

超声处理对杜仲籽仁蛋白结构及理化特性的影响

王艳珍¹, 张圆圆², 纵伟²

(1. 鹤壁职业技术学院 交通与材料工程学院, 河南 鹤壁 458030; 2. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 郑州 450002)

摘要:旨在为杜仲籽仁蛋白的开发与应用提供参考,以杜仲籽仁粕为原料,采用碱溶酸沉法提取蛋白,采用500 W、35 kHz超声波对杜仲籽仁蛋白处理不同的时间(0、10、20、30 min和40 min),探究超声处理对杜仲籽仁蛋白微观结构、理化特性(粒径、Zeta-电位、内源荧光光谱、溶解性、持水性、持油性、起泡性、起泡稳定性、乳化性、乳化稳定性)的影响。结果表明:超声处理可改变杜仲籽仁蛋白的微观结构、粒径、Zeta-电位和荧光强度;超声处理20 min时,杜仲籽仁蛋白溶解度达到75.35%;超声处理10 min时,杜仲籽仁蛋白乳化性最大,达到72.12 m²/g;超声处理40 min时,杜仲籽仁蛋白持水性、持油性、起泡性和起泡稳定性最大,分别达到4.32 g/g、3.46 g/g、23.12%和21.12%。综上,超声处理可改善杜仲籽仁蛋白的持水性、持油性、起泡性、乳化性等特性。

关键词:杜仲籽仁蛋白;超声处理;微观结构;理化特性

中图分类号:TS229;TS201.4 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)05-0066-05

Effect of ultrasound treatment on structure and physicochemical properties of *Eucommia ulmoides* seed kernel protein

WANG Yanzhen¹, ZHANG Yuanyuan², ZONG Wei²

(1. School of Traffic and Materials Engineering, Hebi Polytechnic, Hebi 458030, Henan, China; 2. School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To provide reference for the development and application of *Eucommia ulmoides* seed kernel protein, the *Eucommia ulmoides* seed kernel meal was used as material, the protein was extracted with alkali solution and acid precipitation, and *Eucommia ulmoides* seed kernel protein was treated by ultrasound (500 W, 35 kHz) for different time (0, 10, 20, 30 min and 40 min). The effects of ultrasound treatment on *Eucommia ulmoides* seed kernel protein's microstructure and physicochemical properties (particle size, Zeta-potential, fluorescence spectrum, solubility, water holding capacity, oil holding capacity, foaming capacity, foam stability, emulsifying capacity, emulsifying stability) were studied. The results showed that ultrasound treatment could change microstructure, particle size, Zeta-potential and fluorescence intensity of *Eucommia ulmoides* seed kernel protein. When the ultrasound treatment time was 20 min, the solubility of *Eucommia ulmoides* seed kernel protein reached 75.35%. When the ultrasound treatment time was 10 min, the emulsifying capacity of *Eucommia ulmoides* seed kernel protein was the highest, reaching 72.12 m²/g. When the ultrasound treatment time was 40 min, the water holding capacity, oil holding capacity, foaming capacity and foam stability of *Eucommia ulmoides* seed kernel protein were the largest, reaching 4.32 g/g, 3.46 g/g, 23.12% and 21.12%, respectively. In summary, ultrasound treatment can improve the functional characteristics of *Eucommia*

ulmoides seed kernel protein, such as water holding capacity, oil holding capacity, foaming capacity and emulsifying capacity.

Key words: *Eucommia ulmoides* seed kernel protein; ultrasound treatment; microstructure; physicochemical property

收稿日期:2024-01-08;修回日期:2024-02-26

基金项目:河南省重大科技专项(231100110400)

作者简介:王艳珍(1978),女,硕士,研究方向为植物蛋白加工(E-mail)15639239877@163.com。

通信作者:纵伟,教授,博士(E-mail)zongwei1965@126.com。

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)为杜仲科杜仲属植物,其翅果中的籽仁富含亚麻酸、亚油酸等多种不饱和脂肪酸及苷、绿原酸等活性成分^[1-2]。杜仲籽仁提取油脂后,其粕中含有丰富的蛋白质^[3-4],对其进行加工,有利于杜仲翅果资源的开发利用。

研究发现,一些植物蛋白在溶解性、乳化性功能特性方面较差^[5],使其在食品工业中的应用受到一定的限制。对植物蛋白进行改性处理,可改善其功能性质,满足食品工业需求。目前,对蛋白质改性的方法主要有物理法^[6]、酶法^[7-8]和化学法^[9-10]。其中,超声处理作为一种物理法改性技术,具有高效、绿色、环保的特点^[11],在大豆蛋白^[12]、花生蛋白^[13]、豌豆蛋白^[14]等蛋白的改性中得到应用,但在杜仲籽仁蛋白的改性方面,还未见报道。因此,本研究以杜仲籽仁蛋白为原料,研究不同超声时间对杜仲籽仁蛋白结构和理化特性的影响,以期对杜仲籽仁蛋白的开发及应用提供一定的理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

杜仲籽仁粕(杜仲翅果去除果壳后经超临界CO₂萃取油脂后的粕,其蛋白质含量为37.1%,脂肪含量为0.9%),河南金杜仲生物工程公司;溴化钾、石油醚、氢氧化钠、浓硫酸、盐酸、无水硫酸铜等,均为市售分析纯。

FA2004分析天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;pHS-3C酸度计,上海仪电科学仪器股份有限公司;JIDI-20D台式多用途高速离心机,广州吉迪仪器有限公司;XY-FD-18冷冻干燥机,上海欣渝仪器有限公司;XHF-DY高速分散器,宁波新芝生物科技股份有限公司;JSM-6490LV扫描电子显微镜,日本电子株式会社;Nano-ZS90型激光散射仪,英国马尔文仪器有限公司;RF-5301PC荧光分光光度计,日本岛津公司。

1.2 试验方法

1.2.1 杜仲籽仁蛋白的制备

将杜仲籽仁粕粉碎,过0.180 mm(80目)筛得到杜仲籽仁粕粉。取杜仲籽仁粕粉,按料液比1:10加入pH 9.5的NaOH溶液,于50℃提取2 h后,在8 000 r/min下离心20 min,取上清液并用1 mol/L HCl溶液调pH至4.6,静置过夜后取沉淀,水洗至pH为7.0,冷冻干燥后得杜仲籽仁蛋白(蛋白质含量为85.8%)。

1.2.2 杜仲籽仁蛋白的超声处理

取杜仲籽仁蛋白,用蒸馏水配制成50 mg/mL

的蛋白溶液,然后采用500 W、35 kHz的超声波在25℃下处理0、10、20、30 min和40 min,冷冻干燥后得到超声处理的杜仲籽仁蛋白。

1.2.3 微观结构的测定

将杜仲籽仁蛋白用导电双面胶固定在金属样品台上后喷金镀膜,在20 kV加速电压条件下采用扫描电子显微镜观测样品微观结构。

1.2.4 理化指标的测定

1.2.4.1 粒径、Zeta-电位

取超声处理的杜仲籽仁蛋白,用蒸馏水配制成2 mg/mL的溶液,再采用激光粒度仪测定其粒径和Zeta-电位。

1.2.4.2 内源荧光光谱

用0.01 mol/L、pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液将超声处理的杜仲籽仁蛋白配制为质量浓度为1 mg/mL的样品溶液,在激发波长280 nm、激发狭缝宽度5 nm、发射狭缝宽度5 nm条件下采用荧光分光光度计进行扫描,测定样品的内源荧光光谱。

1.2.4.3 溶解度的测定

取1.2.2中超声波处理不同时间的杜仲籽仁蛋白溶液,在25℃、10 000 r/min下离心15 min,取上清液测定蛋白质含量(按GB 5009.6—2016第一法测定),以上清液中蛋白质质量与原料中蛋白质质量的比值表征样品的溶解度。

1.2.5 功能特性的测定

1.2.5.1 持水性、持油性

参考Yang等^[15]的方法测定样品的持水性和持油性。分别准确称取1 g超声处理的杜仲籽仁蛋白于2个离心管中,分别加入20 mL去离子水和大豆油,混合均匀后静置30 min,在10 000 r/min下离心20 min,去除上清,测定吸水和吸油后的质量,以吸收的水/油的质量与吸水/油前蛋白质质量的比值表征样品的持水/油性。

1.2.5.2 起泡性和起泡稳定性

参考望运滔等^[16]的方法测定样品的起泡性和起泡稳定性。将质量分数为5%的杜仲籽仁蛋白溶液置于量筒中,采用高速分散器在12 000 r/min下搅打5 min,记录搅打后以及静置30 min时泡沫的体积。分别按式(1)和式(2)计算起泡性(C_F)和起泡稳定性(S_F)。

$$C_F = (V_1 - V_0) / V_0 \times 100\% \quad (1)$$

$$S_F = (V_{30} - V_0) / V_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中: V_1 为搅打后的体积; V_0 为搅打前的体积; V_{30} 为静置30 min后的体积。

1.2.5.3 乳化性和乳化稳定性

参考 Purdi 等^[17]的方法测定样品的乳化性和乳化稳定性。分别取 9 mL 1.2.2 中经不同时间超声处理后的样品溶液于 25 mL 烧杯中,加入 3 mL 大豆油,在 12 000 r/min 下高速搅打 2 min,分别在 0、10 min 时从烧杯底部吸取 50 μ L 液体到 10 mL 离心管中,加入 5 mL 0.1% SDS 溶液混合均匀,在 500 nm 处测定其吸光值。分别按式(3)和式(4)计算乳化性(I_{EA})和乳化稳定性(I_{ES})。

$$I_{EA} = (2 \times 2.303 \times A \times N) / (c \times \varphi \times 10\,000) \quad (3)$$

$$I_{ES} = I_{EA10} / I_{EA0} \times 100\% \quad (4)$$

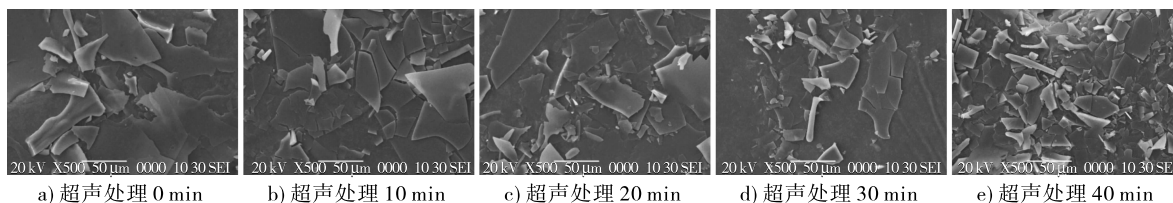


图1 超声处理对杜仲籽仁蛋白微观结构的影响

由图1可见,未超声处理的杜仲籽仁蛋白呈大块不规则片状,随着超声处理时间的延长,蛋白质颗粒尺寸减小,同时,表面的多孔结构增加。这是由于超声波提供的能量将大尺寸的蛋白质颗粒破碎,蛋白质的结构疏松,形成多孔状态^[18]。

2.2 超声处理对杜仲籽仁蛋白理化指标的影响

2.2.1 对粒径和 Zeta - 电位的影响

超声处理对杜仲籽仁蛋白粒径和 Zeta - 电位的影响如表1所示。

表1 超声处理对杜仲籽仁蛋白粒径和 Zeta - 电位的影响

处理时间/min	平均粒径/nm	Zeta - 电位/mV
0	968.32 \pm 5.65 ^a	-22.28 \pm 0.82 ^a
10	465.32 \pm 3.65 ^b	-27.18 \pm 0.92 ^b
20	135.68 \pm 2.64 ^d	-27.32 \pm 0.78 ^b
30	95.65 \pm 1.24 ^e	-27.38 \pm 1.02 ^b
40	168.95 \pm 2.65 ^c	-27.45 \pm 0.87 ^b

注:同列不同字母代表差异显著, $p < 0.05$

由表1可知,随着超声处理时间的延长,杜仲籽仁蛋白平均粒径显著降低,在超声处理 30 min 时杜仲籽仁蛋白的平均粒径达到(95.65 \pm 1.24) nm,之后随着超声处理时间的继续延长,杜仲籽仁蛋白的平均粒径显著增加。马蓉等^[19]在研究超声处理对酪蛋白作用时也发现,超声波作用过程中产生的空化、剪切力和湍流作用可加速蛋白质颗粒破碎,处理时间越长,破碎程度越大,但破碎到一定程度后,颗粒平均粒径过小,会发生团聚现象,导致颗粒粒径增大。由表1还可知,超声处理后,杜仲籽仁蛋白的

式中: A 为 500 nm 处的吸光值; φ 为油相体积分数; c 为蛋白质量浓度, g/mL; N 为稀释倍数, I_{EA10} 为 10 min 时的乳化性, m^2/g ; I_{EA0} 为 0 min 时的乳化性, m^2/g 。

1.2.6 数据处理

所有数据重复测定 3 次,结果用“平均值 \pm 标准偏差”表示,采用 SPSS 24.0 进行差异显著性分析, $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 超声处理对杜仲籽仁蛋白微观结构的影响

超声处理对杜仲籽仁蛋白微观结构的影响见图1。

Zeta - 电位绝对值增大,但超声处理时间对 Zeta - 电位绝对值的影响不显著($p > 0.05$)。这是因为超声处理使杜仲籽仁蛋白带电基团暴露,负电荷增加,10 min 的超声处理已经可将杜仲籽仁蛋白带电基团充分暴露。

2.2.2 超声处理对杜仲籽仁蛋白内源荧光光谱的影响

超声处理对杜仲籽仁蛋白内源荧光光谱的影响见图2。

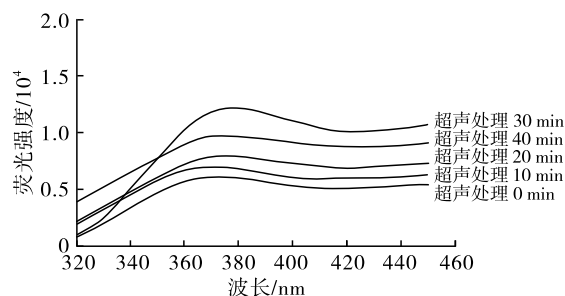


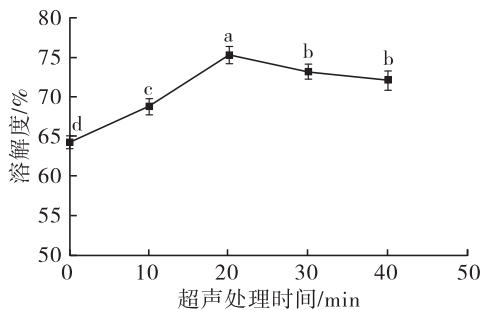
图2 超声处理对杜仲籽仁蛋白内源荧光光谱的影响

由图2可见,在超声处理 0 ~ 30 min 内,杜仲籽仁蛋白的荧光强度随着超声处理时间的延长而增加,但超声处理 40 min 时,杜仲籽仁蛋白的荧光强度下降。这是因为在超声的作用下,蛋白质构象发生变化,色氨酸、酪氨酸基因和苯丙氨酸基因等产生荧光的基团从蛋白质内部暴露,从而导致荧光强度增加,但继续延长超声处理时间,蛋白质发生变性、交联,暴露的色氨酸、酪氨酸基因和苯丙氨酸基因又被包埋,导致荧光强度减小^[16]。此外,未超声处理的杜仲籽仁蛋白最大荧光发射波长为 371.4 nm,超

声处理 30 min 时,最大荧光发射波长增加到 377.4 nm,产生 6.0 nm 的红移,这是由于蛋白质在超声处理后舒展,蛋白质内部的色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等芳香氨基酸分子侧链基团暴露于水溶液中,使环境极性增大所致^[16]。

2.2.3 超声处理对杜仲籽仁蛋白溶解度的影响

超声处理对杜仲籽仁蛋白溶解度的影响如图 3 所示。



注:不同字母代表差异显著, $p < 0.05$

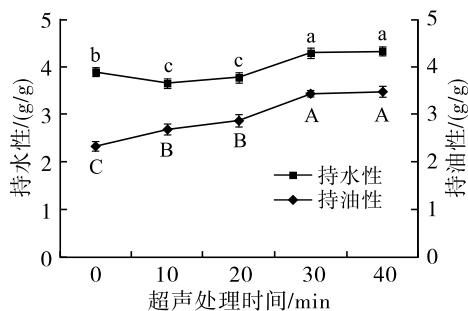
图 3 超声处理对杜仲籽仁蛋白溶解度的影响

由图 3 可见,在超声处理 20 min 内,杜仲籽仁蛋白溶解度随着超声处理时间的延长而增加,在 20 min 时溶解度达到最大,为 75.35%,超过 20 min 后,杜仲籽仁蛋白溶解度降低。这是由于超声处理后,蛋白质颗粒粒径减小,表面积增加,与水分子结合能力增大,溶解度增大,但超声处理时间过长,内部疏水基团暴露,溶解度反而降低^[20]。

2.3 超声处理对杜仲籽仁蛋白功能特性的影响

2.3.1 对持水性和持油性的影响

超声处理对杜仲籽仁蛋白持水性和持油性的影响如图 4 所示。



注:同一指标不同字母表示差异显著, $p < 0.05$ 。下同

图 4 超声处理对杜仲籽仁蛋白持水性和持油性的影响

由图 4 可见,杜仲籽仁蛋白的持水性和持油性均随着超声处理时间的延长而增加,在超声处理 40 min 时持水性和持油性分别达到 4.32 g/g 和 3.46 g/g。这是由于超声波作用下,颗粒表面形成大量空穴,蛋白质内部功能基团暴露,使蛋白质吸附和结合能力增加^[21]。

2.3.2 对起泡性和起泡稳定性的影响

超声处理对杜仲籽仁蛋白起泡性和起泡稳定性的影响如图 5 所示。

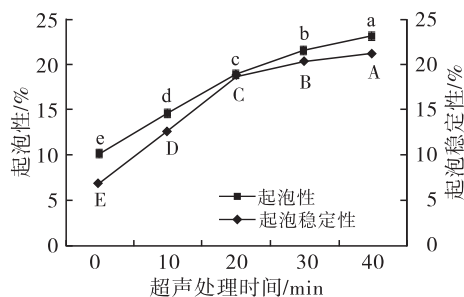


图 5 超声处理对杜仲籽仁蛋白起泡性和起泡稳定性的影响

由图 5 可见,杜仲籽仁蛋白起泡性和起泡稳定性随超声处理时间的延长显著增加,当超声处理 40 min 时,起泡性和起泡稳定性最大,分别达到 23.12% 和 21.12%。研究表明,超声波的作用可导致蛋白结构疏松,蛋白质分子疏水基团暴露,同时,蛋白质分子柔韧性增强,使蛋白质容易吸附在气-水界面上,从而使起泡性增强^[22]。

2.3.3 对乳化性和乳化稳定性的影响

超声处理对杜仲籽仁蛋白乳化性和乳化稳定性的影响如图 6 所示。

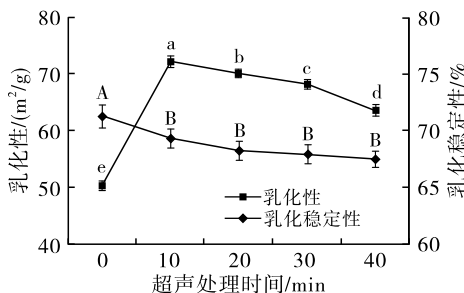


图 6 超声处理对杜仲籽仁蛋白乳化性和乳化稳定性的影响

由图 6 可见:在超声处理 10 min 时,杜仲籽仁蛋白的乳化性最高,达到 72.12 m²/g,继续延长超声处理时间,乳化性下降;随超声处理时间延长,杜仲籽仁蛋白的乳化稳定性下降,但超声处理时间超过 10 min 后,不同超声处理时间下杜仲籽仁蛋白的乳化稳定性无显著差异($p > 0.05$)。这是两方面共同作用的结果,即一方面适当的超声处理能够使蛋白质空间结构分散,乳化性增强,但另一方面,超声处理会导致蛋白质变性,分子聚集,溶解度降低,乳化活性降低^[23]。

3 结论

超声处理可改变杜仲籽仁蛋白的微观结构,使其结构疏松,同时使其粒径和 Zeta-电位、荧光强度和溶解度发生改变。另外,超声处理对杜仲籽仁蛋

白功能特性有一定的影响。在超声处理 10 min 时,杜仲籽仁蛋白乳化性最大,达到 72.12 m²/g;在超声处理 40 min 时,杜仲籽仁蛋白持水性、持油性、起泡性和起泡稳定性最大,分别达到 4.32 g/g、3.46 g/g、23.12% 和 21.12%。综上,超声处理可改变杜仲籽仁蛋白的微观结构和理化特性,改善其持水性、持油性、起泡性和乳化性等功能特性。

参考文献:

- [1] 陈亮,刘悠,姚茂君,等. 杜仲籽油冻干脂质体的制备及表征[J]. 中国油脂, 2021, 46(3): 68-73, 92.
- [2] DUAN C J, ZHANG Y, YU L, et al. The simultaneous extraction and separation of hydrophobic and hydrophilic phytochemicals from *Eucommia ulmoides* seeds with green solvent CPME system [J]. Chem Pap, 2023, 77(9): 5357-5369.
- [3] 刘玉兰,焦惠丽,李骁. 醇洗法提取杜仲籽仁粕中桃叶珊瑚苷及制取浓缩蛋白[J]. 中国油脂, 2017, 42(4): 89-92.
- [4] 葛珍珍,王维静,张圆圆,等. 杜仲籽粕蛋白的分离提取及其体外消化产物的抗氧化特性研究[J]. 食品科技, 2021, 46(4): 202-207.
- [5] 李闪闪,刘哲,职兰懿,等. 新型物理改性技术改善植物蛋白加工特性研究进展[J]. 中国食品学报, 2023, 23(11): 413-422.
- [6] QUINTERO - QUIROZ J, CELIS - TORRES A, CIRO - GÓMEZ G, et al. Physicochemical properties and functional characteristics of ultrasound - assisted legume - protein isolates: A comparative study [J]. J Food Sci Technol, 2022, 59(5): 1665-1676.
- [7] OLATUNDE O O, OWOLABI I O, FADAIRO O S, et al. Enzymatic modification of plant proteins for improved functional and bioactive properties [J]. Food Bioprocess Technol, 2023, 16(6): 1216-1234.
- [8] SAREEN J, SHI D, STONE A K, et al. Effect of enzyme hydrolysis on the physicochemical, functional, and nutritional properties of pea and faba bean protein isolates [J]. Eur Food Res Technol, 2023, 249(12): 3175-3190.
- [9] ZHANG X G, XUE Y, LU Z P, et al. Chemical modification for improving catalytic performance of lipase B from *Candida antarctica* with hydrophobic proline ionic liquid [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2022, 45(4): 749-759.
- [10] 宋赛赛,马森,孙冰华,等. 燕麦蛋白的改性及其在燕麦加工中理化性质变化的研究进展 [J/OL]. 食品与发酵工业: 1-9 [2024-01-08]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037019>.
- [11] KARABULUT G, FENG H, YEMİŞ O. Physicochemical and antioxidant properties of industrial hemp seed protein isolate treated by high - intensity ultrasound [J]. Plant Foods Hum Nutr, 2022, 77(4): 577-583.
- [12] 衣程远,孙冰玉,刘琳琳,等. 超声处理对大豆蛋白结构及性质的影响研究进展[J]. 中国调味品, 2022, 47(12): 197-200.
- [13] 张淑艳,章绍兵,陈林,等. 花生蛋白的浓度对其超声改性效果的影响[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2022, 43(3): 58-64.
- [14] 丁芳芳,田少君,常慧敏,等. 超声改性豌豆蛋白乳状液稳定性的研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(2): 76-110, 116.
- [15] YANG M, SHI Y, WANG P, et al. Effect of succinylation on the functional properties of yak caseins: A comparison with cow caseins [J]. Dairy Sci Technol, 2014, 94(4): 359-372.
- [16] 望运滔,王营娟,田金凤,等. 高强度超声对鹰嘴豆分离蛋白结构和功能特性的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(8): 9-14, 71.
- [17] PURDI T S, SETIOWATI A D, NINGRUM A. Ultrasound - assisted extraction of *Spirulina platensis* protein: Physicochemical characteristic and techno - functional properties [J]. J Food Meas Charact, 2023, 17(5): 5474-5486.
- [18] 李婷婷,田亚平,周楠迪,等. 超声振荡改性玉米醇溶蛋白及高 F 值寡肽制备 [J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(11): 104-111.
- [19] 马蓉,杨富民,杨敏,等. 超声处理对脱脂牛乳蛋白质结构和界面性质的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2018, 53(5): 169-175, 184.
- [20] 谢为峰,罗丰收,解超男,等. 超声波处理对杏仁粕蛋白质理化和功能性质的改性研究[J]. 农产品加工, 2016, 17(1): 1-3.
- [21] 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.
- [22] JAMBRAK A R, LELA S V, MASON T J, et al. Physical properties of ultrasound treated soy proteins [J]. J Food Eng, 2009, 93(4): 386-393.
- [23] 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.