

## 高水分挤压温度对绿豆蛋白结构的影响

张俊杰, 郑嘉琛, 谢宜桐, 罗文江, 张媛, 何熙, 刘丹怡, 韩建春

### Effect of Extrusion Temperature on the Structure of High-moisture Extruded Mung Bean Protein

ZHANG Junjie, ZHENG Jiachen, XIE Yitong, LUO Wenjiang, ZHANG Yuan, HE Xi, LIU Danyi, and HAN Jianchun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022020139>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 植物基替代蛋白的利用进展

Advances in the Utilization of Plant-based Alternative Protein

食品工业科技. 2021, 42(18): 1-8

#### 利用光谱技术分析加热温度对肌红蛋白结构的影响

Effect of Heating Temperature on Myoglobin Structure with Spectroscopic Technology

食品工业科技. 2018, 39(24): 35-39

#### 温度对高水分稻谷储藏品质的影响及其预测模型研究

Effect of Temperature on Storage Quality of High-Moisture Paddy and Its Prediction Model

食品工业科技. 2020, 41(19): 304-308, 326

#### 焙烤对绿豆蛋白结构和功能性质的影响

Effects of Baking on the Structure and Functional Properties of Mung Bean Protein

食品工业科技. 2021, 42(4): 44-49

#### 蛋白质氧化对核桃蛋白质结构的影响

Effect of oxidative modification of protein on structure of walnut protein

食品工业科技. 2018, 39(12): 32-38

#### 挤压改性绿豆粉对小麦粉加工及其面条品质特性的影响

Effects of Mung Bean Flour Modified by Extrusion on Characteristics of Flour Processing and Quality of Noodles

食品工业科技. 2019, 40(20): 36-41



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

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. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020139

ZHANG Junjie, ZHENG Jiachen, XIE Yitong, et al. Effect of Extrusion Temperature on the Structure of High-moisture Extruded Mung Bean Protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(20): 130–136. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020139

· 研究与探讨 ·

# 高水分挤压温度对绿豆蛋白结构的影响

张俊杰<sup>1</sup>, 郑嘉琛<sup>1</sup>, 谢宜桐<sup>1</sup>, 罗文江<sup>1</sup>, 张 媛<sup>2</sup>, 何 熙<sup>3</sup>, 刘丹怡<sup>4,\*</sup>, 韩建春<sup>1,\*</sup>

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030;

2. 哈尔滨酷豆食品科技有限公司, 黑龙江哈尔滨 150028;

3. 北京银星通达科技开发有限公司, 北京 100088;

4. 黑龙江省绿色食品科学研究院, 黑龙江哈尔滨 150028)

**摘 要:** 本文以绿豆蛋白为原料, 在不同挤压温度下通过高水分挤压技术制备组织化绿豆蛋白, 利用傅里叶红外光谱、内源荧光光谱、SDS-PAGE 凝胶电泳、扫描电镜等方法对蛋白质结构进行分析。结果表明, 高水分挤压后, 离子键、疏水相互作用、二硫键含量呈先上升后下降的趋势, 游离巯基含量呈先降低后上升的趋势。绿豆蛋白二级结构中  $\beta$ -折叠含量显著降低 ( $P<0.05$ ),  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角含量显著增加 ( $P<0.05$ )。通过内源荧光光谱发现, 蛋白质在 130 和 140℃ 条件下最大发射波长发生红移, 在 150 和 160℃ 条件下蛋白的最大发射波长没有明显变化。通过扫描电镜可以明显观察到绿豆蛋白形成了纤维结构。综上, 经过高水分挤压处理后的绿豆蛋白结构会发生变化, 挤压温度对绿豆蛋白高水分挤压组织化产品有显著影响。

**关键词:** 高水分挤压, 挤压温度, 绿豆蛋白, 结构

中图分类号: TS209

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)20-0130-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020139



本文网刊:

## Effect of Extrusion Temperature on the Structure of High-moisture Extruded Mung Bean Protein

ZHANG Junjie<sup>1</sup>, ZHENG Jiachen<sup>1</sup>, XIE Yitong<sup>1</sup>, LUO Wenjiang<sup>1</sup>, ZHANG Yuan<sup>2</sup>, HE Xi<sup>3</sup>, LIU Danyi<sup>4,\*</sup>,  
HAN Jianchun<sup>1,\*</sup>

(1. Collage of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Harbin Kudou Food Technology Co., Ltd., Harbin 150028, China;

3. Beijing Yinxing Tongda Technology Development Co., Ltd., Beijing 100088, China;

4. Heilongjiang Green Food Research Institute, Harbin 150028, China)

**Abstract:** In this paper, mung bean protein was prepared by high moisture extrusion technology at different extrusion temperatures. The structure of the protein was analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy, internal fluorescence spectroscopy, SDS-PAGE gel electrophoresis, and scanning electron microscopy. The results showed that the content of ionic bond, hydrophobic interaction, and disulfide bond increased first and then decreased, and the content of free thiol decreased first and then increased, after high-moisture extrusion. The content of  $\beta$ -sheet in the secondary structure of protein decreased significantly ( $P<0.05$ ), and the content of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -turn increased significantly ( $P<0.05$ ). The endogenous fluorescence spectra showed that the maximum emission wavelength of protein showed redshift at 130 and 140 °C, while the maximum emission wavelength of protein did not change significantly at 150 and 160 °C. The fiber structure of mung bean protein was observed by scanning electron microscope. In conclusion, the structure of mung bean protein after

收稿日期: 2022-02-18

基金项目: 传统豆制品加工关键技术与示范 (sky20210120)。

作者简介: 张俊杰 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工及贮藏, E-mail: zhangjjha@163.com。

\* 通信作者: 刘丹怡 (1990-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 农产品加工及贮藏, E-mail: liudanyi@126.com。

韩建春 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工及贮藏, E-mail: hanjianchun@hotmail.com。

high moisture extrusion treatment would change, and extrusion temperature would have a significant effect on the high-moisture extrusion textured products of mung bean protein.

**Key words:** high-moisture extrusion; extrusion temperature; mung bean protein; structure

肉类是人类重要的食品资源,然而人口增加以及肉类生产导致环境变化和自然资源的枯竭<sup>[1]</sup>使得人造肉作为肉类替代品成为趋势。人造肉是动物肉的健康替代品,不含胆固醇,脂肪含量低,蛋白含量高,更加满足现代人对健康饮食的需求<sup>[2]</sup>。高水分挤压是生产人造肉的一种技术,它主要以植物蛋白为原料,生产出具有肉类纤维、口感和风味的组织化植物蛋白(Texturized vegetable protein, TVP)<sup>[3]</sup>。目前,国内外市场上主要的产品是低水分挤压技术生产的植物组织化蛋白产品,比如辣条、豆干等。由于高水分挤压技术对原料、设备要求较高,市场上还未出现成熟的产品,对 TVP 产品的开发仍然停留在试验阶段。

绿豆富含蛋白质、淀粉、维生素<sup>[4]</sup>,是我国重要的食用豆类作物。目前,我国对绿豆利用主要是制取绿豆淀粉,而绿豆蛋白(Mung bean protein, MBP)粉作为加工副产物,常被用做动物饲料或丢弃,造成了蛋白资源的浪费<sup>[5]</sup>。绿豆蛋白约占绿豆(干重)的 25%~28%,含有丰富的必需氨基酸,如赖氨酸、亮氨酸<sup>[6]</sup>。MBP 具有多种生理活性,如抗癌、抗氧化和抗增殖<sup>[7]</sup>。MBP 表现出优异的功能特性,是各种食品加工中有潜力的原料。经超声处理过的绿豆蛋白具有良好的溶解性和稳定性<sup>[8]</sup>,可以作为高蛋白饮料的原料。乔宁等将绿豆蛋白添加到熟制速冻水饺中,改善了速冻水饺的品质和储藏性能<sup>[9]</sup>。Fhb 等研究了加水量对组织化绿豆蛋白结构和流变学性质的影响,认为 49.3% 的加水量有利于改善产品的特性<sup>[10]</sup>。在高水分挤压过程中,通过改变螺杆转速、喂料量、挤压温度等工艺参数可以得到不同质地的产品。挤压温度是蛋白质形成纤维结构的重要因素,决定了蛋白质变性的剧烈程度。目前,用大豆蛋白、豌豆蛋白和谷朊粉通过高水分挤压生产的 TVP 较为常见<sup>[11-13]</sup>,而关于绿豆蛋白在高水分挤压生产 TVP 的研究很少。

绿豆蛋白比其它植物蛋白有较多优点,以其作为食品原料开发新产品的潜力巨大,并且植物蛋白组织化机理尚未完全阐明,特别是在挤压过程中蛋白质之间发生的相互作用和蛋白质结构改变的机制。因此本试验以绿豆蛋白粉为原料,研究不同高水分挤压温度对组织化绿豆蛋白结构的影响,旨在为高水分组织化绿豆蛋白产品开发以及植物蛋白组织化形成机理提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

绿豆蛋白粉(蛋白质含量 70.8%,脂肪 0.6%、碳水化合物 19.3%) 哈尔滨哈达淀粉有限公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、彩虹 245plus 广谱蛋白 Marker、考马斯亮蓝 G-250、EDTA、牛血清蛋白

北京索莱宝科技有限公司;Tris、Gly(甘氨酸) 北京博奥拓达科技有限公司;DTNB(5,5-二巯基-2,2-二硝基苯甲酸) 上海源叶生物科技有限公司;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、尿素等试剂均为国产分析纯。

FMHE36-40 高湿挤压设备 湖南富马科食品工程技术有限公司与黑龙江省绿色食品科学研究院联合创制;ALPHA 1-2 LD plus 冷冻干燥机 德国 Christ 公司;Nicolet is50 傅里叶变换红外光谱仪 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;F-7100 荧光分光光度计 日本日立公司;3-18K 高速冷冻离心机 Sigma 公司;SDS-PAGE 电泳仪 美国 Bio-Rad 公司;TU-1810 紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;S-3400N 钨灯丝扫描电子显微镜 日本日立公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 以绿豆蛋白粉为原料,挤压参数:固体喂料量 6.5 kg/h、液体喂料量 190%、螺杆转速 180 r/min,挤压温度从温区 2 到温区 6 以及温区 9、温区 10 保持不变,分别设置为 50、80、100、120、130、120、120 °C,控制温区 7、温区 8 的温度同步变化(文中的挤压温度指温区 7、8 温度),各水平设置为 130、140、150、160 °C。将挤压出的组织化绿豆蛋白(Texturized mung bean protein, TMBP),迅速冷却,真空包装密封,放入 4 °C 冰箱中保存。各取一部分 TMBP 冷冻干燥,研磨后过 80 目筛,于-20 °C 冰箱中保存备用。在挤压温度为 130、140、150、160 °C 条件下得到的 TMBP 分别编号为: TMBP-130 °C、TMBP-140 °C、TMBP-150 °C、TMBP-160 °C。

1.2.2 化学作用力的测定 根据 Wang 等<sup>[14]</sup>的方法。取 0.2 g MBP 和 TMBP 冻干粉分别与 10 mL 的 0.05 mol/L NaCl(A)、0.6 mol/L NaCl(B)、0.6 mol/L NaCl+1.5 mol/L 尿素(C)、0.6 mol/L NaCl+8 mol/L 尿素(D)溶液混合,振荡均匀后,4 °C 冰箱静置 2 h,于 10000×g 离心 15 min,取上清液测定其吸光度。用双缩脲法测定上清液中蛋白质含量。离子键、氢键、疏水相互作用的大小用公式(1)~(3)计算:

$$\text{离子键含量} = B - A \quad \text{式 (1)}$$

$$\text{氢键含量} = C - B \quad \text{式 (2)}$$

$$\text{疏水相互作用} = D - C \quad \text{式 (3)}$$

式中:A、B、C、D 分别表示 A、B、C、D 溶液上清液中蛋白质含量(mg/mL)。

1.2.3 巯基、二巯键含量的测定 根据张媛等<sup>[15]</sup>的方法。总巯基的测定:将 75 mg MBP 和 TMBP 冻干粉分别溶于 15 mL Tris-Gly-Urea 缓冲液(0.086 mol/L Tris、0.09 mol/L Gly、8 mol/L Urea 和 0.04 mol/L EDTA,

pH8.0)中,加入 0.1 mL Ellamn 试剂(0.2 g DTNB 溶于 50 mL Tris-Gly-Urea 缓冲液),混匀,避光 1 h,4 ℃ 下 10000 g 离心 15 min。取上清液测蛋白含量。另取上清液,412 nm 条件下用紫外分光光度计测其吸光度( $A_{412}$ )。

游离巯基的测定:将 75 mg MBP 和 TMBP 冻干粉分别溶于 15 mL Tris-Gly 缓冲液(0.086 mol/L Tris、0.09 mol/L Gly 和 0.04 mol/L EDTA, pH8.0)中,加入 0.1 mL Ellamn 试剂(0.2 g DTNB 溶于 50 mL Tris-Gly 缓冲液),混匀,避光 1 h,4 ℃ 下 10000 g 离心 15 min。取上清液测蛋白含量。另取上清液,412 nm 条件下用紫外分光光度计测其吸光度( $A_{412}$ )。

根据公式(4)计算巯基含量:

$$SH(\mu\text{mol/g}) = \frac{73.53 \times A_{412} \times D}{C} \quad \text{式(4)}$$

式中:SH 为巯基含量;73.53—Ellamn 试剂摩尔消光系数;D 为稀释倍数;C 为蛋白含量(mg/mL)。

根据公式 5 计算二硫键含量:

$$S-S(\mu\text{mol/g}) = \frac{\text{总巯基含量} - \text{游离巯基含量}}{2} \quad \text{式(5)}$$

式中:S-S 为二硫键含量。

1.2.4 傅里叶变换红外光谱 根据 Brishti 等<sup>[16]</sup>的方法,用傅里叶变换红外光谱仪对冻干的样品在波长范围 4000~500  $\text{cm}^{-1}$ ,分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数 32 次。利用 Omnic 8.0 和 Peakfit 4.12 软件进行光谱图分析,经过基线校正、平滑处理、去卷积、对酰胺 I 区(1700~1600  $\text{cm}^{-1}$ )的二阶导数进行 Gaussian 曲线拟合,通过各子峰面积百分比,计算出样品二级结构组成。各子峰与二级结构关系:1615~1640  $\text{cm}^{-1}$  为  $\beta$ -折叠,1641~1649  $\text{cm}^{-1}$  为无规则卷曲,1650~1659  $\text{cm}^{-1}$  为  $\alpha$ -螺旋,1660~1688  $\text{cm}^{-1}$  为  $\beta$ -转角。

1.2.5 内源荧光光谱 根据 Qi 等<sup>[17]</sup>的方法。将 MBP 和 TMBP 冻干粉溶于磷酸钠缓冲液(33 mmol/L, pH6.75)中,制备蛋白质分散体(10 mg/mL),经 8000 g 离心 15 min,收集上清液并用一次性针头滤器(0.45  $\mu\text{m}$ )过滤。荧光分光光度计在激发波长为 295 nm、扫描速度为 1200 nm/min、激发和发射狭缝宽度为 5 nm 的条件下,记录 300~450 nm 范围内的发射光谱。

1.2.6 SDS-PAGE 测定 根据王超<sup>[18]</sup>的方法。将 MBP 和 TMBP 冻干粉过 80 目筛,分别取 2 mg 溶于 1 mL 上样缓冲液中,然后在沸水浴中加热 10 min,8000 g 离心 10 min。进样时取上清液 10  $\mu\text{L}$ ,浓缩胶 5%、分离胶 13%,电压采用浓缩胶 80 V 和分离胶 120 V 进行电泳。

1.2.7 扫描电镜观察 根据杨竺红<sup>[19]</sup>的方法并做适当的修改。将新鲜的 TMBP 样品切片后,用戊二醛固定,在用 pH6.8 磷酸缓冲液冲洗、乙醇脱水、置

换、干燥处理后,将样品固定在样品台上,然后镀膜,最后用扫描电子显微镜将样品放大 1500 倍后,观察其表现形态。

### 1.3 数据处理

本研究采用软件 SPSS 22.0 和 Origin 2019 对实验数据用进行分析与作图,三次重复独立试验结果表达形式为平均值 $\pm$ 标准差(Means $\pm$ SD),用 SPSS 22.0 进行差异显著性分析, $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 化学作用力的测定

如图 1 可知,三种化学作用力由大到小依次为:疏水相互作用>离子键>氢键。疏水相互作用的可溶性蛋白含量均大于 9 mg/mL,明显高于氢键和离子键,表明在这三种化学作用力中疏水相互作用是维持组织化蛋白空间结构的主要作用力。蛋白高水分挤压处理后,疏水相互作用显著增加( $P < 0.05$ ),挤压过程促进了蛋白质疏水性基团的暴露,导致了蛋白疏水相互作用的增强。随着温度的升高,TMBP 中疏水相互作用先增加后减小,可能是过高的温度使得蛋白质空间结构发生变化,更多的疏水基团暴露并发生聚集,疏水基团再次被包埋在蛋白内部,结构变得更加复杂,进而导致蛋白疏水相互作用的降低<sup>[20]</sup>。离子键在高水分挤压处理后,含量显著增加,随着挤压温度的升高,离子键含量呈先上升后下降的趋势,但变化不显著。离子键可以维持 TMBP 的三级结构,变化趋势与疏水相互作用变化趋势相同,离子键含量的减少,说明蛋白质发生了聚集,验证了疏水相互作用下降的原因。高水分挤压后氢键的含量显著增加,是因为高水分挤压处理使得大量的水分子存在于组织化蛋白网络结构中,有利于水分子之间、水分子和蛋白质之间氢键的形成<sup>[21]</sup>。在 130 和 140 ℃ 疏水相互作用含量较高,有利于蛋白组织化。

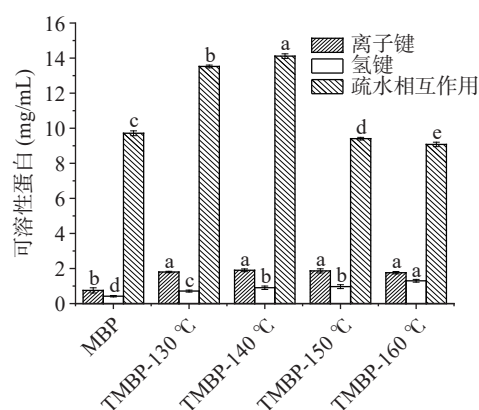


图 1 挤压温度对化学作用力的影响  
Fig.1 Effect of extrusion temperature on chemical force  
注:相同指标上的不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

### 2.2 巯基、二硫键含量的测定

在挤压过程中,分子内和分子间的巯基和二硫键相互转化,影响着蛋白质的构象和稳定性。挤压温



度是影响组织化蛋白构象变化的重要原因之一,由表 1 可知,随着挤压温度的升高,游离巯基含量先显著降低( $P<0.05$ ),可能是由于巯基发生了氧化反应形成了硫氧化物以及蛋白质和蛋白质之间发生了聚集<sup>[22]</sup>。随着挤压温度的增加,总巯基含量先显著上升( $P<0.05$ ),游离巯基含量先显著降低( $P<0.05$ ),表明隐藏在蛋白质内部的巯基暴露并且与游离巯基间相互交联形成新的二硫键,从而导致二硫键含量先显著上升( $P<0.05$ )<sup>[23]</sup>。随着二硫键含量的增加,游离巯基的含量降低,表明巯基二硫键之间发生交换反应,形成了新的二硫键。当温度继续升高,新形成的二硫键会被破坏,导致了游离巯基含量的增加<sup>[24]</sup>。可知,不同温度处理会导致组织化蛋白的巯基暴露程度不同,通过巯基、二硫键的相互转化以及巯基氧化所导致蛋白质不同程度的聚集,影响着蛋白质结构。在 130 ℃ 时,二硫键含量最高,有利于蛋白质组织化。

表 1 MBP 和 TMBP 的巯基、二硫键含量  
Table 1 Sulfhydryl group and disulfide bond contents of MBP and TMBP

样品	游离巯基(μmol/g)	总巯基(μmol/g)	二硫键(μmol/g)
MBP	3.776±0.027 <sup>a</sup>	4.051±0.034 <sup>b</sup>	0.137±0.031 <sup>c</sup>
TMBP-130 ℃	3.360±0.077 <sup>c</sup>	4.444±0.030 <sup>a</sup>	0.542±0.054 <sup>a</sup>
TMBP-140 ℃	3.335±0.106 <sup>c</sup>	3.905±0.057 <sup>c</sup>	0.285±0.027 <sup>b</sup>
TMBP-150 ℃	3.162±0.050 <sup>d</sup>	3.298±0.085 <sup>c</sup>	0.067±0.037 <sup>d</sup>
TMBP-160 ℃	3.534±0.061 <sup>b</sup>	3.625±0.078 <sup>d</sup>	0.046±0.012 <sup>d</sup>

注: 同列数据后不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

2.3 傅里叶红外光谱分析

傅里叶红外光谱常用来表征蛋白质结构和构象,4000~400  $\text{cm}^{-1}$  范围内的红外光谱是由于化学键的拉伸和弯曲运动吸收能量产生的。图 2 显示了 TMBP 和 MBP 的傅里叶红外光谱。所有光谱都在 3500~3000  $\text{cm}^{-1}$  范围内显示出一个宽峰,说明有淀粉存在,同时峰的存在也与游离和结合的 O-H 和 N-H 基团有关<sup>[25]</sup>。TMBP 与 MBP 相比,在 3269.24  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰降低,说明淀粉结构遭到破坏<sup>[26]</sup>。在 2990~2850  $\text{cm}^{-1}$  附近的峰通常与蛋白质侧链中的  $\text{CH}_2$  拉伸有关。在红外光谱中,有典型的蛋白质条带:酰胺 I 带(1700~1600  $\text{cm}^{-1}$ )、酰胺 II 带(1580~1500  $\text{cm}^{-1}$ )、酰胺 III 带(1400~1200  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>[27]</sup>。

样品红外光谱拟合的二级结构含量如表 2 所

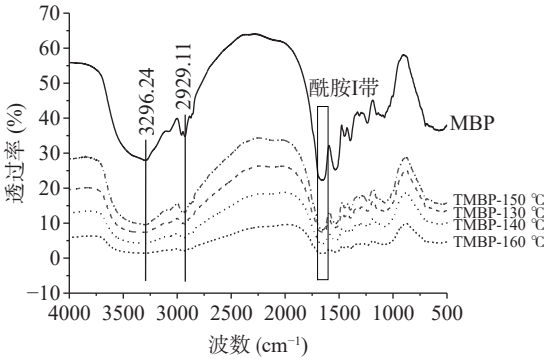


图 2 MBP 和 TMBP 的红外光谱图  
Fig.2 Infrared spectrum of MBP and TMBP

示,绿豆蛋白的  $\beta$ -折叠含量高, $\alpha$ -螺旋含量最低,表现出典型的植物蛋白结构,这与 Ma 等<sup>[28]</sup> 研究结果相一致。 $\beta$ -折叠含量高,会导致蛋白水解酶的获取率低,蛋白的消化率低<sup>[29]</sup>。在不同温度下,经高水分挤压处理后的蛋白,二级结构中各组成的含量都发生了变化。TMBP-130 ℃ 与 MBP 相比, $\beta$ -折叠含量略微减小从 33.423%±0.098% 变为 33.401%±0.139%。TMBP-140 ℃ 与 MBP 相比, $\beta$ -折叠含量显著降低( $P<0.05$ ), $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角含量显著增加( $P<0.05$ ),无规则卷曲含量变化不显著( $P>0.05$ )。这表明部分  $\beta$ -折叠结构转化成  $\alpha$ -螺旋结构和  $\beta$ -转角结构,表明蛋白结构更加紧密。随着温度的继续升高 TMBP 的  $\beta$ -折叠含量和  $\beta$ -转角含量变化显著( $P<0.05$ ),而  $\alpha$ -螺旋含量变化不显著( $P>0.05$ )。Hossain 等<sup>[10]</sup> 研究加水量对单螺杆挤压绿豆蛋白二级结构变化也有类似发现。 $\beta$ -折叠含量的显著降低,表明蛋白质分子之间的化学键断裂、原始构象展开,提高蛋白的消化率<sup>[30]</sup>,导致蛋白的变性以及随后的聚集。 $\beta$ -转角含量的显著增加,表明挤压温度继续升高,在组织化过程中蛋白-蛋白发生聚集,结构不稳定。

2.4 内源荧光光谱分析

荧光光谱可以提供色氨酸、酪氨酸等荧光氨基酸的微环境信息,可被作为表征蛋白质构象的指标<sup>[31]</sup>。色氨酸荧光光谱用于研究蛋白质三级结构的变化以及蛋白质间的相互作用。

如图 3 所示,MBP 的荧光最大发射波长( $\lambda_{\text{max}}$ ) 在 354 nm,而高水分挤压处理后,130、140、150 和 160 ℃ 条件下生产的 TMBP 的  $\lambda_{\text{max}}$  分别在 357.6、

表 2 MBP 和 TMBP 的二级结构  
Table 2 Secondary structure of MBP and TMBP

样品	结构			
	$\beta$ -折叠(%)	无规则卷曲(%)	$\alpha$ -螺旋(%)	$\beta$ -转角(%)
MBP	33.423±0.098 <sup>a</sup>	24.860±0.000 <sup>a</sup>	11.197±0.006 <sup>b</sup>	30.520±0.104 <sup>d</sup>
TMBP-130 ℃	33.401±0.139 <sup>a</sup>	24.660±0.000 <sup>a</sup>	11.603±0.006 <sup>a</sup>	30.333±0.150 <sup>d</sup>
TMBP-140 ℃	32.103±0.196 <sup>b</sup>	24.797±0.023 <sup>a</sup>	11.663±0.006 <sup>a</sup>	31.443±0.185 <sup>c</sup>
TMBP-150 ℃	31.443±0.023 <sup>c</sup>	24.900±0.329 <sup>a</sup>	11.810±0.294 <sup>a</sup>	31.843±0.064 <sup>b</sup>
TMBP-160 ℃	30.797±0.420 <sup>d</sup>	24.693±0.102 <sup>a</sup>	11.723±0.045 <sup>a</sup>	32.787±0.345 <sup>a</sup>

注: 同列数据后不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

356.6、354 和 353.4 nm。 $\lambda_{\max}$  均大于 330 nm, 这表明挤压前后, 色氨酸残留物均处于极性环境中。130 和 140 °C 条件下处理 TMBP 的最大发射波长发生红移, 表明蛋白质的三级结构或四级结构发生变化, 蛋白质内部的色氨酸从非极性环境中暴露出来<sup>[32]</sup>。而 150 和 160 °C 条件下处理的 TMBP 与 MBP 有相似的  $\lambda_{\max}$ , 表明在挤压过程中部分蛋白质展开和变性, 温度过高导致了最终的组织化蛋白中的蛋白结构不太紧凑, 有一部分与天然的绿豆蛋白相似, 因此在相似的波长处检测到峰值。

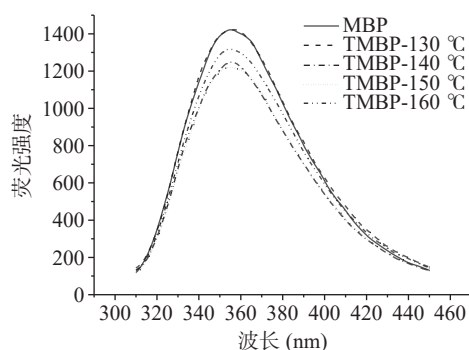


图3 MBP 和 TMBP 荧光光谱图

Fig.3 Fluorescence spectra of MBP and TMBP

除了  $\lambda_{\max}$  的变化, 荧光强度 (fluorescence intensity, FI) 的变化也有助于检测蛋白质结构在三级结构上变化。与 MBP 相比, 除了 130 °C 条件下的 TMBP, 高水分挤压处理降低了所有 TMBP 样品中的 FI, 这可能是通过增加分子间相互作用和蛋白质-蛋白质聚集引起的荧光猝灭的结果<sup>[33]</sup>。随着挤压温度的升高, 蛋白质的变性程度增大, 暴露在表面的色氨酸残基增多, 发色团电子跃迁所需能量减少, 荧光量子产率降低, 会导致 FI 降低<sup>[34]</sup>。而高水分挤压处理会使蛋白质折叠结构的展开从而降低蛋白质荧光的内部猝灭, 会导致 FI 升高<sup>[35]</sup>。多因素共同影响, 导致了在 130 °C 条件下 TMBP 的 FI 没有显著变化。

## 2.5 SDS-PAGE

利用电泳图可以观察到绿豆蛋白的分子量以及高水分挤压后蛋白分子量的变化情况。如图 4 所示, 在 MBP 和 TMBP 中主要有 5 个主要的电泳条带, 分子量在 15~65 kD 之间。该结果与 Hossain 等<sup>[10]</sup>的研究结果一致。与 MBP 相比, 所有 TMBP 泳道顶端的浓缩胶颜色有不同程度的加深, 条带的宽窄也有不同程度的改变, 说明高水分挤压处理后大分子物质发生了聚集, 不同温度下, 这些物质聚集程度也不同。随着挤压温度的增加, 48 kD 附近的条带颜色逐渐变浅、宽度也逐渐变窄, 而泳道顶端的颜色加深, 表明这部分蛋白发生了变性, 形成了分子量较大的蛋白质聚集体, 也可能是这部分蛋白发生了美拉德反应, 生成的不溶性物质无法穿过分离胶<sup>[36]</sup>。

## 2.6 扫描电镜

如图 5 扫描电镜观察结果可知, 挤压前绿豆蛋

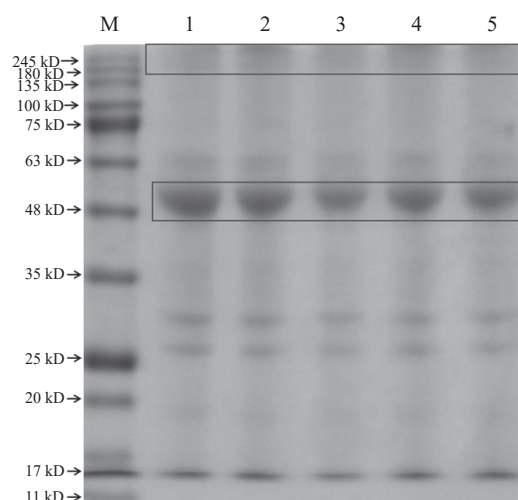


图4 MBP 和 TMBP 的电泳图谱

Fig.4 Electrophoresis patterns of MBP and TMBP

注: 泳道 M: 蛋白 Marker, 5~245 kD; 泳道 1: MBP; 泳道 2: TMBP-130 °C; 泳道 3: TMBP-140 °C; 泳道 4: TMBP-150 °C; 泳道 5: TMBP-160 °C。

白粉中既有表面比较光滑的球形颗粒, 也有表面光滑但表面向内部凹陷的颗粒。在挤压后, 这些颗粒的结构遭到破坏, 样品总体上呈现扁平状, 结构比较致密, 可以看到多层蛋白质堆叠的现象, 形成了纤维结构。高水分挤压过程中, 蛋白质收到了机械作用力和高温的影响, 经历了分子链展开、团聚、交联的过程<sup>[37]</sup>, 从而使得蛋白质在挤压后可以出现组织化结构。由此看来, 绿豆蛋白可以作为高水分挤压产品的原料。

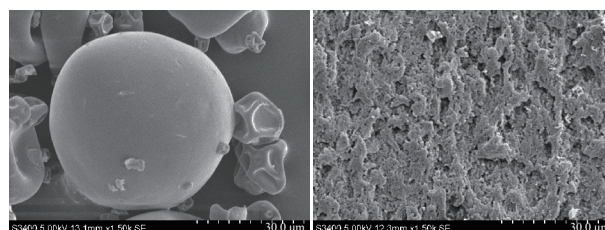


图5 MBP 和 TMBP 的扫描电镜图

Fig.5 SEM pictures of MBP and TMBP

注: 左图为 MBP, 右图为 TMBP-130 °C。

## 3 结论

本研究通过对高水分挤压后绿豆蛋白的结构进行研究, 结果发现多种化学作用力共同维持了组织化蛋白的空间结构, 在 130 °C 时, 组织化绿豆蛋白二硫键含量最高, 疏水相互作用含量高, 蛋白质结构稳定, 有利于蛋白组织化。挤压温度会对蛋白质的二、三级结构产生显著影响 ( $P < 0.05$ ), 并且在挤压过程会发生美拉德反应。温度过高, 会导致疏水相互作用、二硫键的含量和  $\beta$ -折叠含量降低, 导致蛋白结构的不稳定, 不利于高水分挤压的进行。样品挤压前后微观结构发生了显著变化, 高水分挤压破坏了蛋白质的完整性使得蛋白质重组形成了组织化结构。由此可见, 通过调节挤压温度可以改善组织化绿豆蛋白的结构。本文研究了挤压温度对绿豆蛋白结构的影响, 后

续需要进一步探究不同加工参数对绿豆蛋白结构的影响,为组织化绿豆蛋白品质的调控以及绿豆蛋白的开发利用提供理论参考。

### 参考文献

- [1] MAEVE H, MARIA H, ANNE M, et al. Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium[J]. *Foods*, 2017, 6(7): 53–53.
- [2] ALAM M S, KAUR J, KHAIRA H, et al. Extrusion and extruded products: Changes in quality attributes as affected by extrusion process parameters: A review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, 56(3): 445–473.
- [3] MAUNG T T, GU B Y, KIM M H, et al. Fermentation of texturized vegetable proteins extruded at different moisture contents: Effect on physicochemical, structural, and microbial properties[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2020, 29(7): 897–907.
- [4] ZHONG K, LIN W J, WANG Q, et al. Extraction and radicals scavenging activity of polysaccharides with microwave extraction from mung bean hulls[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 51(4): 612–617.
- [5] 柳芬芳, 李迎秋. 绿豆蛋白提取工艺的响应面法优化[J]. *轻工学报*, 2020, 35(2): 7–16. [LIU F F, LI Y Q. Optimization of protein extraction from mung bean using response surface methodology[J]. *Journal of Light Industry*, 2020, 35(2): 7–16.]
- [6] BRISHTI F H, ZAREI M, MUHAMMAD S, et al. Evaluation of the functional properties of mung bean protein isolate for development of textured vegetable protein[J]. *International Food Research Journal*, 2017, 24(4): 1595–1605.
- [7] GUPTA N, SRIVASTAVA N, BHAGYAWANT S S. Vicilin—A major storage protein of mung bean exhibits antioxidative potential, antiproliferative effects and ACE inhibitory activity[J]. *PloS One*, 2018, 13(2): e0191265.
- [8] ZHONG Z F, XIONG Y L. Thermosonication-induced structural changes and solution properties of mung bean protein[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2019, 62: 104908.
- [9] 乔宁, 张坤生, 任云霞. 绿豆蛋白对熟制速冻水饺品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(2): 87–91. [QIAO N, ZHANG K S, REN Y X. Effect of mung bean protein on the quality of cooked frozen dumplings[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(2): 87–91.]
- [10] HOSSAIN B F, CHAY S Y, MUHAMMAD K, et al. Structural and rheological changes of texturized mung bean protein induced by feed moisture during extrusion[J]. *Food Chemistry*, 2021, 344: 128643.
- [11] PIETSCH V L, BÜHLER J M, KARBSTEIN H P, et al. High moisture extrusion of soy protein concentrate: Influence of thermo-mechanical treatment on protein-protein interactions and rheological properties[J]. *Journal of Food Engineering*, 2019, 251(JUN.): 11–18.
- [12] CHEN Q L, ZHANG J C, ZHANG Y J, et al. Rheological properties of pea protein isolate-amylose/amylopectin mixtures and the application in the high-moisture extruded meat substitutes[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 117(3): 106732.
- [13] PIETSCH V L, WERNER R, KARBSTEIN H P, et al. High moisture extrusion of wheat gluten: Relationship between process parameters, protein polymerization, and final product characteristics[J]. *Journal of Food Engineering*, 2019, 259: 3–11.
- [14] WANG K Q, LUO S Z, ZHONG X Y, et al. Changes in chemical interactions and protein conformation during heat-induced wheat gluten gel formation[J]. *Food Chemistry*, 2017, 214: 393–399.
- [15] 张媛, 姜帆, 刘骞, 等. 超高压均质对大豆分离蛋白乳化特性的影响[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(1): 1–5. [ZHANG Y, JIANG F, LIU Q, et al. The changes of emulsify properties of soybean protein isolate induced by ultra high pressure homogenization[J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(1): 1–5.]
- [16] BRISHTI F H, CHAY S Y, MUHAMMAD K, et al. Effects of drying techniques on the physicochemical, functional, thermal, structural and rheological properties of mung bean (*Vigna radiata*) protein isolate powder[J]. *Food Research International*, 2020, 138(Pt B): 109783.
- [17] QI P X, ONWULATA C I. Physical properties, molecular structures, and protein quality of texturized whey protein isolate: Effect of extrusion temperature[J]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94(5): 2231–2244.
- [18] 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. Effect of extrusion conditions on processing properties of pea flour and its main components[D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2019.]
- [19] 杨竺红. 即食小麦拉丝蛋白素肉饼的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021. [YANG Z H. The research on instant vegetarian meatloaves made from wheat textured protein[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.]
- [20] LIU H M, GAO L L, REN Y X, et al. Chemical interactions and protein conformation changes during silver carp (*Hypophthalmichthys Molitrix*) surimi gel formation[J]. *International Journal of Food Properties*, 2014, 17(8): 1702–1713.
- [21] 周绪霞, 陈红, 陈小草, 等. 谷氨酰胺转氨酶对白姑鱼鱼糜蛋白-油脂复合凝胶特性及微观结构的影响[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(6): 106–113. [ZHOU X X, CHEN H, CHEN X C, et al. Effect of transglutaminase on properties and microstructure of surimi protein-lipids composite gel[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(6): 106–113.]
- [22] 任娣. 重组脂肪氧合酶对小麦水溶性阿拉伯木聚糖氧化交联作用及面包品质影响的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015. [RENG D. Study on the oxidative crosslinking of wheat water-soluble araboxylan by recombinant lipoxigenase and the effect of recombinant lipoxigenase on bread quality[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.]
- [23] 计红芳, 李莎莎, 王雪菲, 等. 豌豆蛋白对牛肉盐溶蛋白理化性质及二级结构的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(7): 7. [JI H F, LI S S, WANG X F, et al. Effects of protein on physicochemical properties and secondary structure of beef salt-soluble proteins[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(7): 7.]
- [24] 戴意强, 刘小莉, 吴寒, 等. 不同凝固剂对大豆分离蛋白分子间作用力及蛋白质二级结构的影响[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(12): 89–94. [DAI Y Q, LIU X L, WU H, et al. Effects of different coagulants on intermolecular forces and secondary structure



- of soybean protein isolate[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(12): 89–94. ]
- [ 25 ] 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 (AUG.): 361–373.
- [ 26 ] AWAIS M, ASHRAF J, WANG L L, et al. Effect of controlled hydrothermal treatments on mung bean starch structure and its relationship with digestibility[J]. *Foods*, 2020, 9(5): 664.
- [ 27 ] DU M X, XIE J H, GONG B, et al. Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 76: 131–140.
- [ 28 ] MA C Y, ROUT M K, MOCK W Y. Study of oat globulin conformation by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2001, 49(7): 3328–3334.
- [ 29 ] LONG G H, JI Y, PAN H B, et al. Characterization of thermal denaturation structure and morphology of soy glycinin by FTIR and SEM[J]. *International Journal of Food Properties*, 2015, 18(4): 763–774.
- [ 30 ] PERREAULT V, HÉNAUX L, BAZINET L, et al. Pretreatment of flaxseed protein isolate by high hydrostatic pressure: Impacts on protein structure, enzymatic hydrolysis and final hydrolysate antioxidant capacities[J]. *Food Chemistry*, 2017, 221 (PT.2): 1805–1812.
- [ 31 ] WANG K Q, SUN D W, PU H B, et al. Principles and applications of spectroscopic techniques for evaluating food protein conformational changes: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 67: 207–219.
- [ 32 ] 钟俊桢, 涂越, 刘伟, 等. 动态高压微射流协同糖基化对 $\beta$ -乳球蛋白乳化性和结构的影响[J]. *食品科学*, 2014, 35(1): 7–11.
- [ ZHONG J Z, TU Y, LIU W, et al. Effect of glycosylation treatment coupled with dynamic high pressure microfluidization on emulsifying properties and structure of  $\beta$ -lactoglobulin[J]. *Food Science*, 2014, 35(1): 7–11. ]
- [ 33 ] JIANG L Z, WANG Z J, LI Y, et al. Relationship between surface hydrophobicity and structure of soy protein isolate subjected to different ionic strength[J]. *International Journal of Food Properties*, 2015, 18(5): 1059–1074.
- [ 34 ] 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): 8. [ LIU Z W, ZHU M M, WANG F X, et al. Effect of high temperature hydrothermal treatment on structure and functional properties of soybean protein isolate[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(15): 8. ]
- [ 35 ] SIROUS G, MOHAMMAD R A, HAMID M, et al. Enhancement of intrinsic fluorescence of human carbonic anhydrase II upon topiramate binding: Some evidence for drug-induced molecular contraction of the protein[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 108: 240–249.
- [ 36 ] 王子欢, 刘丹怡, 郑嘉琛, 等. 超高压条件下大豆分离蛋白美拉德反应及乳化性质[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(23): 49–58.
- [ WANG Z H, LIU D Y, ZHENG J C, et al. Preparation and emulsifying properties of Maillard reaction products of soybean protein isolate under high hydrostatic pressure[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(23): 49–58. ]
- [ 37 ] LIU K S, HSIEH F H. Protein-protein interactions during high-moisture extrusion for fibrous meat analogues and comparison of protein solubility methods using different solvent systems[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2008, 56(8): 2681.