

挤压处理对薏米蛋白组分结构及功能性质的影响

王佳蓉¹, 欧才智^{1,2}, 武玥¹, 丁阳月¹, 张高鹏¹, 程建军^{1*}

(¹东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030

²江苏冬泽特医食品有限公司 江苏南通 226133)

摘要 以脱脂薏米粉为原料进行挤压,采用 Osborne 分级法提取清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白与谷蛋白,探讨挤压处理对 4 种蛋白组分结构与功能性质的影响。结果表明,挤压后 4 种蛋白组分的粒径均呈下降趋势(低至 3 nm)。挤压导致清蛋白、球蛋白与谷蛋白发生不同程度的聚集融合,游离巯基含量分别降低了 72.37%,40.64%和 51.71%,蛋白的最大荧光吸收波长蓝移,电泳图谱中高分子质量区域分布的条带逐渐消失,亚基种类减少,而醇溶蛋白无明显变化。除球蛋白外,挤压后清蛋白、醇溶蛋白与谷蛋白中有序结构,即 α -螺旋与 β -折叠结构的含量明显下降($P < 0.05$),分别减小了 1.58%,22.88%和 7.75%。此外,挤压后清蛋白、球蛋白与谷蛋白的持水性分别提高了 1.74,3.18 倍和 4.89 倍,持油性分别增长了 2.00,2.23 倍和 1.67 倍。结论:挤压处理诱导清蛋白、球蛋白与谷蛋白的结构性质发生明显改变,而醇溶蛋白具有较高的结构稳定性与抗热剪切能力。研究结果为薏米蛋白组分的工业化制备及在多种食品配方中的应用提供参考。

关键词 薏米蛋白; 挤压处理; 结构; 功能性质

文章编号 1009-7848(2023)03-0111-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.012

薏米(*Coix lacrymajobi* L.)是禾本科植物薏苡的成熟种仁,其蛋白含量为 12.2%~16.7%,富含谷氨酰胺、亮氨酸和脯氨酸,易于人体吸收。此外,薏米蛋白中不含麸质,适用于麸质不耐受人群;与其它杂粮谷物相比,薏米具有更高的蛋白-碳水化合物比率^[1-2]。基于 Osborne 蛋白分类方法,根据溶解性的差异将薏米蛋白分为 4 种,即:溶于弱酸性水的清蛋白,溶于盐溶液的球蛋白,溶于乙醇溶液的醇溶蛋白以及溶于碱性溶液的谷蛋白^[3]。薏米营养均衡且具有食疗作用,然而其难以烹饪,仍然是一种未被充分利用的谷物。挤压技术集混合、搅拌、破碎、加热、杀菌、膨化及成型等为一体,所得产品不仅糊化度较高,而且生产周期短,成本低。挤压是在高温、高压及高剪切力的综合作用下对原料进行物理改性、塑形、灭菌、熟化与结构重组的技术^[4]。研究表明,蛋白二级、三级和四级结构的变化既依赖于高温诱导的交联聚集,也依赖于高剪切引起的机械展开,因此挤压处理会对蛋白的结构与性质产生影响。Beck 等^[5]在挤压过程中调节水

分含量为 35%时,可诱导豌豆蛋白经氢键相互作用形成大的聚集体,并且挤压后豌豆蛋白的溶解性会下降 50%~90%。Hossain 等^[6]研究表明挤压后绿豆蛋白的所有物理性质(如膨胀率、体积密度、复水化率、吸水率和组织化程度)均可得到明显改善。Chen 等^[7]探讨了不同挤压温度对添加花生油的小麦面筋蛋白聚集性的影响,发现较高的挤压温度可以加速面筋蛋白中巯基-二硫键的交换反应,提高小麦面筋蛋白的聚集性。总之,挤压处理可诱导蛋白分子间氢键与二硫键部分断裂,使蛋白发生变性,进而对蛋白的溶解性、乳化性与消化率产生影响,这有利于获得多样的蛋白产品。

为丰富与发展谷物蛋白的改性研究体系,研究人员探讨了挤压处理对谷物蛋白组分结构与性质的影响。Li 等^[8]研究表明麦谷蛋白与麦醇溶蛋白组分对挤压小麦粉网络结构的形成至关重要,挤压后小麦蛋白的聚集主要依赖两种蛋白组分中的二硫键与疏水相互作用。段庆松等^[9]发现挤压后米糠蛋白组分的持水性、起泡稳定性与乳化稳定性均得到明显改善。郭莲东^[10]通过扫描电镜分析发现挤压后小米醇溶蛋白、清蛋白与球蛋白均会发生一定程度的聚集融合,而挤压谷蛋白聚集后颗粒形状也发生变化,由球型变为立方体型。然而,目前关于挤压处理薏米的研究大多集中在挤压对

收稿日期: 2022-03-18

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目
(2017YFD0401204-5)

第一作者: 王佳蓉,女,硕士生

通信作者: 程建军 E-mail: cheng577@163.com

不同品种薏米或薏米淀粉特性^[10-11]的影响上,较少有对薏米蛋白组分进行挤压处理的研究。

本文以脱脂薏米粉为原料,探讨挤压处理对薏米蛋白组分结构与功能特性的影响,为其的开发和应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

薏米购于辽阳种子农贸市场。无水乙醇、氢氧化钠及磷酸,天津市天力化学试剂有限公司;氯化钠,天津市光复科技发展有限公司;彩虹 180 光谱蛋白 Marker、蛋白质上样缓冲液,北京索莱宝科技有限公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;Tris,北京太阳神科技有限公司;甘氨酸,北京生物科技有限公司;8-苯胺-1-萘磺酸(ANS),阿拉丁试剂有限公司。所用化学试剂均为分析纯级。

1.2 设备与仪器

Process 11 平行双螺杆挤出机,美国赛默飞世尔科技公司;索氏抽提器,森信(上海)实验仪器有限公司;Allegra X-30R 离心机,贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司;ALPHA 1-2 LD plus 冻干机,德国 Martin Christ 公司;Zetasizer NanoZS-90 激光粒度分析仪,英国马尔文仪器有限公司;SU 8010 扫描电子显微镜,日本 Hitachi 公司;BG-Power 600i SDS-PAGE 电泳仪,北京百晶生物技术有限公司;KDN-04 型蛋白质测定仪,上海纤检仪器有限公司;ALPHA-T 傅里叶变换红外光谱仪,德国 Bruker 公司;F4500 荧光分光光度计,日本日立公司。

1.3 试验方法

1.3.1 薏米蛋白组分的分离提取 薏米粉碎过 80 目筛,用索氏抽提法去除其中脂肪,以脱脂薏米粉为原料进行挤压前蛋白质的分离提取。参照 Osborne 分级原理^[3],略作修正,提取薏米蛋白 4 种组分,具体步骤参见图 1。清蛋白提取条件:浸提溶剂为蒸馏水(调节 pH 值至清蛋白等电点 2.8),浸提温度 50 ℃,浸提时间 1 h,料液比 1:12,此条件下蛋白得率约 0.48%。球蛋白提取条件:浸提溶剂为 2%氯化钠溶液,浸提温度 50 ℃,浸提时间 0.5 h,料液比 1:10,此条件下蛋白得率约 0.42%。

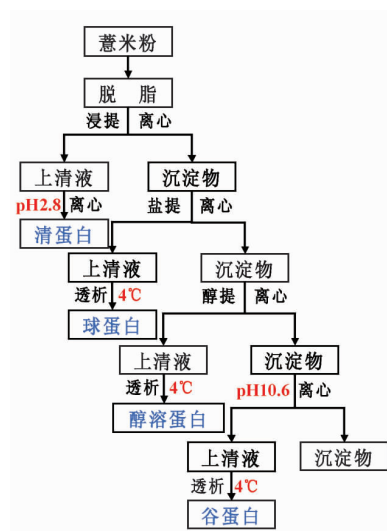


图 1 薏米蛋白组分分离提取流程

Fig.1 The extraction process of adlay seed protein fractions

醇溶蛋白提取条件:浸提溶剂为 75%乙醇溶液,浸提温度 50 ℃,浸提时间 90 min,料液比 1:10,此条件下蛋白得率约 8.2%。谷蛋白提取条件:浸提溶剂为 pH 10.6 的氢氧化钠溶液,浸提温度 50 ℃,浸提时间 1.5 h,料液比 1:6,蛋白得率约 0.37%,4 种蛋白组分经冷冻干燥后备用。

1.3.2 挤压薏米蛋白的制备 使用 Process 11 型双螺杆挤压机,螺杆直径为 25 mm,长径比 16:1,挤出圆形模头内径为 4 mm,挤压机共有 8 个加热段。以脱脂薏米粉为原料进行挤压,挤压过程 8 段温度分别设置为 20,40,80,110,120,110,100 及 90 ℃,螺杆转速 270 r/min,物料含水率 20%。参照挤压前蛋白提取条件,分离提取挤压后冻干薏米粉中的清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白与谷蛋白组分。

1.3.3 蛋白粒径分布测定 参照 Li 等^[12]方法略做修正,测定时分别使用蒸馏水、0.5 mol/L NaCl、70%乙醇及 NaOH(pH=10.6)将清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白溶解,并稀释至质量浓度 0.1 mg/mL 后测定。

1.3.4 蛋白微观结构观察 取冻干蛋白粉样品,在加速电压为 5 kV,10 000 倍条件下选择合适的视野观察,拍摄蛋白形貌特征。

1.3.5 蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 参照 Kumar 等^[13]的方法,取冻干蛋白粉于上样缓冲液中混合均匀,100 ℃煮沸 3 min,冷却备用。分离

胶、浓缩胶质量分数分别为 15%、5%。蛋白样品上样量 12 μL , marker 上样量 5 μL 。电泳过程中将浓缩胶电压调为 80 V, 分离胶电压调为 120 V。当试样带距边缘 1 cm 处时停止电泳, 将胶体取出, 浸入染色液中染色后, 于脱色液中脱色 3~4 次, 直到蛋白条带清晰, 拍照分析。

1.3.6 蛋白游离巯基含量测定 参照 Beveriger 等^[14]的方法并略作修正。PBS 缓冲液的配制: 4 g NaCl、0.1 g KCl、0.71 g Na_2HPO_4 和 0.135 g NaH_2PO_4 在蒸馏水中充分溶解, 定容 500 mL, 调节 pH 值为 7.4。Tris-Gly-Urea 缓冲液的配制: 5.209 g Tris、3.378 g Gly、0.7445 g EDTA-2Na 和 240.24 g 尿素于蒸馏水中充分溶解, 定容 500 mL, 调节 pH 值为 8.0。Tris-Gly 缓冲液的配制: 10.418 g Tris、6.756 g Gly 和 1.489 g EDTA-2Na 充分溶解于蒸馏水中, 定容 1 000 mL, 调节 pH 值为 8.0。Ellman 试剂的配制: 20 mg DTNB 溶解于 5 mL Tris-Gly 缓冲液中。

取 60 mg 冻干蛋白样品分散于 1 mL PBS 缓冲液中, 用 5 mL Tris-Gly-Urea 缓冲液均匀混合后充分振荡, 加入 50 μL Ellman's 试剂, 避光静置 1 h, 随后与 $3\,000 \times g$ 离心 10 min, 取上清液测定 412 nm 处的吸光值 ($A_{412\text{nm}}$), 游离巯基含量计算公式:

$$\text{游离巯基}(\text{mol/g}) = \frac{73.53A_{412\text{nm}}D}{C} \quad (1)$$

式中: 73.53 为——Ellman 试剂的摩尔消光系数; D ——稀释倍数; C ——蛋白质质量浓度, mg/mL。

1.3.7 蛋白二级结构测定 参考郭莲东等^[10]的方法, 使用衰减全反射技术检测, 将经过冷冻干燥的蛋白样品置于仪器上, 记录 $500\sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 内红外光谱的变化。利用 32 次扫描和 4 cm^{-1} 分辨率记录红外光谱, 使用 Peak Fitv4.12 软件处理 $1\,600\sim 1\,700\text{ cm}^{-1}$ 酰胺 I 带红外曲线。

1.3.8 蛋白三级结构测定 参照 Liu 等^[15]的方法, 采用荧光分光光度计测定样品的内源荧光光谱。将薏米蛋白冻干粉用 PBS 缓冲液 (pH 值 7.0) 稀释至 0.5 mg/mL 后测定, 设置激发波长 290 nm, 发射波长 $300\sim 460\text{ nm}$, 狭缝宽度 2.5 nm, 电压 700 mV 条件下扫描。

1.3.9 蛋白持水、持油性的测定 参照 Maneerat 等^[16]的方法并略作修正。称量 0.25 g 蛋白样品于 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 蒸馏水(食用油), 旋紧瓶盖并将离心管置振荡器上震荡 20 min, 使样品充分溶解, 随后在室温条件下以 $1\,684 \times g$ 离心 15 min, 弃上清液, 使用滤纸吸干残留在离心管管壁上的液体, 用差减法称量残余物的质量, 计算持水、持油性。

$$\begin{aligned} \text{持水(油)性}(\text{g/g}) = & \\ \frac{\text{样品湿质量}(\text{g}) - \text{样品干质量}(\text{g})}{\text{样品干质量}(\text{g})} & \quad (2) \end{aligned}$$

1.4 数据处理

每组试验进行 3 次, 数据表示为平均值 \pm 标准差, 使用 SPSS 软件 (Version. 20) 进行显著性分析, 显著性水平 (P) 设定为 0.05, 使用 Origin 2021 绘图。

2 结果与分析

2.1 挤压对薏米蛋白组分粒径的影响

如图 2 所示, 挤压后, 薏米蛋白中 4 种组分的粒径均下降, 清蛋白由主要分布在 1 113.9 nm 附近变为分布在 3 nm 附近; 球蛋白由主要分布在 1 292 nm 附近变为 3, 15, 500 nm 附近的多峰分布; 挤压前醇溶蛋白呈多峰分布, 主要在 950 nm 附近, 挤压后醇溶蛋白主要分布于 3 nm 和 85 nm 附近; 而谷蛋白挤压前为主要分布在 980 nm 的单峰, 挤压后为分布在 9 nm 和 13 nm 附近的双峰。粒径的下降可能是因为挤压处理使薏米蛋白四级结构受到破坏, 导致蛋白聚集体破碎并随后聚集融合形成小分子多肽聚集体^[11, 19]。挤压前除醇溶蛋白外, 薏米蛋白中其它组分的粒径均呈单峰分布, 这可能与醇溶蛋白肽链网状结构较密集, 具有半自组装特性, 可以诱导形成少量聚集体有关^[17]。挤压后, 薏米球蛋白与谷蛋白粒径由单峰转变为多峰分布, 这主要因为挤压过程的热机械可以诱导蛋白变性, 并通过非共价(疏水)和共价(二硫键)相互作用诱导蛋白聚集^[18]。

2.2 挤压对薏米蛋白组分微观结构的影响

图 3 显示挤压处理对薏米蛋白组分微观形貌的影响。如图 3b、3d、3f 和 3h 所示, 挤压后薏米蛋白组分的表现形貌均有不同程度地融合拉伸。未

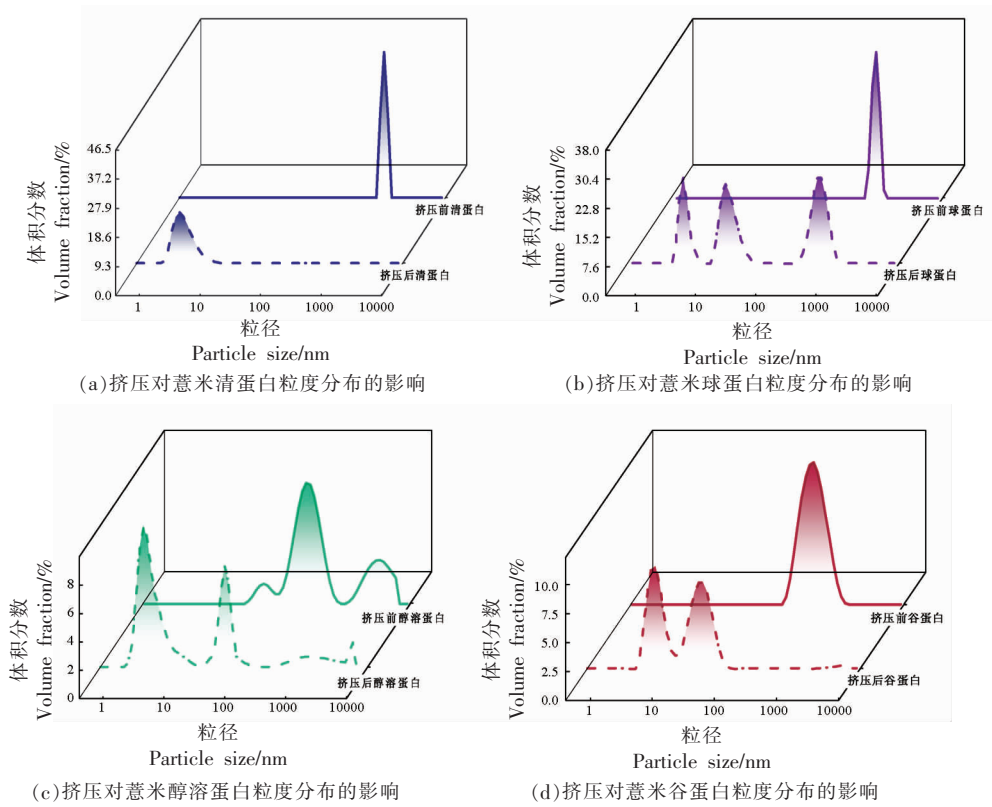
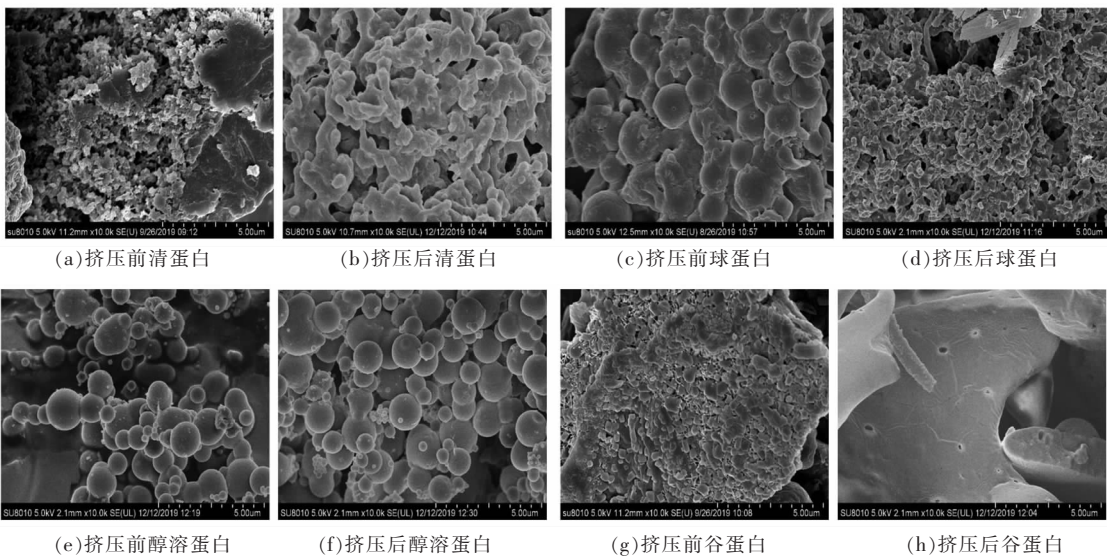


图2 挤压对薏米蛋白组分粒度分布的影响

Fig.2 Effect of extrusion on the particle size distribution of adlay seed protein fractions

处理清蛋白(图 3a)颗粒间有较大空隙,挤压后清蛋白(图 3b)由松散无序的碎片状变为边缘光滑的链状簇排列;与之类似,未处理谷蛋白(图 3g)是

表面粗糙且呈不规则排布的小颗粒,挤压后谷蛋白(图 3h)相互聚集形成表面光滑且有裂缝和微孔的片层结构。结合挤压后清蛋白与谷蛋白游离



注:加速电压 5 kV,放大倍数 10 000。

图3 挤压对薏米蛋白组分微观结构的影响

Fig.3 Effect of extrusion on the microstructure of adlay seed protein fractions

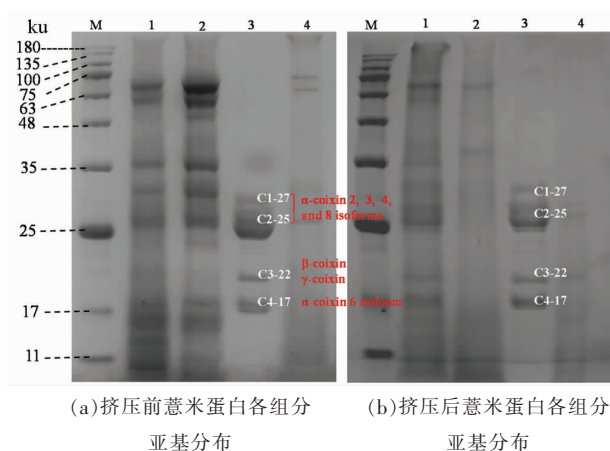
巯基含量明显下降(见 2.4 节),推测它们的聚集可能与蛋白分子间形成二硫键有关。挤压谷蛋白中出现的孔洞与裂缝可能与高温诱导强韧网络结构的快速形成,导致蛋白表面连接性下降有关。未处理球蛋白(图 3c)是表面有孔洞,呈鳞片型有序排布的球体,挤压后球蛋白(图 3d)的分子直径明显下降,以堆积形式无序聚集,推测可能是因薏米球蛋白的热稳定性较差,暴露在高温、高压和机械剪切环境中而极易发生降解。由图 3e、3f 可知,挤压前、后醇溶蛋白的微观形貌变化不明显,蛋白呈表面光滑的椭球状,而挤压处理后醇溶蛋白排布更加密集。

2.3 挤压对薏米蛋白组分亚基分布的影响

图 4a、4b 分别为薏米蛋白组分在挤压前、后的亚基分布图。未处理薏米清蛋白和球蛋白的亚基分布较广并有部分重叠(主要在 11~68 ku 分布),醇溶蛋白的亚基分子质量相对集中(14~35 ku),谷蛋白的亚基种类较少。挤压后,薏米清蛋白、球蛋白与谷蛋白在高质量区域分布的条带逐渐消失,亚基分布呈现出由高分子质量向低分子质量转变的趋势,这可能是由于挤压处理诱导蛋白降解形成低分子质量蛋白,这与挤压后薏米蛋白的粒径降低结果一致。醇溶蛋白是薏米蛋白的主要组分,如图所示,挤压前、后在醇溶蛋白中均可观察到 α -薏苡辛 2、3、4、6 和 8 组分,以及 β -薏苡辛与 γ -薏苡辛的特征谱带,其亚基分子质量的变化并不明显,这可能是由于醇溶蛋白中疏水性氨基酸或半胱氨酸的含量较低,因此在挤压过程中,它们无法通过疏水作用或二硫键发生聚合,这也表明薏米醇溶蛋白的抗剪切性能较好。Li 等^[9]得到类似的研究结果,当挤压温度 160~185 °C 时,高分子质量小麦醇溶蛋白区域条带强度的变化不显著,受挤压的影响也极小。

2.4 挤压对薏米蛋白组分游离巯基含量的影响

如图 5 所示,挤压后薏米清蛋白、球蛋白与谷蛋白的游离巯基含量分别降低了 72.37%、40.64% 与 51.71%,表明挤压后薏米蛋白分子变性、展开,分子运动速率提高,使巯基-二硫键的交换反应加速。结合前人研究,挤压处理产生的机械剪切力会对二硫键的形成产生两种相反的作用:一方面,较高的机械剪切力会促使蛋白分子暴露更多的巯基



注:泳道从左到右 M、a、b、c 和 d 分别表示 Marker、清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白。

图 4 挤压对薏米蛋白组分亚基分布的影响

Fig.4 Effect of extrusion on the distribution of subunits of adlay seed protein fractions

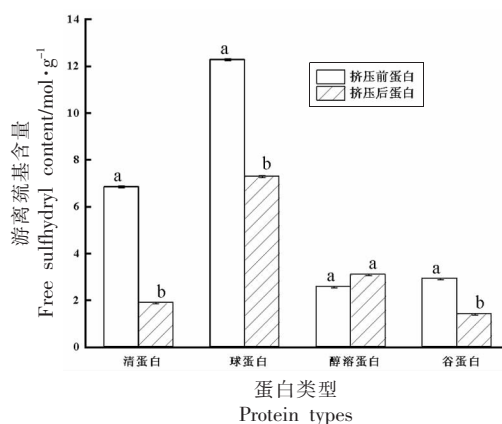


图 5 挤压对薏米蛋白组分游离巯基含量的影响

Fig.5 Effect of extrusion on the free sulfhydryl content of adlay seed protein fractions

基团,在有氧环境下,加速巯基-二硫键的交换反应,促进二硫键的形成;另一方面,挤压产生的物理剪切作用,会打断蛋白分子间的二硫键,使二硫键的含量下降^[20-21]。Fisher 等^[22]研究表明挤压过程中机械剪切对游离巯基和二硫键含量的影响可能会因机械剪切强度的不同而产生差异。推测本研究采用的挤压参数可能对二硫键形成有正影响,而对游离巯基含量有负影响。然而,挤压后薏米醇溶蛋白的游离巯基含量(2.57~3.09 mol/g)无明显变化($P > 0.05$),表明其具有较高的结构稳定性与抗热剪切能力。

2.5 挤压对薏米蛋白组分二级结构的影响

挤压对4种蛋白组分二级结构的影响见表1。对红外图谱进行拟合时,各子峰与二级结构的对应关系为:1 650~1 660 cm^{-1} 附近的吸收峰为 α -螺旋,1 610~1 642 cm^{-1} 为 β -折叠,1 660~1 680 cm^{-1} 为 β -转角,1 680~1 700 cm^{-1} 为 β -反平行折叠,1 642~1 650 cm^{-1} 为无规卷曲^[10]。挤压前、后4种蛋白组分的二级结构均以 β -折叠为主(37.50~46.48%),其次是 β -转角(10.97~27.96%)、 α -螺旋(12.83~22.16%)与无规卷曲(13.69~22.16%), β -反平行折叠(3.81~5.60%)结构的含量最低。挤压处理诱导清蛋白、醇溶蛋白与谷蛋白中更有序的 α -螺旋与 β -折叠结构向较无序的 β -转角与无规卷曲结构转变,这表明3种蛋白组分

在挤压机内受高温、高压和高剪切作用后,稳定性较差的部分发生聚集或重排,蛋白分子去折叠化,相对线性化,二级结构也受到一定程度的破坏^[23]。与之类似,Carbonaro等^[24]研究表明鹰嘴豆蛋白经热处理后其 α -螺旋和 β -折叠结构的含量呈下降趋势。挤压球蛋白中有序结构的含量增加,其中 β -折叠结构的含量显著提高。Bonwell等^[25]研究表明挤压诱导的蛋白聚集主要是依赖 β -折叠结构,其可阻碍蛋白分子中疏水性基团的暴露,推测挤压后球蛋白分子间仍存在较强的疏水作用。然而,挤压对谷蛋白中 α -螺旋(14.26%~12.85%)结构的影响并不显著($P > 0.05$),这与谷蛋白具有较高的空间位阻,在挤压过程中能保持较稳定的构象有关。

表1 挤压对薏米蛋白组分二级结构的影响

Table 1 Effect of extrusion on the secondary structure of adlay seed protein fractions

蛋白种类	α -螺旋/%	β -折叠/%	β -转角/%	β -反平行折叠/%	无规卷曲/%
挤压前清蛋白	12.83 ± 1.02 ^c	46.48 ± 1.70 ^a	22.30 ± 4.36 ^a	5.07 ± 1.11 ^a	14.40 ± 1.99 ^d
挤压后清蛋白	15.95 ± 0.34 ^b	42.42 ± 0.44 ^c	19.93 ± 0.07 ^c	4.40 ± 0.02 ^a	17.28 ± 0.08 ^{bc}
挤压前球蛋白	16.13 ± 0.01 ^b	40.33 ± 0.00 ^d	22.58 ± 0.00 ^d	4.61 ± 0.02 ^a	16.36 ± 0.01 ^c
挤压后球蛋白	21.23 ± 0.06 ^a	43.58 ± 0.21 ^{bc}	11.43 ± 0.17 ^{bc}	5.60 ± 0.16 ^a	18.17 ± 0.08 ^b
挤压前醇溶蛋白	22.16 ± 0.01 ^a	43.26 ± 0.00 ^{bc}	10.97 ± 0.00 ^{bc}	5.58 ± 0.01 ^a	22.16 ± 0.00 ^a
挤压后醇溶蛋白	12.95 ± 0.68 ^c	37.50 ± 0.53 ^c	26.72 ± 4.40 ^c	4.35 ± 1.10 ^a	18.47 ± 4.33 ^b
挤压前谷蛋白	14.26 ± 1.31 ^{bc}	44.22 ± 2.12 ^b	21.40 ± 5.52 ^b	3.81 ± 0.28 ^a	16.31 ± 1.80 ^c
挤压后谷蛋白	12.85 ± 0.26 ^c	41.10 ± 0.37 ^d	27.96 ± 0.99 ^d	4.41 ± 1.44 ^a	13.69 ± 0.56 ^d

注:同列中不同字母上标表示薏米蛋白组分的二级结构存在显著性差异($P < 0.05$)。

2.6 挤压对薏米蛋白组分三级结构的影响

如图6所示,挤压后,薏米蛋白组分的荧光强度均显著下降,这表明暴露的发光基团减少,挤压诱导疏水基团向蛋白分子内部移动,使蛋白聚集形成更稳定的结构^[26-27]。薏米清蛋白、球蛋白与谷蛋白经挤压处理,最大荧光吸收波长均向短波长方向移动,即发生蓝移,清蛋白由346 nm移至338 nm,球蛋白由339 nm移至337 nm,谷蛋白由340 nm移至338 nm,表明暴露的发色光团含量减少,推测挤压处理诱导蛋白分子间更强的相互作用,促使更多的疏水性残基转移到疏水性更强的区域^[28],即蛋白变性解折叠后,分子重排相互聚集,使蛋白表面的疏水性位点被覆盖。Mozafarpour

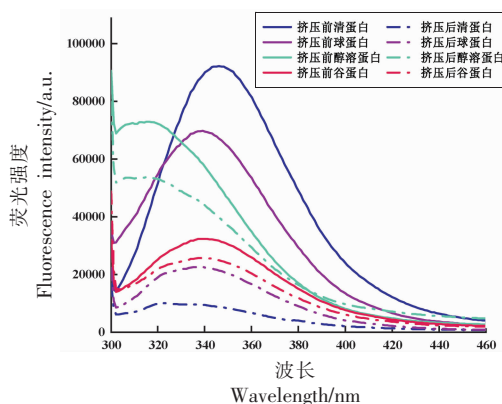


图6 挤压对薏米蛋白组分三级结构的影响

Fig.6 Effect of extrusion on the tertiary structure of adlay seed protein fractions

等^[29]和 Chen 等^[26]对挤压大豆分离蛋白的研究也取得类似结论,因形成聚集体而使其表面疏水性明显下降。挤压后,薏米醇溶蛋白的最大荧光吸收波长无明显变化(315 nm),说明该挤压条件下薏米醇溶蛋白的三级结构较稳定且具有较优的抗热剪切性能。

2.7 挤压对薏米蛋白组分功能性质的影响

挤压处理对薏米蛋白组分持水性与持油性的影响如表 2 所示。挤压对醇溶蛋白持水性(3.71~3.57 g/g)与持油性(5.35~4.47 g/g)的影响并不显著($P > 0.05$),这与其是一种内部结构高度紧密且具有较高疏水性的蛋白有关。挤压后薏米清蛋白(4.69~8.17 g/g)、球蛋白(3.00~9.55 g/g)与谷蛋白(1.50~7.34 g/g)的持水性均明显增加($P < 0.05$),蛋白的持水性与其分子组成、构象状态和亲水性能密切相关,不仅受蛋白共价交联程度的影响,而且与蛋白-水相互作用的能力有关^[30]。在高温、高压条件下,样品内部的水分会在瞬间汽化蒸发,产生很大压力,使大分子颗粒的外部状态与内部分子结构发生改变,在表观上形成多孔结构^[31],这与 SEM 中挤压后薏米蛋白形成孔洞与缝隙的结果一致,有助于提高水分子在蛋白中的扩散速率,增强蛋白持水性。此外,挤压后薏米清蛋白、球蛋白与谷蛋白的持油性也明显增大($P < 0.05$),分别增加了 100.20%,122.59%与 66.83%。其原因是:1)蛋白质的持油能力受其表面疏水性基团数目的影响,挤压可诱导蛋白分子解折叠,使蛋白分子内部疏水性基团的暴露,提高蛋白与油脂的接触面积,有助于提高蛋白的持油性^[32]。2)挤压后薏米蛋白的持水能力显著改善,薏米蛋白可能在高温与高水分条件的诱导下发生变性与重组,通过挤压三维网络结构中较强的毛细作用将油脂截留在内部,使蛋白的持油能力增强^[33]。

3 结论

1) 挤压后薏米蛋白组分的粒径均明显下降,且呈多峰分布。清蛋白分子由碎片状变为边缘光滑的链条簇状,其直径明显下降且分子呈无序分布;挤压谷蛋白呈表面光滑,有微孔的片层结构;挤压后醇溶蛋白的微观形貌无明显变化,然而,分布更加密集。

表 2 挤压对薏米蛋白组分功能性质的影响

Table 2 Effect of extrusion on the functional properties of adlay seed protein fractions

蛋白种类	持水性/ $g \cdot g^{-1}$	持油性/ $g \cdot g^{-1}$
挤压前清蛋白	4.69 ± 0.01 ^c	4.92 ± 0.02 ^{cd}
挤压后清蛋白	8.17 ± 0.12 ^{ab}	9.85 ± 0.04 ^a
挤压前球蛋白	3.00 ± 0.00 ^{cd}	3.94 ± 0.02 ^d
挤压后球蛋白	9.55 ± 0.02 ^a	8.77 ± 0.00 ^{ab}
挤压前醇溶蛋白	3.71 ± 0.02 ^c	5.35 ± 0.01 ^{cd}
挤压后醇溶蛋白	3.57 ± 0.02 ^c	4.47 ± 0.05 ^{cd}
挤压前谷蛋白	1.50 ± 0.02 ^d	4.13 ± 0.02 ^d
挤压后谷蛋白	7.34 ± 0.01 ^b	6.89 ± 0.05 ^{bc}

注:同列中不同字母上标表示薏米蛋白组分的功能性质存在显著性差异($P < 0.05$)。

2) 薏米醇溶蛋白具有较高的结构稳定性,挤压后醇溶蛋白的亚基分布、游离巯基含量与三级结构均无明显变化。挤压后,薏米清蛋白、球蛋白与谷蛋白的亚基分布均由高分子质量向低分子质量转变,且游离巯基含量明显下降($P < 0.05$)。挤压薏米蛋白的二级结构由较有序的 α -螺旋与 β -折叠结构向更无序的 β -转角与无规卷曲结构转变。挤压后薏米清蛋白、球蛋白与谷蛋白的最大荧光吸收波长显示蓝移且荧光强度下降。整体而言,挤压诱导蛋白聚集并形成大量的无序结构。

3) 挤压处理使 4 种蛋白组分的功能性质发生改变。挤压后薏米清蛋白、球蛋白与谷蛋白的持水性分别提高 74.20%,218.33%与 389.33%;持油性分别提高 100.20%,122.59%与 66.83%。挤压后薏米醇溶蛋白的持水性与持油性无显著变化($P > 0.05$)。

参 考 文 献

- [1] LIU X, YANG Y J, WANG Z W. Structure characteristics of Coix seeds prolamins and physicochemical and mechanical properties of their films [J]. Journal of Cereal Science, 2017, 79: 233-239.
- [2] ZHU F. Coix; Chemical composition and health effects [J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 61: 160-175.
- [3] OSBORNE, THOMAS B. The vegetable proteins [M]. London: Longmans, Green and Co., 1924: 13-20.

- [4] PRABHA K, GHOSH P, ABDULLAH S, et al. Recent development, challenges, and prospects of extrusion technology[J]. *Future Foods*, 2021, 3: 100019.
- [5] BECK S M, KNOERZER K, ARCOT J. Effect of low moisture extrusion on a pea protein isolate's expansion, solubility, molecular weight distribution and secondary structure as determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) [J]. *Journal of Food Engineering*, 2017, 214: 166–174.
- [6] HOSSAIN B F, YEA C S, KHARIDAH M, et al. Texturized mung bean protein as a sustainable food source: Effects of extrusion on its physical, textural and protein quality[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2021, 67: 102591.
- [7] CHEN Y, LIANG Y, JIA F, et al. Effect of extrusion temperature on the protein aggregation of wheat gluten with the addition of peanut oil during extrusion[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 166: 1377–1386.
- [8] LI M, LEE T C. Effect of extrusion temperature on solubility and molecular weight distribution of wheat flour proteins [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1996, 44(3): 763–768.
- [9] 段庆松, 段玉敏, 肖志刚, 等. 挤压稳定化处理对米糠各组分蛋白结构及功能性质的影响[J]. *农业工程学报*, 2020, 36(19): 283–290.
- DUAN Q S, DUAN Y M, XIAO Z G, et al. Effects of extrusion stabilization treatment on the structure and functional properties of various protein fractions of rice bran[J]. *Journal of Agricultural Engineering*, 2020, 36(19): 283–290.
- [10] 郭莲东. 挤压对小米蛋白结构的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
- GUO L D. Effect of extrusion on the protein structure of millet[D]. Harbin: Northeastern Agricultural University, 2019.
- [11] ZHANG G P, NI C L, DING Y Y, et al. Effects of low moisture extrusion on the structural and physicochemical properties of adlay (*Coix lacrym-jobi* L.) starch-based polymers[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 96: 30–37.
- [12] LI D, ZHAO Y, WANG X, et al. Effects of (+)-catechin on a rice bran protein oil-in-water emulsion: Droplet size, zeta-potential, emulsifying properties, and rheological behavior[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 98: 105306.
- [13] KUMAR K K, PARAMESWARAN K P. Characterisation of storage protein from selected varieties of foxtail millet (*Setaria italica* (L) Beauv)[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 77(4): 535–542.
- [14] BEVERIDGE T, TOMA S. J, NAKAI S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent[J]. *Journal of Food Science*, 1974, 39(1): 49–51.
- [15] LIU Y, ZHAO G L, ZHAO M M, et al. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction[J]. *Food Chemistry*, 2012, 131(3): 901–906.
- [16] MANEERAT J, SUCHADA P, HIROFUMI T, et al. Effect of high-pressure homogenization on stability of emulsions containing zein and pectin[J]. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 12(1): 21–27.
- [17] 吕鹏. 薏苡仁蛋白的提取及其功能的研究[D]. 太原: 山西大学, 2011.
- LÜ P. Study on the extraction of Adlay seed protein and its function[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2011.
- [18] JEBALIA I, MAIGRET J E, REGUERRE A L, et al. Morphology and mechanical behaviour of pea-based starch-protein composites obtained by extrusion[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 223: 115086.
- [19] GARCIA -VALLE D E, AGAMA -ACEVEDO E, NUEZ -SANTIAGO M D, et al. Extrusion pregelatinization improves texture, viscoelasticity and in vitro starch digestibility of mango and amaranth flours[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 80: 104441.
- [20] CREIGHTON T E, ZAPUN A, NIGEL J D. Mechanisms and catalysts of disulphide bond formation in proteins[J]. *Trends in Biotechnology*, 1995, 13(1): 18–23.
- [21] VISSCHERS R W, JONGH H J. Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation[J]. *Biotechnology advances*, 2005, 23(1): 75–80.
- [22] FISCHER T. Effect of extrusion cooking on protein modification in wheat flour[J]. *European Food Research and Technology*, 2004, 218(2): 128–132.
- [23] 王超. 挤压条件对豌豆粉及其主要组分加工特性的影响研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2019.
- WANG C. Study on the influence of extrusion conditions on the processing characteristics of pea flour

- and its main components[D]. Tianjin:Tianjin University of Commerce, 2019.
- [24] CARBONARO M, MASELLI P, NUCARA A. Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins:a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study[J]. *Amino Acids*, 2011, 43(2): 911-921.
- [25] BONWELL E S, WETZEL D L. Innovative FT-IR imaging of protein film secondary structure before and after heat treatment[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(21): 10067-10072.
- [26] CHEN F L, MIN Y W, ZHANG B, et al. Chemical cross-linking and molecular aggregation of soybean protein during extrusion cooking at low and high moisture content[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2011, 44(4): 957-962.
- [27] OSEN R, TOELESTEDE S, EISNER P, et al. Effect of high moisture extrusion cooking on protein-protein interactions of pea (*Pisum sativum* L.) protein isolates[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2015, 50(6): 1390-1396.
- [28] MA W J, XIE F Y, ZHANG S, et al. Characterizing the structural and functional properties of soybean protein extracted from full-fat soybean flakes after low-temperature dry extrusion[J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3265.
- [29] MOZAFARPOUR R, KOOCHEKI A, MILANI E, et al. Extruded soy protein as a novel emulsifier: Structure, interfacial activity and emulsifying property[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 93: 361-373.
- [30] MAURYA A K, SAID P P. Extrusion processing on physical and chemical properties of protein rich products-an overview [J]. *Journal of Bioresource Engineering and Technology*, 2014, 2(4): 61-67.
- [31] AI Y A, CICHY K A, HARTE J B, et al. Effects of extrusion cooking on the chemical composition and functional properties of dry common bean powders[J]. *Food Chemistry*, 2016, 211: 538-545.
- [32] BARONE J R, SCHMIDT W F, GREGOIRE N T. Extrusion of feather keratin[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, 100(2): 1432-1442.
- [33] ALONSO R, ORUE E, ZABALZA M J, et al. Effect of extrusion cooking on structure and functional properties of pea and kidney bean proteins[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80(3): 397-403.

Effect of Extrusion Treatment on the Structural and Functional Properties of the Adlay Seed Protein Fractions

Wang Jiarong¹, Ou Caizhi^{1,2}, Wu Yue¹, Ding Yangyue¹, Zhang Gaopeng¹, Cheng Jianjun^{1*}

¹College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030

²Jiangsu Daisy Food for Special Medical Purpose Co., LTD, Nantong 226133, Jiangsu)

Abstract Adlay seed (*Coix lacrymajobi* L.) is the mature seed kernel of adlay, a gramineous plant, with a protein content of 12.2% to 16.7%, rich in glutamine, leucine and proline, and easily absorbed by the body. Despite its nutritional balance and healing properties, adlay seed remains an underutilized grain due to its difficult-to-cook characteristics. Extrusion technology integrates mixing, stirring, crushing, heating, sterilization, puffing and forming into one, resulting in a product with not only a higher degree of pasting but also a short production cycle and low cost, which facilitates the consumption of adlay seed and indirectly promotes the economic growth of the adlay seed consumption industry. Some studies have shown that changes in the secondary, tertiary and quaternary structure of proteins depend on high temp-induced cross-link aggregation and high shear-induced mechanical unfolding, so extrusion treatments could have an impact on the structure and properties of proteins. For example, extrusion treatment could induce partial breakage of the hydrogen and disulfide bonds between protein molecules, causing denaturation of proteins, which in turn has an impact on solubility, emulsification and digestibility of proteins, providing new ideas for obtaining a wide range of adlay seed protein products. However, most of the research on the extrusion processing of adlay seed has focused on the effect of extrusion treatment on the starch properties of different varieties of adlay seed, while the extrusion processing of adlay seed protein is less. In addition, in order to enrich and develop the research system of adlay seed protein modifi-

cation, it is necessary to further explore the influence of extrusion treatment on the structure and properties of adlay seed protein components. Therefore, in this study, defatted adlay seed powder was used as the raw material for extrusion and the Osborne classification method was used to separate and extract albumin, globulin, prolamin and glutenin to investigate the effects of extrusion treatment on the structural and functional properties of the four protein fractions. The results showed that the particle size of all four protein fractions decreased significantly after extrusion, and the particle size curves of globulin, prolamin and glutenin showed a multi-peaked distribution. After extrusion, the free sulfhydryl content of the albumin, globulin and glutenin decreased by 72.37%, 40.64% and 51.71%, respectively. And the maximum fluorescence absorption wavelength of these protein fractions was blue-shifted, and the subunit types and molecular weight were also significantly reduced, but there was no significant change in the prolamin. With the exception of globulin, the content of ordered structures, i.e., α -helix and β -sheet, in the secondary structure of all three protein fractions was significantly reduced after extrusion ($P < 0.05$). The water- and oil-holding properties of the albumin, globulin and glutenin were significantly increased ($P < 0.05$). In conclusion, the structural properties of albumin, globulin and glutenin were significantly changed after extrusion, but the prolamin had higher structural stability and resistance to thermal shear. The results could provide theoretical support for the industrial preparation of adlay seed protein fractions and their application in a variety of food formulations.

Keywords adlay seed protein; extrusion treatment; structure; functional properties