

# 物理处理对黄粉虫蛋白理化及消化性质的影响

王金梅<sup>1</sup>, 江轶群<sup>1</sup>, 穆利霞<sup>2</sup>, 骆兆娇<sup>1</sup>, 孟赫诚<sup>1\*</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东省农产品加工重点实验室, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东广州 510610)

**摘要:** 以碱溶酸沉法提取黄粉虫蛋白 (*Tenebrio molitor* Larvae Protein Isolates, TPI), 探究了热处理和动态高压微射流处理对其理化、功能和体外消化性质的影响。研究表明: 天然 TPI 主要由疏水相互作用、氢键及二硫键稳定高级结构。热处理和微射流处理均可诱导 TPI 聚集体的形成, 且这种聚集可能是以疏水性聚集为主。热处理 TPI 的溶解性略有降低, 可能是由于热处理导致蛋白内部疏水基团暴露, 削弱了 TPI 与水分子间的相互作用; 高压微射流的机械作用增强了蛋白与水分子间的相互作用, 显著提升了 TPI 的溶解性, 且与处理压力呈正相关。中性条件下, 50 MPa 和 100 MPa 微射流处理 TPI 的溶解度由 24.05% 分别提升至 50.08% 和 64.81%。热处理改善了 TPI 的乳化活性和泡沫性质, 但降低了其乳化稳定性; 微射流处理增强了 TPI 的泡沫稳定性, 但对其乳化性能和起泡性均无显著影响。两种物理处理均提升了 TPI 的体外消化抗性, 其中, 90 °C 和 120 °C 热处理 TPI 的氮释放量由 39.53% 分别降至 35.58% 和 33.90%, 微射流处理 TPI 在 17 ku 附近的亚基无法在体外消化过程中被完全水解。

**关键词:** 黄粉虫蛋白; 热处理; 高压微射流; 理化性质; 体外消化

文章编号: 1673-9078(2023)01-230-237

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.1.0260

## Effects of Physical Treatments on the Physicochemical and Digestive

## Properties of *Tenebrio molitor* Larvae Protein Isolates

WANG Jinmei<sup>1</sup>, JIANG Yiqun<sup>1</sup>, MU Lixia<sup>2</sup>, LUO Zhaojiao<sup>1</sup>, MENG Hecheng<sup>1\*</sup>

(1.College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510610, China)

**Abstract:** The *Tenebrio molitor* larvae protein isolate (TPI) was first extracted via alkaline solubilization and acid precipitation. Subsequently the effects of heat treatment and dynamic high-pressure microfluidization on the physicochemical, functional properties and the *in vitro* bioaccessibility of the TPI were investigated. The results showed that the higher order structure of native TPI was mainly stabilized through hydrophobic interaction, hydrogen bonds, and disulfide bonds. TPI aggregates could be induced by both heat and microfluidization, of which the aggregation was possibly dominated by hydrophobic interactions. The solubility of the TPI decreased slightly after heat treatment, likely due to the exposure of the hydrophobic groups inside the protein impairing the interaction between the TPI and water molecules. The mechanical force of microfluidization improved the interaction between the TPI and water molecules and distinctly increased TPI solubility, which was positively correlated with the pressure level. Under neutral conditions, the solubility of the TPI after microfluidization at 50 and 100 MPa was elevated from 24.05% to 50.08% and 64.81%, respectively. The emulsifying and foaming properties of the TPI were improved by heat treatment, although this weakened the emulsifying stability. Microfluidization increased the foaming stability of the TPI yet had no considerable impact on

引文格式:

王金梅,江轶群,穆利霞,等.物理处理对黄粉虫蛋白理化及消化性质的影响[J].现代食品科技,2023,39(1):230-237

WANG Jinmei, JIANG Yiqun, MU Lixia, et al. Effects of physical treatments on the physicochemical and digestive properties of *Tenebrio molitor* larvae protein isolates [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(1): 230-237

收稿日期: 2022-03-10

基金项目: 云浮市科技重大专项 (2020A090102)

作者简介: 王金梅 (1982-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白质化学与工程, E-mail: fejmwang@scut.edu.cn

通讯作者: 孟赫诚 (1984-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: femenghc@scut.edu.cn

its emulsifying properties and foaming capacity. Both types of physical treatments increased the *in vitro* bioaccessibility of the TPI, since the nitrogen releases of 90 °C and 120 °C heat-treated TPI were reduced from 39.53% to 35.58% and 33.90%, respectively. Furthermore, the TPI subunits at approximately 17 ku could not be hydrolyzed thoroughly after microfluidization.

**Key words:** *Tenebrio molitor* larvae protein isolate; heat treatment; dynamic high-pressure microfluidization treatment; physicochemical properties; *in vitro* bioaccessibility

黄粉虫 (*Tenebrio molitor*) 是粉虱的幼虫, 蛋白含量高 (48%~66%, 干基), 且富含必需氨基酸, 是一种良好的可食性昆虫蛋白资源<sup>[1]</sup>。黄粉虫蛋白 (TPI) 常采用碱溶酸沉法进行提取, 目前的研究大多集中于提取工艺的优化, 评价黄粉虫蛋白的乳化性和起泡性等功性质, 以期为黄粉虫蛋白应用于食品体系提供理论依据。Jiang 等<sup>[2]</sup>采用盐溶/盐析辅助碱溶酸沉法提取 TPI, 发现 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  盐析处理可显著提高蛋白的溶解性、乳化活性和泡沫稳定性。Zhao 等<sup>[3]</sup>报道两次碱提可有效提高 TPI 提取率和蛋白含量, 并发现提取过程中物料比、温度、盐浓度、pH 等因素均影响了 TPI 的流变学特性。然而, 关于不同加工处理对 TPI 结构和功性质影响的研究仍较为有限, 且未见关于 TPI 体外消化性的研究, 限制了 TPI 在食品工业的应用。

热处理是食品工业中常见的操作单元, 如热杀菌等。热处理可诱导蛋白质去折叠, 内部疏水基团暴露并发生热聚集, 影响其在界面上的吸附和界面膜的形成, 从而影响其界面性质<sup>[4]</sup>。对大豆分离蛋白进行热处理可获得具有高表面疏水性的柔性的蛋白结构, 显著提高其在油水和气水界面的表面活性, 改善起泡性和泡沫稳定性<sup>[5]</sup>。Lee 等<sup>[6]</sup>发现随着加热温度和加热时间的提高, TPI 的表面疏水性和聚集程度不断提高, 乳化性能和起泡性降低但凝胶强度增强。热处理对蛋白体外消化性的影响与蛋白种类和热处理强度密切相关。Ren 等<sup>[7]</sup>认为热处理不影响大豆分离蛋白在体外模拟胃中的水解, 但显著改善了其在体外模拟肠道中的水解速率, 且高温处理 (121 °C) 的蛋白去折叠程度更高, 暴露了更多的酶结合位点, 故其消化性的改善效果明显高于巴氏杀菌 (70 °C) 处理的样品。Liu 等<sup>[8]</sup>则认为热处理促进了大米蛋白分子间二硫键的形成和疏水相互作用, 提高了其抗消化性。

动态高压微射流是一种新型均质技术, 流体在高压状态下经受高强剪切力、冲击力和空穴效应, 可能改变大分子的结构及其与水分子间的相互作用, 进而影响蛋白的功能性和消化性<sup>[9]</sup>。微射流处理 (120 MPa) 下, 大豆分离蛋白发生部分去折叠和结构重排, 乳化活性和乳化稳定性得以改善<sup>[10]</sup>。微射流处理对蛋白聚集体的解聚作用也可用以提升难溶蛋白的溶解度<sup>[11]</sup>。Chen 等<sup>[12]</sup>认为微射流处理可改变  $\beta$ -乳球蛋白的构象

和聚集状态, 从而改善其胃肠道消化性。本文以碱溶酸沉法提取的 TPI 为原料, 探究了热处理和动态高压微射流处理对 TPI 的理化、功能和体外消化性质的影响, 为昆虫蛋白作为食品蛋白资源应用于蛋白饮料、乳液、泡沫食品的可行性提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

脱脂黄粉虫 (Dumas 法测定其蛋白含量为 73.30%  $\pm$  0.15%, N $\times$ 5.71, 干基), 广东泽和诚生物科技有限公司, 粉碎 60 目备用。福林酚试剂盒购于北京鼎国公司。SDS-PAGE 电泳试剂盒购于北京索莱宝公司。胃蛋白酶 (效价 1:10 000) 和胰蛋白酶 (效价 1:250) 购于美国 Sigma 公司, 猪胆盐提取物购于北京索莱宝公司。其他化学试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

DELTA 冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; Dumas 定氮仪, 德国 Elementer 公司; Zeta 电位及纳米粒度分析, 英国 Malvern 公司; UVA2300 紫外可见分光光度计, 德国 Christ 公司; RW20 电动搅拌机, 德国 IKA 公司; PYCZ-30 垂直板电泳仪, 北京六一仪器厂。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 黄粉虫蛋白的制备

将黄粉虫以 1:20 的料液比加入去离子水, 调 pH 值 12.0, 充分搅拌 2 h 后 8 000 r/min 离心 20 min, 上清液调 pH 值 4.5 后 8 000 r/min 离心 20 min, 蛋白沉淀水洗、复溶, 调 pH 值 7.0, 4 °C 透析 48 h 后冷冻干燥, 制得天然黄粉虫蛋白 NTPI。

热处理: 将 NTPI 溶于 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 值 7.0), 配置成 1% (m/m) 的 NTPI 溶液, 室温搅拌 2 h 后密封于带盖瓶分别在 90 °C 和 120 °C 进行热处理, 处理时间均为 15 min。其中, 90 °C 热处理采用水浴方式, 120 °C 热处理采用高压蒸汽灭菌方式进行。热处理后, 样品迅速冰浴冷却制得 HTPI-90 和 HTPI-120。

动态高压微射流处理: 将 NTPI 溶于 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 值 7.0), 配置成 1% (m/m) 的 NTPI

溶液, 室温搅拌 2 h 后分别在 50 MPa 和 100 MPa 的压力下经动态高压微射流循环处理三次, 制得 DTPI-50 和 DTPI-100。

### 1.3.2 天然黄粉虫蛋白在不同溶液中溶解度

将 NTPI 溶于 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 值 7.0), 配置成 1 mg/mL 的 NTPI 溶液, 分别加入 10 mmol/L DTT、8 mol/L 尿素、 $m=1\%$  SDS、 $m=1\%$  SDS+8 mol/L 尿素、 $m=1\%$  SDS+8 mol/L 尿素+10 mmol/L DTT。水化过夜后 8 000 r/min 离心 20 min, 采用 Lowry 法<sup>[13]</sup>测定上清液中的蛋白含量。以牛血清白蛋白为标准蛋白制作标曲, 上清液的蛋白总含量与样品蛋白总含量的比值即为溶解度。

### 1.3.3 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

电泳分析参考 Laemmli<sup>[14]</sup>的方法进行。分别向天然和物理处理后的 TPI 溶液中加入还原型上样缓冲液 [0.125 mol/L Tris-HCl 缓冲液, 包含 1% SDS ( $m/V$ )、2%  $\beta$ -巯基乙醇 (2-ME,  $V/V$ )、5% 甘油 ( $V/V$ ) 和 0.025% 溴酚蓝 ( $m/V$ )] 后涡旋, 热水煮沸 5 min, 10 000 r/min 离心 5 min。配制浓度为 12.5% 的分离胶与 5% 的浓缩胶, 取 10  $\mu$ L 样品上清上样, 在恒压条件下进行电泳。其中样品在浓缩胶中时电压为 40 V, 进入分离胶后将电压调至 120 V。用考马斯亮蓝 R<sub>250</sub> 配制的染色液对胶片染色 30~45 min, 然后用脱色液 (乙醇:乙酸:水=100:100:800,  $V/V/V$ ) 对胶片进行脱色。

### 1.3.4 巯基和二硫键

游离巯基依据 Beveridge 等<sup>[15]</sup>方法测定, 分别向 2 mL 天然和物理处理后的蛋白溶液加入 10 mL Tris-Gly-8M Urea 缓冲液, 8 000 r/min 离心 20 min, 取上清进行检测。游离巯基含量 ( $SH_F$ ,  $\mu$ mol/g protein): 取 2 mL 上清液, 加入 80  $\mu$ L Ellman's 试剂 (4 mg/mL DTNB), 立即混匀, 静置 15 min 后在 412 nm 波长下测定吸光值 ( $A_1$ )。总巯基含量 ( $SH_T$ ,  $\mu$ mol/g protein): 取 2 mL 上清液, 加入 0.2%  $\beta$ -巯基乙醇处理 2 h 后, 再加入 4 mL TCA 溶液 (12%,  $m/V$ ), 8 000 r/min 离心 20 min, 洗涤沉淀后复溶, 取 2 mL 测吸光值 ( $A_2$ )。巯基及二硫键 (SS,  $\mu$ mol/g protein) 的计算公式如下:

$$SH_F = \frac{73.53A_1}{C} \quad (1)$$

$$SH_T = \frac{73.53A_2}{C} \quad (2)$$

$$SS = \frac{SH_T - SH_F}{2} \quad (3)$$

式中:

73.53=10<sup>6</sup>/(1.36 $\times$ 10<sup>4</sup>), 1.36 $\times$ 10<sup>4</sup> 为 Ellman's 试剂的摩尔消

光系数;

$C$ —蛋白浓度, mg/mL。

### 1.3.5 黄粉虫蛋白在不同 pH 值下的溶解度

天然和物理处理后的 TPI 溶液分别调 pH 值至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0。8 000 r/min 离心 20 min 后, 采用 Lowry 法<sup>[13]</sup>测定上清液中的蛋白含量。以牛血清白蛋白为标准蛋白制作标曲, 上清液的蛋白总含量与样品蛋白总含量的比值即为溶解度。

### 1.3.6 乳化性

采用经典的比浊法<sup>[16]</sup>, 以乳化活性指数 (Emulsifying Activity Index, EAI, 单位  $m^2/g$ ) 和乳化稳定指数 (Emulsifying Stability Index, ESI, 单位 min) 表征 TPI 的乳化性。将 TPI 充分溶解于磷酸缓冲液 (pH 值 7.0) 中, 与大豆油以 4:1 的体积比混合, 15 000 r/min 均质 1 min, 迅速从乳液底部吸取 50  $\mu$ L 加入 5 mL SDS 溶液 (0.1%,  $m/V$ ) 中并涡旋, 在 500 nm 下测其吸光值, 记为  $A_0$ ; 10 min 后再次吸取 50  $\mu$ L 加入 5 mL SDS 溶液 (0.1%,  $m/V$ ) 中, 涡旋后测其吸光值, 记为  $A_{10}$ , 以 0.1% 的 SDS 溶液作为空白对照。

$$EAI = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times DF}{\rho \phi (1 - \theta) \times 10^4} \quad (4)$$

$$ESI = \frac{10 \times A_0}{A_0 - A_{10}} \quad (5)$$

式中:

$DF$ —稀释因子;

$\rho$ —蛋白浓度, g/mL;

$\phi$ —光程,  $\phi=0.01$ ;

$\theta$ —油相的体积分数,  $\theta=0.25$ 。

### 1.3.7 起泡性

以起泡能力 (Foaming Capacity, FC) 和泡沫稳定性 (Foaming Stability, FS) 表征 TPI 的起泡性。将 10 mL TPI 溶液 (1%,  $m/V$ ) 用均质机以 10 000 r/min 的速率剪切 2 min 后迅速转入 50 mL 量筒中记录搅打后样品体积, 记为  $V_1$ ; 静置 30 min 后再次读取样品体积, 记为  $V_2$ 。

$$FC = \frac{V_1 - 10}{10} \times 100\% \quad (5)$$

$$FS = \frac{V_2 - V_1}{V_1} \times 100\% \quad (6)$$

### 1.3.8 体外消化性

TPI 的体外消化实验根据 Nunes<sup>[17]</sup>等的体外消化模型进行。调节 TPI 溶液 (1%,  $m/V$ ) 的 pH 值至 2.0, 于 37  $^{\circ}$ C 摇床中预热搅拌 10 min 后加入胃蛋白酶进行酶解, 酶解 1 h 后调节 pH 值至 7.0 以终止模拟胃消化过程。向消化液中加入猪胆盐提取物和胰蛋白酶酶解,

酶解 2 h 后对消化液进行加热处理以终止模拟肠消化。期间分别于 0、10、30、60、90、120、150 和 180 min 取样，同时对体外消化过程中的亚基降解情况进行 SDS-PAGE 的分析，具体方法见 1.3.3，并采用 TCA-NSI 法测定氮释放量。

### 1.3.9 数据分析

实验数据为三次测定平均值，结果以“平均值 (mean) ± 标准偏差 (SD)”表示。组间的显著性差异和相关性分析采用 SPSS 19.0 软件的 ANOVA 分析方法， $p < 0.05$  为显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 天然黄粉虫蛋白在不同溶液中的溶解度

天然黄粉虫蛋白在不同溶液中的溶解度见图 1。由图可知，NTPI 在 pH 值 7.0 的磷酸缓冲液中溶解度较低 (22.49%)。加入可裂解蛋白质分子间二硫键的强还原剂 DTT 后，其溶解度略有提升，说明二硫键参与了 TPI 高级结构的形成。尿素和 SDS 的添加使 NTPI 溶解度分别显著提升至 75.41% 和 96.20%，表明氢键和疏水相互作用是 NTPI 高级结构形成过程中的主要作用力。当以上三种试剂全部添加时，NTPI 可完全溶

解。二硫键、氢键及疏水相互作用均参与 TPI 高级结构的形成，其中，疏水相互作用在稳定 TPI 结构中占主导地位。

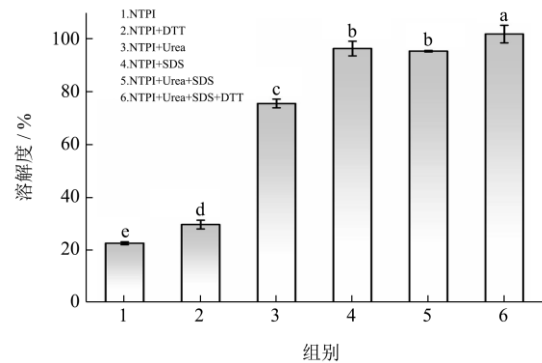


图 1 天然黄粉虫蛋白在不同溶液中的溶解度

Fig.1 Solubility of NTPI in different solutions

注：NTPI 为天然黄粉虫蛋白、NTPI+DTT 为天然黄粉虫蛋白溶于 10 mmol/L DTT、NTPI+Urea 为天然黄粉虫蛋白溶于 8 mol/L 尿素、NTPI+SDS 为天然黄粉虫蛋白溶于 1% SDS、NTPI+Urea+SDS 为天然黄粉虫蛋白溶于 1% SDS+8 mol/L 尿素、NTPI+Urea+SDS+DTT 为天然黄粉虫蛋白溶于 1% SDS+8 mol/L 尿素+10 mmol/L DTT，各组数据小写字母不同表示  $p < 0.05$ ，下同。

### 2.2 物理处理对黄粉虫蛋白理化性质的影响

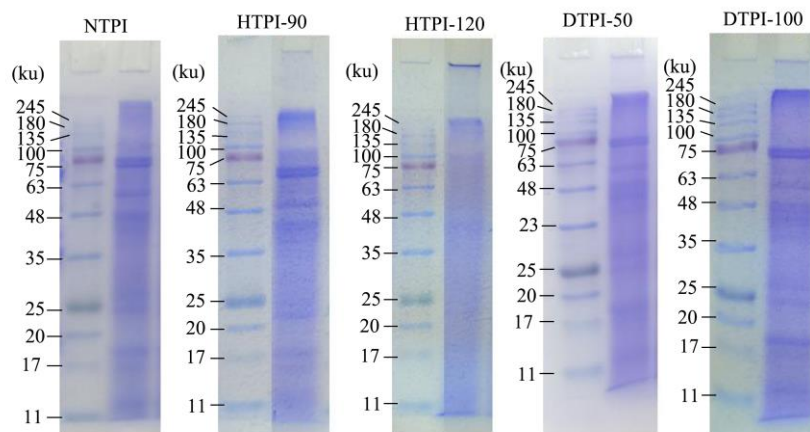


图 2 物理处理后黄粉虫蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE profiles of TPI after physical treatments

注：NTPI、HTPI-90、HTPI-120、DTPI-50、DTPI-100 分别为天然黄粉虫蛋白、90 °C 热处理黄粉虫蛋白、120 °C 热处理黄粉虫蛋白、50 MPa 动态微射流处理黄粉虫蛋白、100 MPa 动态微射流处理黄粉虫蛋白。下同。

天然和物理处理后黄粉虫蛋白的 SDS-PAGE 图谱见图 2。由图可知，NTPI 在分子量 75 ku 附近出现两条清晰的蛋白条带，可能与黄粉虫中调控脂肪形成的蛋白有关<sup>[18]</sup>。在 43 ku 和 59 ku 附近出现的条带可能来自昆虫自身的黑化抑制蛋白 (43 ku)<sup>[19]</sup>、胰蛋白酶 (59 ku)<sup>[20]</sup> 和  $\beta$ -糖苷酶 (59 ku)<sup>[21]</sup>。在 14~32 ku 之间出现的蛋白条带可能来源于黄粉虫的表皮蛋白<sup>[22]</sup>。在分子量小于 14 ku 范围内的条带可能来自黄粉虫的抗冻蛋白<sup>[1]</sup>。

中性条件下的热处理可能导致蛋白结构的展开和聚集行为的发生<sup>[4]</sup>。HTPI-90 在分离胶顶端颜色加深，说明在 90 °C 热处理形成了聚集体，这可能是由于 TPI 发生了部分去折叠，内部疏水基团暴露，发生疏水性聚集。而当加热温度提升至 120 °C 时，HTPI-120 分离胶中大量特征条带明显变浅甚至完全消失，而在点样孔处和分离胶顶端均出现深色条带，意味着 120 °C 热处理诱导 TPI 亚基发生了更强烈的聚集。Lee 等<sup>[6]</sup>以荧

光法监测热处理过程中 TPI 的疏水性聚集,发现 TPI 的聚集程度随着温度的升高而提高。DTPI-50 与 NTPI 的 SDS-PAGE 图谱基本一致,DTPI-100 在点样孔处出现颜色较浅的条带,说明说明动态高压微射流处理并不影响 TPI 的亚基组成,100 MPa 处理可形成少量 TPI 聚集体。Fan 等<sup>[11]</sup>采用高压微射流在 40~120 MPa 下处理燕窝蛋白,其 SDS-PAGE 图谱与对照样品差异较小,说明微射流处理不改变蛋白的初级结构。

游离巯基是影响蛋白质界面和乳化行为的重要参数之一,见图 3。NTPI 的游离巯基和总巯基含量分别 8.58  $\mu\text{mol/g}$  和 31.66  $\mu\text{mol/g}$ ,说明 NTPI 中的大部分巯基均以二硫键形式存在。90  $^{\circ}\text{C}$  热处理后,HTPI-90 的游离巯基含量略有下降(7.99  $\mu\text{mol/g}$ ),二硫键含量略有提升。蛋白质在热处理时二硫键可断裂生成游离巯基,冷却过程中游离巯基重排可形成二硫键,巯基-二硫键的互换反应导致了 HTPI-90 游离巯基含量的变化。当热处理温度提升至 120  $^{\circ}\text{C}$  时,HTPI-120 游离巯基含量提升 8.41  $\mu\text{mol/g}$ ,二硫键含量从 11.77  $\mu\text{mol/g}$  降低至 11.17  $\mu\text{mol/g}$ 。结合图 2 可知,HTPI-120 发生了强烈的疏水聚集,在聚集过程中游离巯基可能被包埋入聚集体内部,无法与氧气或其他游离巯基接触,从而抑制了二硫键的生成。

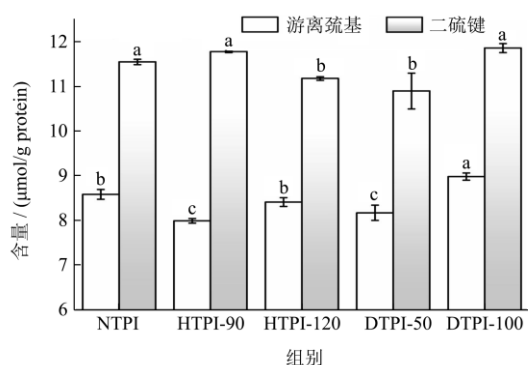


图 3 物理处理对 TPI 游离巯基及二硫键含量的影响

Fig.3 Effects of physical treatments on contents of free sulfhydryl group and disulfide bond in TPI

动态高压微射流作为一种高压剪切方式,可显著影响蛋白的高级结构,导致蛋白构象的改变,蛋白游离巯基的变化为其表现形式之一,且这些变化与压力水平并不一定具有直接相关性<sup>[9]</sup>。50 MPa 动态微射流处理后,DTPI-50 的游离巯基和二硫键含量均有所下降(8.17  $\mu\text{mol/g}$  和 10.89  $\mu\text{mol/g}$ ),而当压力增至 100 MPa 时,DTPI-100 的游离巯基和二硫键含量分别提升至 8.98  $\mu\text{mol/g}$  和 11.85  $\mu\text{mol/g}$ 。整体而言,热处理和动态高压微射流处理对 TPI 游离巯基和二硫键含量的改变较为有限,说明 HTPI 和 DTPI 的聚集体可能以疏水性聚集为主,而非以二硫键交联形成的共价聚集。

## 2.3 物理处理对黄粉虫蛋白溶解度的影响

商业化的蛋白产品生产过程中通常包括热处理等一系列的物理处理,可能导致蛋白的变性、聚集,影响蛋白的溶解度。图 4 为天然和物理处理 TPI 的溶解度-pH 曲线,显示了天然和物理处理 TPI 溶解度具有 pH 依赖性,呈现 U 型趋势,且所有蛋白的 NPI 的 pI 均约为 4.5,说明本文中的物理处理不会造成 TPI 的 pI 偏移。NTPI 的溶解度较低,在 pH 值 2.0~9.0 间的溶解度均低于 30%。热处理后的 HTPI 的溶解度略低于 NTPI,且 HTPI-90 和 HTPI-120 无明显差异。蛋白经过高于变性温度的热处理后易发生高度去折叠,疏水基团暴露,带电氨基酸在蛋白分子表面重排,蛋白分子表面电荷变化,同时蛋白与水分子间的相互作用减弱,导致蛋白溶解度的下降。Lee 等<sup>[6]</sup>对黄粉虫蛋白进行 55~95  $^{\circ}\text{C}$  热处理后,蛋白溶解度在 pH 值 2.0~11.0 也出现一定程度的下降。

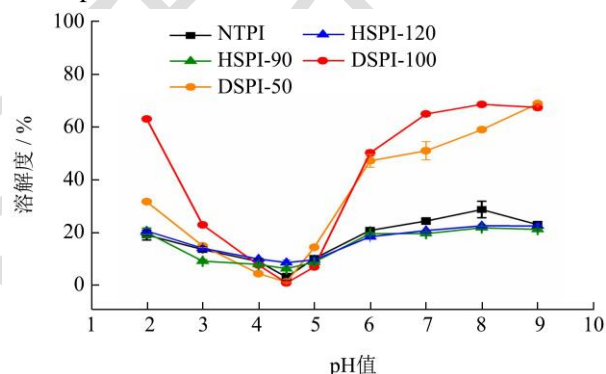


图 4 物理处理对 TPI 溶解度的影响

Fig.4 Effects of physical treatments on TPI solubility

动态高压微射流可显著提高 TPI 的溶解性,且溶解性随着处理压力的提高而增强。pH 值 7.0 时,DTPI-50 和 DTPI-100 的溶解度由 24.05% 分别提升至 50.80% 和 64.81%,这可能是由于动态高压微射流的高剪切力、冲击力和空穴效应所致。微射流处理过程中产生强大的机械力和冲击力可破坏大分子的有序结构,同时空穴效应可破坏蛋白的氢键和疏水相互作用,加强蛋白与水分子间的相互作用,提升难溶蛋白的可溶性<sup>[9]</sup>。Fan<sup>[11]</sup>等对燕窝水提后的沉淀物进行高压微射流处理,发现蛋白的水溶性显著增强,且当处理压力在 40~120 MPa 之间时,溶解度与处理压力也呈正相关趋势。Shen<sup>[10]</sup>等也发现对大豆蛋白进行热处理会导致其在中性条件下溶解度的下降,但 120 MPa 的微射流处理可提高热处理大豆蛋白的溶解性至与天然大豆蛋白同一水平。

## 2.4 物理处理对黄粉虫蛋白乳化性和起泡性的影响

乳化活性 (EAI) 和乳化稳定性 (ESI) 是评价其蛋白乳化性能的重要指标, 结果见表 1。热处理可大幅提升 TPI 的乳化活性, 其中 HTPI-90 的 EAI 值由  $14.82 \text{ m}^2/\text{g}$  提升至  $22.12 \text{ m}^2/\text{g}$ , HTPI-120 的 EAI 值较 HTPI-90 略有提升但无显著性差异。热处理虽然降低了 TPI 的溶解性(见图 4), 但显著改善了其乳化活性, 说明 HTPI 的疏水性聚集可能在其乳化活性的提升中发挥主要作用。高温条件下 TPI 的结构充分展开, 暴露出更多疏水基团, 具有更良好的两亲性, 故更易吸附于油滴表面。Shen 等<sup>[10]</sup> 也认为热处理对球蛋白乳化活性的改善与其表面疏水性的提高有直接相关性。但 Lee 等<sup>[6]</sup> 发现热处理降低了 TPI 的乳化活性, 这可能是由于其热处理强度不同, 所得 HTPI 的结构与本文有显著差异所致。普遍认为, 适宜的热变性和去折叠才能提升球蛋白的乳化活性, 过度加热可能破坏蛋白的乳化性。HTPI 的乳化稳定性显著低于 NTPI, 可能是由于热处理提升了 TPI 的表面疏水性, 促进了相邻液滴表面蛋白分子间的相互作用, 导致液滴的絮凝和聚结。高压微射流处理虽然大幅提升了 TPI 的溶解性(见图 4), 但对 TPI 的乳化活性与乳化稳定性无显著影响, 这可能是由于 DTPI 的构象变化对其乳化性产生了负面影响。蛋白经微射流处理后, 可能具有更稳定的三级结构<sup>[10]</sup>, 而乳化活性与三级结构的柔性程度呈正相关<sup>[23]</sup>, 故 DTPI 的乳化性并无显著改善。

表 1 也反映了物理处理对 TPI 起泡能力 (FC) 及起泡稳定性 (FS) 的影响。通常而言, 蛋白的 FC 受蛋白内在性质如尺寸、表面电荷、表面疏水性和结构柔性等因素的影响。HTPI 的 FC 值从 74.18% 提升至 80.77%, 且不同温度处理后的样品无差异, 这可能是因为热处理后蛋白的构象变化导致其内部疏水基团暴露, 分子柔性增强, 提升了 HTPI 在界面的吸附效率<sup>[5]</sup>。DTPI 在中性条件下溶解度提升 (见图 4), 说明蛋白分子间的静电斥力增强, 且 DTPI 对蛋白具有一定的解聚作用<sup>[11]</sup>, 可生成较小尺寸的蛋白结构, 但 DTPI 与 NTPI 的 FC 并无显著差异, 这可能是由于微射流处理后的蛋白呈现较稳定的三级结构<sup>[10]</sup>, 不利于其 FC 的改善。不同物理处理均提升了 TPI 的 FS, 且高压动

态微射流处理对 FS 的改善效果优于热处理。泡沫的不稳定性主要由排液、聚结和奥氏熟化等原因所致<sup>[24]</sup>, 提升蛋白分子间的静电斥力和界面膜的粘弹性有利于提升泡沫的稳定性。HTPI-120 的 FC 值高于 HTPI-90 (80.91% vs 75.25%), 这可能是由于  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  处理后蛋白的聚集状态更有利于其凝胶状界面膜的形成, 提供了有效的空间位阻, 避免了泡沫因聚结导致的破灭。课题组前期研究也发现对大豆分离蛋白进行亚临界水处理 ( $121 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 后的 FS 和 FC 均优于传统热处理 ( $90 \text{ }^\circ\text{C}$ )<sup>[5]</sup>。DTPI-120 的 FS 值最高 (89.44%), 可能归因于微射流处理提升了蛋白分子间的静电斥力, 削弱了泡沫表面蛋白分子间的相互作用, 降低了泡沫的聚结, 从源头上避免了泡沫破灭。

## 2.5 物理处理对黄粉虫蛋白体外消化性影响

对天然和物理处理 TPI 进行模拟体外消化并监测消化过程中亚基的降解情况, 见图 5。所有样品在模拟胃消化 10 min 时的电泳条带均无明显变化, 说明胃蛋白酶酶解 10 min 时对 TPI 亚基并无水解作用。NTPI 在胃消化 30 min 时所有的亚基条带基本消失, 在 11 ku 处出现深色条带, 可能是亚基水解后的小分子产物。随着模拟肠消化的进行, NTPI 的亚基进一步水解, 且 11 ku 处条带的颜色逐渐变浅, 说明胰蛋白酶对该水解产物具有一定的酶解作用。HTPI-90 与 NTPI 的 SDS-PAGE 图谱变化基本一致。HTPI-120 在模拟胃消化 30 min 时, 点样孔处的深色条带明显变浅, 说明胃蛋白酶可水解该聚集体。体外消化结束后, 除 11 ku 处条带外, HTPI-120 在浓缩胶顶端仍可见条带, 说明  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  热处理形成的 TPI 聚集体具有较差的体外消化性。本课题组前期研究也报道了喷射蒸煮处理中的高温 ( $120 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 导致天然米糠蛋白的热变性与聚集, 引起其消化性的降低<sup>[25]</sup>。动态高压微射流处理后的 TPI 表现出明显的抗消化性。模拟胃消化 60 min 时, DTPI 在 45 ku 和 17 ku 附近仍有条带。模拟肠消化开始后, 45 ku 处条带消失, 但体外消化结束后, 17 ku 处条带仍存在, 这可能是由于微射流处理引起了 TPI 的疏水性聚集, 增强了 TPI 表皮蛋白中部分亚基的抗消化性。

表 1 物理处理对 TPI 乳化性和起泡性的影响

Table 1 Effects of physical treatments on the emulsification and foamability of TPI

物理处理	NTPI	HTPI-90	HTPI-120	DTPI-50	DTPI-100
EAI/( $\text{m}^2/\text{g}$ )	$14.82 \pm 0.19^a$	$22.12 \pm 1.87^b$	$23.32 \pm 0.34^b$	$13.94 \pm 0.44^a$	$13.34 \pm 0.42^a$
ESI/(min)	$30.52 \pm 1.51^a$	$22.02 \pm 2.06^b$	$21.71 \pm 0.54^b$	$30.51 \pm 1.52^a$	$29.30 \pm 1.43^a$
FC/%	$74.18 \pm 3.89^a$	$80.77 \pm 5.44^b$	$80.77 \pm 5.44^b$	$73.76 \pm 3.50^a$	$74.25 \pm 3.24^a$
FS/%	$71.36 \pm 1.93^a$	$75.25 \pm 3.57^a$	$80.91 \pm 1.29^b$	$78.89 \pm 1.57^b$	$89.44 \pm 0.79^c$

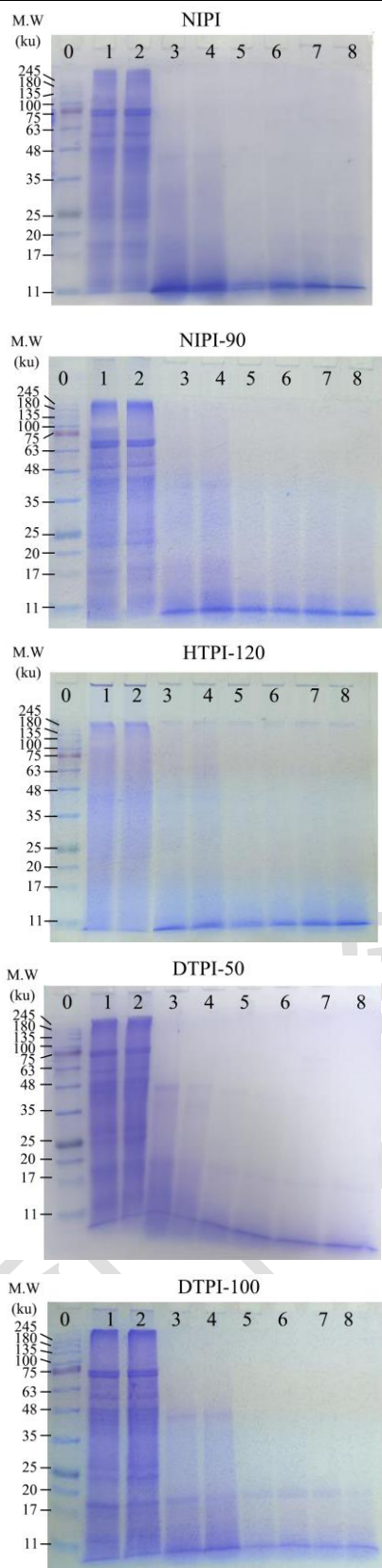


图5 物理处理后 TPI 体外消化过程的 SDS-PAGE 图谱

Fig.5 SDS-PAGE profiles of TPI after physical treatments during *in vitro* digestion

注：泳道0对应Marker条带，1~8对应不同TPI在模拟胃消化0、10、30、60min及模拟肠消化90、120、150、180min的条带。

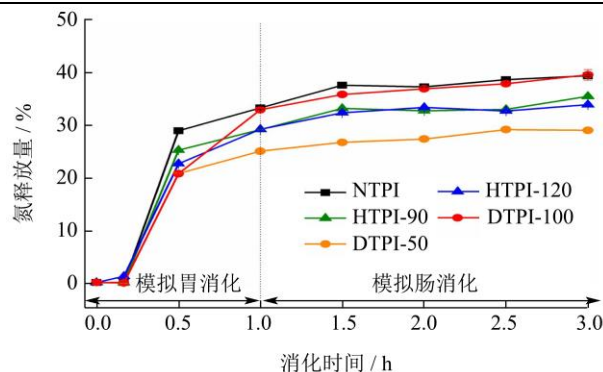


图6 TPI 体外消化过程中氮释放量的变化

Fig.6 Changes of nitrogen release during TPI *in vitro* digestion

蛋白体外消化过程中的可溶性氮释放的变化情况可补充 SDS-PAGE 结果反映蛋白的消化情况，见图 6。在模拟胃消化 10 min 时，所有样品无明显氮释放，说明此时蛋白的水解度较低，这与 SDS-PAGE 图谱一致。当胃消化进行至 30 min 时，所有样品的氮释放量均急剧增加，随着消化的进行，氮释放量的增速逐渐减缓，直至体外消化结束时达到最大值。整体而言，NTPI 的氮释放量最高，在 3 h 为 39.53%。热处理降低了 TPI 的体外消化性，与 SDS-PAGE 图谱一致（图 5），但 HTPI-90 和 HTPI-120 的差异并不显著，二者在 3 h 时氮释放量分别为 35.58% 和 33.90%。DTPI-50 在整个消化过程中都表现出极强的抗消化性，其在 3 h 时氮释放量仅为 29.02%。当处理压力增至 100 MPa 时，DTPI-100 在体外消化 60~180 min 内的氮释放量均基本与 NTPI 持平，说明高压下的微射流处理虽然降低了 TPI 中部分亚基的消化性（图 5），但可能提升了 TPI 水解物的消化性，水解物被继续裂解成分子量更小的肽，难以染色或跑出分离胶，故其 SDS-PAGE 图谱中（图 5）虽可见未降解亚基的条带，但其氮释放量仍可维持较高水平。

### 3 结论

碱溶酸沉法提取的 TPI 主要由疏水相互作用、氢键及二硫键稳定其高级结构，且疏水相互作用占主导地位。热处理和动态高压微射流处理均能诱导 TPI 大分子聚集体的形成，且以疏水性聚集为主，而非以二硫键交联形成的共价聚集。热处理 TPI 的溶解度整体略低于天然 TPI，而动态高压微射流可显著提升 TPI 的溶解度。pH 值 7.0 时，DTPI-50 和 DPI-100 的溶解度由 24.05% 分别提升至 50.80% 和 64.81%。热处理提升 TPI 的乳化活性、起泡能力和泡沫稳定性，但降低了其乳化稳定性；微射流处理对 TPI 的乳化性能和起泡能力均无显著影响，但可大幅提升其泡沫稳定性。热处理和动态高压微射流处理均导致了 TPI 的消化性能的降低。在体外模拟消化结束时，HTPI-90 和

HTPI-120 的氮释放量由 NTPI 的 39.53% 分别降至 35.58% 和 33.90%, DTPI-50 和 DPI-100 的 SDS-PAGE 图谱中均可见未被完全降解的亚基条带。热处理和微射流处理对 TPI 进行改性后, 黄粉虫蛋白作为食品配料可能可以用于蛋白饮料、乳液和泡沫食品中。

### 参考文献

- [1] Yi Liya, Lakemond C M M, Sagis L M C, et al. Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4):3341-3348
- [2] JIANG Yongli, ZHU Yifan, ZHENG Yuanrong, et al. Effects of salting-in/out-assisted extraction on structural, physicochemical and function properties of *Tenebrio molitor* larvae protein isolates [J]. Food Chemistry, 2021, 338: 128158
- [3] ZHAO Xue, Vazquez-Gutierrez J L, Johanssondp, et al. Yellow mealworm protein for food purposes-extraction and functional properties [J]. PLOS ONE, 2017, 11(2): 1-17
- [4] WANG Jinmei, XIANing, YANG Xiaoquan, et al. Adsorption and dilatational rheology of heat-treated soy protein at the oil-water interface: relationship to structural properties [J]. Agric Food Chem, 2012, 60(12): 3302-3310
- [5] WANG Mengping, CHEN Xiaowei, GUOJian, et al. Stabilization of foam and emulsion by subcritical water-treated soy protein: effect of aggregation state [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 619-628
- [6] Lee H J, Kim J H, Ji D S, Effects of heating time and temperature on function properties of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor* L.) [J]. Food Science of Animal Resources, 2019, 39(2): 296-308
- [7] REN Cong, XIONG Wenfei, PENG Dengfeng, et al. Effects of thermal sterilization on soy protein isolate/polyphenol complexes: aspects of structure, *in vitro* digestibility and antioxidant activity [J]. Food Research International, 2018, 112: 284-290
- [8] LIU Kunlun, ZHENG Jiabao, CHEN Fusheng. Heat-induced changes in the physicochemical properties and *in vitro* digestibility of rice protein fractions [J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58(4): 1368-1377
- [9] CHEN Xing, XU Xinglian, ZHOU Guanghong. Potential of high pressure homogenization to solubilize chicken breast myofibrillar proteins in water [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 33: 170-179
- [10] SHEN Lan, TANG Chuanhe. Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate [J]. Food Research International, 2012, 48(1): 108-118
- [11] FAN Qunyan, WANG Peixin, ZHENG Xinyi, et al. Effect of dynamic high pressure microfluidization on the solubility properties and structure profiles of proteins in water-insoluble fraction of edible bird's nests [J]. LWT - Food Science and Technology, 2020, 132(1): 109923
- [12] CHEN Hao, HONG Qitong, ZHONG Junzhen, et al. The enhancement of gastrointestinal digestibility of  $\beta$ -LG by dynamic high-pressure microfluidization to reduce its antigenicity [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2018, 54(5): 1677-1683
- [13] Lowry Oh, Rosenbrough Hj, Lewis A, et al. Protein measurement with the Folinphenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-275
- [14] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685
- [15] Beveridge T, Toma Sj, Nakai S. Determination of SH- and SS-groups in some foodproteins using Ellman's reagent [J]. Journal of Food Science, 1974, 39: 49-51
- [16] Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26: 716-723
- [17] Nunes A, Correia I, Barros A, et al. Sequential *in vitro* pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maizesamples [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 5(27): 2052-2058
- [18] Chacon-Almeida V M L, Simoes Z L P, Bitondi M M G. Induction of heat shock proteins in the larval fat body of *Apis mellifera* L. bees [J]. Apidologie, 2000, 31(4): 487-501
- [19] ZHAO Mingyi, Soderhall I, Park J W, et al. A novel 43-kDa protein as a negative regulatory component of phenoloxidase-induced melanin synthesis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(26): 24744-24751
- [20] Prabhakar S, Chen, M S, Elpidina E N, et al. Sequence analysis and molecular characterization of larval midgut DNA transcripts encoding peptidases from the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. [J]. Insect Molecular Biology, 2007, 16(4): 455-468
- [21] Ferreira A H, Marana S R, Terra W R, et al. Purification, molecular cloning, and properties of a beta-glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 31(11): 1065-1076
- [22] Andersen S O, Rafn K, Krogh T N, et al. Comparison of larval and pupal cuticular proteins in *Tenebrio molitor* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 25(2): 177-187
- [23] TANG Chuanhe, SUN Xin. A comparative study of physicochemical and conformational properties in three vicilins from *Phaseolus legumes*: Implications for the structure-function relationship [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(3): 315-324
- [24] ZOU Yuan, WAN Zhili, GUO Jian. Modulation of the surface properties of protein particles by a surfactant for stabilizing foams [J]. RSC Advances, 2016, 6: 66018-66026
- [25] 夏宁. 喷射蒸煮制备米糠、碎米蛋白及其功能性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012



现代食品科技