

不同米蛋白组分与镉的结合规律

Study on the binding behaviors of cadmium to different fractions of rice proteins

冯 伟^{1,2} 王 涛^{1,2} 董田田^{1,2} 徐鹏程^{1,2}
FENG Wei^{1,2} WANG Tao^{1,2} DONG Tian-tian^{1,2} XU Peng-cheng^{1,2}
李克强² 张添琪^{1,2} 王 韧^{1,2} 陈正行^{1,2}
LI Ke-qiang² ZHANG Tian-qi^{1,2} WANG Ren^{1,2} CHEN Zheng-xing^{1,2}

(1. 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)
(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:对制备的 4 种不同米蛋白样品与镉进行结合动力学、热力学分析,结果表明:4 种蛋白与镉结合的速度均非常快,30 min 就达到了反应平衡;其中,醇溶蛋白与镉的结合量最高(23.78 mg/g),球蛋白的 q 值最低(3.64 mg/g);结合过程符合准二级动力学模型;与 Freundlich 模型相比,Langmuir 模型能更好地用来描述 4 种蛋白的等温吸附;结合反应的 ΔG° 值均为负值,而 ΔH° 均为正值,表明都是自发的吸热反应;酶提蛋白、谷蛋白、醇溶蛋白的 ΔH° 分别为 41.44, 40.32, 58.75 kJ/mol,推测它们与镉的结合是配位结合,其中醇溶蛋白可能是多齿配位;氨基酸组成的不同,可能是影响 4 种米蛋白与镉结合的主要因素,谷氨酸和天冬氨酸含量之和与 q 值的相关性达到了 0.967。

关键词:米蛋白;镉;结合规律;等温吸附;模型

Abstract: Rice pollution by cadmium in China is becoming a crucial problem in food safety. It is of great importance for the future design of cadmium-removal strategy by studying the binding behaviors of cadmium to different fractions of rice proteins (RPs). In this study, the thermodynamics and kinetics involved in the bindings of cadmium to four different RP fractions, *i.e.*, glutelin, prolamin, globulin and enzyme-extracted proteins, were investigated. The results showed that cadmium was readily bound to each fraction of RPs, and the equilibrium was attained within 30 min. Of all the protein fractions, prolamin obtained the highest binding capacity with a binding q of 23.78 mg/g, whereas globulin had the lowest binding of 3.64 mg/g.

基金项目:粮食公益性行业科研专项(编号:201513006);无锡市科技发展资金现代农业前瞻性与其性关键技术类项目(编号:WX0302B010504180011PB)

作者简介:冯伟,男,江南大学在读博士研究生。

通信作者:陈正行(1960—),男,江南大学教授,博士研究生导师,博士。E-mail: zxchen_2008@126.com

收稿日期:2018-08-05

The bindings of cadmium to all of the protein fractions belonged to a quasi-second-order kinetics model, and two experimental models, *i.e.*, Freundlich and Langmuir equations were applied to the reactions. Compared to Freundlich equation, Langmuir equation displayed better fitting of the binding reactions. The fitting parameters $\Delta G^\circ < 0$ and $\Delta H^\circ > 0$ indicated that the bindings were spontaneous and endothermic. The bindings of cadmium to enzyme-extracted proteins, glutelin, and prolamin had ΔH° of 41.44, 40.32, and 58.75 kJ/mol, respectively, implying that the bindings were due to coordinating, and the binding of cadmium to prolamin was a result of multidentate coordination. The differences in amino acid compositions might attribute to the variations of the bindings. It was found that the sum of glutamic acid and aspartic acid was significantly correlated with the q value with a correlation coefficient of 0.967.

Keywords: rice protein; cadmium; binding behaviors; adsorption isotherm; model

重金属镉摄入对人体健康有很大危害^[1]。在中国南方很多区域的耕地受到重金属镉污染^[2-3],而与其他谷物相比,大米更容易从土壤中吸附镉^[4],已经成为当地居民身体中镉最主要的来源^[5]。

大米中镉主要是和蛋白质相结合^[6-7]。现有研究^[8-10]对大米中镉结合蛋白的分布、存在形式做了探索,也有报道通过物理研磨^[11]、浸泡^[12]、微生物发酵^[13-14]可以部分脱除大米中镉。但目前还没有对大米蛋白与镉结合特性的研究报道,因而缺乏对稻米制品加工过程中脱除镉的指导依据。

利用蛋白质数据库(Protein Data Bank, PDB)分析发现,在生物系统中各种氨基酸残基参与金属离子配位的频率最高的是谷氨酸(Glu)和天冬氨酸(Asp)的羧基,组氨酸(His)的咪唑基团以及半胱氨酸(Cys)的巯基^[15-16]。大米蛋白中

富含谷氨酸、天冬氨酸,也含有少量半胱氨酸和组氨酸^[17],有大量的金属离子结合位点,而且蛋白质分子具有复杂的空间结构,可以形成多种形式的多齿配体组合,从而强化与金属离子形成配合物的稳定性^[18]。

大米蛋白从组成上可以分为清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白^[19-20],依据提取方式的不同,又可分为碱法提取米蛋白(ARPS)和淀粉酶法提取米蛋白(ERPS)^[21-22]。清蛋白主要分布在米糠中,且水溶性好,比较容易脱除。目前市售的食品级大米蛋白都是源自工业上以碎米为原料生产淀粉糖或发酵制品时获得的酶提米蛋白。

本试验拟以大米中提取的球蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白和ERPS为研究对象,分析时间、温度、镉浓度对蛋白与镉结合的影响,并通过动力学模型和等温吸附模型的建立,进一步探讨不同米蛋白组分与镉结合的机制以及与其氨基酸组成的关系,以期为米制品加工过程中镉的脱除提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

早籼稻谷:湘早籼 24 号,湖南聚宝金昊农业高科有限公司;

α -淀粉酶(Termamyl 120L):100 000 U/mL,诺维信公司;

氯化镉、氯化钠、盐酸、氢氧化钠等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器和设备

砻谷机:Satake-THU 35G 型,日本佐竹公司;
碾米机:Satake-TM 05G 型,日本佐竹公司;
冲击磨:XFB-500 型,中国中湘制药机械厂;
水浴振荡床:BS-21 型,南京荣华科学器材有限公司;
冻干机:Beta2-8plus 型,德国 Christ 公司;
高速离心机:Beckman Coulter Avanti J-26 XP 型,美国贝克曼库尔特公司;

微波消解仪:WX-6000 型,上海屹尧仪器科技发展有限公司;

原子吸收光谱仪:Aanalyst 600 型,珀金埃尔默仪器有限公司;

扫描电镜:TM-3030 型,日本 Hitachi 公司;

超纯水系统:Millipore-Q 型, $\geq 18\text{ M}\Omega/\text{cm}$,美国 Millipore 公司;

全自动氨基酸分析仪:L-8800 型,日本 Hitachi 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 大米粉制备 稻谷采用砻谷机脱去颖壳获得糙米,然后采用碾米机进行碾米脱除 10%米糠,获得的大米经粉碎并过 80 目筛,制得大米粉。

1.3.2 ERPS 的制备 参照 Morita 等^[23]的方法并加以改良,以上述大米粉为原料,调整米浆浓度为 30 g/100 g, pH 6.0,加入 0.05 g/100 g 的高温 α -淀粉酶,97 ℃水浴搅拌反应 90 min,反应结束后,真空抽滤,滤饼用 3 倍的沸水调浆,pH 调至 7.0,通过胶磨粉碎后,再次进行真空抽滤,最终

滤饼在 50 ℃烘箱烘干后,粉碎过 80 目筛,得到 ERPS。

1.3.3 不同米蛋白组分的制备 参考改良 Osborn 连续提取法^[24],称取 100 g 大米粉用 500 mL 石油醚浸泡,搅拌 3 h 后,在 4 000 r/min 离心 10 min,弃去上层有机相,在通风厨内通风挥发 24 h,得到脱脂米粉样品。在室温条件下将脱脂米粉分别按照 1:8 (g/mL) 比例,用超纯水、2 g/100 mL NaCl、70%乙醇(体积比)溶液、0.1 mol/L NaOH 连续提取,每次提取时间为 4 h,提取后采用 4 000 r/min 离心 10 min,所获得盐提上清液、碱提上清液,分别用 0.1 mol/L 盐酸调节至等电点沉淀蛋白,醇提液用氮吹仪吹干,将所提取的蛋白,再次用去离子水洗涤后,冷冻干燥即可得到球蛋白、谷蛋白和醇溶蛋白。将谷蛋白按照 1:8 (g/mL) 的比例分散在去离子水中,加热煮沸 15 min 后,再离心分离,沉淀物冻干后,即为热变性的谷蛋白。

1.3.4 米蛋白与镉的结合反应 精确称取 0.06 g 不同的米蛋白,分别置于一系列 50 mL 聚乙烯离心管中,加入 10 mL 的 Tris-HCl(pH 7.5)缓冲溶液,超声振荡 2 min 后,加入一定体积的已知浓度的 CdCl₂ 溶液,再用上述 Tris-HCl 缓冲溶液补充至 20 mL。盖紧盖子后,置于设定好温度的恒温水浴振荡器中,以 180 r/min 速度振荡一定时间,反应结束后,立即在 8 000 r/min 离心 2 min,上清液用定量滤纸过滤后,采用原子吸收法测定其镉浓度。

米蛋白的镉结合量按式(1)计算:

$$q=(c_0-c_1)\times\frac{v}{m},\tag{1}$$

式中:

q ——米蛋白的镉结合量,mg/g;

c_0 ——溶液中镉的初始浓度,mg/L;

c_1 ——反应后溶液中镉的浓度,mg/L;

m ——米蛋白质量,g;

v ——溶液体积,L。

1.3.5 米蛋白与镉的结合动力学、等温吸附模型建立

(1) 动力学模型建立:参照 1.3.3 的反应方法,设定初始镉浓度为 100 mg/L,反应温度为 303 K,反应时间分别选取 1,3,5,10,30,60,120 min,测定反应后溶液中镉的浓度,并采用目前广泛使用的 3 种模型,分别为准一级动力学模型、准二级动力学模型和 Elovich 模型^[25],研究吸附时间与单位吸附量的关系,建立吸附动力学模型,得到吸附速率和吸附机制。

准一级动力学模型:

$$q_t=q_e[1-\exp(-k_1t)],\tag{2}$$

式中:

q_e ——平衡吸附量,mg/g;

k_1 ——准一级动力学模型速率常数,min⁻¹;

t ——吸附时间,min。

准二级动力学模型:

$$q_t=\frac{k_2q_e^2t}{1+k_2q_et},\tag{3}$$

式中:

k_2 ——准二级动力学模型速率常数, $\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。
 $t=0$ 时吸附速率 h 可以通过式(4)进行计算^[26]：
$$h=k_2q_e^2。$$
 (4)
Elovich 模型：
$$q_t=a+b\ln(t)，$$
 (5)
式中：
 $a、b$ ——反应常数。

(2) 等温吸附模型的建立：参照 1.3.3 的反应方法，设定不同初始镉浓度为 10, 20, 40, 60, 80, 100 mg/L ，在 288, 303, 318 K 条件下，分别测试 4 种米蛋白与镉的结合能力，绘制吸附等温曲线，并采用 Langmuir(L)模型和 Freundlich(F)模型进行拟合^[27]，其方程式如下：

$$q_e=\frac{q_{\max}K_Lc_e}{1+K_Lc_e}，$$
 (6)

$$q_e=K_Fc_e^{\frac{1}{n}}，$$
 (7)

式中：
 q_e ——平衡吸附量, mg/g ；
 $q_{\max}$ ——吸附剂的饱和吸附量, mg/g ；
 c_e ——平衡浓度, mg/L ；
 K_L ——L 模型的吸附平衡常数，与吸附剂和吸附质的结合强度有关；

K_F ——F 模型的吸附平衡常数, K_F 越大，吸附能力越强；
 n ——与吸附强度有关的 F 模型常数。

(3) 热力学参数确定：参考 Özcan 等^[28]的方法，吸附过程的热力学参数吉布斯自由能可以通过式(8)计算得到。

$$\Delta G^{\circ}=-RT\ln K_L，$$
 (8)

式中：
 ΔG° ——吉布斯自由能, kJ/mol ；
 R ——气体通用常数, 8.314 J/mol ；
 T ——绝对温度, K 。

焓变 ΔH° (kJ/mol) 和 熵变 ΔS° (J/mol) 则可以通过式(9) 求出：

$$\ln K_L=\frac{-\Delta G^{\circ}}{RT}=\frac{\Delta H^{\circ}}{RT}+\frac{\Delta S^{\circ}}{R}。$$
 (9)

以 $\ln K_L$ 和 $1/T$ 作图可获得一条直线，再通过该直线的斜率和截距分别计算出 ΔH° 和 ΔS° 。

1.3.6 镉浓度的测定 参照 GB 5009.15—2014，设定仪器的波长为 228.8 nm、电流为 4 mA、狭缝为 0.5 nm，调整背景为塞曼效应。试样的预处理采用微波消解法。

1.3.7 理化指标测定

(1) 蛋白质含量：按 GB 5009.5—2016 中凯氏定氮法执行。

(2) 水分含量：按 GB 5009.3—2016 中直接干燥法执行。

1.3.8 扫描电镜分析(SEM) 取些许样品置于导电胶表面，对样品进行喷金处理。采用扫描电镜在 10 kV 下观察粉末状样品的微观结构。

1.3.9 氨基酸分析 采用氨基酸分析仪测定不同种类氨基酸组分的含量，蛋白样品测定前须用 6 mol/L HCl 于充氮管

中充分酸水解(110 $^{\circ}\text{C}$ ，24 h)，具体方法参考 GB/T 5009.124—2003。

1.4 数据处理

用 Excel 软件对数据进行统计分析，结果以平均值标准差($X\pm SD$)表示，用 Origin 9.0 软件对数据进行绘图，并用 SPSS 21.0 软件对数据进行 ANOVE 方差分析及相关性分析。

2 结果与讨论

2.1 不同米蛋白样品的蛋白含量

由表 1 可见，原料大米粉中的蛋白含量只有 8.53%，几种蛋白经过提纯后蛋白含量都达到了 80% 以上，谷蛋白的蛋白含量最高(86.26%)，ERPS 蛋白含量最低(82.12%)，球蛋白、醇溶蛋白分别达到了 84.38% 和 85.54%。EPRS 蛋白浓度最低，主要是蛋白提取方式造成的，因为酶法工艺是将淀粉水解，蛋白高温变性后，将蛋白过滤分离所得，基本上所有米蛋白组分都在沉淀物中，同时脂肪、纤维等非水溶性的物质也都留在蛋白中，所以得率高，但纯度相对较低。

表 1 不同米蛋白样品的蛋白质含量	
Table 1 Protein contents in different protein samples %	
蛋白样品	蛋白含量
大米粉	8.53±0.34
ERPS	82.12±0.26
球蛋白	84.38±0.52
醇溶蛋白	85.54±0.46
谷蛋白	86.26±0.49

2.2 不同米蛋白组分与镉结合的吸附动力学

图 1 给出了米蛋白吸附镉的 q 值与反应时间的关系，可以看出几种米蛋白与镉的结合速度都非常快，ERPS、球蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白在反应 5 min 时， q 值就分别达到了 8.84, 2.15, 16.86, 8.46 mg/g ，在 30 min 时则分别增加到了 9.87, 3.64, 23.78, 9.40 mg/g ，超过 30 min, q 值变化就非常小了，标志着反应达到了平衡。反应平衡后，醇溶蛋白的 q 值最高，其次是谷蛋白，最后是球蛋白。ERPS、谷蛋白、热处理谷蛋白三者的 q 值基本一致，主要是因为 ERPS 中 80% 以上

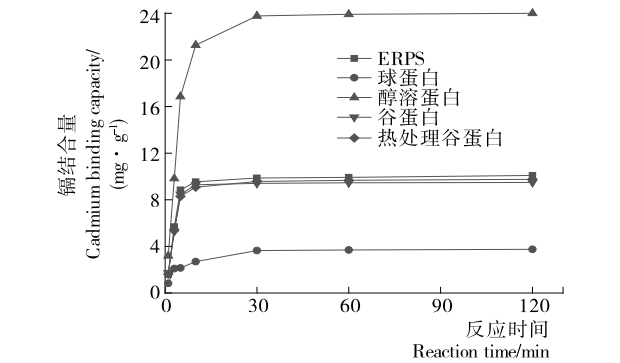


图 1 反应时间对米蛋白与镉结合的影响
Figure 1 Effects of reaction time on the binding of cadmium to rice proteins

都是谷蛋白,同时也说明了热处理对蛋白与镉的结合基本没有产生影响,Morita 等^[23]也发现加热处理并未使米蛋白形成更大的聚集体,因此氨基酸组成和一级结构可能是决定米蛋白与镉结合关键因素。

如图 2 所示,2 种蛋白表面均呈片状,且内部结构非常致密,相似的结果之前已被报道^[29-30]。由于 ERPS 和谷蛋白几乎无法溶解(≤ 0.8 g/100 mL),扫描电镜结果基本上反映了二者悬浮在水中的形态特征。ERPS 和谷蛋白的形态学特征,决定了与镉的结合主要发生在水接触的蛋白表面,而蛋白热变性聚集更多是疏水基团之间相互作用,因此可以解释热处理对镉结合基本没有产生影响。由于反应发生在蛋白表面,这也解释了 ERPS、谷蛋白与镉的结合都非常迅速的原因,球蛋白、醇溶蛋白同样不溶于水,所以有相类似的反应速率。Liu 等^[31]研究了大豆蛋白微球与镉的结合行为,发现大豆蛋白微球的多孔表面结构需要镉向内进行扩散渗透,所以直至 240 min 后反应才达到平衡。此外,大豆蛋白微球对镉的结合量(83.36 mg/g)明显高于大米蛋白,可能是大豆蛋白微球的中空结构创造了更多的镉结合位点。

准一级动力学模型假设吸附速率正比于有效吸附位点

表 2 不同米蛋白与镉结合的动力学模型参数

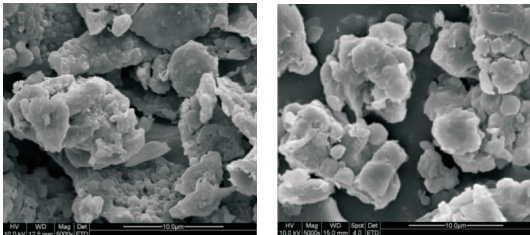
Table 2 Parameters for dynamic models fitting the binding of cadmium to different rice proteins

蛋白样品	$c_0/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Measured	准一级动力学模型			准二级动力学模型				Elovich 模型		
		$q_{t=120 \text{ min}}/$ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	$k_1/(\text{mg} \cdot$ $\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	$q_e/$ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	R^2	$k_2/(\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot$ $\text{min}^{-1})$	$q_e/$ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	$h/(\text{mg} \cdot$ $\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	R^2	a	b	R^2
ERPS	100	10.09	0.301	10.008	0.962	0.043	10.307	4.578	0.998	4.383	1.499	0.637
球蛋白	100	3.75	0.254	3.587	0.974	0.078	3.870	1.173	0.999	0.885	0.714	0.951
醇溶蛋白	100	24.00	0.236	24.107	0.969	0.012	24.907	7.291	0.998	9.447	4.173	0.701
谷蛋白	100	9.49	0.316	9.668	0.935	0.056	9.681	5.225	0.999	6.056	0.950	0.329

2.3 不同米蛋白组分与镉结合的吸附等温线

由图 3 可见,随着温度升高,4 种米蛋白的镉结合量 q 值都有一定程度增加,与 Liu 等^[31]在研究大豆中空微孔蛋白在水溶液中吸附金属离子时所得结果一致。温度升高,一方面可以使蛋白分子展开,暴露出更多与镉结合的位点,另一方面可能反应是吸热反应,温度上升提高了米蛋白与镉结合反应的平衡常数。

初始镉浓度也是影响米蛋白与镉结合的关键因素。在图 3 中,随着镉浓度增加,ERPS、球蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白的 q 值均显著增加,当初始镉浓度分别达到 60, 40, 80, 60 mg/L 后, q 值的增加幅度开始减缓,而溶液中镉离子平衡浓度开始快速上升,表明在反应开始时,各蛋白组分表面都有大量的结合位点,可以与镉进行结合,因此在低镉浓度水平上,镉的初始浓度在结合能力中扮演了重要的角色^[32],随着镉初始浓度的增加,蛋白的结合位点逐渐减少。与此同时,因为结合位点上的离子密度增加,镉离子之间的自我排斥也相应增加,因此抵制游离镉的进一步与蛋白对接,所以当镉的初始浓度大于一定值时,蛋白上的结合位点接近饱和,溶液中镉的平衡浓度急剧增加。



(a) 谷蛋白 (b) ERPS

图 2 谷蛋白和 ERPS 的扫描电镜图

Figure 2 Scanning electron microscopy images of rice glutelin and ERPS

数,即物理吸附过程;准二级动力学模型假设吸附过程是由于吸附剂与吸附质间通过共用电子或者交换电子完成的,即化学吸附过程;Elovich 模型综合了准一级与准二级动力学模型的边界条件范围,即同时存在物理吸附与化学吸附^[26]。表 2 给出了不同米蛋白与镉结合的动力学拟合结果,通过相关系数 R^2 可以看出 Elovich 模型的拟合效果不好,而准二级动力学模型的 R^2 要优于准一级动力学模型,故准二级动力学模型更适合用于描述不同米蛋白与镉的结合过程,因此推测该结合过程应该是以化学吸附为主。

表 3 是用 Langmuir 和 Freundlich 吸附等温模型对试验数据进行拟合的结果。由表 3 可知:在 3 个温度条件下,4 种米蛋白的 L 模型的回归相关系数(R^2)为 0.942~0.999,要显著优于 F 模型(0.833~0.989),表明 L 模型更适合用于描述米蛋白与镉的结合过程。Saif 等^[33]在研究中也发现,L 模型能够很好地描述镉与马钱子(*strychnos potatorum*)种子中蛋白质的结合。L 模型假设吸附质只在吸附剂表面进行单层吸附,被吸附在吸附剂表面的吸附质间没有相互作用;而 F 模型则假设吸附过程没有限定,吸附过程倾向于多层吸附^[34-35]。这也说明了米蛋白与镉的结合应该是在表面进行的单层吸附,同时进一步解释了米蛋白与镉的结合速度非常快的原因。

本研究中通过 L 模型获得的最大吸附量 $q_{\max}$ 值均比实际测得数值要高,这可能是试验浓度范围较小(10~100 mg/L),而 L 模型适用于较大的浓度范围^[36]。与试验结果不同的是,4 种蛋白在 L 模型中得到的 $q_{\max}$ 值均随着温度升高而呈下降趋势。Boparai 等^[37]研究了铁纳米粒子对镉的吸附,发现 297 K 时 $q_{\max}$ 值为 769.2 mg/g,在 307 K 时则降为 714.3 mg/g,出现了与本研究类似的情况。

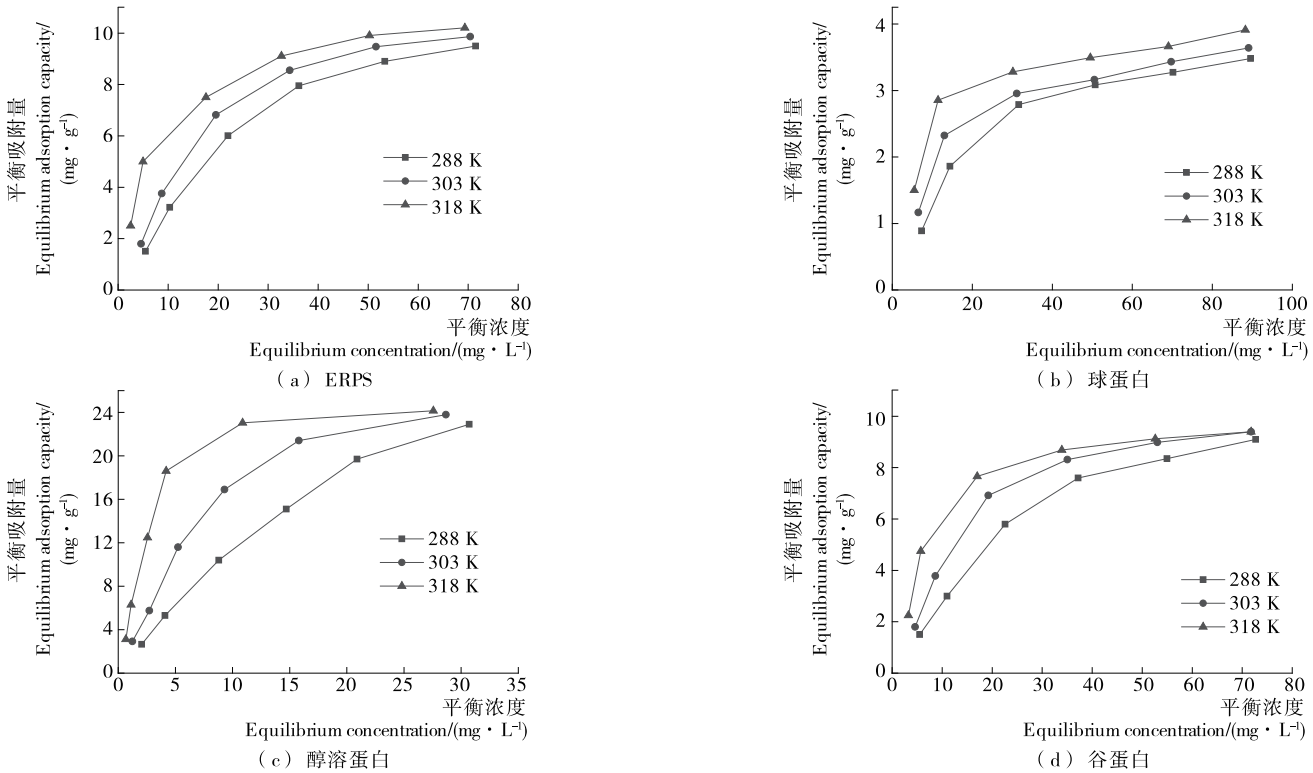


图 3 不同米蛋白与镉结合的等温吸附曲线
Figure 3 Sorption isotherm of cadmium binding to different rice proteins

表 3 不同米蛋白与镉结合的等温吸附模型及热力学参数

Table 3 Sorption isotherm models and thermodynamic parameters for cadmium binding to different rice proteins												
蛋白样品	温度/ K	Measured $q_{\max}/$ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	等温吸附模型参数							热力学参数		
			Langmuir 模型				Freundlich 模型			$\Delta G^\circ/$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	$\Delta H^\circ/$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	$\Delta S^\circ/$ ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$)
			$q_{\max}/$ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	$K_L/$ ($\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$)	$K_L/$ ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	R^2	K_F	$1/n$	R^2			
ERPS	288	9.50	15.75	0.024	2 690	0.942	0.551	0.710	0.947	−18.92		
	303	9.87	13.70	0.042	4 673	0.975	0.883	0.612	0.927	−21.30	41.44	208.67
	318	10.21	11.42	0.124	13 888	0.999	2.157	0.396	0.920	−25.23		
球蛋白	288	3.48	4.41	0.044	4 918	0.986	0.396	0.512	0.903	−20.36		
	303	3.64	4.16	0.072	8 121	0.995	0.686	0.390	0.877	−22.69	25.66	159.65
	318	3.91	4.19	0.120	13 515	0.996	1.102	0.296	0.833	−25.16		
醇溶蛋白	288	22.90	55.51	0.028	3 208	0.975	1.625	0.810	0.989	−19.34		
	303	23.78	35.21	0.083	9 320	0.966	2.964	0.696	0.948	−23.04	58.75	270.61
	318	24.15	27.78	0.290	32 554	0.986	5.786	0.540	0.843	−27.49		
谷蛋白	288	9.10	14.88	0.024	2 668	0.957	0.529	0.703	0.955	−18.90		
	303	9.40	12.45	0.048	5 453	0.975	0.950	0.581	0.906	−21.69	40.32	205.20
	318	9.40	10.63	0.116	13 095	0.995	1.842	0.420	0.858	−25.08		

在 F 模型中 K_F 可以大致表示吸附能力的强弱, K_F 值大则表示吸附能力强, n^{-1} 值也可作为吸附剂对重金属离子吸附作用的亲和力指标, n^{-1} 值愈小, 表示吸附剂对重金属离子的亲和力愈大^[38]。在本研究中 4 种蛋白都遵循了随着温度升高 K_F 值增大, n^{-1} 值减小的规律, 与试验结果一致, 这也说明温度升高可以提高大米蛋白对镉的吸附能力和亲和力。

2.4 不同米蛋白组分与镉结合的吸附热力学分析

在 L 模型成功拟合的基础上, 利用热力学方法确定了 4

种米蛋白与镉结合的热力学参数, 如表 3 所示。在该研究所选取的 3 个不同温度条件下, 4 种米蛋白与镉结合的 ΔG° 值均为负值, 表明 4 种米蛋白与镉的结合都是自发的。此外, 4 种蛋白与镉结合的 ΔH° 都是正值, 说明该反应是吸热反应, 这与试验实测结果相一致, 并证实了前文中关于温度升高导致结合反应的平衡常数增大的假设。

不同作用力在吸附中所需要的热不同, 范德华力的吸附热为 4~10 kJ/mol, 疏水键力约为 5 kJ/mol, 氢键力为 20~

40 kJ/mol, 配位基交换约为 40 kJ/mol, 偶极间力为 2~29 kJ/mol, 化学键力>60 kJ/mol^[39]。ERPS、谷蛋白与镉结合反应的 ΔH° 分别为 41.44, 40.32 kJ/mol, 均大于配位基交换热(大约 40 kJ/mol), 醇溶蛋白与镉结合反应的 ΔH° 甚至达到了 58.75 kJ/mol, 接近于化学键力。因此, 推测镉与 ERPS、谷蛋白、醇溶蛋白的结合是配位结合, 其中与醇溶蛋白的配位结合可能是一种多齿配位的形态。

2.5 不同米蛋白组分的氨基酸组成与镉结合量的相关性分析

由表 4 可知:醇溶蛋白中 Glu 含量最高, 达到了27.13%, His 和 Cys 含量均为几种蛋白中最低, 分别只有 1.40%和

0.47%, 这与前人^[40-41]的研究结果相吻合;球蛋白中 Cys 含量最高, 达到了 1.29%, 但醇溶蛋白与镉的结合能力要远高于球蛋白。以表 3 中 ERPS、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白在 303 K 等温吸附中实测的 $q_{\max}$ 值, 与不同蛋白的氨基酸组成, 进行相关性分析, q 值与 Glu 含量的相关性达到了 0.948, 与 Glu 和 Asp 含量之和的相关性达到了 0.967。之所以产生上述现象, 可能是 Cys、His、Asp、Glu 在蛋白质中绝大部分都存在于肽链中, 因此能与镉结合的主要是侧链基团, 这 4 种氨基酸的 pK_{aR} 值分别为 8.80, 7.00, 4.60, 4.60^[42], 而米蛋白的正常 pH 值为 6~7, 此时绝大部分的 Asp 和 Glu 都带有负电荷, 供电子能力更强, 更适合与镉进行结合。

表 4 不同米蛋白组分的氨基酸组成及其与镉结合量的相关性分析

Table 4 Amino acid compositions of different rice proteins and analysis of their correlation with cadmium binding amounts									
蛋白样品	Asp	Glu	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr
ERPS	8.970	20.850	4.194	2.028	3.637	3.413	8.552	5.896	5.514
球蛋白	5.317	19.747	5.624	1.748	5.860	2.079	15.286	4.794	5.790
醇溶蛋白	6.865	27.132	4.167	1.401	2.920	2.341	5.998	6.231	7.651
谷蛋白	9.749	20.860	4.330	2.262	4.519	3.359	9.186	5.318	4.390
与 $q_{\max}$ 的相关性 R^2	0.519	0.948	0.190	0.058	0.658	-0.480	0.606	0.641	0.340
蛋白样品	Cys-s	Val	Met	Phe	Ile	Leu	Lys	Pro	Asp+Glu
ERPS	0.790	6.989	2.655	5.640	5.087	8.655	3.400	3.729	29.820
球蛋白	1.291	5.671	4.499	4.533	3.372	6.802	2.516	5.068	25.064
醇溶蛋白	0.470	6.676	1.630	6.139	5.121	12.198	0.168	2.891	37.997
谷蛋白	0.326	6.936	1.726	5.959	5.176	8.426	3.811	3.666	30.610
与 $q_{\max}$ 的相关性 R^2	0.100	-0.203	0.325	0.340	0.086	-0.174	0.422	0.710	0.967

3 结论

本试验研究了 4 种不同米蛋白样品与镉的结合规律, 结果表明:米蛋白致密的片状结构导致其与镉的结合是快速的、发生在蛋白表面的;该结合是自发的、吸热的且以单分子层的化学吸附为主;在 4 种米蛋白中, 醇溶蛋白与镉结合的 ΔH° 值最大, 推测是与镉形成了多齿配体结构;此外, 米蛋白与镉的配位结合主要是通过 Asp 和 Glu 来实现的。基于上述结果, 后续的研究将从配位竞争的角度来探索其它金属离子对米蛋白中镉的脱除效果。

参考文献

[1] AGRAWAL P, MITRAL A, KUMAR M, et al. A review of toxicological profile of cadmium (CD)[J]. International Journal of Medical Toxicology & Legal Medicine, 2010, 12(4): 34-37.

[2] HU Yuan-an, LIU Xue-ping, BAI Jin-mei, et al. Assessing heavy metal pollution in the surface soils of a region that had undergone three decades of intense industrialization and urbanization[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2013, 20(9): 6 150-6 159.

[3] JIN Tai-yi, NORDBERG Monica, FRECH Wolfgang, et al. Cadmium biomonitoring and renal dysfunction among a population environmentally exposed to cadmium from smelting in China (ChinaCad)[J]. Biometals An International Journal on

the Role of Metal Ions in Biology Biochemistry & Medicine, 2002, 15(4): 397.

[4] GRANT C A, CLARKE J M, DUGUID S, et al. Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation[J]. Science of the Total Environment, 2008, 390(2/3): 301-310.

[5] MEHARG Andrew A, NORTON Gareth, DEACON Claire, et al. Variation in Rice Cadmium Related to Human Exposure[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(11): 5 613-5 618.

[6] 杨居荣, 查燕, 刘虹. 污染稻、麦籽实中 Cd、Cu、Pb 的分布及其存在形态初探[J]. 中国环境科学, 1999, 19(6): 500-504.

[7] 田阳, 魏帅, 魏益民, 等. 稻谷加工产物的镉含量及累积量分析[J]. 中国食品学报, 2014, 14(5): 186-191.

[8] 何孟常, 杨居荣. 水稻籽实中蛋白质-Cd、Pb 结合体及其稳定性[J]. 环境科学学报, 2001, 21(2): 213-217.

[9] 刘珊珊, 陈季旺, 陈露, 等. 大米镉结合蛋白的凝胶层析纯化及生化性质[J]. 食品安全质量检测学报, 2015(6): 2 269-2 274.

[10] 陈露, 陈季旺, 蔡俊, 等. 大米镉结合蛋白的分离纯化及纯度鉴定[J]. 食品科学, 2016, 37(13): 60-64.

[11] 魏帅, 田阳, 郭波莉, 等. 稻谷加工工艺对产品镉含量的影响[J]. 中国食品学报, 2015, 15(3): 146-150.

[12] 刘晶, 任佳丽, 林亲录, 等. 大米浸泡过程中重金属迁移规律研究[J]. 食品与机械, 2013(5): 66-67.

[13] 刘也嘉, 林亲录, 肖冬梅, 等. 大米乳酸菌发酵降镉工艺优

化[J]. 农业工程学报, 2016, 34(7): 276-282.

[14] 傅亚平, 廖卢艳, 刘阳, 等. 乳酸菌发酵技术脱除大米粉中镉的工艺优化[J]. 农业工程学报, 2015, 31(6): 319-326.

[15] DOKMANIC I, SIKIC M, TOMIC S. Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino-acid residues involved in the coordination[J]. Acta Crystallographica, 2010, 64(3): 257-263.

[16] GAMBLE A J, PEACOCK A F. De novo design of peptide scaffolds as novel preorganized ligands for metal-ion coordination [J]. Methods in Molecular Biology, 2014, 1 216: 211.

[17] 杨林, 宋欣欣, 栾慧, 等. 碱处理对大米蛋白氨基酸组成与含量的影响[J]. 粮食科技与经济, 2010, 35(5): 43-44.

[18] 马晓川, 费浩. 金属配位在多肽与蛋白质研究中的应用[J]. 化学进展, 2016, 28(2): 184-192.

[19] 佟立涛, 陈倩倩, 钱海峰, 等. 大米蛋白体外消化产物抗氧化活性的研究[J]. 现代食品科技, 2015(9): 92-97.

[20] 张晶, 丁芳, 邹晴晴, 等. 高压均质对大米蛋白功能特性及物化特性的影响[J]. 食品与机械, 2016(6): 9-12.

[21] WANG Zheng-xuan, YE Liu, HUI Li, et al. Rice proteins, extracted by alkali and α -amylase, differently affect in vitro antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2016, 206: 137-145.

[22] 李艳, 高文明, 易翠平. 碱提残余蛋白对籼米糊化特性的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 5-8.

[23] MORITA T, KIRIYAMA S. Mass production method for rice protein isolate and nutritional evaluation[J]. Journal of Food Science, 1993, 58(6): 1 393-1 396.

[24] 方勇, 杨文建, 马宁, 等. 体积排阻色谱-电感耦合等离子体质谱分析富硒大米含硒蛋白组成[J]. 分析化学, 2013, 41(6): 882-887.

[25] KHAMBHATY Yasmin, MODY Kalpana, BASHA Shaik, et al. Kinetics, equilibrium and thermodynamic studies on bio-sorption of hexavalent chromium by dead fungal biomass of marine *Aspergillus niger*[J]. Chemical Engineering Journal, 2009, 145(3): 489-495.

[26] KHAMBHATY Yasmin, MODY Kalpana, BASHA Shaik. Efficient removal of Brilliant Blue G (BBG) from aqueous solutions by marine *Aspergillus wentii*: Kinetics, equilibrium and process design[J]. Ecological Engineering, 2012, 41(4): 74-83.

[27] ZOU Shu-ping, LIU Miao, WANG Qiu-liang, et al. Preparative separation of echinocandin B from *Aspergillus nidulans* broth using macroporous resin adsorption chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2015, 978-979: 111-117.

[28] ÖZCAN A Safa, GÖK Özer, ÖZCAN Adnan. Adsorption of lead(II) ions onto 8-hydroxy quinoline-immobilized bentonite[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 161(1): 499-509.

[29] 王章存, 刘建学, 姚惠源. 酶水解法制取大米蛋白的机理研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(5): 82-82.

[30] 刘永乐, 王发祥, 周小玲, 等. 酶法脱酰胺对米谷蛋白分子微观结构的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 69-71.

[31] LIU Da-gang, LI Ze-hui, LI Wei, et al. Adsorption Behavior of Heavy Metal Ions from Aqueous Solution by Soy Protein Hollow Microspheres[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2013, 52(32): 11 036-11 044.

[32] YU Shen, HE Zhen-li, HUANG Cai-yan, et al. Adsorption-desorption behavior of copper at contaminated levels in red soils from China[J]. Journal of Environmental Quality, 2002, 31(4): 1 129-1 136.

[33] SAIF M M, KUMAR N S, PRASAD M N. Binding of cadmium to *Strychnos potatorum* seed proteins in aqueous solution: adsorption kinetics and relevance to water purification[J]. Colloids Surfaces B Biointerfaces, 2012, 94(7): 73-79.

[34] OZACAR M, SENGIL I A. Adsorption of metal complex dyes from aqueous solutions by pine sawdust[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(7): 791-795.

[35] CRINI Grégorio, PEINDY Harmel Ndongo, GIMBERT Frédéric, et al. Removal of C. I. Basic Green 4 (Malachite Green) from aqueous solutions by adsorption using cyclodextrin-based adsorbent: Kinetic and equilibrium studies[J]. Separation Purification Technology, 2007, 53(1): 97-110.

[36] 张增强, 张一平, 全林安, 等. 镉在土壤中吸附等温线及模拟研究[J]. 西北农业大学学报, 2000, 28(5): 88-94.

[37] BOPARAI H K, JOSEPH M, OCARROLL D M. Kinetics and thermodynamics of cadmium ion removal by adsorption onto nano zerovalent iron particles[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 186(1): 458-465.

[38] TSAI W T, LAI C W, HSIEN K J. Effect of particle size of activated clay on the adsorption of paraquat from aqueous solution[J]. Journal of Colloid Interface Science, 2003, 263(1): 29-34.

[39] OEPEN B Von, KÖRDEL W, KLEIN W. Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD-Guideline 106[J]. Chemosphere, 1991, 22(3/4): 285-304.

[40] HORIKOSHI Masako, MORITA Yuhei. Changes in ultra-structure and subunit composition of protein body in rice endosperm during germination [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2006, 46(1): 269-274.

[41] KIM Woo Taek, OKITA Thomas W. Structure, expression, and heterogeneity of the rice seed prolamines[J]. Plant Physiology, 1988, 88(3): 649.

[42] 王璋, 许时婴, 汤坚. 食品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008: 128.