

萌发处理对藜麦分离蛋白结构和功能特性的影响

蔡 硕, 靳高阳, 顾瑞娟, 王玉堂*
(西北农林科技大学食品科学与工程学院 陕西杨凌 712100)

摘要 为了提高藜麦蛋白的功能特性和利用率,通过不同萌发时间(0,12,24,48 h)处理藜麦,采用传统碱溶酸沉法提取藜麦分离蛋白(QPI),对其结构特性与功能特性进行分析。结果显示:与未经萌发组相比,经萌发处理的 QPI 结构更加致密,孔洞结构明显减少,表面均匀平滑。当萌发时间从 24 h 变为 48 h 时,可以观察到 QPI 起泡性和泡沫稳定性明显的下降。萌发处理 48 h 时,QPI 表面疏水性、乳化性、乳化稳定性均达到最大值,分别为 6.67、88.8% 和 74.65%,溶解度最低(0.33%)。此外,萌发促使藜麦蛋白体结构降解,高分子质量蛋白条带逐渐消失,藜麦蛋白质的变性温度均有不同程度的降低,酰胺 II 带等范围的官能团伸缩振动明显增强,影响 QPI 的功能特性。这些结果表明萌发处理可以显著影响 QPI 的结构和功能特性,为萌发藜麦的加工处理提供技术参考,为未来植物蛋白的改性与应用提供一定的理论依据。

关键词 藜麦; 分离蛋白; 萌发; 结构特性; 功能特性

文章编号 1009-7848(2023)05-0011-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.002

藜麦是一种原产于南美洲安第斯山脉的双子叶植物,在我国青海、甘肃、四川、西藏、陕西等地区广泛种植,有一定的耐旱、耐寒和耐盐性。藜麦是一种营养全能的“假谷物”,富含蛋白质^[1]、膳食纤维、脂肪以及人体必需的多不饱和脂肪酸^[2]。由于均衡的营养素配比,藜麦被广泛应用于各种食品中。例如,烘焙甜点、沙拉、休闲食品以及混合其它谷物粉制作的面条等^[3]。

藜麦蛋白是一种完全蛋白质,含有人体所需的 8 种必需氨基酸和婴幼儿必需的组氨酸,具有很高的营养价值,有利于运动员、儿童、老年人、乳糖不耐受、糖尿病、血脂异常、肥胖、贫血和腹腔疾病等特殊群体的营养补充^[4]。此外,藜麦蛋白中 44%~77% 是清蛋白和球蛋白,这也是藜麦蛋白中最重要的组成,其次是醇溶蛋白和谷蛋白,这二者含量相对较低,使得藜麦蛋白具有溶解性高的特点,易于被人体吸收利用;同时,藜麦蛋白中存在的二硫键使其拥有良好的稳定性,保证了藜麦原有的特性和营养价值在加工利用过程中不被破坏^[5]。萌发是植物种子通过吸胀作用吸收氧气,排出二氧化碳的一种生理过程。作为一种谷物常见

的精加工方式,萌发能够改善藜麦蛋白质的理化性质,进而对藜麦相关产品的风味、感官品质和功能成分产生积极影响。有研究^[6]表明,萌发处理适当的时间会使藜麦淀粉含量最多下降 24%;脂肪含量呈下降趋势;蛋白质含量先减少后增加;维生素和矿物质等营养素含量明显提高。因此,萌发处理是显著改变藜麦成分含量及理化性质的有效手段。

目前,国内外针对藜麦蛋白的研究主要集中在超声处理^[7]、热诱导^[8]、微波处理^[9]等外在条件对 QPI 的营养特性、功能特性、结构特性的影响,而鲜有研究评估萌发处理对 QPI 特性的影响。本研究以青海黑色藜麦为试材,采用碱溶酸沉法提取 QPI,通过控制萌发处理时间(0,12,24,48 h),以蛋白质的变性程度作为变量,对 QPI 的功能特性(溶解性、乳化性及乳化稳定性、起泡性及泡沫稳定性、DSC 热学特性、荧光特性)和结构特性(扫描电镜、二级结构、SDS-PAGE 凝胶电泳、表面疏水性)进行系统研究,分析萌发处理对藜麦蛋白特性的影响,为藜麦精深加工提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

供试黑色藜麦产地为格尔木(中国青海),生产日期为 2020 年 8 月。

收稿日期: 2022-05-02

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2021NY-125)

第一作者: 蔡硕,女,硕士

通信作者: 王玉堂 E-mail: wyt991023@nwsuaf.edu.cn

SDS-PAGE 用标准蛋白, BIO-RAD 公司; 8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)、考马斯亮蓝 R-250、DTNB (Ellmann 试剂)、牛血清蛋白(BSA), 美国 Sigma 公司; 乙二胺四乙酸(EDTA), 国药集团化学试剂有限公司; 电泳制胶液、Tris-甘氨酸、四甲基乙二胺(TEMED)、蛋白 Marker 等为电泳级, 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

HC-3018R 型冷冻离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; LGJ-25G 型真空冷冻干燥机, 北京四环仪器厂 Factory; FE20K 型 pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; ETS-D5 型恒温磁力搅拌器, 德国 IKA 集团; UV-1700 型紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司; Q2000 型差示量热扫描仪(DSC), 美国 WATERS 公司; Vetex-70 型傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR), 德国布鲁克公司; LS55 型荧光分光光度计, 美国 PE 公司; GE1DOC XR+型凝胶成像系统, 美国 Bio-rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 藜麦萌发处理方法 参考廖映秀等^[10]的方法: 在室温条件下, 萌发组藜麦用去离子水浸泡 6 h, 沥干水后均匀铺在垫有湿纱布的铁盘, 置于室温 25 °C 的房间内进行萌发, 期间每 6 h 喷淋去离子水。试验以萌发时间为变量, 设置 0, 12, 24 h 和 48 h 的萌发时间。萌发后冷冻干燥, 打粉后过 80 目筛。

1.3.2 藜麦蛋白质的提取 参考王隼等^[11]的方法并作适度调整, 提取过程如下: 取适量藜麦粉与正己烷按料液比 1:3 比例配制, 室温下恒温磁力搅拌 2 h, 抽滤, 重复以上步骤 2 次后, 置于通风处自然挥发溶剂 12 h 得到脱脂藜麦粉。然后按 1:10 的料液比加入蒸馏水, 室温下调节 pH 值至 10, 搅拌 2 h, 13 500×g 离心 30 min 并收集上清液, 重复浸提 2 次, 合并上清液并调节 pH 值至 4.5, 静置 30 min 后 3 300×g 离心 20 min, 收集全部沉淀, 用蒸馏水洗涤 2 次, 室温下调节 pH 值至 7.0, 冷冻干燥后即得到 QPI。

1.3.3 QPI 结构特性的测定

1.3.3.1 扫描电镜测定 将冻干后的藜麦蛋白粉均匀平整的粘贴在扫描电镜专用台面上, 粘贴好样品之后, 对其表面进行离子溅射喷金, 调整好参

数, 在高倍放大倍数下, 12 000 倍调整清晰度, 细调 X、Y 按钮, 分别在 1 000, 3 000, 8 000 放大倍数下观察样品, 使用内置软件捕获图像, SEM 加速电压设置为 5 kV。

1.3.3.2 二级结构测定 室温条件下, 将冻干后的藜麦蛋白粉与溴化钾按质量比 1:100 的比例混匀后, 进行手动研磨压片, 用 FT-IR 仪进行扫描。分辨率设为 4 cm⁻¹, 波数 4 000~400 cm⁻¹ 进行扫描^[12]。

1.3.3.3 表面疏水性测定 表面疏水性参考 Li 等^[13]的 ANS 荧光探针法来测定。具体操作如下: 用 0.1 mol/L 中性磷酸盐缓冲溶液将样品溶液配制成 0.150, 0.075, 0.038, 0.019 mg/mL 4 个质量浓度, 滴加 8 mmol/L 的 ANS 溶液 20 μL 至 4 组蛋白溶液中振荡混匀, 避光静置 15 min 后测试。测试条件为: 激发波长 390 nm, 发射波长 470 nm, 扫描夹缝 5 nm, 扫描速率 10 nm/s。以蛋白质浓度为 x 轴, 荧光强度为 y 轴作线性图, 图形斜率值即表示蛋白的表面疏水性大小。

1.3.3.4 DSC 热学特性分析 使用 DSC 法测定冻干处理后的藜麦蛋白变性温度。称取 6~8 mg 藜麦蛋白于坩锅中, 以空坩锅作为对照, 测试参数设置: 氮气流速 20 mL/min, 升温速率 10 °C/min, 20~150 °C 扫描得到曲线, 所得数据采用 TA Universal analysis 软件分析。

1.3.3.5 内源荧光测定 将冻干后的 QPI 溶解于中性磷酸盐缓冲溶液中, 制成 0.10 mg/mL 质量浓度的样品。内源荧光的测定主要是荧光分光光度计以藜麦蛋白所含的色氨酸基团为荧光探针所测定的^[14], 在此过程中, 为了避免其它氨基酸, 如酪氨酸的荧光干扰, 设置荧光光谱的激发波长为 290 nm, 光谱的扫描范围设置为 300~400 nm, 激发狭缝和发射狭缝宽均设置为 5 nm。

1.3.3.6 SDS-PAGE 凝胶电泳分析 参考 Wang 等^[15]凝胶电泳测试方法并作适度调整。分离胶为 12.5%, 浓缩胶为 4%。将藜麦蛋白与上样缓冲溶液混合配制, 使蛋白质量浓度为 1 mg/mL, 95 °C 水浴加热 5 min, 在蛋白凝胶电泳中上样 10 μL。电泳测试过程中调控浓缩胶电压和分离胶电压分别为 80 V 和 120 V。以蒸馏水、冰乙酸、甲醇、0.1% 考马斯亮蓝 R-250 共同配制染色剂, 配置完成之后侵

染蛋白电泳胶,并以甲醇、冰乙酸、蒸馏水配制脱色剂用于染色之后脱除蛋白电泳胶的底色背景。

1.3.4 QPI 功能特性的测定

1.3.4.1 溶解性

1) 标准曲线的制作 准确称取 5 mg 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 粉末于 50 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容到 50 mL 制成 0.1 mg/mL 的 BSA 试剂备用。然后用蒸馏水将 0.1 mg/mL 的 BSA 试剂稀释成 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 mg/mL 的梯度溶液。将不同质量浓度梯度的 200 μ L BSA 试剂和 1 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂反应 10 min 后在波长 595 nm 下测定其吸光度。

2) 藜麦蛋白溶解度的测定 准确称取藜麦蛋白粉 100 mg 于 25 mL 烧杯中,加入 10 mL 蒸馏水后在磁力搅拌仪上搅拌 1 h。搅拌结束后的混合物置于高速冷冻离心机中,20 $^{\circ}$ C、8 000 \times g 离心 20 min 以获得上清液,备用。取 200 μ L 藜麦蛋白溶液和 1 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂反应 10 min 后在波长 595 nm 处测定其吸光度。按公式(1)计算藜麦蛋白的溶解度。

$$\text{蛋白质溶解度}(\%) = \frac{\text{上清液中蛋白的含量}}{\text{称取的总蛋白含量}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.4.2 乳化性及乳化稳定性 取 0.25 g 藜麦蛋白分散于 5 mL 蒸馏水中,加入 5 mL 菜籽油,混合振荡并进行高速均质处理制备为均一乳液,倒入平底容器静置至乳化层稳定,测量并记录乳化层高度(H_1)和管中液体总高度(H_2)。将上述离心管置于 80 $^{\circ}$ C 水浴中加热 30 min,冷却至室温后离心,测量并记录乳化层高度(H_3)和液体总高度(H_4)。蛋白质乳化性及乳化稳定性按式(2)和(3)计算:

$$\text{蛋白质乳化性}(\%) = \frac{H_1}{H_2} \times 100 \quad (2)$$

式中, H_1 ——第 1 次测得的乳化层高度,cm;
 H_2 ——第 1 次测得的液体总高度,cm。

$$\text{蛋白质乳化稳定性}(\%) = \frac{H_3}{H_4} \times 100 \quad (3)$$

式中, H_3 ——加热后测得的乳化层高度,cm;

H_4 ——加热后测得的液体总高度,cm。

1.3.4.3 起泡性及泡沫稳定性 取 350 mg 藜麦蛋白溶于 50 mL 蒸馏水中,10 000 r/min 均质 2 min。30 s 之后记录泡沫体积,记为 V_1 ,再分别测定静置 15, 30, 45, 60 min 后的泡沫体积。蛋白质起泡性及泡沫稳定性按式(4)和(5)计算:

$$\text{蛋白质起泡性}(\%) = \frac{(V_1 - \text{原始体积})}{\text{原始体积}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{蛋白质泡沫稳定性}(\%) = \frac{\text{静置后泡沫体积}}{(V_1 - \text{原始体积})} \times 100 \quad (5)$$

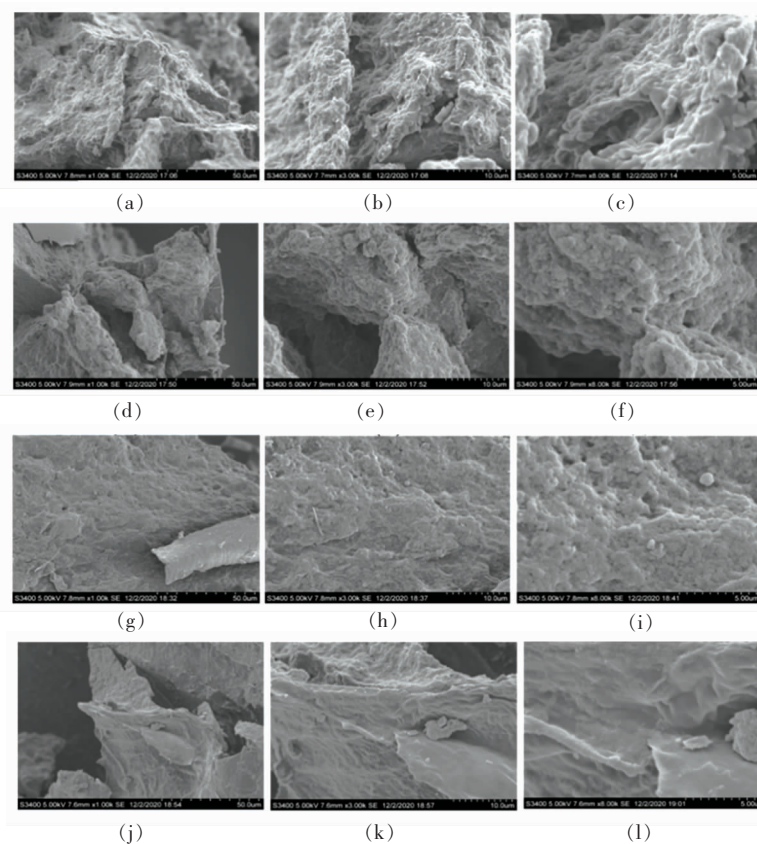
式中, V_1 ——均质后测得的泡沫体积,mL。

2 结果与分析

2.1 萌发处理对 QPI 结构特性的影响

2.1.1 萌发处理对 QPI 扫描电镜结构的影响 用扫描电镜分别在 1 000 倍、3 000 倍和 8 000 倍下观察经萌发处理后的藜麦蛋白的表面结构,从图 1 可以看出,未进行萌发处理的 QPI 的表面结构疏松多孔,褶皱较多;而萌发处理之后 QPI 的微观结构变化显著,其表面均匀平滑,结构紧密。这可能是由于某些酶在萌发过程中促进了藜麦蛋白分子的水解和展开。因此,蛋白的结构形态变得均匀平滑。

2.1.2 萌发处理对 QPI 二级结构的影响 一般来说,蛋白质的酰胺 I 带(1 700~1 600 cm^{-1})包含了 C=O 键和 C-N 键的伸缩振动及微弱的 N-H 面内弯曲振动,酰胺 I 带对二级结构的变化非常敏感,因此红外光谱常被用于分析蛋白质的二级结构^[16]。3 600~3 300 cm^{-1} 的强吸收峰通常可以表示藜麦蛋白分子内部及其分子间氢键、O-H、C-H 键伸缩振动的强度^[17],与 N-H 拉伸有关的酰胺 II 带带在 1 575~1 480 cm^{-1} 范围内,而出现在 1 400~1 200 cm^{-1} 范围内的酰胺 III 带则与 C-N 拉伸和 N-H 弯曲有关^[18]。通过图 2 可以看出,未处理组与萌发处理组蛋白质吸收区和峰形在 1 400 cm^{-1} 和 1 600 cm^{-1} 波长处基本相同,无太大差异。然而,萌发会明显增强 N-H、C-H、O-H 和氢键的伸缩振动,导致波段的变化,从而影响藜麦蛋白的功能特性。



注:(a)~(c)图为萌发0 h后在1 000,3 000,8 000倍下观察到的藜麦蛋白表面结构;(d)~(f)图为萌发12 h后在1 000,3 000,8 000倍下观察到的藜麦蛋白表面结构;(g)~(i)萌发24 h后在1 000,3 000,8 000倍下观察到的藜麦蛋白表面结构;(j)~(l)图为萌发48 h后在1 000,3 000,8 000倍下观察到的藜麦蛋白表面结构。

图1 不同萌发时间对QPI聚集体外貌形态的影响

Fig.1 The effect of different germination time on the appearance of QPI aggregates

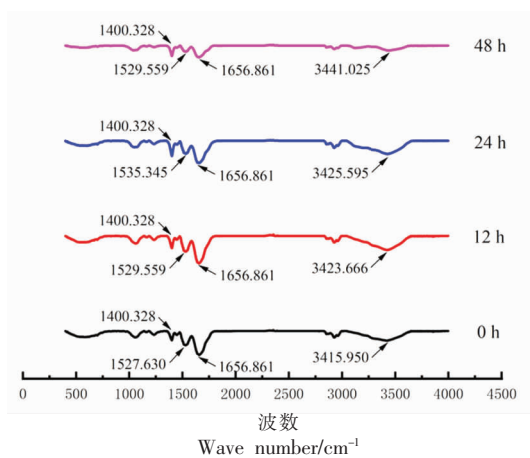
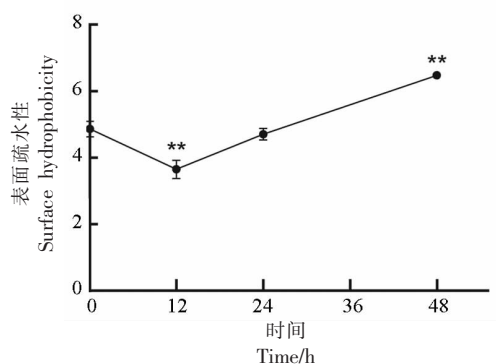


图2 萌发处理后QPI的FT-IR红外光谱
Fig.2 FT-IR spectra of QPI after FT-IR germination treatment

2.1.3 萌发处理对QPI表面疏水性的影响 表面疏水性可以反映疏水性氨基酸在蛋白质表面的分布情况,与蛋白质的功能特性密切相关^[19]。暴露在蛋白质表面的疏水性氨基酸越多,则蛋白质的表面疏水性越大,分子内蛋白质之间和蛋白质-脂质的相互作用也会影响蛋白质的表面疏水性大小。由图3可知,藜麦蛋白的表面疏水值随着萌发时间的延长先下降后上升,在萌发48 h后达到最大值,这可能是由于激活了某种藜麦萌发过程中的内源性蛋白酶,藜麦蛋白质展开并暴露蛋白质分子中更多的疏水残基。这与Liu等^[20]之前的研究结果一致,即萌发处理提高了大豆分离蛋白的表面疏水性。此外,表面疏水性的增强与QPI的扫描电镜结果也是相一致的,即萌发促使QPI结构展开,导致更多疏水性氨基酸的暴露。



注:结果表示为平均值±标准误差;显著性为:与 0 h 相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$,下同。

图 3 萌发时间对 QPI 表面疏水性的影响

Fig.3 Effect of germination time on the surface hydrophobicity of QPI

2.1.4 萌发处理对 QPI DSC 热学特性的影响

DSC 常用于蛋白质热变性过程的热学研究。蛋白质受热吸收能量,氢键和范德华力被破坏,蛋白质分子展开,无序性增强,这一过程即为热变性过程^[21]。峰值温度(Peak temperature, T_p)代表蛋白质热稳定性与聚集程度^[22]。由图 4 可知,4 组藜麦蛋白均出现了明显的放热峰,其 T_p 值顺序为:0 h>24 h>12 h>48 h。与未萌发处理的藜麦蛋白质相比,萌发处理之后的藜麦蛋白质变性温度均有不同程度的降低。表明萌发藜麦的蛋白质发生变性所需热量减少,这可能是萌发处理导致藜麦蛋白质组成改变,新生成的蛋白质结构更紧密。

2.1.5 萌发处理对 QPI 色氨酸荧光强度的影响

色氨酸(Tryptophan, Trp)残基对微环境的变化十分敏感,因此常被用作研究蛋白分子三级结构的变化及蛋白质间的相互作用的表征参数。激发波长 290 nm 下, QPI 发射的内源荧光主要来自于 Trp。如图 5 所示,萌发处理后的 QPI 具有相同的谱峰形状,随着萌发处理时间的延长, QPI 的荧光强度也随之减小,4 种样品在波长 340 nm 处的吸收峰强度顺序为:0 h>12 h>24 h>48 h;荧光峰的位置未有明显迁移;除此之外,未处理的 QPI 最大发射波长在 340 nm 处且荧光强度最大,表明色氨酸残基位于 QPI 的内部疏水区域^[23]。随着萌发时间的延长,蛋白质的变性程度越大,蛋白结构展开,暴露在表面的 Trp 残基越多,发色团电子跃迁所需能量减少,荧光量子产率降低,导致荧光强度的

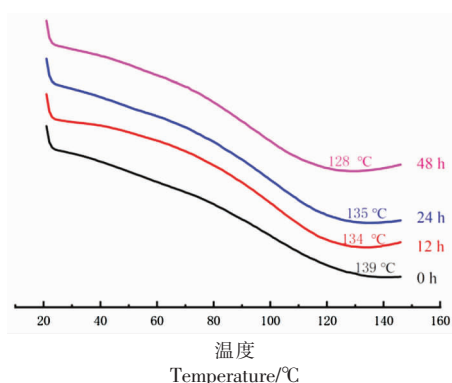


图 4 萌发后 QPI 的差示扫描量热分析

Fig.4 Differential scanning calorimetry analysis of QPI after germination

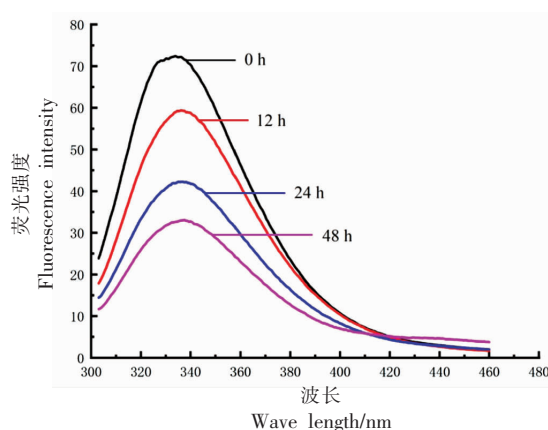


图 5 萌发后 QPI 的内源荧光光谱图

Fig.5 The endogenous fluorescence spectrum of QPI after germination

降低^[24]。Sun 等^[25]研究表明蛋白质氧化情况及结构变化情况可通过荧光强度的变化反映,乳液荧光强度显著降低表明蛋白质的结构逐渐展开,这与前面的研究结果一致。

2.1.6 萌发处理对 QPI 凝胶电泳的影响 萌发处理不同时长后的 QPI 的 SDS-PAGE 电泳结果如图 6 所示。藜麦的蛋白质分布主要集中在 30~72 ku 和 130 ku 附近,而分子量小于 30 ku 的相对较少。萌发时间达到 24 h 后,在 30 ku 和 43 ku 处只显示出轻微的条带,而萌发 48 h 的蛋白质条带趋于消失。这些蛋白条带的消失,可能是因为这部分蛋白参与了藜麦萌发的代谢,为自身提供能量,在此过程中,蛋白水解酶被激活,大分子蛋白被分解成更小分子的蛋白质、肽和氨基酸等。可以看

出,萌发引起了QPI分子组成的改变,高分子质量蛋白被分解成低分子质量蛋白、低分子质量蛋白逐渐消失,从而引起QPI结构和性质的变化。

2.2 萌发处理对QPI功能特性的影响

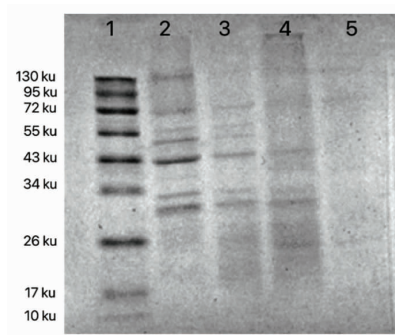
2.2.1 萌发处理对QPI溶解性的影响

溶解度体现的是蛋白质在水相环境中的分散能力,同时对蛋白质的其它结构特性有着重要影响^[26]。图7展示出:不同时间的萌发处理均会显著($P<0.05$)降低QPI的溶解度。与未进行萌发处理的藜麦相比,萌发24 h的QPI溶解度变化最小;其次是萌发时间12 h的藜麦;萌发48 h的QPI溶解度下降了约2~3倍,这可能是由于长时间的萌发破坏了蛋白的高级结构,使其在化学键的作用下形成大分子质量聚集体,从而显著降低了蛋白的溶解度。这与延莎等^[27]经过研究得出的结论相似,溶解度的降低与蛋白质表面电荷的变化引起的疏水作用增强有关^[28]。萌发是种子呼吸代谢的过程,在这个过程中种子中的水分、温度等因子不断变化,促使一些基因表达活化,同时在内源酶的作用下,引发一系列与胚生长有关的反应,原有蛋白不断分解并合成新的蛋白,组成和结构改变的蛋白质可能具有更好的亲水性,因此溶解性提升^[29],这可能是萌发处理24 h的藜麦蛋白质溶解度突然增大的原因。

2.2.2 萌发处理对QPI乳化性及乳化稳定性的影响

乳化性是指蛋白质促进水油相互作用形成乳浊液的能力,而乳化稳定性是保持乳浊液状态的性能。从图8a中可以看出,QPI乳化性随着萌发时间的延长呈现先减小后增大的变化趋势,乳化能力依次为萌发处理48 h>24 h>0 h>12 h,对萌发处理时长为24 h和48 h这2个试验组乳化活性的显著($P<0.05$)提高,这可能是由于蛋白质和脂肪之间的高度相互作用引起的——多肽链断裂导致蛋白质的疏水部位大量暴露,这些部位与脂类结合,帮助QPI获得了更好的乳化特性^[30],这与上述对QPI的表面疏水性研究结果相一致。

QPI乳化稳定性的变化趋势与乳化性相似。QPI在蛋白酶的作用下,界面特性部分改变,一些新蛋白或蛋白亚基在油-水界面上相互作用更紧密,界面强度提高,使乳化稳定性改善^[31]。萌发时长12 h,藜麦蛋白的乳化稳定性稍有下降,萌发时



注:1~5泳道分别为:蛋白质分子质量Marker、萌发处理0,12,24,48 h。

图6 萌发后QPI的SDS-PAGE图谱

Fig.6 SDS-PAGE profile of QPI after germination

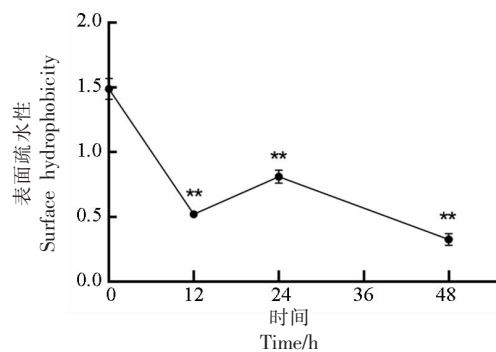


图7 不同萌发时间对QPI溶解度的影响

Fig.7 The influence of different germination time on the solubility of QPI

长24 h和48 h,乳化稳定性随着萌发时间的延长显著增强($P<0.05$),且在萌发时长为48 h时乳化稳定能力达到最大,约80%(图8b)。

上述结果与尹丽莎等^[32]的超声处理对藜麦分离蛋白功能特性和微观结构的影响的试验结果相似。众所周知,蛋白质的乳化性及乳化稳定性与其分子结构密切相关。乳化体系的形成是疏水、亲水基团与油、水相互作用产生的乳化现象,萌发处理时间越长,蛋白质分子的内部结构展开越彻底,这使得蛋白质分子表面的疏水区充分暴露,增加了疏水基团与油相的相互作用,因此在这个过程中蛋白质的乳化性被提高。除此之外,蛋白质的溶解度在乳化性能中也起着重要作用。在本研究中,QPI的乳化能力发生明显变化就有可能是由于QPI的溶解度减低,使其无法在油水界面迅速扩散和吸附造成的结果。

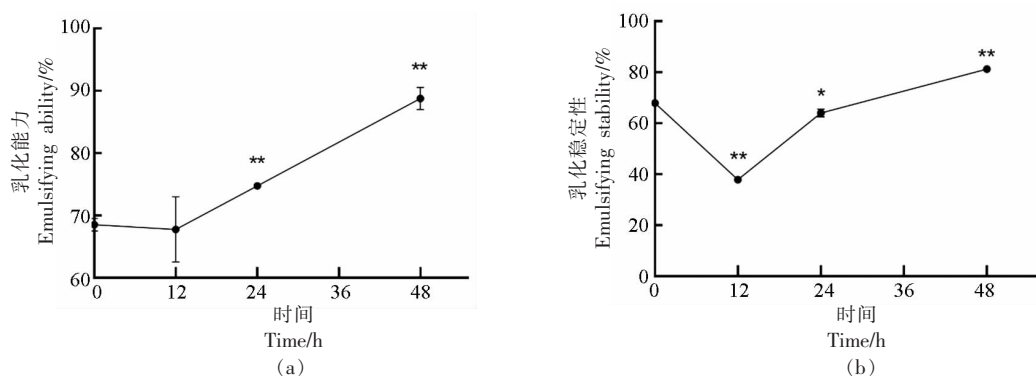


图 8 不同萌发时间对 QPI 乳化性(a)及乳化稳定性(b)的影响

Fig.8 The influence of different germination time on QPI emulsification (a) and emulsification stability (b)

2.2.3 萌发处理对 QPI 起泡性及泡沫稳定性的影响 蛋白质的起泡性与蛋白的类型、浓度、水合能力及蛋白质膜的流变性等相关,良好的蛋白质起泡特性可赋予食品蓬松软糯的结构和优良的适口性^[33]。从图 9a 可以看出,萌发对藜麦蛋白起泡性的影响与乳化性恰好相反,呈现先增大后减小趋势。萌发 24 h, QPI 的起泡能力达到最大值 75.38%, 约为萌发前的 1.5 倍, 这可能与蛋白质表面疏水性有紧密的关系, 萌发时藜麦蛋白质适度水解, 更多的表面疏水相互作用导致了更高的起泡能力。萌发处理 48 h 组起泡性和泡沫稳定性明显 ($P < 0.05$) 降低的原因可能是 QPI 中结合有少量皂苷

产生的影响或过度的萌发导致蛋白质进一步水解,一级结构发生破坏,进而出现 QPI 起泡性降低的现象。

萌发处理虽将 QPI 中的大肽水解成小肽,提高了 QPI 的起泡能力,但是并没有产生稳定的泡沫^[34]。蛋白质的泡沫稳定性取决于蛋白质膜的流变学特性,以及蛋白质-蛋白质之间的相互作用和环境因素(pH 值和温度)等。从图 9b 中可以看出, QPI 的泡沫稳定性随静置时间的延长而降低,且不同处理时长的 QPI 泡沫稳定性也存在显著差异。这些结果表明控制适当的萌发处理时间有利于提高 QPI 的发泡能力。

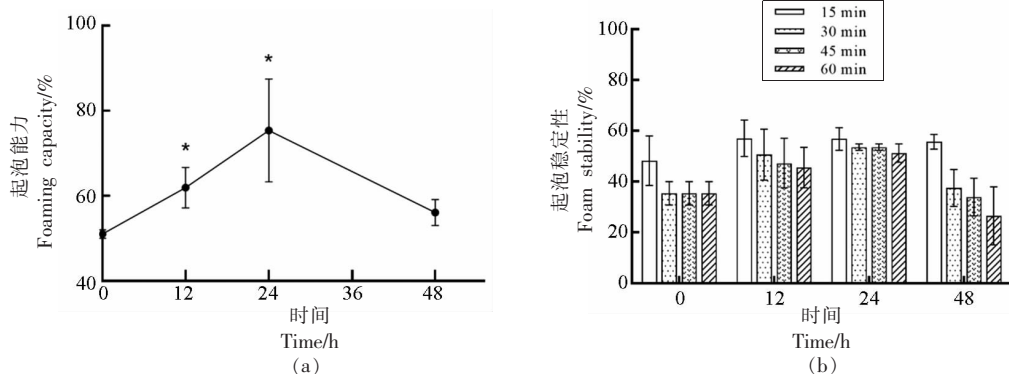


图 9 不同萌发时长对 QPI 起泡性(a)及泡沫稳定性(b)的影响

Fig.9 The influence of different germination time on QPI foamability (a) and foam stability (b)

3 结论

本文探究了不同萌发处理时间对 QPI 结构与功能特性的影响。结果表明,萌发处理 48 h 时, QPI 拥有最高的表面疏水性、乳化性、乳化稳定性的同时也具有最低的溶解度、变性温度与荧光强

度;萌发处理 24 h 时, QPI 具有最好的起泡能力和泡沫稳定性。综上所述,选择适当的萌发处理会帮助改善 QPI 的表面结构,提高蛋白的表面疏水值,溶解度、起泡性及起泡稳定性、乳化性及乳化稳定性等特性也可以得到改善。总的来说,适度的萌发

处理可以得到 QPI 有利的结构和构象变化, 这样的结构和构象变化积极的影响着 QPI 的各种结构特性和功能特性。后续研究可以考虑萌发过程中 QPI 的转化机制, 针对萌发藜麦中主要蛋白(球蛋白和白蛋白)进行分离提取, 研究其营养活性和变化规律。

参 考 文 献

- [1] 黄金. 基于藜麦营养及功能成分的健康食品研发[D]. 贵州: 贵州大学, 2017.
HUANG J. Research and development of healthy food based on quinoa nutrition and functional ingredients[D]. Guizhou: Guizhou University, 2017.
- [2] FANALI C, BECCARIA M, SALIVO S, et al. Non-polar lipids characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa*) seed by comprehensive two-dimensional gas chromatography with flame ionization/mass spectrometry detection and non-aqueous reversed-phase liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry detection[J]. Sep Sci, 2015, 38(18): 3151-3160.
- [3] RAM R C V, LA S. Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd.) as a source of dietary fiber and other functional components[J]. Food Science and Technology (Campinas), 2011, 31(1): 225-230.
- [4] SEMRA N, NEVIN S. Nutritional and health benefits of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)[J]. Journal of Cereal Science, 2016, 69: 371-376.
- [5] 王龙飞, 王新伟, 赵仁勇. 藜麦蛋白的特点、性质及提取的研究进展[J]. 食品工业, 2017, 38(7): 255-258.
WANG L F, WANG X W, ZHAO R Y. Research progress in the characteristics, properties, and extraction of quinoa protein[J]. Food Industry, 2017, 38(7): 255-258.
- [6] 管骁, 马志敏, 宋洪东, 等. 萌发藜麦的营养及其功能特性研究进展[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(4): 1-11.
GUAN X, MA Z M, SONG H D, et al. Research progress on nutrition and functional characteristics of germinated quinoa[J]. Cereals, Oils and Foods Science and Technology, 2021, 29(4): 1-11.
- [7] CAO H W, SUN R L, SHI J R, et al. Effect of ultrasonic on the structure and quality characteristics of quinoa protein oxidation aggregates[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 77: 105685.
- [8] YANG Z, DECAMPO L, PAUL GILBERT E, et al. Effect of NaCl and CaCl₂ concentration on the rheological and structural characteristics of thermally-induced quinoa protein gels[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 124: 0268-005X.
- [9] 苏巧艳. 微波处理对藜麦蛋白功能特性的影响[J]. 食品工程, 2021(2): 33-37.
SU Q Y. The effect of microwave treatment on the functional properties of quinoa protein[J]. Food Engineering, 2021(2): 33-37.
- [10] 廖映秀, 戴红燕, 杨蛟, 等. 温度对陇藜 1 号种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(19): 30-33.
LIAO Y X, DAI H Y, YANG J, et al. Effects of temperature on seed germination and seedling growth of Longliu No.1[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(19): 30-33.
- [11] 王斐, 张文斌, 杨瑞金, 等. 藜麦蛋白质的提取及其功能性质研究[J]. 食品科技, 2018, 43(2): 228-234.
WANG D, ZHANG W B, YANG R J, et al. Study on the extraction of quinoa protein and its functional properties[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(2): 228-234.
- [12] 齐宝坤, 赵城彬, 李杨, 等. 热处理对大豆 11S 球蛋白溶解性和二级结构的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 39-44.
QI B K, ZHAO C B, LI Y, et al. Effects of heat treatment on solubility and secondary structure of soybean 11S globulin[J]. Food Science, 2018, 39(22): 39-44.
- [13] LI T, WANG C Y, LI T Q, et al. Surface hydrophobicity and functional properties of citric acid cross-linked whey protein isolate: The impact of pH and concentration of citric acid[J]. Molecules, 2018, 23(9): 2383.
- [14] 周麟依, 孙玉凤, 吴非. 丙二醛氧化对米糠蛋白结构及功能性质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 98-107.
ZHOU L Y, SUN Y F, WU F. Effect of malondialdehyde oxidation on the structure and functional properties of rice bran protein[J]. Food Science, 2019, 40(12): 98-107.

- [15] WANG X W, ZHAO R Y, YUAN W Q. Composition and secondary structure of proteins isolated from six different quinoa varieties from China [J]. *Journal of Cereal Science*, 2020, 95: 103036.
- [16] 刘紫薇, 朱明明, 王凤新, 等. 高温湿热处理对大豆分离蛋白的结构及其功能特性的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(15): 157-164.
LIU Z W, ZHU M M, WANG F X, et al. The effect of high temperature and humidity heat treatment on the structure and functional properties of soybean protein isolate[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(15): 157-164.
- [17] SCHMIDT V, GIACOMELLI C, SOLDI V. Thermal stability of films formed by soy protein isolate - sodium dodecyl sulfate[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2005, 87(1): 25-31.
- [18] MIR N A, RIAR C S, SINGH S. Structural modification of quinoa seed protein isolates (QPIs) by variable time sonification for improving its physicochemical and functional characteristics[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2019, 58: 104700.
- [19] 贾娜, 林世文, 王乐田, 等. 没食子酸诱导肌原纤维蛋白巯基含量和表面疏水性变化对蛋白凝胶特性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(22): 1-7.
JIA N, LIN S W, WANG L T, et al. Effects of gallic acid-induced changes in myofibrillar protein sulfhydryl content and surface hydrophobicity on protein gel properties[J]. *Food Science*, 2020, 41(22): 1-7.
- [20] LIU A J, YIN S W, LI L. Structure, trypsin inhibitor activity and functional properties of germinated soybean protein isolate[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2014, 49(3): 911-919.
- [21] 冉乐童, 郭丹郡, 胥伟, 等. 喷雾干燥与冷冻干燥对蛋清粉功能特性的影响[J]. *食品科技*, 2021, 46(11): 69-73.
RAN L T, GUO D J, XU W, et al. Effects of spray drying and freeze drying on functional properties of egg white powder[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(11): 69-73.
- [22] 代晓凝, 刘丽莉, 陈珂, 等. 不同干燥方式对蛋清粉蛋白质凝胶特性及结构的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(19): 112-118.
DAI X N, LIU L L, CHEN K, et al. Effects of different drying methods on the properties and structure of egg white powder protein gel[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(19): 112-118.
- [23] ERIC D, GASTON H, TOMASZ H. High-pressure effects on β^2 -lactoglobulin interactions with ligands studied by fluorescence[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1994, 1206(2): 166-172.
- [24] 张俊杰, 郑嘉琛, 谢宜桐, 等. 高水分挤压温度对绿豆蛋白结构的影响[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(20): 130-136.
ZHANG J J, ZHENG J C, XIE Y T, et al. The effect of high moisture extrusion temperature on the structure of mung bean protein[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2022, 43(20): 130-136.
- [25] SUN W Z, ZHAO M M, YANG B, et al. Oxidation of sarcoplasmic proteins during processing of Cantonese sausage in relation to their aggregation behaviour and *in vitro* digestibility[J]. *Meat Science*, 2011, 88(3): 462-467.
- [26] 孙筱. 高强度超声对芸豆蛋白理化和功能特性的影响[J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(2): 93-96.
SUN X. The effect of high-intensity ultrasound on the physicochemical and functional properties of kidney bean protein[J]. *Cereals & Oils*, 2021, 34(2): 93-96.
- [27] 延莎, 刘新秀, 冯翠萍, 等. 湿热处理对藜麦蛋白功能特性的影响[J]. *食品工业*, 2018, 39(3): 39-43.
YAN S, LIU X X, FENG C P, et al. The effect of heat treatment on the functional properties of quinoa protein[J]. *Food Industry*, 2018, 39(3): 39-43.
- [28] 彭武, 王炜清, 王萍, 等. 贮藏条件对核桃仁蛋白质品质的影响[J]. *食品与机械*, 2021, 37(4): 143-149.
PENG W, WANG W Q, WANG P, et al. Effects of storage conditions on the protein quality of walnut kernels[J]. *Food and Machinery*, 2021, 37(4): 143-149.
- [29] 张文刚, 杜春婷, 杨希娟, 等. 不同加工方式对藜麦蛋白质结构与功能特性的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(7): 88-95.
ZHANG W G, DU C T, YANG X J, et al. Effects of different processing methods on protein structure and functional properties of quinoa[J]. *Food Science*, 2022, 43(7): 88-95.
- [30] SINGH A, SHARMA S, SINGH B. Effect of germination time and temperature on the functionality and

- protein solubility of sorghum flour[J]. *Journal of Cereal Science*, 2017, 76(5): 131–139.
- [31] SUAREZ-ESTRELLA D, BRESCIANI A, LAMETTI S, et al. Effect of sprouting on proteins and starch in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2020, 75(4): 635–641.
- [32] 尹丽莎, 朱莹莹, 董吉林, 等. 超声处理对藜麦分离蛋白功能特性和微观结构的影响[J]. *轻工学报*, 2022, 37(2): 38–43.
- YIN L S, ZHU Y Y, DONG J L, et al. Effects of ultrasonic treatment on the functional properties and microstructure of quinoa protein isolate[J]. *Journal of Light Industry*, 2022, 37(2): 38–43.
- [33] 杨华连, 陈莉, 卢红梅, 等. 提取方法对薏仁碎米蛋白氨基酸组成及功能特性的影响[J]. *食品科技*, 2018, 43(11): 262–268.
- YANG H L, CHEN L, LU H M, et al. Effects of extraction methods on the amino acid composition and functional properties of barley protein[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(11): 262–268.
- [34] GHUMMAN A, KAUR A, SINGH N. Impact of germination on flour, protein and starch characteristics of lentil (*Lens culinari*) and horsegram (*Macrotyloma uniflorum* L.) lines[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 65: 137–144.

Effects of Germination Treatment on the Structural and Functional Properties of Quinoa Protein Isolate

Cai Shuo, Jin Gaoyang, Gu Ruijuan, Wang Yutang*

(College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi)

Abstract In order to improve the functional characteristics and utilization rate of quinoa protein, this study treated quinoa with different germination times (0, 12, 24, 48 h), extracted quinoa protein isolate (QPI) using traditional alkali solution and acid precipitation method, and analyzed its structural and functional characteristics. The results showed that compared with the non germinated group, the QPI after germination treatment had a denser structure, significantly reduced pore structure, and a uniform and smooth surface. After 48 hours of germination treatment, the surface hydrophobicity, emulsification, and emulsification stability of QPI reached their maximum values, which were 6.67, 88.8% and 74.65%, respectively, with the lowest solubility (0.33%). In addition, germination promotes the degradation of the structure of quinoa protein bodies, and the disappearance of high molecular weight protein bands. The denaturation temperature of quinoa protein is reduced to varying degrees, and the stretching vibration of functional groups such as amide II bands is significantly enhanced, which affects the functional characteristics of QPI. These results indicated that germination treatment could significantly affect the structural and functional characteristics of QPI, providing an effective reference for the processing of germinated quinoa, and providing a theoretical basis for the modification and application of plant protein in the future.

Keywords quinoa; isolate protein; germination; structural properties; functional properties