粗脂肪含量的测定: 索式抽提法[S].
- 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.3—2010 食品中水分的测定[S].
- 李向红, 周小玲, 刘永乐, 等. 正交试验优化谷氨酰胺酶改性米谷蛋白工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(4): 47-50.
- GULEWICZ P, MARTINEZ-VILLALUENGA C, FRIAS J, et al. Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds[J]. Food Chemistry, 2008, 107: 830-844.
- FAO/WHO. Protein quality evaluation[C]// FAO food and nutrition paper No.51, Rome, 1991.
- REEMA, HIRA C K, SADANA B. Nutritional evaluation of supplementary foods prepared from germinated cereals and legumes[J]. Journal of Food Science and Technology, 2004, 41(6): 627-629.
- KATSUBE-TANAKA T, DULDULAO J B A, KIMURA Y, et al. The two subfamilies of rice glutelin differ in both primary and higher-order structures[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1699(1): 95-102.
- van der BORGHT A, VANDEPUTTE G E, DERYCKE V, et al. Extractability and chromatographic separation of rice endosperm proteins[J]. Journal of Cereal Science, 2006, 44(1): 68-74.
- 闫清平, 朱永义. 大米淀粉、蛋白质与其食用品质关系[J]. 粮食与油脂, 2001(5): 29-32.
- 李里特. 烘焙食品与饮食文化[J]. 食品科技, 2002, 27(4): 28-30.
- 何熙璞, 张敏, 李俊芳. γ -氨基丁酸的生理学功能及研究现状[J]. 广西大学学报: 自然科学版, 2007, 9(增刊1): 465-466.
- 茅原, 杉浦友美. 近年のGABA生理機能研究(脳機能改善作用、高血圧作用を中心に)[J]. 食品と開発, 2001, 36(6): 4-6.
- MUBARAK A E. Nutritional composition and anti-nutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes[J]. Food Chemistry, 2005, 89(4): 489-495.