碳酸氢钠对组织化小麦蛋白体外消化特性的影响

桑梦丽[1,2]，黄德奕[1,2]，邓宁华[1,2]，陈楚玲[1,2]，张叶勤[1,2]，
金慧婷[1,2]，杨欣悦[1,2]，林全全*[1,2,3]

（1. 浙江工商大学 食品与生物工程学院，浙江 杭州 310018；2. 浙江工商大学 浙江省食品安全重点实验室，浙江 杭州 310018；3. 嘉兴未来食品研究院，浙江 嘉兴 314015）

摘要：近年来，基于组织化植物蛋白的植物肉受到越来越多的关注。有关植物肉的蛋白质消化特性还不明确。碳酸氢钠是组织化蛋白制备中常用的添加剂。为了探究碳酸氢钠对组织化蛋白的纤维结构和蛋白质消化特性的影响，制备了含0、0.05%和0.10%（质量分数，以干粉质量计）碳酸氢钠的组织化小麦蛋白。通过测定样品的堆积密度、质构特性、组织化度、微观结构和蛋白质分子间相互作用力分析样品的纤维结构特性。结果表明，随着碳酸氢钠质量分数由0增加到0.1%，组织化小麦蛋白的堆积密度、硬度和组织化度逐渐减小，其纤维结构更加纤细，纤维之间的间隙更多。经过体外口腔和胃消化阶段后，3种组织化小麦蛋白的食糜粒径均随碳酸氢钠质量分数的增大而增大（$P>0.05$）；在模拟小肠消化结束后，3种样品的消化产物粒径接近（$P>0.05$）。胃消化30 min时，蛋白质电泳图谱中，3组样品中相对分子质量小于14 300的蛋白质条带颜色随着碳酸氢钠质量分数的增加而变浅。在体外消化结束后，消化食糜中可溶性氮质量分数随碳酸氢钠质量分数的增大而增大（$P<0.05$）。这些结果表明，随着碳酸氢钠质量分数的增大，组织化小麦蛋白中蛋白质的消化速度和程度逐渐增大，消化结束后3种组织化小麦蛋白释放的游离氨基酸总质量分数分别为（39.53±0.56）、（41.56±0.59）、（44.85±0.39）mg/g（以消化液质量计），这可能主要是由其较细的纤维和更多的纤维间隙促进蛋白酶与作用位点的接触导致的。

关键词：植物肉；纤维结构；小麦蛋白；碳酸氢钠；体外消化

中图分类号：TS 201.4　**文章编号**：1673-1689(2023)03-0102-10　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.03.012

Effect of Sodium Bicarbonate on *in Vitro* Digestion of Textured Wheat Protein

SANG Mengli[1,2]，*HUANG Deyi*[1,2]，*DENG Ninghua*[1,2]，*CHEN Chuling*[1,2]，*ZHANG Yeqin*[1,2]，
JIN Huiting[1,2]，*YANG Xinyue*[1,2]，*LIN Quanquan*[*1,2,3]

（1. School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China; 2. Food Safety Key Laboratory of Zhejiang Province, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China; 3. Jiaxing Institute of Future Food, Jiaxing, 314015, China）

Abstract: In recent years, textured-vegetable-protein-based meat analogs have received more and more attention. The protein digestibility of plant-based meat analogs is still unclear. Sodium bicarbonate is a commonly used additive in the preparation of textured proteins. In order to explore

收稿日期：2022-07-24

基金项目：国家自然科学基金项目（31901686，32072218）；浙江省教育厅一般科研项目（Y202147653）。

* **通信作者**：林全全（1990—），女，博士，讲师，硕士研究生导师，主要从事食品消化与营养方面的研究。E-mail：quanquanlin@zjgsu.edu.cn

the effect of sodium bicarbonate on the fibrous structure and protein digestibility of textured protein, textured wheat proteins containing 0, 0.05%, and 0.1% (mass fraction of dry powder) sodium bicarbonate were prepared. The fibrous structure was analyzed by measuring the bulk density, texture properties, degree of texturization, microstructure, and protein-protein intermolecular interactions of the samples. The results showed that with the increase of sodium bicarbonate mass fraction from 0 to 0.1%, the bulk density, hardness, and degree of texturization of the textured wheat protein decreased gradually, and the gaps between fibers became larger when the fibers became thinner. After *in vitro* oral and gastric digestion, the digesta particle size of three textured wheat proteins increased with the increase of sodium bicarbonate concentration (P>0.05). After the simulated small intestinal digestion, the particle sizes of the digestion products of three textured wheat proteins were similar (P>0.05). After 30 min of gastric digestion, the band intensity of protein with relative molecular weight less than 14 300 in three samples declined with the increase of sodium bicarbonate mass fraction. After the *in vitro* digestion, the content of soluble nitrogen in digesta increased with the increase of sodium bicarbonate mass fraction (P<0.05). These results suggested that the protein digestion rate and degree of textured wheat proteins gradually increased with the increase of sodium bicarbonate mass fraction. After digestion, the total free amino acids obtained released from three textured wheat proteins were (39.53±0.56), (41.56±0.59), and (44.85±0.39) mg/g of digesta, respectively. The greater extent of proteolysis in the textured wheat proteins containing the higher mass fractions of sodium bicarbonate might be due to the thinner fibers and more fiber gaps, which promoted the proteases to interact with the cleavage sites.

Keywords: plant-based meat analogs, fibrous structure, wheat protein, sodium bicarbonate, *in vitro* digestion

肉类是优质、重要的蛋白质来源之一。随着生活水平不断提升，人们对肉类食品的需求呈爆炸性增长。据 FAO(联合国粮食及农业组织)预计，2050 年肉类消费将会增加 1 倍[1]。然而，现在全球肉类生产能力已接近最大值[2]，传统畜牧业供给将严重不足。为应对未来可能出现的粮食安全危机，同时减少全球碳排放，满足日益增加的肉类需求，开发绿色环保、可持续的肉类替代品势在必行。目前，以植物蛋白(如大豆蛋白、小麦蛋白、豌豆蛋白)为原料的植物肉是最主要的肉类替代品。同时，市面上的大部分植物肉是以挤压法制备的低水分组织化植物蛋白为主要配料，通过添加色素、香辛料等调制而成[3]。

获取蛋白质是人们摄入肉类的主要原因。然而，植物肉能否替代动物肉以满足人们对蛋白质的营养需求还尚不可知。目前，有关植物肉的消化营养特性研究还很少。2021 年，Zhou 等研究发现，经过胃消化，植物牛肉蛋白质的消化程度高于牛肉；而经过小肠消化，前者的蛋白质消化程度低于后者[4]。Xie 等也发现了类似的现象，他们对比了植物猪肉和猪肉、植物牛肉和牛肉的蛋白质体外消化特性，发现在胃阶段，植物牛肉中蛋白质的消化程度要高于牛肉，而植物猪肉中蛋白质的消化程度则要低于猪肉；在小肠阶段，植物肉的蛋白质消化程度均低于相应动物肉[5]。另外，作者所在课题组也做了一些相关研究[6-9]，发现植物鸡肉和植物猪肉在胃和小肠阶段的消化程度均低于相应动物肉[6-7]。许多研究表明，食物消化特性与其结构有重要联系[10-12]。最近，作者所在课题组研究发现，植物肉的主要配料——组织化小麦蛋白的蛋白质消化特性受纤维结构的影响，蛋白质的消化程度随挤压过程中物料水分的减小而降低，这可能是因为在较低水分条件下制得的组织化小麦蛋白中的纤维较为致密，不利于蛋白酶与作用位点的接触，从而抑制消化[8]。这说明可以通过改变组织化蛋白的加工条件以改变纤维结构，进而调控蛋白质消化特性。

碳酸氢钠是制备组织化蛋白常用的添加剂。许多研究[13-16]表明,碳酸氢钠对组织化蛋白纤维结构的形成有重要影响。例如,贾旭通过扫描电子显微镜观察到,随着碳酸氢钠质量分数的增大,组织化蛋白中的气孔逐渐增多[13]。李婷发现随着碳酸氢钠质量分数(0~1.5%)的增加,组织化小麦蛋白的堆积密度降低,组织化度和硬度呈先增大后减小的变化规律[14]。然而,碳酸氢钠对组织化蛋白的消化特性有何影响尚不明确。因此,作者以组织化小麦蛋白为研究对象,采用体外消化模型,探究碳酸氢钠对组织化植物蛋白消化特性的影响,明确纤维结构特性与蛋白质消化特性的相关性,从而为开发具有高蛋白质营养价值的植物肉产品提供理论依据,具有重要的研究意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

谷朊粉:封丘县华丰粉业有限公司产品;小麦淀粉:山东渠风食品科技有限公司产品;唾液淀粉酶、胃蛋白酶、胰酶、2-巯基乙醇(2-mercaptoethanol,2-ME)、过硫酸铵和十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,SDS):Sigma-Aldrich 试剂公司产品;尿素(urea,U)、碳酸氢钠、牛胆盐(生化试剂):国药集团化学试剂有限公司产品;质量分数 30% Acr-Bis:上海双螺旋生物有限公司产品;Bradford 蛋白质定量试剂盒:上海源叶生物科技有限公司产品;BCA 总蛋白质定量测定试剂盒:南京建成生物工程研究所产品;苏木精-伊红染色试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司产品。

1.2 仪器与设备

FMHE36-24 智能型挤压机:湖南富马科食品工程有限公司产品;Sync 型激光粒度分析仪:美国麦奇克公司产品;KDN-816 型定氮仪、HYP-320 型消化炉:上海纤检仪器有限公司产品;TA-XT Plus 型组织分析仪:英国 Stable Micro Systems 公司产品;S475 多参数测试仪:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品;TS100 倒置显微镜:日本尼康仪器有限公司产品;UV2100 型紫外可见分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 组织化小麦蛋白的制备 参照 Lin 等的方法并适当修改[8]。采用双螺杆挤压机制备组织化小麦蛋白,具体方法如下:将谷朊粉和小麦淀粉以质量比 9:1 装入混粉机,同时按照干粉质量的 0、0.05% 和 0.1%分别向混合器中添加碳酸氢钠,混合均匀后灌入双螺旋挤压机的喂料桶。

根据预备实验的结果,采用统一的挤压参数:物料水分质量分数 26.5%,螺杆转速 270 r/min,喂料量 12 kg/h,5 个加热段温度分别为 65、90、130、170、145 ℃,模孔尺寸 33 mm×3 mm。当挤压机预热到设定的温度后,加入原料,待原料从模头挤出且挤压机稳定运行一段时间后取样,置于 50 ℃烘箱中干燥 6 h,放入密封袋中保存。当碳酸氢钠质量分数超过 0.1%后,样品膨化过度难以得到稳定的产品,因此选取碳酸氢钠的最大质量分数为 0.1%。得到的 3 组样品分别记为 TWP-SB1、TWP-SB2 和 TWP-SB3。

1.3.2 水分、pH、堆积密度、蛋白质的测定 根据国标 GB/T 5009.3—2010,利用烘干法测定样品中的水分。将组织化小麦蛋白复水沥干,与水以质量比 1:4 混合后利用高速分散机粉碎,测量 pH。利用小米体积替换法测定样品的体积,以质量与体积之比来计算样品的堆积密度。根据国标 GB/T 5009.5—2010,利用凯氏定氮法测定样品中的蛋白质。

1.3.3 复水率测定 取 10 g 组织化小麦蛋白,记录质量 m_1,室温下复水 30 min,于漏网上沥水 10 min 后称量,记录质量 m_2。根据公式(1)得出样品复水率。

$$W=\frac{m_2-m_1}{m_1}\times 100\% \quad (1)$$

式中:W 为样品复水率,%;m_1 和 m_2 分别为复水前后组织化小麦蛋白的质量,g。

1.3.4 组织化度测定 根据 Lin 等的方法[8],将组织化小麦蛋白复水沥干后切成 1 cm×1 cm×1 cm 的正方体,放置在物性测定仪测试台中央,采用 A-CKB 探头,进行横向和纵向的剪切实验,每组重复 20 次。组织化度计算公式如下:

$$Z=\frac{F_V}{F_L} \quad (2)$$

式中:Z 为样品组织化度;F_V 为横向剪切力,g;F_L 为纵向剪切力,g。

1.3.5 质构特性分析 参考林全全等的方法[6],将复水后的样品切成 1 cm×1 cm×1 cm 的样品块,放于物性仪测试台中央,采用 TPA 操作模式,P50 探头,测试前、中、后速率均为 1 mm/s,下压程度为 75%,测量得到硬度、弹性、内聚性、咀嚼性、回复性等一系列指标,每组样品重复 20 次。

1.3.6 蛋白质溶解度测定 利用磷酸盐缓冲溶液提取天然状态的蛋白质，而SDS、尿素和2-ME可以分别破坏蛋白质分子的疏水键、氢键和二硫键[17]。因此，利用蛋白质在不同提取液中溶解度的不同来分析蛋白质之间的交联方式。参考Chiang等的方法适当修改[18]，准备6组不同的浸提组合溶液来溶解蛋白质网络中的特殊化学键。浸提溶液如下：①0.035 mol/L pH 7.6磷酸盐缓冲液(PBS)；②PBS+8 mol/L U(PU)；③PBS+2%(质量分数)2-ME(PM)；④PBS+8 mol/L U+2%(质量分数)2-ME(PUM)；⑤PBS+1.5%(质量分数)SDS(PS)；⑥PBS+8 mol/L U+1.5%(质量分数)SDS(PUS)。取0.5 g左右粉碎的组织化小麦蛋白，分别加入10 mL上述浸提溶液后置于40 ℃水浴摇床中以150 r/min振荡3 h，然后将混合物在14 000 *g*下离心20 min，用Bradford蛋白质试剂盒测定①至④上清液中可溶性蛋白质的质量分数，用BCA试剂盒测定⑤和⑥上清液中可溶性蛋白质的质量分数。样品中总蛋白质质量分数用凯氏定氮法测定。蛋白质溶解度计算方法如下：

$$S=\frac{m_3\times V}{m_0\times w_0}\times 100\% \quad (3)$$

式中：S为蛋白质溶解度，%；m_3为上清液中蛋白质质量浓度，g/mL；V为上清液的体积，10 mL；m_0为样品的质量，g；w_0为样品中总蛋白质质量分数，%。

1.3.7 微观结构观察 将复水后的样品切成1 cm×1 cm×1 cm的正方体，用OCT包埋于冻存盒中，液氮速冻后取出，用冷冻切片机切割成18 μm薄片，吸附于载玻片上，然后置于烤片机上烘干。接着，参照王稣嫱的方法[19]，采用苏木精-伊红染色试剂盒染色。具体方法为：流水冲洗2 min，苏木精染色5 min，流水冲洗10 min，盐酸乙醇分色5 s，水洗3次，每次5 min。再用伊红染色30 s，然后分别用体积分数70%、95%、100%乙醇溶液各洗2次，每次2 min。然后用二甲苯洗2次，每次5 min。最后用中性树胶封片，自然晾干，保存于室温下，用普通光学显微镜拍照记录实验结果。

1.3.8 体外消化实验 参照Lin等的方法[8]，采用INFOGEST体外静态消化方法[20]进行模拟消化。配制口腔、胃和小肠消化储备液（简称SSF、SGF和SIF）并进行预实验，确定各步骤酶及用量、pH调节所需酸用量。之后开始进行消化实验：

1）口腔阶段 将约1.5 g的组织化小麦蛋白样品完全复水后粉碎。然后转移至50 mL三角瓶中，加入一定量水使样品质量为5 g。保持每个样品中的蛋白质质量分数相同。加入5.0 mL含$CaCl_2$和唾液淀粉酶（在口腔混合物中的浓度和活性分别为0.75 mmol/L和75 U/mL）的SSF，调整pH至7.0。置于37 ℃摇床中以100 r/min振摇2 min，收集口腔消化产物，记为SSF 2。

2）胃阶段 口腔消化结束后，立即加入10 mL含$CaCl_2$和胃蛋白酶（在胃混合物中的浓度和活性分别为0.075 mmol/L和2 000 U/mL）的SGF。调整pH为3.0。然后在100 r/min、37 ℃摇床上孵育120 min。分别在30、60、120 min收集胃消化产物，记为SGF 30、SGF 60和SGF 120。

3）小肠阶段 胃消化结束后，加入11 mL SIF储备液、40 μL 0.3 mol/L $CaCl_2$、2.5 mL 0.16 mol/L胆汁和5 mL胰酶溶液（预先溶解在SIF中，最终在小肠混合物中的胰蛋白酶活性为100 U/mL），调节pH至7.0，补充蒸馏水至40 mL。继续在37 ℃摇床中以100 r/min模拟小肠消化120 min。分别在10、30、60、120 min收集小肠消化产物，记为SIF 10、SIF 30、SIF 60和SIF 120。

空白对照实验：采用5 g水代替复水后的组织化蛋白质，与消化液混合进行上述模拟口腔-胃-小肠消化实验。

1.3.9 粒径大小和分布测定 在模拟口腔、胃和小肠消化阶段结束后，分别取适量消化产物，用激光粒度仪测定粒度，结果采用平均粒径$D_{(4,3)}$表示。

1.3.10 可溶性氮质量分数测定 参照林全全等的方法[6]，取一定量的消化产物，在10 000 r/min下离心20 min，获得上清液。然后利用凯氏定氮法测定上清液中的可溶性氮质量分数(g/hg，以消化液质量计)。

1.3.11 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分析 采用12 g/dL分离胶和5 g/dL浓缩胶。取一定量的原始样品及各阶段消化产物与上样缓冲液以体积比1:1混合，用磁力搅拌器搅拌3 h。再在超声水浴和95 ℃水浴中各处理5 min，然后在10 000 r/min下离心15 min。取10 μL上清液注入泳道，在125 V下进行电泳。用考马斯亮蓝进行染色，再用体积分数10%醋酸和体积分数10%异丙醇混合溶液进行脱色，最后置于凝胶成像系统中获取图像。

1.3.12 氨基酸组成分析 具体如下：参照 GB/T 5009.124—2016 中的方法对未消化样品进行酸水解处理，得到水解液。将消化产物在 10 000 r/min 下离心 15 min，取上清液，再以体积比 1:4 加入质量分数 5%磺酸水杨酸沉淀蛋白质，用高速冷冻离心机在 18 000 r/min 下离心 30 min，取上清液经滤膜（0.45 μm 和 0.22 μm）过滤得到滤液。采用日立 L8900 全自动氨基酸分析仪对酸水解液或消化产物的滤液进行氨基酸组成分析。

1.3.13 数据统计与分析 除特殊说明外，所有实验数据均取 3 组平行实验的平均值，实验结果均采用平均值±标准差的方式表示。使用 SPSS 19.0 软件包的 One-Way ANOVA 和 Duncan 法进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 组织化小麦蛋白基本指标和结构分析

2.1.1 组织化小麦蛋白的基本指标 由表 1 可知，3 种组织化小麦蛋白的水分和蛋白质质量分数接近。经复水后样品的 pH 随碳酸氢钠质量分数的增大而逐渐增大，但均接近中性。此外，随着碳酸氢钠质量分数的增加，组织化小麦蛋白的复水率逐渐增加（$P>0.05$），而堆积密度逐渐变小（$P<0.05$）。这与李婷报道的结果一致[14]。这是因为在挤压腔中，碳酸氢钠质量分数越大，产生的二氧化碳气体越多，使产品中的气孔结构越多[13]，膨化程度越大，即堆积密度越小。同时，气孔越多，样品的吸水能力越强，复水率越高。

2.1.2 组织化小麦蛋白的纤维结构特性 通过测定复水后的组织化小麦蛋白的质构特性、组织化度和微观结构以表征组织化蛋白的纤维结构特性。由表 2 可知，随着碳酸氢钠质量分数的增加，样品硬度显著下降（$P<0.05$），而咀嚼性、弹性、回复性和内聚性均显著提高（$P<0.05$）。这可能是由于添加碳酸氢钠后，在挤压腔内受高温影响产生二氧化碳，碳酸氢钠的质量分数越大，所形成的气腔结构越多，导致样品结构变得更为柔软而富有弹性。组织化度是横向剪切力和纵向剪切力的比值，可以表征纤维结构的形成。由表 2 可知，样品的组织化度也随碳酸氢钠质量分数的增加而减小。这可能是因为不含碳酸氢钠样品的膨化度已经较大。碳酸氢钠的加入使挤压过程中产生的包裹在蛋白质熔融体中的二氧化碳在挤出口处瞬间释放，形成的孔洞结构过大，导致纤维结构断裂，弱化了组织化度和硬度[15]。李婷和徐添等研究发现随着碳酸氢钠质量分数（0~1.5%，1.58%~3.69%）增加，组织化小麦蛋白的组织化度均呈先增大后减小的变化规律[14,21]，他们的研究结果与该研究结果的差异可能与碳酸氢钠质量分数、原料来源和挤压条件不同有关。

表 1 组织化小麦蛋白样品的基本指标

Table 1 Basic indicators of the textured wheat protein

样品	碳酸氢钠质量分数/%	水分质量分数/%	蛋白质质量分数/%	pH	复水率/%	堆积密度/(g/cm³)
TWP-SB1	0	9.56±0.34^{a}	64.21±2.74^{a}	6.45±0.03^{c}	106.71±20.54^{a}	0.54±0.09^{a}
TWP-SB2	0.05	9.21±0.10^{ab}	65.37±0.89^{a}	6.58±0.03^{b}	138.65±9.67^{a}	0.41±0.04^{a}
TWP-SB3	0.10	8.93±0.33^{b}	66.24±0.80^{a}	6.75±0.05^{a}	147.57±32.29^{a}	0.36±0.05^{b}

注：同一列不同上标字母表示差异显著（$P<0.05$）。

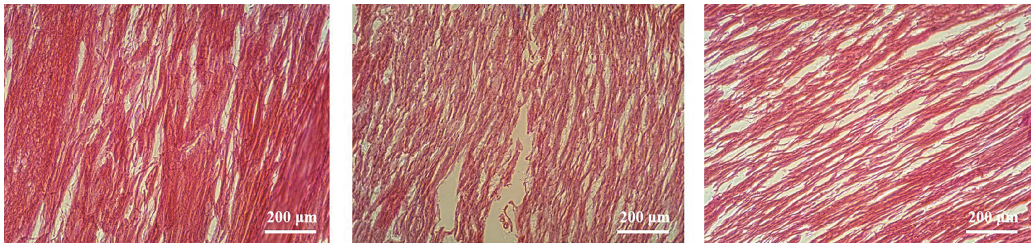
表 2 组织化小麦蛋白样品的质构特性和组织化度

Table 2 Textural characteristics and texturization of the textured wheat protein

样品	硬度/g	咀嚼性/g	弹性	回复性	内聚性	组织化度
TWP-SB1	1 780.45±296.78^{a}	713.46±187.56^{c}	0.83±0.15^{b}	0.24±0.03^{c}	0.49±0.06^{c}	2.01±0.15^{a}
TWP-SB2	1 612.42±231.77^{ab}	870.90±166.41^{b}	0.91±0.10^{a}	0.29±0.05^{b}	0.60±0.10^{b}	1.85±0.13^{a}
TWP-SB3	1 567.64±285.33^{b}	1 025.26±267.53^{a}	0.95±0.13^{a}	0.35±0.06^{a}	0.70±0.09^{a}	1.62±0.21^{b}

注：同一列不同上标字母表示差异显著（$P<0.05$）。

如图 1 所示，3 种组织化小麦蛋白均有明显的纤维结构。在不添加碳酸氢钠的样品中，纤维较粗且致密；随着碳酸氢钠质量分数增大，样品中的纤维越来越细，且纤维与纤维之间的空隙越来越多。这一结果与堆积密度结果一致，进一步验证了碳酸氢钠的加入使组织化小麦蛋白中的气孔增多[13]，导致纤维与纤维之间的空隙增多，纤维变细。

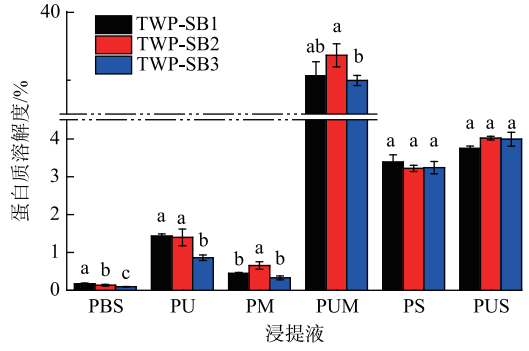


TWP-SB1　　TWP-SB2　　TWP-SB3

图 1　组织化小麦蛋白的纤维结构显微图

Fig. 1　Microstructure of the fibrous structure in the textured wheat protein

2.1.3　蛋白质溶解度测定　挤压过程中，蛋白质的构象以及分子间相互作用力会发生改变[22]。将组织化小麦蛋白溶解在不同溶剂中，以分析挤压过程中添加碳酸氢钠对蛋白质分子间作用力的影响，结果见图 2。PBS 溶液仅能溶解天然蛋白质[23]。在所有溶剂中，PBS 中的蛋白质溶解度最低。当 PBS 中加入其他试剂（尿素、2-ME 或 SDS）后，蛋白质的溶解度均有所增大，这意味着组织化小麦蛋白中的蛋白质结构是由多种作用力共同维持的[17]。6 种溶液中，PUM 溶液中的蛋白质溶解度最大。这说明氢键和二硫键的相互作用是维持小麦蛋白结构的主要作用力。此外，当只有 1 种试剂加到 PBS 溶液中时，PS、PU 和 PM 中的蛋白质溶解度依次减小，这说明组织化小麦蛋白中的疏水相互作用、氢键和二硫键作用力的重要性依次降低。



相同溶剂中不同字母表示不同组织化小麦蛋白的蛋白质溶解度差异显著（$P<0.05$）。

图 2　组织化小麦蛋白在各溶液中的蛋白质溶解度

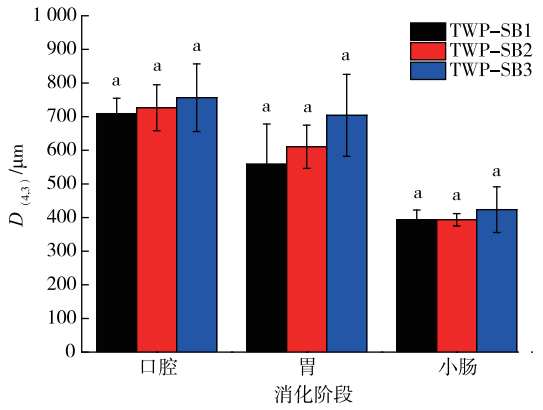
Fig. 2　Solubility of protein of the textured wheat protein in different solvents

随着碳酸氢钠质量分数的增大，组织化小麦蛋白在 PBS 和 PU 中的蛋白质溶解度逐渐减小（$P<0.05$）。这说明碳酸氢钠的加入促进了小麦蛋白的变性，使可溶性的天然蛋白质质量分数逐渐减少、氢键作用力减小。此外，随着碳酸氢钠质量分数的增加，在 PM 和 PUM 溶液中蛋白质溶解度先增大后减小，这说明随着碳酸氢钠质量分数的增大，组织化小麦蛋白中的二硫键、二硫键和氢键的相互作用力先增大后减小。另外，碳酸氢钠质量分数对 PS 和 PUS 中的蛋白质溶解度没有显著影响，即疏水相互作用力没有发生显著变化。杨文报道表明，随着碳酸氢钠质量分数从 0 增大到 0.6%，组织化小麦蛋白中的氢键作用力先增大后减小，疏水作用力逐渐增加[16]。这与作者研究结果不同可能是与样品、碳酸氢钠质量分数、原料来源和挤压条件不同有关。

2.2　消化特性分析

2.2.1　粒径大小和分布　组织化小麦蛋白在消化过程中的粒径变化见图 3。在模拟口腔消化结束后，样品的粒径随碳酸氢钠质量分数的增大而增大，但没有显著性差异（$P>0.05$）。有研究表明，硬度越大的样品，其粒径越小[24]。当碳酸氢钠质量分数增大时，复水后的组织化小麦蛋白的硬度逐渐减小，因此，经模拟咀嚼后得到的食团粒径较大。在模拟胃液中消化 120 min 后，三者的粒径均有所减小，这表明样品中的蛋白质在胃蛋白酶的消化作用下开始被水解成多肽和氨基酸，导致粒径变小。在胃中消化 120 min 后，三者的粒径大小排序与口腔消化结束时的一致。在模拟小肠消化 120 min 后，消化产物的粒径进一步减小，此时 3 种样品的消化产物粒径十分接近，无显著差异（$P>0.05$）。

2.2.2　蛋白质相对分子质量变化　根据 SDS-PAGE 图谱（见图 4）可知，消化前 3 种组织化小麦蛋白中的蛋白质条带分布均与作者所在课题组先前报道[8]的组织化小麦蛋白条带相近，且三者没有显著差异。在胃中消化 30 min 后，3 种样品中所有相对分子质量大于 29 000 的条带颜色明显变浅。同时，所有样品中均出现相对分子质量小于 14 300 的



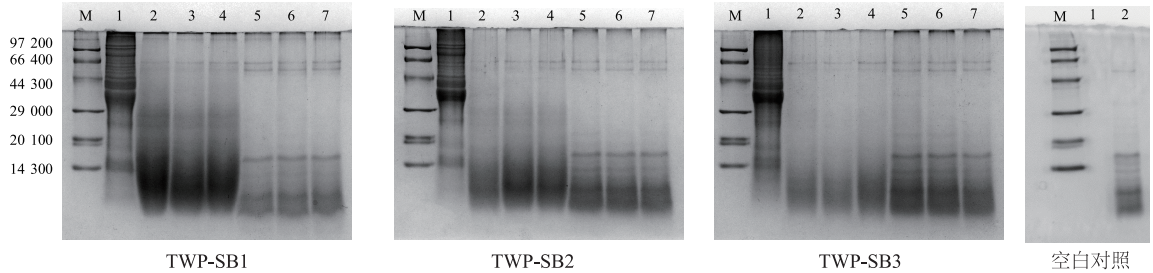
相同消化阶段相同字母表示不同组织化小麦蛋白的食糜粒径无显著差异(P>0.05)。

图 3　组织化小麦蛋白消化过程中的粒径大小

Fig. 3　Particle size of the textured wheat protein during digestion

条带。这表明大分子蛋白质被胃蛋白酶水解成小分子肽和氨基酸。另外,对比 3 组样品中胃消化 30 min 时的蛋白质条带,发现相对分子质量小于 14 300 的条带颜色随着组织化小麦蛋白中碳酸氢钠质量分数的增加而变浅。说明组织化小麦蛋白在胃消化阶段中产生更多的游离氨基酸和小肽,样品中蛋白质在胃中的消化程度随碳酸氢钠质量分数的增加而增大。电泳过程中,一些游离氨基酸和小分子肽可能会跑出凝胶,这导致其不能在 SDS-PAGE 中被观察到。由样品的微观结构(见图 1)可知,随着加入的碳酸氢钠质量分数逐渐增大,组织化小麦蛋白的纤维逐渐变细,纤维与纤维之间的间隙越来越多,这促进了胃蛋白酶与蛋白质接触,最终导致蛋白质消化程度增加。这一结果与作者所在课题组先前的研究结果相近[8],即组织化小麦蛋白中纤维之间的间隙越大、越多,越有利于蛋白质水解。然而,蛋白质溶解度结果表明,随着碳酸氢钠质量分数的增加,组织化小麦蛋白中可溶性的天然小麦蛋白减少、氢键作用力减小,二硫键、二硫键和氢键的相互作用力先增大后减小,疏水作用力没有显著性变化,蛋白质变性程度增大。这说明碳酸氢钠的加入促进小麦蛋白中的游离巯基暴露并与其他分子发生相互作用。许多研究显示,二硫键的增加会降低蛋白质的消化率[25-27]。例如,Duodu 等研究发现,经高强度蒸煮处理后的高粱蛋白中大量形成的二硫键是蛋白质消化率降低的主要原因[25]。本研究中,随着碳酸氢钠质量分数从 0 增加至 0.05%,组织化小麦蛋白中的二硫键增加。可以推测,二硫键的交联增加可能会降低蛋白质消化程度。SDS-PAGE 结果表明,质量分数 0.05%碳酸氢钠的加入提高了蛋白质在胃中的消化程度,这可能是在加入碳酸氢钠的情况下,组织化小麦蛋白中更细的纤维结构和更多的纤维空隙对小麦蛋白消化的促进作用比二硫键对蛋白质消化的抑制作用更强。当碳酸氢钠质量分数由 0.05%增加至 0.10%时,组织化小麦蛋白中的二硫键减少,在此条件下,二硫键的减少以及更细的纤维结构和更多的纤维空隙均有利于蛋白质消化。

随着在胃液中消化时间的延长,3 种样品中的蛋白质条带变化不大,说明蛋白质水解主要发生在胃消化前 30 min。另外,空白对照样品中,胃消化 120 min 后消化液中不能观察到明显的蛋白质条带,这可能是因为胃蛋白酶在该条件下浓度过低和酶自溶导致的。在小肠中消化 30 min 后,所有组织化小麦蛋白样品的 SDS-PAGE 中仅观察到胰酶条带,而空白样品中也可观察到这些条带,表明大部分小麦蛋白已被水解成小分子肽或氨基酸。这也与作者先前的研究结果一致[8]。

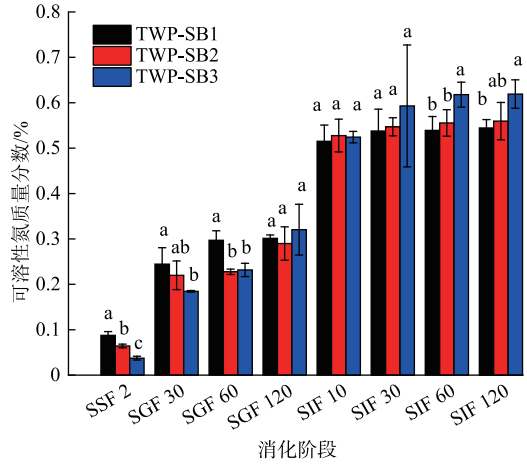


TWP-SB1、TWP-SB2 和 TWP-SB3 的泳道 1~7 分别代表消化前样品、SGF 30、SGF 60、SGF 120、SIF 30、SIF 60、SIF 120;空白对照的泳道 1 和 2 分别代表 SGF 120 和 SIF 120。

图 4　消化过程中样品的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 4　SDS-PAGE of the samples during digestion

2.2.3 可溶性氮质量分数变化 图5显示了消化过程中可溶性氮质量分数的变化。由于天然小麦蛋白基本不溶于水,其可溶性氮质量分数较低。小麦蛋白可以水解成肽和游离氨基酸。因此,消化过程中小麦蛋白在消化液中的可溶性氮质量分数会增加。采用消化液中的可溶性氮质量分数的变化来反映样品中蛋白质的消化率。在口腔消化阶段,由于不存在蛋白质水解酶,3种组织化小麦蛋白消化产物中的可溶性氮质量分数很低且随碳酸氢钠质量分数的增大而减小。这与蛋白质溶解度的结果一致(见图2)。进入胃消化30 min后,3种样品中的可溶性氮质量分数显著增大。由SDS-PAGE结果可知,此时3种样品的蛋白质消化程度随碳酸氢钠质量分数的增大而增大。然而,图5显示胃消化30 min的样品中可溶性氮质量分数随着碳酸氢钠质量分数的增大而减小,这可能是因为未消化的可溶性天然蛋白质随着碳酸氢钠质量分数的增大而减小导致的。随着胃消化时间的延长,消化产物中的可溶性氮质量分数不断增大,到120 min时,3种样品的可溶性氮质量分数没有显著性差异。进入小肠消化10 min后,尽管进一步被稀释,所有样品的可溶性氮质量分数迅速增大然后趋于平衡。这表明小肠中蛋白质的水解也主要发生在消化前期。在小肠中消化60 min和120 min时,样品中可溶性氮质量分数随着碳酸氢钠质量分数的增大而增大($P<0.05$)。这表明组织化小麦蛋白中的蛋白质消化程度随着碳酸氢钠质量分数的增大而增大。3种组织化小麦蛋白中,碳酸氢钠的加入导致样品中的气孔增多,纤维与纤维之间的空隙增多且纤维较细,使蛋白酶更容易扩散接触到蛋白质,增加了蛋白酶与底物的接触面积,从而促进蛋白质的消化及可溶性氮的增加。



同一消化阶段的不同字母表示不同组织化小麦蛋白的食糜中可溶性氮质量分数差异显著($P<0.05$)。

图5 消化过程中组织化小麦蛋白的可溶性氮质量分数

Fig. 5 Mass fraction of soluble nitrogen content of the textured wheat protein during digestion

2.2.4 氨基酸组成分析 采用全自动氨基酸分析仪测定消化产物中的游离氨基酸组成,结果见表3。可以看出,在胃和小肠消化120 min后,组织化小麦蛋白的产物中17种主要氨基酸均随着样品中碳酸氢钠质量分数的增大而逐渐增大,这与SDS-PAGE及可溶性氮分析结果一致。进一步表明蛋白质的消化程度随组织化小麦蛋白中碳酸氢钠质量分数的增大而增大。

表3 消化过程中组织化小麦蛋白释放的游离氨基酸质量分数

Table 3 Release of free amino acids mass fraction of the textured wheat protein during *in vitro* digestion

游离氨基酸	SGF 120 质量分数/(mg/g)			SIF 120 质量分数/(mg/g)		
	TWP-SB1	TWP-SB2	TWP-SB3	TWP-SB1	TWP-SB2	TWP-SB3
天冬氨酸	1.90±0.03^{c}	2.31±0.02^{b}	2.50±0.06^{a}	3.72±0.07^{c}	4.00±0.08^{b}	4.29±0.06^{a}
苏氨酸	0.51±0.02^{c}	0.58±0.03^{b}	0.67±0.03^{a}	0.93±0.05^{b}	0.93±0.01^{b}	1.25±0.07^{a}
丝氨酸	1.01±0.02^{c}	1.13±0.09^{b}	1.37±0.05^{a}	1.92±0.03^{c}	2.14±0.17^{b}	2.46±0.03^{a}
谷氨酸	3.07±0.07^{b}	3.28±0.05^{a}	3.40±0.07^{a}	6.04±0.07^{b}	6.29±0.17^{b}	7.11±0.13^{a}
脯氨酸	1.09±0.02^{c}	1.22±0.03^{b}	1.28±0.03^{a}	2.03±0.07^{b}	2.10±0.04^{b}	2.32±0.10^{a}
甘氨酸	1.33±0.04^{c}	1.44±0.03^{b}	1.66±0.30^{a}	2.60±0.03^{c}	2.81±0.02^{b}	2.98±0.04^{a}
丙氨酸	1.54±0.03^{c}	1.68±0.03^{b}	1.98±0.03^{a}	2.91±0.03^{c}	3.10±0.03^{b}	3.31±0.15^{a}
胱氨酸	0.15±0.01^{c}	0.21±0.01^{b}	0.24±0.01^{a}	0.30±0.01^{b}	0.35±0.02^{a}	0.37±0.03^{a}
缬氨酸	1.09±0.03^{c}	1.34±0.02^{b}	1.42±0.03^{a}	2.01±0.14^{a}	1.91±0.03^{a}	2.01±0.03^{a}
甲硫氨酸	0.80±0.02^{c}	1.00±0.03^{b}	1.13±0.09^{a}	1.42±0.03^{c}	1.52±0.04^{b}	1.65±0.07^{a}

续表 3

游离氨基酸	SGF 120 质量分数/(mg/g)			SIF 120 质量分数/(mg/g)		
	TWP-SB1	TWP-SB2	TWP-SB3	TWP-SB1	TWP-SB2	TWP-SB3
异亮氨酸	1.03±0.02^{c}	1.13±0.03^{b}	1.34±0.04^{a}	1.92±0.04^{c}	2.00±0.01^{b}	2.11±0.02^{a}
亮氨酸	1.79±0.02^{b}	1.89±0.02^{a}	1.91±0.03^{a}	3.29±0.16^{a}	3.25±0.07^{a}	3.30±0.08^{a}
酪氨酸	0.80±0.03^{c}	0.87±0.03^{b}	1.02±0.01^{a}	1.48±0.04^{c}	1.58±0.06^{b}	1.77±0.03^{a}
苯丙氨酸	1.08±0.02^{c}	1.21±0.02^{b}	1.35±0.02^{a}	2.00±0.02^{b}	2.21±0.05^{a}	2.23±0.08^{a}
赖氨酸	1.63±0.04^{c}	1.80±0.02^{b}	2.06±0.07^{a}	3.08±0.04^{b}	3.28±0.16^{ab}	3.37±0.08^{a}
组氨酸	0.40±0.01^{b}	0.44±0.02^{b}	0.49±0.03^{a}	0.71±0.02^{c}	0.88±0.01^{b}	0.94±0.03^{a}
精氨酸	1.62±0.03^{c}	1.89±0.02^{b}	2.27±0.05^{a}	3.16±0.06^{b}	3.21±0.06^{b}	3.36±0.08^{a}
总游离氨基酸	20.85±0.12^{c}	23.43±0.31^{b}	26.10±0.04^{a}	39.53±0.56^{c}	41.56±0.59^{b}	44.85±0.39^{a}

注:游离氨基酸质量分数以消化液质量计;同一行同一消化阶段的不同字母表示不同组织化小麦蛋白释放的游离氨基酸质量分数差异显著(P<0.05)。

3 结 语

在挤压过程中添加碳酸氢钠对组织化小麦蛋白的结构特性以及体外蛋白质消化特性有显著影响。碳酸氢钠的加入使组织化小麦蛋白中的气孔增多,导致样品的堆积密度、硬度和组织化度减小。体外消化研究显示,组织化小麦蛋白中蛋白质的消化程度随碳酸氢钠质量分数的增大而增大。这主要是因为碳酸氢钠质量分数较大的组织化小麦蛋白中的纤维较细、间隙较多,更有利于蛋白酶向切割位点扩散和接触,从而促进蛋白质的消化。结果表明,可以通过改变组织化小麦蛋白的纤维结构来控制蛋白质的消化。该研究可能为基于组织化小麦蛋白的高蛋白质营养价值的植物肉的开发提供理论指导。

参考文献:

[1] 庞卫军,孙世铎,渊锡藩,等. 体外培养肉—肉类生产发展的方向[J]. 养猪,2014(4):78-80.
[2] POST M J. Cultured meat from stem cells: challenges and prospects[J]. **Meat Science**,2012,92(3):297-301.
[3] JONES G O. Recent advances in the functionality of non-animal-sourced proteins contributing to their use in meat analogs[J]. **Current Opinion in Food Science**,2016,7:7-13.
[4] ZHOU H,ZHENG B,MCCLEMENTS D J. *In vitro* gastrointestinal stability of lipophilic polyphenols is dependent on their oil-water partitioning in emulsions: studies on curcumin,resveratrol,and quercetin[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2021,69(11): 3340-3350.
[5] XIE Y,CAI L,ZHAO D,et al. Real meat and plant-based meat analogues have different *in vitro* protein digestibility properties[J]. **Food Chemistry**,2022,387: 1-11.
[6] 林全全,刘璐飒,吴丽芳,等. 人造鸡肉的蛋白质消化特性研究[J]. 中国粮油学报,2021,36(10):63-69.
[7] 陈楚玲,邓宁华,罗梅,等. 植物猪肉的蛋白质消化特性研究[J]. 中国食品学报,2022,22(11):96-102.
[8] LIN Q,PAN L,DENG N,et al. Protein digestibility of textured-wheat-protein (TWP) -based meat analogues:effects of fibrous structure[J]. **Food Hydrocolloids**,2022,130: 1-10.
[9] 蔡可腾. 组织化小麦蛋白的制备工艺与消化特性关系研究[D]. 杭州:浙江工商大学,2021.
[10] LIN Q,LIANG R,ZHONG F,et al. Effect of degree of octenyl succinic anhydride (OSA) substitution on the digestion of emulsions and the bioaccessibility of β-carotene in OSA-modified-starch-stabilized-emulsions[J]. **Food Hydrocolloids**,2018,84: 303-312.
[11] LIN Q,LIANG R,ZHONG F,et al. *In vivo* oral breakdown properties of whey protein gels containing OSA-modified-starch-stabilized emulsions: impact of gel structure[J]. **Food Hydrocolloids**,2021,113:1-9.
[12] GUO Q,YE A,LAD M,et al. Effect of gel structure on the gastric digestion of whey protein emulsion gels [J]. **Soft Matter**,2014,10(8):1214-1223.

[13] 贾旭. 碱性条件对组织化蛋白品质的影响[J]. 肉类工业，2016(8)：24-26.
[14] 李婷. 小麦组织化蛋白品质改良及机理研究[D]. 无锡：江南大学，2017.
[15] 刘艳香，谭斌，刘明，等. 添加剂对高水分挤压组织化复合蛋白理化性质的影响[J]. 农业工程学报，2019，35(1)：294-302.
[16] 杨文. 添加剂对组织化小麦蛋白理化性质及结构影响的研究[D]. 合肥：合肥工业大学，2017.
[17] 陈锋亮. 植物蛋白挤压组织化过程中水分的作用[D]. 北京：中国农业科学院，2010.
[18] CHIANG A. Protein-protein interaction of soy protein isolate from extrusion processing [D]. Columbia：University of Missouri-Columbia，2007.
[19] 王稣嫱. 绿原酸对 LPS 诱导小鼠肠上皮损伤的保护机制研究[D]. 杭州：浙江工商大学，2020.
[20] BRODKORB A，EGGER L，ALMINGER M，et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion[J]. **Nature Protocols：Recipes for Researchers**，2019，14(4)：991-1014.
[21] 徐添，赵妍嫣，袁蓓蕾，等. 双螺杆挤压处理对小麦蛋白组织化程度的影响[J]. 食品工业科技，2013，34(15)：87-90.
[22] ZHANG J，LIU L，LIU H，et al. Changes in conformation and quality of vegetable protein during texturization process by extrusion[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**，2019，59(20):3267-3280.
[23] HORVATH E，CZUKOR B. Effect of extrusion temperature and initial moisture content on the protein solubility and distribution in full fat soybean[J]. **Acta Alimentaria**，1993，22:151-167.
[24] CHEN J S，KHANDELWAL N，LIU Z Y，et al. Influences of food hardness on the particle size distribution of food boluses[J]. **Archives of Oral Biology**，2013，58(3)：293-298.
[25] DUODU K G，NUNES A，DELGADILLO I，et al. Effect of grain structure and cooking on sorghum and maize *in vitro* protein digestibility[J]. **Journal of Cereal Science**，2002，35(2)：161-174.
[26] WU L，LI J，WU W，et al. Effect of extraction pH on functional properties，structural properties，and *in vitro* gastrointestinal digestion of tartary buckwheat protein isolates[J]. **Journal of Cereal Science**，2021，101：1-8.
[27] 龙佩. 超声波和脱酰胺改性对谷物蛋白体外消化率的影响[D]. 无锡：江南大学，2015.

科　技　信　息

空气搅拌对高固体厌氧消化系统性能的影响及其机制

近日，农业农村部沼气科学研究所畜禽粪污能源化利用与污染控制创新团队发现空气搅拌对高固体厌氧消化系统大分子物质水解、碳转化和甲烷生产具有促进作用，并从功能基因角度阐述其机制，为提高厌氧消化系统效能提供参考。相关研究成果发表在 *Bioresource Technology* 上。

搅拌是沼气发酵不可或缺的重要环节，适当搅拌可促进传质传热、提高有机物的降解转化效率以及沼气逸出。空气搅拌是近几年提出的一种新的厌氧消化系统搅拌方式，其可行性已在实验室小试和工程应用中得到验证。但以往研究主要将空气搅拌应用于低固体厌氧消化系统。因此，无法全面评估空气搅拌在厌氧消化工艺中的适用性。

该研究进一步发现空气搅拌对高固体厌氧消化系统性能的影响，并通过碳转化、微生物群落和关键功能基因等分析揭示其内在机制。研究发现，当空气搅拌强度范围为 12.5~62.5 mL/(L·min)时，与不搅拌相比，甲烷产率提高了 6%~13%，大分子物质的水解速率提高了 5%~16%，甲烷形式的碳回收率提高了 6%~7%。在空气搅拌条件下，功能菌群和水解代谢相关酶的丰度较高，从而促进有机质的降解和甲烷的产生。该研究为利用空气搅拌来改善高固体废物的厌氧消化提供了一些新的见解。

[信息来源]农业农村部成都沼气科学研究所.研究发现空气搅拌对高固体厌氧消化系统性能的影响及其机制[EB/OL].(2023-2-8).https://www.caas.cn/xwzx/kyjz/325862.html.