

热处理对小麦面筋蛋白结构、酶解特性和非氮端谷氨酰胺含量的影响

龚昱荣, 赵超亚, 郑淋, 赵谋明, 刘通讯*

(华南理工大学食品科学与工程学院 广州 510640)

摘要 目的:探究不同加热温度和时间对小麦面筋蛋白结构特性、酶解特性以及非氮端谷氨酰胺含量的影响。方法:首先选择 4 个加热温度(60,70,80,90 °C)3 个加热时间(15,30,60 min)对小麦面筋蛋白进行前处理,然后用 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶酶解蛋白,以未经前处理的小麦面筋蛋白酶解物为参考,比较小麦面筋蛋白酶解前的结构变化和酶解后水解效率及非氮端谷氨酰胺含量的差异。结果:小麦面筋蛋白在水中形成的面团结构随加热温度的升高而逐渐松散乃至分散,同时热处理改变了小麦面筋蛋白的二级结构,这可能暴露出更多的酶切位点。热处理可显著促进酶解物的水解,提高其非氮端谷氨酰胺的含量($P < 0.05$)。特别是经 90 °C 加热 30 min 处理的小麦面筋蛋白,与对照组蛋白酶解物相比,其酶解物中分子量小于 1 ku 的组分占比由 75.85% 提高到 80.75%,非氮端谷氨酰胺含量由 26.27% 提高到 34.87%。结论:热处理有利于提高小麦面筋蛋白的酶解,可增加酶解物中非氮端谷氨酰胺的含量。

关键词 小麦面筋蛋白; 热处理; 酶解特性; 非氮端谷氨酰胺

文章编号 1009-7848(2024)09-0244-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.023

小麦面筋蛋白(谷朊粉)是指小麦粉经水洗后,去除淀粉及水溶性物质的复杂黏性蛋白,属于淀粉生产加工中的副产物。小麦面筋蛋白主要由麦谷蛋白和麦醇溶蛋白组成,通过二硫键、氢键、疏水作用等相互作用形成致密三维网状结构^[1],这导致该蛋白的溶解性较差,从而限制了在食品中的加工和利用。酶法改性作为一种温和的蛋白改性手段,不仅能够提高小麦面筋蛋白的溶解性,还可以通过水解制备出一系列具有不同生理活性的生物活性肽。此外,小麦面筋蛋白中蛋白质含量可达 80%,且富含谷氨酰胺(谷氨酰胺+谷氨酸含量可在 35% 以上),是制备谷氨酰胺肽的理想原料^[2]。谷氨酰胺虽具有多种生理活性,但游离谷氨酰胺溶解度差且不稳定,易转化为谷氨酸和焦谷氨酸。谷氨酰胺肽作为谷氨酰胺的稳态化供体,具有更高的溶解度和稳定性,也具有相似的生理活性,如 ACE 抑制活性^[3-4]、阿片样活性^[5]、抗氧化活性^[6-7]、免疫活性^[8-9]、肠道修复活性^[10-11]、抗疲劳活性^[12-13]等。另外,由于肽中氮端谷氨酰胺与游离谷氨酰胺

相似,易在酸性条件下转变为谷氨酸或受热变为焦谷氨酸,因此谷氨酰胺肽的生物活性与其非氮端谷氨酰胺含量有着密切关系^[2]。有学者通过酶解小麦面筋蛋白制备富含非氮端谷氨酰胺的酶解物。例如,Soichi 等^[14]首次以小麦面筋蛋白为原料,采用 Molsin(XIII)和 Actinase E 两种蛋白酶对底物进行 48 h 酶解,再经 Sephadex G-15 纯化后得到高谷氨酰胺小麦低聚肽。马洪龙等^[15]采用 Alcalase 碱性蛋白酶质量分数 4%,底物质量分数 7%,酶解时间 150 min 的条件酶解小麦面筋蛋白,制得非氮端谷氨酰胺含量 17.65% 的酶解物。然而,由于小麦面筋蛋白易在水中形成难以分开的面团结构^[16],导致其酶解制备需要较多的酶种类或较高的加酶量/加酶时间,这大幅提高了谷氨酰胺肽的加工成本。因此,有必要在酶解小麦面筋蛋白之前对其进行处理,通过改变该蛋白的结构来达到提高后续酶解效率,增加非氮端谷氨酰胺含量的效果。

热处理条件简单、易操作,是酶解加工中常用的前处理手段之一。Elizabete 等^[17]发现乳清蛋白经 65 °C 和 95 °C 处理,其水解度有明显提升,酶解物中小分子组分的含量显著提高。涂丹等^[18]发现在 121 °C 下对罗非鱼鳞蛋白加热 15 min 发生酶解,相较于未热处理组,其蛋白回收率和水解度分别提升了 78.29% 和 89.23%。王金水^[19]发现采用

收稿日期: 2023-09-05

基金项目: 广东省重点研发计划项目(2022B0202030001)

第一作者: 龚昱荣,男,硕士生

通信作者: 刘通讯 E-mail: txliu@scut.edu.cn

90 °C热处理,可使 Protamex 蛋白酶对小麦面筋蛋白的水解度由 10.8%提高到 14.9%。目前对改性小麦面筋蛋白的研究主要是对其功能特性的影响,针对改性对其酶解特性的影响研究不全面,更是鲜有改性对小麦面筋蛋白谷氨酰胺释放影响的研究。本研究首先对小麦面筋蛋白进行不同时间、温度的热处理,然后对其酶解,以未经热处理的小麦面筋蛋白酶解物为参考,比较各样品酶解前的结构差异以及酶解后的水解程度和非氮端谷氨酰胺含量差异,以期对小麦面筋蛋白加工利用提供一定理论参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

小麦面筋蛋白,山东冠县瑞祥生物科技开发有限公司;Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶,诺维信(中国)生物技术有限公司;邻苯二甲醛(OPA)、细胞色素 C、抑肽酶、杆菌肽、甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸(GGYR)、甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(GGG),美国 Sigma 公司;乙腈、三氟乙酸、吡啶、三乙胺、双(1,1-三氟乙酸基)碘苯(BTI)、2,4-二硝基氟苯(DNFB),广州鼎国生物技术有限公司;其余试剂均为国产分析纯级。

1.2 仪器与设备

ME204 电子天平、pHS-25 pH 计,瑞士 Mettler Toledo 公司;UV754N 紫外-可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;多功能酶标仪,上海闪谱生物科技有限公司;石墨消解仪、自动凯氏定氮仪,海能未来技术集团股份有限公司;恒温摇床,常州澳华仪器有限公司;MiniPROTEIN 3 Cell 电泳仪,美国 Bio-Rad Laboratories 公司;TSKgel G2000SWXL 凝胶色谱柱(7.8 mm×300 mm)、U-3000 高效液相色谱仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Waters XBridge Peptide BEH C18 Column 300Å 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 300Å),美国 Waters 公司;移液器,德国 Eppendorf 公司;磁力搅拌水浴锅,常州澳华仪器有限公司;Alpha2-4LDplus 真空冷冻干燥机,德国 Martin Christ 公司;Milli-Q Advantage A10 超纯水系统,美国 Millipore 公司;涡旋仪、磁力搅拌器,德国 IKA 公司;C R 2 2 N 高速冷冻离心机,日本 Hi-

tachi 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 小麦面筋蛋白的热处理 准确称量 10 g 小麦面筋蛋白,缓慢倒入 100 g 去离子水中,设置 60,70,80,90 °C 4 种水浴温度搅拌 15,30,60 min;对照组室温搅拌混合。每种样品做两份,一份继续进行酶解,另一份直接冻干、研磨、过 80 目筛后保存于-20 °C 冰箱,用于后续电泳分析、表面疏水度、游离巯基含量和二级结构的测定。

1.3.2 小麦面筋蛋白酶解物的制备 用 2.0 mol/L NaOH 溶液将前处理后样品的 pH 值调至 8.0,55 °C,预热后加入蛋白质量 1%的 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶,水解 4 h,沸水浴 15 min 灭酶,8 000 r/min 离心 20 min,取上清液并记录上清液的质量。

1.3.3 小麦面筋蛋白傅里叶红外光谱分析 参考 Guan 等^[20]方法,取适量 1.3.1 节制得的小麦面筋蛋白粉末,与溴化钾粉末以 1:100 充分混合,均匀研磨后压片,放入红外光谱仪,分辨率为 4 cm⁻¹,扫描次数为 64 次,在 4 000~600 cm⁻¹ 范围内扫描样品。采用 PeakFit 软件对酰胺带 I (1 700~1 600 cm⁻¹)范围进行分析。

1.3.4 小麦面筋蛋白游离巯基含量的测定 参考张莹莹等^[21]的方法,并作适当修改。

用 Tris-Gly 缓冲液配制 4 mg/mL 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)溶液。用 Tris-Gly-8M 尿素溶液配制浓度为 0,0.01,0.02,0.03,0.04,0.05,0.06 mmol/L-半胱氨酸标准溶液,分别取 4 mL 标准溶液加入 0.1 mL 4 mg/mL DTNB 溶液,室温放置 20 min,以超纯水为空白,在 412 nm 波长处测定吸光值,以吸光值为 X 轴、半胱氨酸浓度为 Y 轴绘制标准曲线。标准曲线方程为:Y=0.085X-0.0046(R²=0.9995)。

称取适量 1.3.1 节制得的小麦面筋蛋白粉末,用 Tris-Gly-8M 尿素溶液配制成 8 mg/mL 的分散液,8 000 r/min、4 °C 离心 20 min,取 4 mL 上清液加入 0.1 mL 4 mg/mL DTNB 溶液,室温放置 20 min,以超纯水为空白,在 412 nm 波长处测定吸光值,通过标准曲线得到小麦面筋蛋白中游离巯基含量(μmol/g)。

1.3.5 小麦面筋蛋白表面疏水度的测定 参考畅鹏等^[22]的方法(溴酚蓝法)测定表面疏水性,并作

适当修改。称取适量 1.3.1 节制得的小麦面筋蛋白粉末,用超纯水配制成 5 mg/mL 的样品分散液,用超纯水配制 1 mg/mL 的溴酚蓝溶液。在 1 mL 的样品分散液中加入 200 μ L 溴酚蓝溶液,记作样品组;在 1 mL pH=7 的 PBS 缓冲液中加入 200 μ L 溴酚蓝溶液,记作空白组。样品组与空白组分别涡旋混匀,室温下反应 10 min,2 000 r/min、25 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清液稀释 10 倍后测定 595 nm 波长处的吸光值,分别记为 $A_{595-样品}$ 和 $A_{595-空白}$ 。小麦面筋蛋白的表面疏水度用溴酚蓝结合量(μ g)表示,计算公式为:

$$\begin{aligned} & \text{溴酚蓝结合量}(\mu\text{g}) \\ & = 200 \mu\text{g} \times \frac{A_{595-空白} - A_{595-样品}}{A_{595-空白}} \end{aligned} \quad (1)$$

1.3.6 SDS-PAGE 电泳分析 参考王辉等^[23]与 Zhou 等^[24]的方法并进行适当修改。称取适量 1.3.1 节制得的小麦面筋蛋白粉末,溶解于非还原性样品缓冲液 [60 mmol/L Tris-HCl, 2 g/L SDS, 25% (体积分数) 甘油, 14.4 mmol/L β -巯基乙醇 (β -ME), 0.05% 溴酚蓝] 与还原性样品缓冲液 (不含 β -ME, 其余与还原性样品缓冲液相同) 中,使其终质量浓度为 2 mg/mL,沸水浴 5 min, 10 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,吸取 10 μ L 上清液上样。电泳采用自制丙烯酰胺含量为 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,调整电压为 80 V,之后用考马斯亮蓝染色液染色,由甲醇、无水乙醇、乙酸混合配制的脱色液脱色后在化学发光分子成像系统上进行图片处理。

1.3.7 小麦面筋蛋白酶解物蛋白回收率的测定 根据 GB 5009.5-2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》采用凯氏定氮法测得小麦面筋蛋白和 1.3.2 节制得的小麦面筋蛋白酶解物上清液的蛋白含量,蛋白回收率的计算公式如下:

$$\text{蛋白回收率}(\%) = \frac{m \times c}{M \times C} \times 100 \quad (2)$$

式中: m 为小麦面筋蛋白酶解物上清液的质量,g; c 为小麦面筋蛋白酶解物上清液的蛋白含量,%; M 为小麦面筋蛋白的添加质量,g; C 为小麦面筋蛋白的蛋白含量,%。

1.3.8 小麦面筋蛋白酶解物水解度的测定 参考 Nielson 等^[25]的方法并作适当修改。将 1.3.2 节制得的小麦面筋蛋白酶解物用去离子水配制成质量浓

度为 0.7 mg/mL 的样品溶液,用去离子水配制 0.9516 mmol/L 丝氨酸标准溶液,采用 OPA 法进行水解度的测定,以丝氨酸标准溶液作为标准品,去离子水作为空白。分别吸取 24 μ L 丝氨酸标准溶液、去离子水、和样品溶液加入 96 孔板中,再加入 180 μ L OPA 反应液,反应 2 min 后测定 340 nm 波长处的吸光值。计算公式如下:

$$\text{Serine-NH}_2 = \frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{standard}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \times 0.9516 \times C_{\text{sample}} \quad (3)$$

$$\text{DH}(\%) = \frac{\text{Serine-NH}_2 - \beta}{\alpha \times h_{\text{tot}}} \times 100 \quad (4)$$

式中:0.9516 为丝氨酸标准溶液的浓度,mmol/L; C_{sample} 为样品溶液的质量浓度,mg/mL;小麦面筋蛋白的 α 、 β 和 h_{tot} 值分别为 1.00、0.40 和 8.3。

1.3.9 小麦面筋蛋白酶解物分子质量分布的测定

依据 GB/T 22492-2008《中华人民共和国国家标准 大豆肽粉》中肽相对分子质量分布的测定方法并进行适当修改,测定小麦面筋蛋白酶解物分子质量分布。采用 TSKgel G2000SWXL 凝胶色谱柱(7.8 mm \times 300 mm),流动相为 0.05% 三氟乙酸,检测波长为 220 nm,流速为 1 mL/min,进样体积 10 μ L。用超纯水分别将细胞色素 C(MW12400)、抑肽酶(MW6511.44)、杆菌肽(MW1422.69)、甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸(GGYR MW451.2)、甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(GGG MW189)配制成 1 mg/mL 的标准品溶液,过 0.22 μ m 滤膜,上机检测,读取保留时间,以各标准品分子量对数为 X 轴,以其保留时间为 Y 轴,绘制标准曲线。标准曲线方程为: $Y = -1.3374 + 11.087(R^2 = 0.9986)$ 。

用超纯水将 1.3.2 节制得的小麦面筋蛋白酶解物配制成 5 mg/mL 的样品溶液,过 0.22 μ m 滤膜,上机检测,根据标准曲线方程得到各样品的分子质量分布。

1.3.10 小麦面筋蛋白非氮端谷氨酰胺含量的测定 参考张海华^[26]和张丽^[27]的方法并作适当修改,采用 BTI 保护法。具体方法如下:

用超纯水将 1.3.2 节制得的小麦面筋蛋白酶解物配制成 10 mg/mL 的样品溶液。吸取 250 μ L 样品溶液或标准品溶液加入安瓿瓶中,再加入 1

mL 质量浓度为 10 mg/mL 的 BTI 乙腈水溶液 (乙腈和水的体积比为 3:2), 同时加入 62.5 μL 浓度为 50 mmol/L 吡啶水溶液, 用酒精喷灯熔封瓶口, 混合均匀, 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h, 反应后打开安瓿瓶取 450 μL 加入到新的安瓿瓶中氮吹吹干备用。

将 BTI 制备样与 10 mg/mL 谷氨酰胺肽水溶液 (未经 BTI 保护) 110 $^{\circ}\text{C}$ 酸水解 24 h。酸水解完成后定容、挥干、加入样品稀释液, 过 0.22 μm 膜于进样瓶中上机检测, 未经 BTI 保护谷氨酰胺样品的谷氨酸含量减去 BTI 制备样中谷氨酸含量即为样品中非氮端谷氨酰胺含量。

1.4 数据统计分析

进行 3 次重复试验, 采用 SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 统计分析软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, 采用 Prism 9 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 不同时间、温度热处理对小麦面筋蛋白在水中形态的影响

如图 1 所示, 未经热处理的小麦面筋蛋白 (对照组) 在水中形成了面团结构, 相比之下, 60 $^{\circ}\text{C}$ 加热使得小麦面筋蛋白在水中形成的面团结构更加紧密。当热处理温度大于 70 $^{\circ}\text{C}$ 时, 可观察到小麦面筋蛋白在水中形成的面团结构随着温度的升高逐渐舒展乃至分散。李翠翠等^[28]测定了小麦面筋蛋白的热变性温度为 67.43 $^{\circ}\text{C}$, 这可能是小麦面筋蛋白在经过 70 $^{\circ}\text{C}$ 以上热处理后面团分散的原因。除此之外, 当热处理温度大于 70 $^{\circ}\text{C}$ 时, 随着加热时间的延长, 小麦面筋蛋白在水中分散开的颗粒变小、变细。这些结果显示高温处理可以使得小麦面筋蛋白在水中变得分散。为了明晰热处理后小麦面筋蛋白在水中形态变化的原因, 进一步对小麦面筋蛋白的结构进行检测。

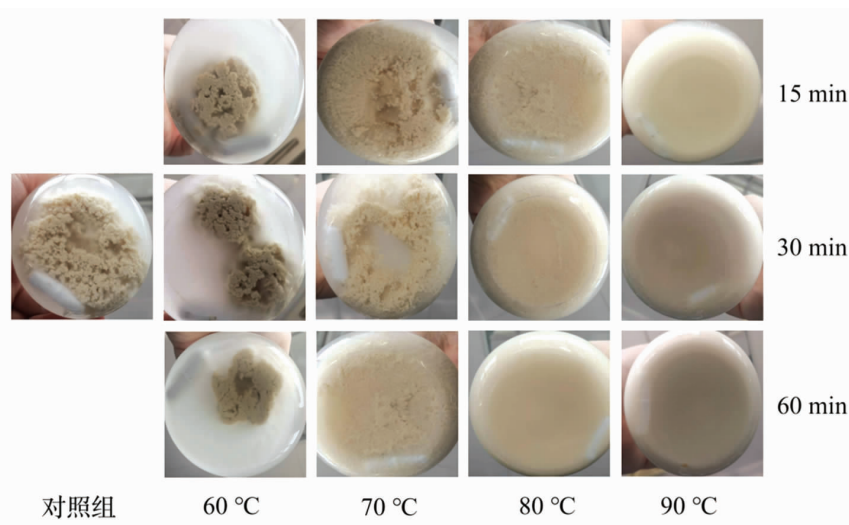


图 1 不同时间、温度热处理后小麦面筋蛋白在水中形态变化

Fig.1 Morphological changes of wheat gluten in water after heat treatment at different time and temperature

2.2 不同时间、温度热处理对小麦面筋蛋白二级结构的影响

为了进一步探究热处理对小麦面筋蛋白结构的影响, 采用傅里叶红外色谱法对热处理和对照组小麦面筋蛋白进行了二级结构的测定。对各样品的红外光谱酰胺带 I (1 700~1 600 cm^{-1}) 进行处理, 用峰面积占比表示二级结构的含量。从酰胺带 I 中得出的各样品的二级结构含量如表 1 所示。

结果显示, 60~80 $^{\circ}\text{C}$ 热处理的样品中, α -螺旋和无规则卷曲的含量没有明显变化, β -转角含量下降了 3% 左右, β -折叠含量有所增加。90 $^{\circ}\text{C}$ 热处理的样品 α -螺旋的含量降低了超过 10%, β -转角的含量也有明显下降, β -折叠和无规则卷曲的含量上升。 α -螺旋的含量降低和无规则卷曲含量的上升说明蛋白的二级结构从有序变为无序, β -折叠的含量上升有利于多肽链的延伸^[26], 这说明热处理

可以使小麦面筋蛋白结构发生变化,具体表现为小麦面筋蛋白 β -折叠的含量增多,蛋白的肽链延

伸,这解释小麦面筋蛋白在水中形成的面团结构随着加热温度的升高逐渐延展、分散的现象。

表1 不同时间、温度热处理后小麦面筋蛋白二级结构变化

Table 1 Change of secondary structure of wheat gluten after heat treatment at different time and temperature

	α -螺旋/%	β -折叠/%	β -转角/%	无规则卷曲/%
对照组	23.01	31.36	34.36	11.27
60 °C 15 min	23.91	34.59	30.72	11.78
60 °C 30 min	23.77	33.38	31.50	11.36
60 °C 60 min	22.96	33.28	32.44	11.32
70 °C 15 min	25.54	32.35	31.41	10.70
70 °C 30 min	22.77	31.52	34.78	10.92
70 °C 60 min	23.43	32.97	32.21	11.39
80 °C 15 min	22.88	33.47	32.10	11.56
80 °C 30 min	23.44	34.45	30.48	11.63
80 °C 60 min	23.70	35.66	29.13	11.51
90 °C 15 min	11.19	34.67	31.98	22.16
90 °C 30 min	10.86	35.27	21.43	22.26
90 °C 60 min	11.20	37.27	26.81	24.72

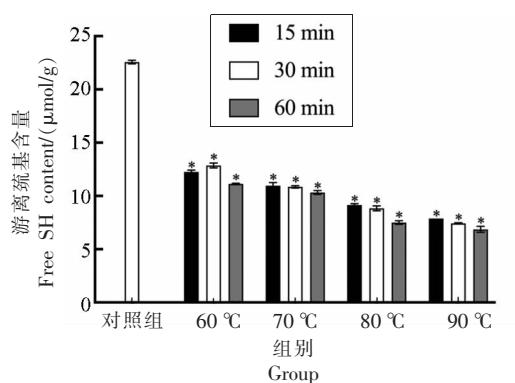
2.3 不同时间、温度热处理对小麦面筋蛋白游离巯基含量的影响

游离巯基是评价蛋白结构稳定程度的重要指标,当其含量下降时,代表着蛋白中二硫键的含量上升^[28-29],二硫键相较于其它作用力(如静电作用力)需要更多的能量破坏,所以二硫键在维持蛋白的天然构象或变性构象上发挥着重要的作用^[30]。因此,测定热处理后小麦面筋蛋白的游离巯基变化可以进一步了解在水中分散的小麦面筋蛋白颗粒结构变化。游离巯基含量如图2所示,与未经加热的小麦面筋蛋白相比,加热后的小麦面筋蛋白游离巯基含量有显著下降,同时随着加热温度的升高和时间的延长其含量仍呈现出下降的趋势。这是因为小麦面筋蛋白经加热后蛋白结构逐渐伸展、分散,内部的游离巯基暴露在空气中,氧化生成二硫键^[29,31]。Wang等^[32]对小米谷蛋白在85 °C分别进行了15,30,45 min的加热处理,也发现了相似现象。

2.4 不同时间、温度处理对小麦面筋蛋白表面疏水度影响

表面疏水度代表着蛋白表面疏水基团的数量,一般情况下,极性分子一般暴露在蛋白质表面,非极性分子则隐藏在蛋白质内部^[33]。当表面疏

水度上升/下降时,表明蛋白结构舒展/聚集,暴露/隐藏了更多疏水基团。溴酚蓝可以与蛋白质表面的疏水性位点结合,因此溴酚蓝结合量可以用于表征蛋白质的表面疏水度^[34]。如图3所示,一方面,加热15,30 min时,随着加热温度的升高,小麦面筋蛋白的表面疏水度逐渐上升,这是因为随着温度的升高,小麦面筋蛋白在水中形成的面团结构逐渐松散乃至分散,暴露出大量的疏水基团^[32,35]。另一方面,60 °C加热15 min后,小麦面筋蛋白的表面疏水性显著低于对照组,这可能因为60 °C加热后小麦面筋蛋白在水中的面团结构更加紧密,在蛋白面团内部隐藏了更多的疏水基团,随着加热时间的延长,蛋白的表面疏水度也随之上升,可能因为随着加热时间的延长,小麦面筋蛋白中二硫键含量上升,而二硫键周围往往聚集着疏水性氨基酸^[35];70 °C加热时,小麦面筋蛋白的表面疏水度随加热时间呈现先增后减的趋势,因为在加热的过程中,小麦面筋蛋白在水中的面团结构逐渐伸展,暴露出更多的疏水性基团,导致表面疏水度上升,当疏水基团的数量达到一定程度后又会发生疏水相互作用,导致表面疏水度下降^[36];当加热温度超过80 °C时,加热15 min后小麦面筋蛋白的表面疏水度相较对照组有明显的上升,而



注:*表示与对照相比具有显著性差异($P < 0.05$)。

图2 不同时间、温度热处理后小麦面筋蛋白游离巯基含量变化

Fig.2 Change of free sulfhydryl content of wheat gluten after heat treatment at different time and temperature

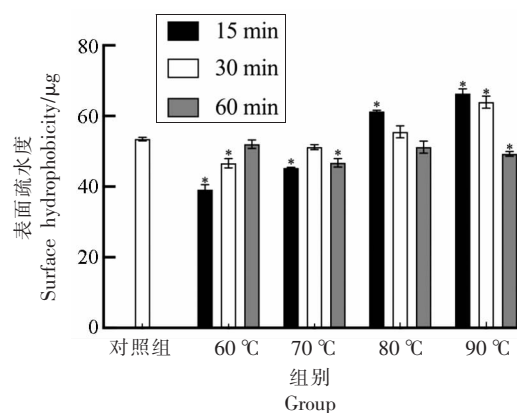
随着加热时间的延长,蛋白表面疏水度呈现下降的趋势,这因为在加热初期(15 min)小麦面筋蛋白在水中就已经分散为细小颗粒,暴露了大量的疏水基团,随后大量暴露的疏水基团发生疏水相互作用。

2.5 不同时间、温度热处理后小麦面筋蛋白 SDS-PAGE 图谱

为了进一步了解热处理后小麦面筋蛋白的结构变化,对热处理后的小麦面筋蛋白进行了还原性、非还原性电泳分析。一方面,在还原性电泳图(图4a)中可以看到,经热处理后的各样品与未热处理的对照组相比,条带的数量和位置都没有变化,说明热处理并不会造成小麦面筋蛋白亚基的解离和降解。另一方面,在非还原电泳图(图4b)中可以看到,小麦面筋蛋白聚集在电泳胶最上端,这表明小麦面筋蛋白各亚基会形成分子质量较大的聚合物。当温度超过80 °C时,小麦面筋蛋白的聚合物条带明显浅于其它样品,且随着加热时间的延长变浅。这表明了一定温度(80, 90 °C)加热使小麦面筋蛋白在水中分散的颗粒变得更加致密,难以溶解在SDS中或者难以进入电泳胶^[37]。

2.6 不同时间、温度热处理对小麦面筋蛋白酶解物蛋白回收率的影响

为了进一步探究热处理对小麦面筋蛋白酶解效率及谷氨酰胺释放的影响,对热处理样品与对照组样品进行了酶解处理。如图5所示,60 °C处



注:*表示与对照相比具有显著性差异($P < 0.05$)。

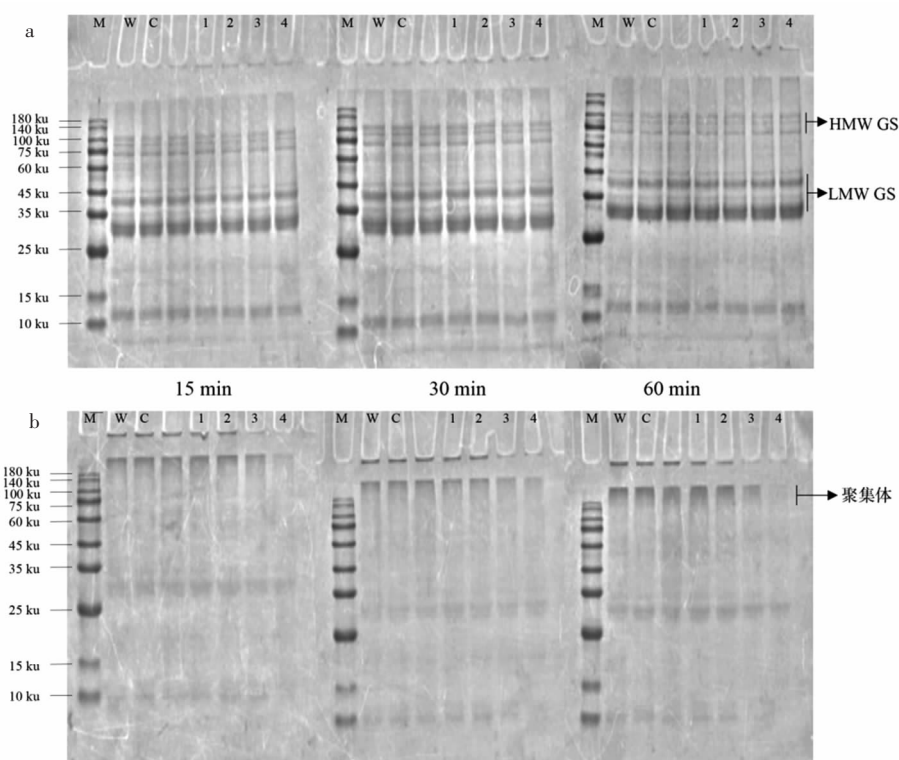
图3 不同时间、温度热处理后小麦面筋蛋白表面疏水度变化

Fig.3 Change of surface hydrophobicity of wheat gluten after heat treatment at different time and temperature

理小麦面筋蛋白时,随着加热时间的延长,其酶解物蛋白回收率逐渐上升,加热60 min的样品其酶解物蛋白回收率显著高于对照组($P < 0.05$);当温度超过70 °C时,其酶解物的蛋白回收率随着加热时间的延长出现明显下降的趋势。王辉等^[23]发现对金枪鱼进行热处理后,金枪鱼肉蛋白形成了新的共价键,形成更致密的结构,导致金枪鱼肉的消化率下降。前面的研究中发现超过70 °C加热时,随着加热时间的延长,小麦面筋蛋白中二硫键含量显著上升,同时发生一定的疏水相互作用,导致在水中分散的小麦面筋蛋白颗粒形成了更致密的结构,这可能导致了超过70 °C热处理后小麦面筋蛋白酶解物蛋白回收率下降。

2.7 不同时间、温度热处理对小麦面筋蛋白酶解物水解度的影响

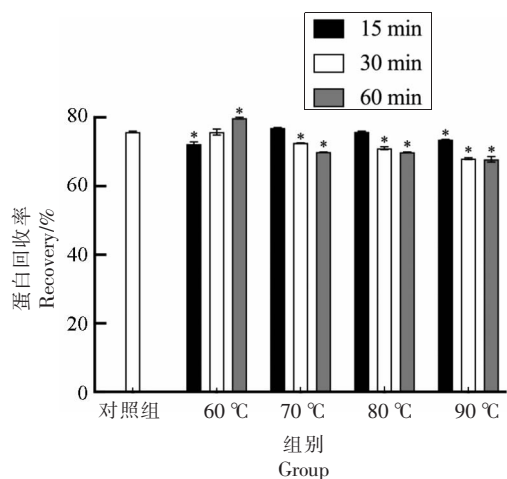
水解度指在水解过程中蛋白质肽键的断裂程度,表示蛋白质的水解程度。有研究发现蛋白质酶解物的生物活性与水解度呈一定正相关关系。Karamac等^[38]从脱脂亚麻籽中分离出蛋白质,并用胰蛋白酶酶解制备出不同水解度的样品,发现水解度越高的样品往往表现出更好的抗氧化能力。Zhao等^[39]通过酶解乳清蛋白制备水解度不同的酶解物发现,水解度较高的酶解物相较于低水解度酶解物有更好的抗疲劳功能。如图6所示,热处理后的小麦面筋蛋白酶解物的水解度较对照组基本都有显著的提高($P < 0.05$)。随着加热温度的提



注:M:蛋白质标准品;W:小麦面筋蛋白;C:对照组(未经加热处理);1~4:60,70,80,90 °C热处理的 wheat 面筋蛋白。

图4 不同时间、温度热处理后小麦面筋蛋白的还原(a)和非还原(b)SDS-PAGE图谱

Fig.4 Reduced (a) and non-reduced (b) SDS-PAGE profiles of wheat gluten after heat treatment at different times and temperatures

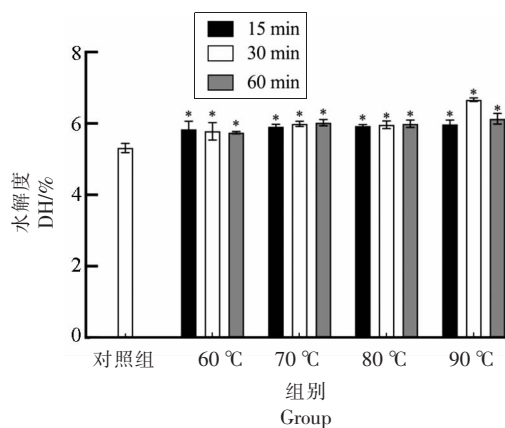


注:*表示与对照相比具有显著性差异($P < 0.05$)。

图5 不同时间、温度热处理后小麦面筋蛋白酶解物蛋白回收率变化

Fig.5 Change of protein recovery rate of wheat gluten hydrolysate after heat treatment at different time and temperature

高,小麦面筋蛋白酶解物的水解度也有所提升,其中90 °C加热30 min的样品相较对照组提升最多,



注:*表示与对照相比具有显著性差异($P < 0.05$)。

图6 不同时间、温度热处理后小麦面筋蛋白酶解物水解度变化

Fig.6 Changes of the degree of hydrolysis of wheat gluten hydrolysates after heat treatment at different times and temperatures

是对照组的1.25倍。结合之前的结果发现,当热处理温度超过70 °C时,小麦面筋蛋白酶解物相较

于未经热处理的蛋白酶解物,其蛋白回收率开始下降,水解度却有所提升。班玉凤等^[40]在酶解热处理改性的大豆蛋白时也发现了相似现象。前面的结果表明,当热处理温度超过 70 °C 时,小麦面筋蛋白发生热变形,其二级结构发生一定变化,在水中形成的面团结构逐渐松散,这可能暴露更多的酶切位点,促进了蛋白的水解;而分散后的小麦面筋蛋白颗粒二硫键含量上升,同时发生疏水相互作用,形成了更为致密的蛋白颗粒,这可能导致了热处理后小麦面筋蛋白回收率的下降^[40]。

2.8 不同时间、温度热处理对小麦面筋蛋白酶解物分子质量组成的影响

有研究表明,小分子肽因其独特的吸收转运机制,可以更好地被人体吸收,有更好的生物利用度^[41]。同时分子质量组成可以更直观地表示蛋白的水解程度。为了探究热处理是否可以促进小麦面筋蛋白释放更多的小分子肽,分析对比了热处理样品和对照组样品的分子质量组成。如图 7 所示,随着加热温度的升高,小麦面筋蛋白酶解物中分子质量大于 5 ku 的组分逐渐减少,分子质量小于 1 ku 的组分逐渐增多,这说明热处理后的小麦面筋蛋白被酶解成了更多的小分子肽。其中 90 °C 加热 30 min 的样品相较于对照组,其分子质量小于 1 ku 的组分相对含量提升最高,由 75.85% 提高到 80.75%。这与水解度的趋势相似,进一步说明了热处理可以促进小麦面筋蛋白的酶解。结合前面的结果表明,热处理可以破坏小麦面筋蛋白在水中形成的面团结构,同时改变小麦面筋蛋白的二级结构,这促进了小麦面筋蛋白的水解,释放更多的小分子肽。结合前面的结果,90 °C 加热 30 min 处理的小麦面筋蛋白在水中完全分散,相较于未经热处理的小麦面筋蛋白其水解程度的提升最高。因此,选择不同温度加热 30 min 的样品与对照组进行非氮端谷氨酰胺含量的比较,以期获得热处理对小麦面筋蛋白活性潜力的影响。

2.9 不同温度热处理 30 min 对小麦面筋蛋白酶解物非氮端谷氨酰胺含量的影响

因为肽中氮端谷氨酰胺不稳定,易转化为其它物质,因此评估蛋白酶解物的谷氨酰胺含量主要通过测定其非氮端谷氨酰胺含量^[42]。如图 8 所示,热处理后的样品中非氮端谷氨酰胺含量相较

对照组有显著提升效果,其中 90 °C 加热 30 min 可以使小麦面筋蛋白酶解物的非氮端谷氨酰胺含量从 26.27% 提升至 34.87%,这说明加热处理可以通过一定程度上改变小麦面筋蛋白的结构,从而促进小麦面筋蛋白中谷氨酰胺的释放。张海华^[26]探究了几种前处理手段对小麦面筋蛋白谷氨酰胺肽释放的影响,其中湿热可以提高小麦面筋蛋白酶解物非氮端谷氨酰胺含量。但由于其酶解时间较短,获得的酶解物非氮端谷氨酰胺含量仅有 18.12%。我们的结果表明,热处理协同酶解的手段

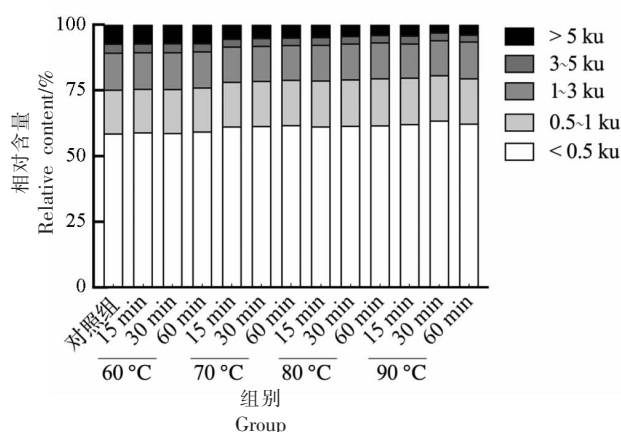
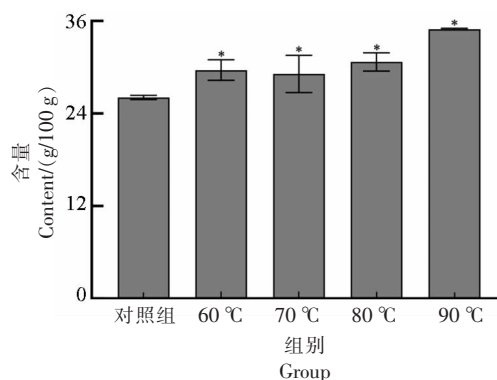


图 7 不同时间、温度热处理后小麦面筋蛋白酶解物分子质量组成变化

Fig.7 Change of distribution of wheat gluten hydrolysates molecular weight after heat treatment at different time and temperature



注: * 表示与对照相比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 8 不同温度热处理 30 min 后小麦面筋蛋白酶解物非氮端谷氨酰胺含量变化

Fig.8 Changes of content of glutamine at non-nitrogen terminal of wheat gluten hydrolysate after heat treatment in 30 minutes at different temperature

可以显著的提高小麦面筋蛋白酶解物的非氮端谷氨酰胺含量,为谷氨酰胺肽的生产提供一定的理论指导。

3 结论

热处理后小麦面筋蛋白在水中形成的面团结构变得分散,同时其二级结构发生改变,分散后的小麦面筋蛋白颗粒二硫键含量上升,并且发生疏水相互作用,形成更为致密的颗粒。以上结构的变化导致了小麦面筋蛋白回收率的下降,但是暴露了更多的酶切位点,促进了酶解。其中,90℃加热30 min后的小麦面筋蛋白在水中完全分散,相较于未经热处理的小麦面筋蛋白,其酶解程度有明显的提升($P < 0.05$),同时非氮端谷氨酰胺含量由26.27%提高到了34.87%。本研究结果对小麦面筋蛋白的深加工利用和谷氨酰胺肽的制备提供了技术参考。

参 考 文 献

- [1] 司晓静. 阿拉伯木聚糖及其酶解物影响面筋蛋白热诱导聚集的机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
SI X J. Study on the mechanism of effect of arabinoxylan and its hydrolysates on heat-induced aggregation of gluten[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [2] 严斌. 小麦谷氨酰胺肽的高浓制备及其肠道修复功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
YAN B. Preparation of glutamine peptide from high substrate concentration of wheat protein and its intestinal repair function[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.
- [3] MICHIO M, ABDULATEF M A, KAZUNORI K, et al. Identification of pro-drug type ACE inhibitory peptide sourced from porcine myosin B: Evaluation of its antihypertensive effects in vivo[J]. *Food Chemistry*, 2008, 114(2): 516-522.
- [4] ZHANG Y Y, LI J, LI S Y, et al. Mechanism study of multimode ultrasound pretreatment on the enzymolysis of wheat gluten[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(4): 1530-1538.
- [5] SHIN-ICHI F, YUNDEN J, TAIJI M, et al. Release of opioid peptides, gluten exorphins by the action of pancreatic elastase[J]. *FEBS Letters*, 1997, 412(3): 475-479.
- [6] 郑志强, 郝利民, 刘晋, 等. 小麦蛋白双酶酶解制备高抗氧化性小麦肽研究[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(8): 78-88.
ZHENG Z Q, HAO L M, LIU J, et al. Preparation of wheat peptide with high antioxidant activity by double enzymes hydrolysis of wheat gluten[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(8): 78-88.
- [7] CHENG Y H, ZHANG L, SUN W, et al. Protective effects of a wheat germ peptide (RVF) against H₂O₂-induced oxidative stress in human neuroblastoma cells[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(8): 1615-1622.
- [8] ZHENG Z Q, YANG X X, LIU J, et al. Effects of wheat peptide supplementation on anti-fatigue and immunoregulation during incremental swimming exercise in rats[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(69): 43345-43355.
- [9] IVAN C, NURIA Á, GUILLERMO S, et al. Immunomodulatory and antioxidant properties of wheat gluten protein hydrolysates in human peripheral blood mononuclear cells[J]. *Nutrients*, 2020, 12(6): 1673.
- [10] ZHANG B L, ZHONG Q Z, LIU N, et al. Dietary glutamine supplementation alleviated inflammation responses and improved intestinal mucosa barrier of LPS-Challenged broilers[J]. *Animals*, 2022, 12(13): 1729-1729.
- [11] TATAKA Y, HARAMURA M, HAMADA Y, et al. Effects of oral cystine and glutamine on exercise-induced changes in gastrointestinal permeability and damage markers in young men[J]. *European Journal of Nutrition*, 2022, 61(5): 1-9.
- [12] 刘辉, 周安妮, 胡胜男, 等. 小麦肽改善慢性疲劳综合征大鼠认知障碍[J]. *食品科学*, 2022, 43(19): 137-143.
LIU H, ZHOU A N, HU S N, et al. Wheat peptide ameliorates cognitive impairment in chronic fatigue syndrome rats[J]. *Food Science*, 2022, 43(19): 137-143.
- [13] CÓRDOVAMARTÍNEZ A, CABALLEROGARCÍA A, BELLO H J, et al. Effect of glutamine supplementation on muscular damage biomarkers in professional basketball players[J]. *Nutrients*, 2021, 13(6):

- 2073–2073.
- [14] SOICHI T, MICHIKO W, SOICHI A. Production of a high - glutamine oligopeptide fraction from gluten by enzymatic treatment and evaluation of its nutritional effect on the small intestine of rats[J]. Journal of Food Biochemistry, 1992, 16(4): 235–248.
- [15] 马洪龙, 韩飞, 李爱科, 等. 碱性蛋白酶水解小麦面筋蛋白制取谷氨酰胺肽的研究[J]. 粮油食品科技, 2014, 22(1): 54–57.
- MA H L, HAN F, LI A K, et al. Study on the production of glutamine -bioactive peptides by hydrolysis of wheat gluten with alkaline protease [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2014, 22(1): 54–57.
- [16] 刘菲琳, 安志丛, 朱科学, 等. 增溶预处理对面筋蛋白功能性质和酶解效率的影响[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(4): 1–6.
- LIU F L, AN Z C, ZHU K X, et al. Improving functional property of wheat gluten by water solubility enhancement[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2010, 25(4): 1–6.
- [17] ELIZABETE L D C, JOSÉ A D R G, FLAVIA M N. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates [J]. International Dairy Journal, 2006, 17(6): 632–640.
- [18] 涂丹, 张益奇, 林亚楠, 等. 热处理对鱼鳞蛋白酶解特性的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 149–155.
- TU D, ZHANG Y Q, LIN Y N, et al. Effect of heating treatment on enzymolysis characteristic of fish scale protein[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(3): 149–155.
- [19] 王金水. 酶解-膜超滤改性小麦面筋蛋白功能特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2007.
- WANG J S. Functional properties of modified wheat gluten by enzymatic hydrolysis-membrane ultrafiltration[D]. Guangzhou: Huanan University of Technology, 2007.
- [20] AIYAN G, KALIN M, MINGCHUN L, et al. The effect of electron beam irradiation on IgG binding capacity and conformation of tropomyosin in shrimp [J]. Food Chemistry, 2018, 264: 250–254.
- [21] 张莹莹, 郭兴凤, 王瑞红, 等. TSP与SPH复合物对面团特性及面条品质的影响机制[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 37–42.
- ZHANG Y Y, GUO X F, WANG R H, et al. Effects of a blend of texturized soy protein and soy protein hydrolysate on dough properties and noodle quality[J]. Food Science, 2020, 41(2): 37–42.
- [22] 畅鹏, 谢艳英, 王浩, 等. 热处理温度及时间对镜鲤肌原纤维蛋白热聚集行为的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(1): 101–107.
- CHANG P, XIE Y Y, WANG H, et al. Effect of heat treatment temperature and time on thermal aggregation behavior of myofibrillar proteins from mirror carp[J]. Food Science, 2021, 42(1): 101–107.
- [23] 王辉, 郑淋, 赵谋明, 等. 热处理对金枪鱼肉体外消化产物特性和抗氧化活性的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 68–75.
- WANG H, ZHENG L, ZHAO M M, et al. Effect of heat treatment on the antioxidant activity and characteristics of digestates products *in vitro* of tuna and its mechanism[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(7): 68–75.
- [24] ZHOU C Y, PAN D D, SUN Y Y, et al. The effect of cooking temperature on the aggregation and digestion rate of myofibrillar proteins in Jinhua ham [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(9): 3563–3570.
- [25] NIELSEN P, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642–646.
- [26] 张海华. 小麦面筋蛋白源谷氨酰胺肽的酶解制备、结构分析与生理活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- ZHANG H H. Preparation, purification and physiological activities of glutamine peptides from wheat gluten hydrolysis[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011.
- [27] 张丽. 谷氨酰胺活性肽的制备及性质研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.
- ZHANG L. Study on preparation and property of glutamine -bioactive peptides [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2009.
- [28] 李翠翠, 陆啟玉. 亚硫酸钠处理对小麦面筋蛋白特性的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(6): 160–166.
- LI C C, LU Q Y. Effect of Na_2SO_3 on the properties of wheat gluten protein[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(6): 160–166.
- [29] 王京. 热处理方式对豆乳蛋白质结构及体外消化性

- 的影响[D]. 北京: 北京农学院, 2022.
- WANG J. Effects of thermal treatment methods on structure and in vitro digestibility of soymilk protein [D]. Beijing: Peking Agricultural University, 2022.
- [30] HARTIG G R S, TRAN T T, SMYTHE M L. Intramolecular disulphide bond arrangements in nonhomologous proteins[J]. *Protein Science: A publication of the Protein Society*, 2005, 14(2): 474–482.
- [31] NARAYAN M. The Formation of native disulfide bonds: Treading a fine line in protein folding[J]. *The Protein Journal*, 2021, 40(2): 134–139.
- [32] WANG Y R, YANG Q, FAN J L, et al. The effects of phosphorylation modification on the structure, interactions and rheological properties of rice glutelin during heat treatment[J]. *Food Chemistry*, 2019, 297: 124978
- [33] SHEN X, FANG T, ZHANG T, et al. Effects of ultrasound treatment on physicochemical properties of whey protein soluble aggregates[J]. *Journal of Animal Science*, 2016, 94(5): 247–247
- [34] BERTSCH M, MAYBURD A, KASSNER R. The identification of hydrophobic sites on the surface of proteins using absorption difference spectroscopy of bromophenol blue[J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 313(2): 187–195.
- [35] ZHANG J B, WU N N, YANG X Q, et al. Improvement of emulsifying properties of Maillard reaction products from β -conglycinin and dextran using controlled enzymatic hydrolysis[J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 28(2): 301–312.
- [36] ANNELIEN E V, MARLIES A L, MARIO J, et al. Microscopic investigation of the formation of a thermoset wheat gluten network in a model system relevant for bread making[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2020, 55(2): 891–898.
- [37] TOHEDER R, TODOR V, LATA R. Shear, heat and pH induced conformational changes of wheat gluten – Impact on antigenicity[J]. *Food Chemistry*, 2016, 196: 180–188.
- [38] MAGDALENA K, ANNA K, KATARZYNA S. Antioxidant activity of hydrolysates prepared from flaxseed cake proteins using pancreatin[J]. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2014, 64(4): 227–233.
- [39] ZHAO C Y, GONG Y R, ZHENG L, et al. The degree of hydrolysis and peptide profile affect the anti-fatigue activities of whey protein hydrolysates in promoting energy metabolism in exercise mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(6): 3010–3021.
- [40] 班玉凤, 朱海峰, 关纳新. 热处理对大豆蛋白酶解性能的影响[J]. *现代食品科技*, 2005(1): 72–73, 77.
- BAN Y F, ZHU H F, GUAN N X. Effect of heat treatment on enzymatic hydrolysis of Soybean protein [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2005(1): 72–73, 77.
- [41] XU Q B, HONG H, WU J P, et al. Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 86: 399–411.
- [42] HIGAKI-SATO N, SATO K, ESUMI Y, et al. Isolation and identification of indigestible pyroglutamyl peptides in an enzymatic hydrolysate of wheat gluten prepared on an industrial scale[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(1): 8–13.

Effects of Heat Treatment on the Structure, Enzymatic Hydrolysis Characteristic and the Content of Glutamine at Non-nitrogen Terminal of Wheat Gluten

Gong Yurong, Zhao Chaoya, Zheng Lin, Zhao Mouming, Liu Tongxun*

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract Objective: to study the effects of different heating temperatures and times on the structural characteristics, enzymatic hydrolysis characteristic, and the content of glutamine at non-nitrogen terminal of wheat gluten. Methods: Firstly, wheat gluten were pretreated with heating treatment at three heating temperatures (60, 70, 80, 90 °C) for (15, 30, 60 min) and then enzymatically hydrolyzed by Alcalase 2.4L alkaline protease. Using the untreated wheat gluten hydrolysate

as a reference, we compared the structure changes of wheat gluten and the hydrolysis efficiency and content of glutamine at non-nitrogen terminal of hydrolysates. Results: the dough structure formed by wheat gluten proteins in water gradually loosened or even dispersed with heating treatment at increasing heating temperature, and at the same time heat treatment changed the secondary structure of wheat gluten, which might expose more enzymatic cleavage sites. Moreover, heat treatment significantly increased the extent of hydrolysis and increased the content of glutamine at non-nitrogen terminal ($P < 0.05$). In particular, compared to wheat gluten without heating treatment, the control protease lysates wheat gluten with heating treatment at 90 °C for 30 min showed better performance, the content of the components with a molecular weight less than 1 ku of whose hydrolysates increased from 75.85% to 80.75% and the content of glutamine at non-nitrogen terminal of whose hydrolysates increased from 26.27% to 34.87%. Conclusions: heat treatment was beneficial in hydrolysis and increasing the content of glutamine at non-nitrogen terminal of wheat gluten hydrolysates.

Keywords wheat gluten; heating treatment; enzymatic hydrolysis characteristics; the content of glutamine at non-nitrogen terminal