

低温贮藏对鸡胸肉肌原纤维蛋白结构及热诱导凝胶性能的影响

施晓予¹, 刘 雪², 刘少伟^{1*}, 张馨宁¹, 宋皓瑜¹, 金 鑫¹

(1. 华东理工大学食品科学与工程系, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237;
2. 中国农业大学信息与电气工程学院, 北京 100083)

摘 要: **目的** 研究 4 °C(冷藏)与-18 °C(冷冻)贮藏条件对鸡胸肉肌原纤维蛋白(myofibrillar protein, MP)结构及热诱导凝胶性能的影响。**方法** 通过测定总巯基、钙离子 ATP 酶(calcium-ATPase, Ca^{2+} -ATPase)活性、表面疏水性、凝胶质构、保水性等指标衡量 MP 结构及凝胶特性的变化, 并从分子间作用力及蛋白质构象角度阐述贮藏条件对 MP 热诱导凝胶机制的影响。**结果** 在 4 °C 与-18 °C 贮藏环境下, 随着贮藏时间的延长, MP 总巯基含量减少, 表面疏水性上升, Ca^{2+} -ATPase 酶活性降低。其次, MP 热诱导凝胶中离子键及氢键作用力也随贮藏时间的延长而呈下降趋势, 而疏水作用力呈上升趋势; 凝胶中的 α -螺旋和 β -折叠含量呈下降趋势, 而 β -转角与无规则卷曲含量呈上升趋势。**结论** 低温贮藏期间 MP 结构发生劣变, 蛋白凝胶结构由有序转向无序结构, 导致凝胶质构、保水性下降; 相较 4 °C 贮藏, -18 °C 能够更好地长时间维持 MP 结构和凝胶特性。

关键词: 鸡胸肉; 肌原纤维蛋白; 低温贮藏; 热诱导凝胶; 分子间作用力

Effects of low temperature storage on the structure and heat-induced gelation properties of myofibrillar protein prepared from chicken breast muscle

SHI Xiao-Yu¹, LIU Xue², LIU Shao-Wei^{1*}, ZHANG Xin-Ning¹, SONG Hao-Yu¹, JIN Xin¹

(1. The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Department of Biological Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. College of Information and Electrical Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of 4 °C (chilled) and -18 °C (frozen) storage conditions on the structure and heat-induced gelation properties of chicken breast muscle myofibrillar protein (MP). **Methods** The changes of MP structure and gel properties were characterized by total sulfhydryl content, the activity of calcium-ATPase (Ca^{2+} -ATPase), the surface hydrophobicity, gel texture and water holding capacity, and the effects of different storage conditions on heat-induced gelation mechanism of MP were studied from the perspectives of protein conformation and intermolecular bonds. **Results** The total sulfhydryl content of MP and the activity of Ca^{2+} -ATPase decreased while the surface hydrophobicity increased with the extension of storage time at 4 °C and -18 °C. In the determination of intermolecular force, the ionic bond and hydrogen bond of gel decreased during the storage, while

基金项目: 北京市家禽产业创新团队项目(BAIC04-2019)

Fund: Supported by the Beijing Poultry Industry Innovation Team (BAIC04-2019)

*通信作者: 刘少伟, 博士, 教授, 主要研究方向为食品加工及贮藏。E-mail: swliu@ecust.edu.cn

*Corresponding author: LIU Shao-Wei, Ph.D, Professor, Department of Biological Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China. E-mail: swliu@ecust.edu.cn

the hydrophobic force was increased; meanwhile, the content of α -helix and β -sheet decreased with the increase of storage time, but the content of β -turn and random coil increased. **Conclusion** During low temperature storage, the structure of MP deteriorate, and the structure of protein gel changes from order to disorder, resulting in the decrease of gel texture and water retention; compared with 4 °C storage, -18 °C can better maintain the structure and gel properties of MP for a long time.

KEY WORDS: chicken breast muscle; myofibrillar protein; low tempertaure storage; heated-induced gelation; intermolecular force

0 引言

肌原纤维蛋白(myofibrillar protein, MP)是肌肉蛋白的重要成分, 占总蛋白的 60%~70%, 主要由肌动蛋白、肌球蛋白、肌动球蛋白、原肌球蛋白及肌钙蛋白组成^[1]。MP 的功能特性在肉制品加工中起着关键作用, 直接影响肉制品的质地结构、多汁性及储藏期间的稳定性。低温保藏是目前应用最广泛的肉类保鲜技术, 但贮藏期间 MP 可能出现氧化损伤或降解变性, 引起蛋白结构变化, 从而使其加工性能劣变^[2-3]。周果等^[4]研究认为贮藏温度及解冻方式对鲐鱼 MP 生化特性影响显著, 与 4 °C 和 -20 °C 贮藏样品相比, -36 °C 的鲐鱼 MP 的各项生化指标变化幅度最小, 表明贮藏温度越低越有利于维持 MP 结构完整性, 保持鲐鱼肉品质。夏秀芳等^[5]研究表明冰温 -1 °C 时牛肉 MP 随贮藏时间变化发生不同的程度降解, 但与 4 °C 冷藏相比, 冰温保鲜可有效延缓 MP 氧化变质, 减少 MP 结构变化, 维持 MP 热稳定性。MP 结构变化会直接造成其功能特性发生相应变化, 进而影响肉类的食用品质与加工性。因此有必要掌握贮藏条件对 MP 结构及生化特性的影响, 以便最大限度地使肌肉蛋白应用于食品加工与新型肉制品开发中。

此外, MP 具有很好的凝胶性, 当其质量浓度达到 5 mg/mL 时即可形成热诱导凝胶。其原理是通过共价和非共价作用力, 使在热处理下展开的蛋白分子链之间相互交联、聚集形成凝胶网络, 有序的凝胶网络结构能起到良好的凝胶效果^[6-7]。MP 的凝胶形成能力与蛋白质构象及分子间相互作用密切相关, 有研究表明氧化反应会诱导 MP 二级结构与三级结构发生改变, 影响凝胶过程中分子间或分子内的相互作用, 如过度氧化会破坏蛋白质与水分子间作用力, 使凝胶保水性下降, 还会促进蛋白间共价二硫键的形成, 影响蛋白质的有序聚集^[8-9]。目前对 MP 贮藏期间理化指标及功能特性的变化进行了大量研究, 而关于贮藏条件对 MP 凝胶分子间作用力影响的相关研究较少, 因此本研究将以从鸡胸肉中提取的 MP 为研究对象, 探究低温贮藏期间 MP 结构及凝胶特性的变化, 并从蛋白质构象及分子间作用力角度阐述不同贮藏条件对 MP 热诱导凝胶机制的影响, 为后续改善凝胶型肉制品的结构提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

本研究选取的 20 只 90 日龄的北京油鸡均由北京百年栗园生态农业有限公司提供, 经常规屠宰工艺宰杀后, 取其鸡胸肉真空包装, 每袋重约 150 g, 放入 4 °C 保温箱中储存, 于 24 h 内送至实验室; 其他常用化学试剂(分析纯, 上海泰坦科技股份有限公司)。

1.1.2 仪器

便携式 pH 计、CP213 电子分析天平[0.001 g, 奥豪斯仪器(上海)有限公司]; HHS-11-1 电热水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司); UV-2000 紫外分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]; DL-5-B 离心机(上海安亭科学仪器厂); SN-FJ200-S 高速分散均质机(上海尚仪仪器设备有限公司); TG16-WS 高速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司); 冰箱 BCD-202M(广东海信容声冰箱有限公司); Scientz Z-10N 真空冷冻干燥机(郑州科达机械仪器设备有限公司); FTIR5700 傅里叶红外光谱仪[安捷伦科技(中国)有限公司]; TA-XT.Plus 质构仪(英国 Stable MicroSystems 公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品准备

将鸡胸肉分别置于 4 °C 冷藏环境与 -18 °C 冷冻环境中贮藏 21 d, 每隔 3 d 随机抽取各组样品 3 块用于 MP 的提取及各类指标的测定。

1.2.2 肌原纤维蛋白的提取

参照 CAO 等^[10]的方法并略加修改。鸡肉过 6 mm 孔径孔板绞制成肉糜, 将 20 g 鸡肉糜与 80 mL 预冷过的磷酸缓冲液[0.1 mol/L NaCl、2 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L 乙二醇四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、10 mmol/L NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7.0]均匀混合, 在冰浴中以 8000 r/min 高速匀浆 90 s。经纱布过滤, 滤液在 1800×g 下离心 10 min。重复 3 次, 收集沉淀即为粗蛋白。用 80 mL 预冷过的 NaCl 洗涤液(0.1 mol/L)洗涤粗蛋白, 重复 3 次, 调整 pH 到 6.25, 得到沉淀即为 MP。以牛血清蛋白为标准蛋白, 利用双缩脲法测定 MP 浓度, 提取的 MP 置于 4 °C 环境下储存备用。

1.2.3 总巯基含量的测定

参照 TONG 等^[11]方法稍加修改, 取上述提取的 MP, 溶解于哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲液(piperazine-1,4-bisethanesulfonic acid, PIPES) (0.6 mol/L NaCl, 15 mmol/L PIPES, pH 6.0), 将 MP 质量浓度调整为 5 mg/mL。取 0.5 mL MP 溶液置于离心管中, 加入 2.5 mL 三羟甲基氨基甲烷-甘氨酸缓冲液(含 8 mol/L 尿素), 摇匀, 再加入 0.02 mL 4 mg/mL 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)[5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), DTNB]溶液, 混合均匀。25 °C 水浴 30 min 后, 1800×g 离心 5 min, 取上清液在 412 nm 处测定 A_{412} 。总巯基含量通过公式(1)计算:

$$\text{总巯基含量}/[\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{pro})]=\frac{73.53 \times A_{412} \times D}{C} \quad (1)$$

式(1)中 D 为稀释倍数, D 为 6.04; C 为蛋白质量浓度, mg/mL。

1.2.4 钙离子 ATP 酶活性

参照 LIU 等^[12]的方法, 略加修改, 取 3.5 mL 1 mg/mL MP 溶液, 依次加入 0.3 mL Tris-HCl 缓冲液 (0.5 mol/L, pH 7.0)、0.5 mL 0.1 mol/L CaCl_2 溶液、加入 0.25 mL 20 mmol/L 腺苷三磷酸(adenosine-5'-triphosphate, ATP)溶液, 摇匀。在 25 °C 恒温环境下反应 10 min 后, 再加入 2.5 mL 15% 三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)溶液终止反应。10500×g 离心 5 min, 取上清液, 用钼酸法测定其在 660 nm 处的吸光度值, 并根据无机磷标准曲线计算得出反应生成的无机磷含量。蛋白钙离子 ATP 酶(calcium-ATPase, Ca^{2+} -ATPase)活性以每毫克蛋白质在单位时间内生成微摩尔无机磷含量表示, 单位为 $\mu\text{mol Pi}/(\text{mg}\cdot\text{pro})$ 每分钟。

1.2.5 表面疏水性的测定

参照孙路等^[13]的方法, 取 5 mg/mL MP 溶液 1 mL, 加入 200 μL 溴酚蓝(bromophenol blue, BPB, 1 mg/mL)溶液, 振荡 10 min 后以 5000×g 离心 15 min。取 0.5 mL 上清液, 加入 4.5 mL 去离子水。于 595 nm 处测定其吸光度值。未加 MP 的样品作为空白组。表面疏水性用溴酚蓝结合量表示, 按公式(2)计算:

$$\text{溴酚蓝结合量}/\mu\text{g}=200 \times \frac{\text{OD}_{\text{空白}} - \text{OD}_{\text{样品}}}{\text{OD}_{\text{空白}}} \quad (2)$$

式(2)中 $\text{OD}_{\text{空白}}$ 为空白组在 595 nm 处的吸光度值, $\text{OD}_{\text{样品}}$ 为样品在 595 nm 处的吸光度值。

1.2.6 热诱导凝胶的制备与评价

(1) 热诱导凝胶的制备

取 40 mg/mL MP 溶液 30 mL, 加热至 75 °C, 升温速度为 1 °C/min, 在 75 °C 下孵育 20 min。用流水快速降温, 以免发生进一步变性。于 4 °C 环境中静置过夜, 得到 MP 凝胶。

(2) 凝胶质构的测定

取 1.2.6 (1) 中制备的凝胶, 切成 1.5 cm×1.5 cm×1.0 cm 的长方体, 利用质构仪测定凝胶强度与凝胶弹性。测定参数为: P/5 探头; 测前速率为 1 mm/s; 测试速率为 0.5 mm/s; 测

试后速率为 1 mm/s; 压缩变形率 50%, 触发力 5 g。

凝胶强度(N·mm)通过穿透力(N)与穿刺距离(mm)的乘积来计算。

(3) 凝胶保水性的测定

取上述制备的凝胶 3 g, 5000×g 离心 15 min。用滤纸吸干析出水分, 称取质量, 通过公式(3)计算凝胶持水力(water holding capacity, WHC):

$$\text{WHC}/\%=\frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100\% \quad (3)$$

式(3)中 W_0 为离心管质量, g; W_1 为离心前凝胶与离心管总质量, g; W_2 为离心后凝胶与离心管总质量, g。

(4) 凝胶二级结构测定

将 MP 凝胶冷冻干燥后, 称取 2 mg 凝胶样品与 200 mg KBr 混合并充分研磨, 压制成片。采用 FTIR5700 傅里叶红外光谱仪对其蛋白结构进行分析, 扫描波数为 400~4000 cm^{-1} , 分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描 32 次。

(5) 凝胶分子间作用力的测定

参考 RU 等^[14]的方法, 将 1 g MP 凝胶分别溶解在 5 mL 的以下 5 种溶液中: S1 (0.05 mol/L NaCl)、S2 (0.6 mol/L NaCl)、S3 (0.6 mol/L NaCl+1.5 mol/L 尿素)、S4 (0.6 mol/L NaCl+8 mol/L 尿素)、S5 (0.6 mol/L NaCl+8 mol/L 尿素+0.5 mol/L β -巯基乙醇), 10000 r/min 高速匀浆 1 min, 于 4 °C 静置 1 h。反应结束后以 10500×g 离心 5 min, 取上清液, 采用双缩脲法测定蛋白浓度。各分子间作用力用每克凝胶在不同溶液中溶解度的差值表示, 单位为 mg/mL。即: 离子键=S2-S1; 氢键=S3-S2; 疏水作用力=S4-S3; 二硫键=S5-S4。

1.2.7 数据分析

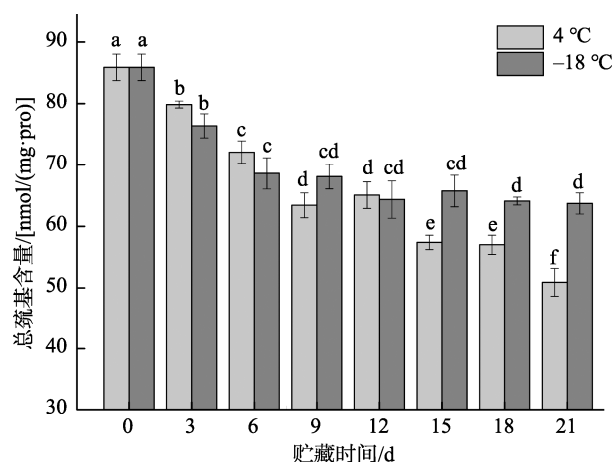
每组实验重复 3 次, 用 Microsoft Office Excel 2016、Origin 8.5 软件分析数据并绘图。运用 SPSS statistics 19 分析软件中的 ANOVA 程序进行显著性分析($P<0.05$), 结果表示为平均值±标准偏差。用 PeakFit 4.12 软件分析傅里叶红外光谱蛋白质二级结构。

2 结果与分析

2.1 4 °C 及 -18 °C 贮藏条件对 MP 总巯基含量的影响

总巯基含量变化可以反映 MP 氧化变性的程度^[15]。由图 1 可知, 贮藏温度与贮藏时间对 MP 总巯基含量有显著影响, 随贮藏时间的增加, MP 总巯基含量均呈下降趋势。当贮藏时间从 0 d 延长至 21 d, 4 °C 下样品总巯基含量由 85.88 nmol/(mg·pro) 显著下降至 50.89 nmol/(mg·pro) ($P<0.05$), 而 -18 °C 样品下降至 63.71 nmol/(mg·pro)。总巯基含量的减少与蛋白质氧化密不可分, 暴露在蛋白质表面上的活性巯基十分敏感, 会在羟基自由基诱导下氧化生成二硫键^[16], 导致巯基减少。随着贮藏时间的增加, MP 构象展开, 隐藏在蛋白质内部的巯基也会暴露在蛋白质表面,

进而被氧化, 总巯基含量因此进一步下降。与 4 °C 相比, -18 °C 可以明显延缓 MP 氧化变性, 使总巯基下降更缓慢。但在 3~6 d, -18 °C 下 MP 的总巯基含量均比 4 °C 下样品更低, 这是由于冻藏初期冰晶的形成破坏了 MP 与水分子间的相互作用, 使 MP 脱水而致蛋白构象展开^[17], 引起 MP 变性, 加速 MP 内部巯基与游离巯基结合, 生成二硫键, 总巯基含量在 0~6 d 内显著下降 ($P<0.05$)。而在 9~21 d, -18 °C 下 MP 的总巯基降幅减缓且随贮藏时间延长无显著变化 ($P>0.05$), 原因可能在于 -18 °C 冷冻可以有效减缓氧化速率, 抑制氧化反应, 而 4 °C 冷藏后期, 由于微生物作用促进 MP 降解, MP 空间结构发生改变, 总巯基含量快速下降。



注: 小写字母不同表示同一贮藏条件、不同贮藏时间样品之间差异显著 ($P<0.05$), 下同。

图 1 4 °C 及 -18 °C 贮藏条件对 MP 总巯基含量的影响 ($n=3$)

Fig.1 Effects of storage conditions at 4 °C and -18 °C on the content of MP total sulfhydryl group ($n=3$)

2.2 4 °C 及 -18 °C 贮藏条件对 MP Ca^{2+} -ATPase 酶活性的影响

Ca^{2+} -ATPase 酶活性常用来衡量肌球蛋白分子完整性。如图 2 所示, 4 °C 下 MP 的 Ca^{2+} -ATPase 酶活性在 6~15 d 内显著下降 ($P<0.05$), 而 -18 °C 样品 0~6 d 内无显著变化 ($P>0.05$), 但在 12 d 后出现明显下降, 在第 21 d 显著下降至 1.01 $\mu\text{mol Pi}/(\text{mg}\cdot\text{pro})$ 每分钟。4 °C 下 MP 的 Ca^{2+} -ATPase 酶活性下降更明显, 在贮藏的第 21 d 下降到 0.83 $\mu\text{mol Pi}/(\text{mg}\cdot\text{pro})$ 每分钟, 相比 0 d 样品下降了 60.29%。原因在于贮藏过程中位于肌球蛋白头部的 S1 亚基结构被氧化破坏, 导致 ATPase 活性中心构象改变, 抑制了 Ca^{2+} -ATPase 酶活性。 Ca^{2+} -ATPase 酶活性在冻藏前期下降速率比冷藏更快; 贮藏第 3 d, 4 °C 和 -18 °C 下的 MP Ca^{2+} -ATPase 酶活性与 0 d 样品相比分别下降了 2.48%、4.68%, 原因可能在于冰晶的形成使细胞内游离水含量降低, 细胞内液浓缩引起细胞内离子强度增加导致肌球蛋白构象改变。

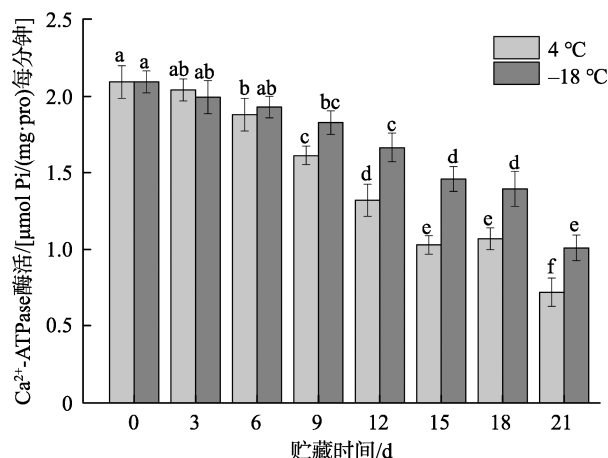


图 2 4 °C 及 -18 °C 贮藏条件对 MP 的 Ca^{2+} -ATPase 酶活的影响 ($n=3$)

Fig.2 Effects of storage conditions at 4 °C and -18 °C on Ca^{2+} -ATPase activities of MP ($n=3$)

2.3 4 °C 及 -18 °C 贮藏条件对 MP 表面疏水性的影响

表面疏水性可以反映疏水性残基在 MP 表面的分布, 与 MP 的三级结构相关联。如图 3 所示, 在贮藏过程中 MP 表面疏水性均随贮藏时间的延长呈上升趋势。贮藏 21 d 后, 4 °C 下 MP 的溴酚蓝结合量增长了 1.63 倍, -18 °C 下 MP 的溴酚蓝结合量增长了 0.98 倍。疏水性残基通常隐藏在天然蛋白质的折叠结构内, 并通过形成疏水作用力来维持蛋白质构象^[18]。在贮藏过程中, 由于 MP 氧化及变性, 构象展开暴露更多的疏水性基团, 引起表面疏水性上升。贮藏的前 3 d, 4 °C 下的 MP 表面疏水性低于 -18 °C 样品, 但在贮藏的 6~21 d 上升速率加快, 在第 21 d 显著上升至 31.39 μg ($P<0.05$), 原因在于 4 °C 冷藏促进蛋白质氧化变性, 加速破坏蛋白质结构。因此在长期贮藏过程中 -18 °C 贮藏条件有利于延缓 MP 构象劣变。

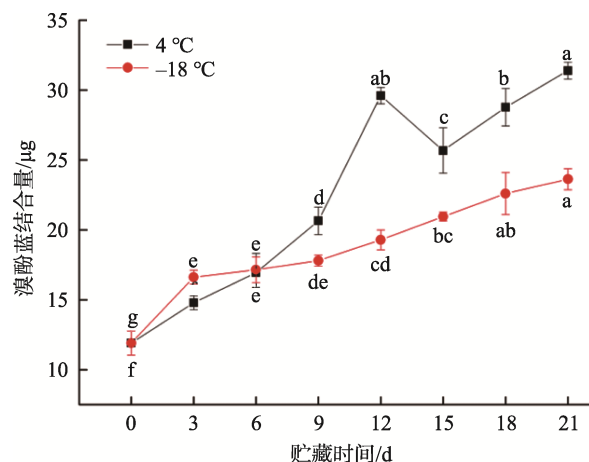


图 3 4 °C 及 -18 °C 贮藏条件对 MP 的表面疏水性影响 ($n=3$)

Fig.3 Effects of storage conditions at 4 °C and -18 °C on surface hydrophobicities of MP ($n=3$)

2.4 4℃及-18℃贮藏对 MP 热诱导凝胶特性的影响

2.4.1 4℃及-18℃贮藏对 MP 凝胶保水性的影响

保水性是 MP 凝胶的重要特性之一。凝胶过程中形成的三维网络结构可固定大量的水,减少加工过程中汁液流失^[18]。由于在冷藏 15 d 后,鸡肉出现明显腐败,故选择前 12 d 进行探究。如图 4 所示,新鲜鸡胸肉的 MP 凝胶可以起到很好的保水作用,持水力为 58.53%,但在贮藏 12 d 后,4℃下的样品持水力显著下降至 48.50% ($P<0.05$),-18℃样品下降至 53.24% ($P<0.05$),表明贮藏的温度与时间会对凝胶网络结构产生影响。4℃贮藏的 0~6 d 内,凝胶持水力显著下降($P<0.05$),在第 6 d 迅速下降至 48.53%,而-18℃下在贮藏前 6 d,持水力无显著变化($P>0.05$)。因此与 4℃相比,-18℃可以更长久地维持凝胶的保水性。这是由于 4℃贮藏初期 MP 氧化程度不高,而后期 MP 氧化速率加快,引起肌球蛋白变性,有研究表明,肌球蛋白的变性和交联对凝胶保水性至关重要,肌球蛋白过度变性不利于蛋白质与水分子间相互作用,不能形成均匀致密的网络结构,会导致保水性下降^[19-20]。在冻藏初期凝胶保水性快速下降,这主要是由于 MP 的冷冻变性使肌球蛋白分子间通过非共价键生成不溶于盐的大分子凝聚体^[21],MP 溶解度下降引起凝胶保水性下降。

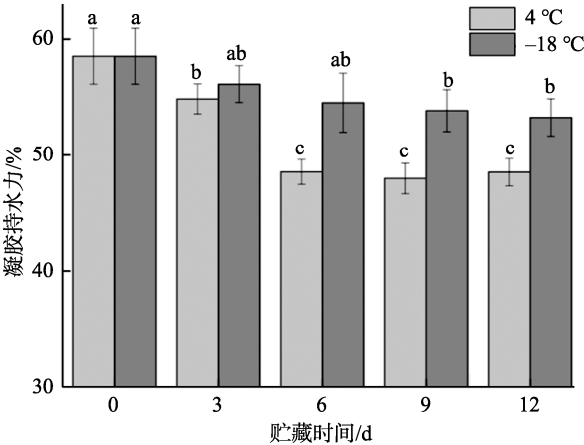


图 4 4℃及-18℃贮藏条件对 MP 凝胶保水性的影响($n=3$)
Fig.4 Effects of storage conditions at 4℃ and -18℃ on water retentions of MP gel ($n=3$)

2.4.2 4℃及-18℃贮藏条件对 MP 凝胶质构的影响

凝胶强度与凝胶弹性是肉制品质地和感官的重要指标。如表 1 所示,凝胶强度与凝胶弹性均随贮藏时间的延长而下降,并且与-18℃样品相比,4℃下 MP 凝胶强度和凝胶弹性降幅更大,其在贮藏 12 d 后下降至 187.09 N·mm 和 0.719,与 0 d 样品相比分别下降了 50.23%和 23.26%。蛋白质过度氧化会导致凝胶弹性、硬度、内聚力等性质变差^[8,22]。在贮藏期间对 MP 氨基酸侧链的氧化修饰会导致蛋白质构象展开和非极性基团的暴露,强疏水作用力和蛋白质交联

不利于凝胶网络的形成。过度氧化还会破坏凝胶过程中形成的非二硫共价键,使凝胶强度降低^[23]。此外,冷藏过程中微生物与蛋白分解酶引起蛋白降解^[24],使 MP 组分发生改变,损失部分原有的功能,加速凝胶网络内部结构劣变。

表 1 4℃及-18℃贮藏条件的 MP 凝胶质构($n=3$)
Table 1 MP gel texture at 4℃ and -18℃ ($n=3$)

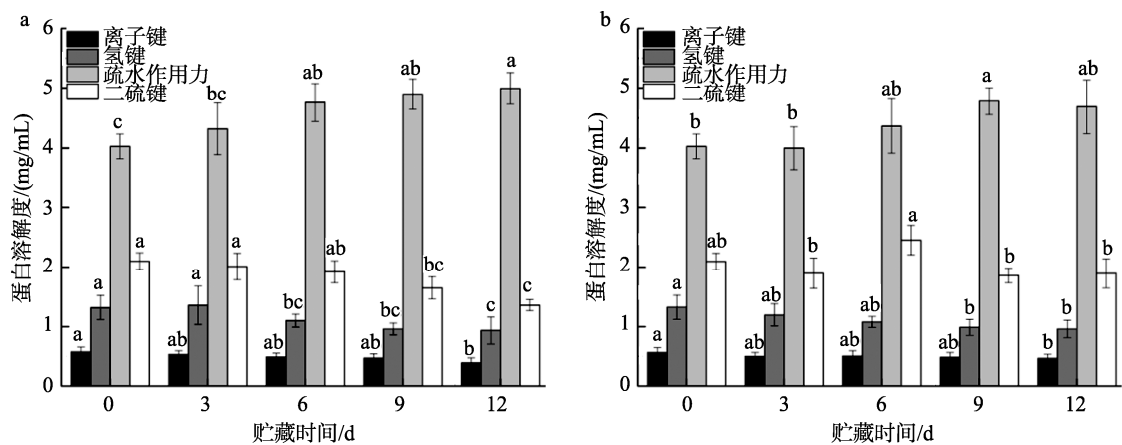
贮藏条件	贮藏时间/d	凝胶强度/(N·mm)	凝胶弹性
4℃	0	375.88±9.27 ^a	0.937±0.022 ^a
	3	340.43±17.45 ^b	0.838±0.013 ^b
	6	226.09±14.15 ^c	0.816±0.015 ^b
	9	197.34±19.43 ^{cd}	0.736±0.008 ^c
	12	187.09±11.71 ^d	0.719±0.017 ^c
-18℃	0	375.88±9.27 ^a	0.937±0.022 ^a
	3	345.40±9.98 ^b	0.899±0.013 ^b
	6	301.58±13.36 ^c	0.867±0.010 ^c
	9	265.38±11.89 ^d	0.835±0.006 ^d
	12	234.91±14.34 ^e	0.805±0.007 ^e

注:同列处小写字母不同表示差异显著($P<0.05$),下同。

2.4.3 4℃及-18℃贮藏过程中 MP 凝胶分子间作用力的变化

MP 热诱导凝胶的形成通常经历 2 个阶段:第一阶段为加热时蛋白质变性展开;第二阶段为蛋白质之间通过共价和非共价作用力聚集交联形成凝胶网络。故 MP 的凝胶形成能力与分子间相互作用密切相关。凝胶是蛋白质分子间引力(氢键、疏水相互作用、二硫键)与斥力(离子键)相平衡的结果^[25]。凝胶在不同变性剂中的蛋白溶解度可以表征分子间作用力。

如图 5 所示,在两种贮藏条件下,随着贮藏时间的延长,MP 凝胶离子键及氢键作用力均呈下降趋势,而疏水作用力整体呈上升趋势,4℃下凝胶作用力变化更明显,在此条件下,二硫键由 0 d 的 2.10 mg/mL 降至第 12 d 的 1.36 mg/mL。从图 5 中可知,疏水作用力与二硫共价键是蛋白质凝胶中的主要作用力,这与任丽娜^[26]结论一致。随着加热温度的上升,蛋白分子内部巯基逐渐暴露出来,促使蛋白质分子间二硫共价键形成,有助于蛋白质交联。然而贮藏期间蛋白质氧化导致巯基过度损失,减少了热诱导过程中二硫键的形成。贮藏期间 MP 变性导致疏水基团暴露在蛋白质表面,是疏水作用力上升的主要原因;但疏水作用力过强,会阻碍凝胶过程活性基团的交联,不利于凝胶的形成。MP 凝胶中的离子键主要来自蛋白质-水或者蛋白质-蛋白质分子表面负电荷产生的静电斥力^[27-28],有研究表明 MP 氧化会改变蛋白表面电荷分布,造成离子键含量的下降^[9]。离子键与氢键是影响凝胶保水性的主要作用力,离子键与氢键含量的下降也符合凝胶保水性下降规律。



注: a: 4 °C; b: -18 °C。

图 5 4 °C及-18 °C贮藏条件对 MP 凝胶分子间作用力的影响(n=3)

Fig.5 Effects of storage conditions at 4 °C and -18 °C on intermolecular forces of MP gel (n=3)

2.4.4 低温贮藏过程中 MP 凝胶蛋白二级结构的变化

运用傅里叶变换红外光谱(Fourier translation infrared spectroscopy, FTIR)谱图进一步分析贮藏条件对 MP 凝胶蛋白二级结构的变化, 通过分析波数范围在 1600~1700 cm⁻¹的酰胺I带得到蛋白质二级结构含量(图 6)^[29-30], 通过基线校正、傅里叶去卷积以及高斯曲线拟合, 计算凝胶蛋白二级结构的相对含量^[31]。

如表 2 所示, 在 4 °C 下, MP 凝胶中 α -螺旋相对含量在第 12 d 下降到 10.565%; β -折叠相对含量下降到 35.889%, 与新鲜鸡肉的凝胶相比, 呈现明显下降趋势($P<0.05$), 而相对应的 β -转角和无规则卷曲含量呈显著上升趋势($P<0.05$)。表明贮藏期间凝胶蛋白质构象发生改变, α -螺旋与 β -折叠可能会部分转化为 β -转角和无规则卷曲, 蛋白二级结构由有序结构转向无序结构。 α -螺旋和 β -折叠构象通过氢键作用维持, 其含量的下降与贮藏过程中凝胶氢键含量下降的结论一致。蛋白质氧化变性破坏 MP 结构, 将螺旋结构转变为随机结构, 蛋白无序结构增加。上述变化导致凝胶结构变松散, 引起凝胶强度与凝胶保水性下降。-18 °C 下, 凝胶中的 α -螺旋和 β -折叠含量在贮藏的 0~6 d 内显著下降($P<0.05$), 而贮藏的第 12 d 与第 6 d 相比并无显著

差异($P>0.05$), 表明与 4 °C 冷藏相比, MP 冷冻变性是造成 MP 贮藏初期构象改变以及 MP 凝胶功能下降的主要原因。

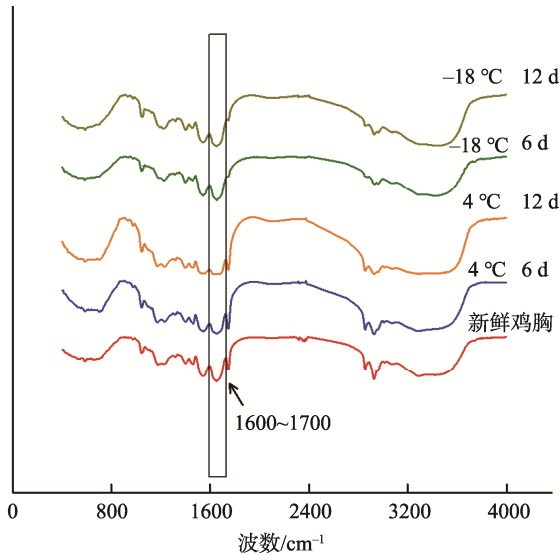


图 6 MP 凝胶的傅里叶红外光谱图(n=3)

Fig.6 FTIR spectrum of MP gel (n=3)

表 2 4 °C及-18 °C贮藏条件下 MP 凝胶蛋白二级结构相对含量(n=3)

Table 2 Relative content of the protein secondary structures of MP gel at 4 °C and -18 °C (n=3)

贮藏条件	贮藏时间/d	α -螺旋/%	β -折叠/%	β -转角/%	无规则卷曲/%
4 °C	0	12.359±0.669 ^a	39.299±0.116 ^a	34.189±0.425 ^c	10.153±1.166 ^c
	6	10.574±0.127 ^b	37.208±0.243 ^b	38.938±0.315 ^b	13.307±0.133 ^b
	12	10.565±0.591 ^b	35.889±0.277 ^c	39.453±0.255 ^a	14.935±0.378 ^a
-18 °C	0	12.359±0.669 ^a	39.299±0.116 ^a	34.189±0.425 ^b	10.153±1.166 ^b
	6	11.224±0.756 ^b	36.134±0.107 ^b	41.763±0.163 ^a	10.879±0.201 ^a
	12	10.404±0.337 ^b	36.033±0.801 ^b	41.478±0.416 ^a	11.028±0.317 ^a

3 结 论

在低温贮藏期间, MP 结构发生改变, 与新鲜鸡胸肉样品相比, MP 的总巯基含量与 Ca^{2+} -ATPase 酶活性呈下降趋势, 表面疏水性呈上升趋势。MP 的凝胶强度、凝胶弹性与凝胶保水性也均随贮藏时间的延长而逐渐下降。在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏过程中, MP 冷冻变性是引起 MP 各生化指标及凝胶特性下降的主要因素, 但相比 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件, 冷冻仍可以在长期贮藏过程中较好地维持 MP 的结构及凝胶特性。进一步分析贮藏条件对 MP 热诱导凝胶分子间作用力的影响, 其离子键及氢键在贮藏过程中均呈下降趋势, 而疏水作用力呈上升趋势。贮藏期间蛋白质构象也发生改变, 且 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下的变化更明显, 具体表现为 α -螺旋和 β -折叠含量下降, 而 β -转角和无规则卷曲含量上升, 表明凝胶蛋白二级结构由有序转向无序结构, 最终造成凝胶结构松散、凝胶功能下降。因此, 后续可以研究通过添加抗氧化剂、盐离子等方法抑制 MP 氧化, 改善凝胶分子间作用力。

参考文献

- JIA W, SHI Q, SHI L. Effect of irradiation treatment on the lipid composition and nutritional quality of goat meat [J]. Food Chem, 2021, 351: 129295.
- GUYON C, MEYNIER A, LAMBALLERIE M. Protein and lipid oxidation in meat: A review with emphasis on high-pressure treatments [J]. Trends Food Sci Technol, 2016, 50(4): 131–143.
- LIU D, LIANG L, XIA W, *et al.* Biochemical and physical changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets stored at -3 and $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ [J]. Food Chem, 2013, 140(1–2): 105–114.
- 周果, 王芝妍, 陈霞霞, 等. 贮藏温度及解冻方式对鲈鱼肉蛋白生化特性的影响[J]. 中国食品学报, 2016, 16(7): 164–169.
ZHOU G, WANG ZY, CHEN XX, *et al.* Effect of storage temperature and thawing way on the biochemical properties of protein from *Pneumatophorus japonicus* [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2016, 16(7): 164–169.
- 夏秀芳, 李芳菲, 王博, 等. 冰温保鲜对牛肉肌原纤维蛋白结构和功能特性的影响[J]. 中国食品学报, 2015, 15(9): 54–60.
XIA XX, LI FF, WANG B, *et al.* Effect of controlled freezing storage on the structural and functional properties of beef myofibrillar protein [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2015, 15(9): 54–60.
- 王静宇, 胡新, 刘晓艳, 等. 肌原纤维蛋白热诱导凝胶特性及化学作用力研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8): 300–306.
WANG JY, HU X, LIU XY, *et al.* Advances in heat-induced gel properties and chemical forces of myofibrillar protein gel [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(8): 300–306.
- ZHANG LF, YE XQ, ZHANG XZ, *et al.* Effects of high intensity ultrasound modification on physicochemical property and water in myofibrillar protein gel [J]. Ultrason Sonochem, 2017, 34: 960–967.
- WANG Z, HE Z, GAN X, *et al.* Effect of peroxy radicals on the structure and gel properties of isolated rabbit meat myofibrillar proteins [J]. Int J Food Sci Technol, 2018, 53(12): 2687–2696.
- ZHANG ZL, XIONG ZY, NOMAN W, *et al.* Effects of oxidative modification on the functional, conformational and gelling properties of myofibrillar proteins from *Culteralburnus* [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 162: 1442–1452.
- CAO Y, XIONG YL. Chlorogenic acid-mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein [J]. Food Chem, 2015, 180(8): 235–243.
- TONG L, YING W, PAN D, *et al.* Effect of trypsin treatments on the structure and binding capacity of volatile compounds of myosin [J]. Food Chem, 2016, 214: 710–716.
- LIU S, ZHAO P, ZHANG J, *et al.* Physicochemical and functional properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) myofibrillar protein glycosylated with konjac oligo-glucomannan [J]. Food Hydrocolloid, 2017, 67(6): 216–223.
- 孙路, 邹金浩, 黄群, 等. 捶打时间对牛肉凝胶品质的影响研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 27–34.
SUN L, ZOU JH, HUANG Q, *et al.* Effect of beating time on the quality of beef gel [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(2): 27–34.
- RU L, ZHAP SM, XIE BJ, *et al.* Contribution of protein conformation and intermolecular bonds to fish and pork gelation properties [J]. Food Hydrocolloid, 2011, 25(5): 898–906.
- 代媛媛, 李美莹, 李琳, 等. 加工方式对牛肉蛋白质氧化的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 70–76.
DAI YY, LI MY, LI L, *et al.* Effect of processing methods on protein oxidation of beef [J]. Food Ind Sci Technol, 2022, 43(2): 70–76.
- ZHANG Y, MAGRO A, PUOLANNE E, *et al.* Myofibrillar protein characteristics of fast or slow frozen pork during subsequent storage at $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ [J]. Meat Sci, 2021, 176(2): 108468.
- RAMIAEZ JA, MARTIAN MO, BANDMAN E. Fish myosin aggregation as affected by freezing and initial physical state [J]. J Food Sci, 2010, 65(4): 556–560.
- SILVA F, MARIO E, FERREIRA V, *et al.* Protein and lipid oxidations in jerky chicken and consequences on sensory quality [J]. LWT-Food Sci Technol, 2018, 97: 341–348.
- YANG H, ZHANG W, LI T, *et al.* Effect of protein structure on water and fat distribution during meat gelling [J]. Food Chem, 2016, 204(8): 239–245.
- 白京, 田寒友, 邹昊, 等. 不同冻结方式对冻结猪肉保水性的影响机制[J]. 食品科学, 2020, 41(11): 83–89.
BAI J, TIAN HY, ZOU H, *et al.* Effects of different freezing methods on water-holding capacity of frozen pork [J]. Food Sci, 2020, 41(11): 83–89.
- 姜明慧, 田元勇, 闫丽新, 等. 冷藏过程中虾夷扇贝横纹肌微观结构变化与肌原纤维蛋白稳定性[J]. 食品科学, 2020, 41(21): 175–181.
JIANG MH, TIAN YY, YAN LX, *et al.* Microstructure change and myofibrillar protein stability of *Patinopecten yessoensis* striated adductor muscle during chilling storage [J]. Food Sci, 2020, 41(21): 175–181.
- ZHOU A, LIN L, LIANG Y, *et al.* Physicochemical properties of natural actomyosin from threadfin bream (*Nemipterus* spp.) induced by high hydrostatic pressure [J]. Food Chem, 2014, 156(8): 402–407.
- 朱潘红, 齐慧红, 李婷, 等. 不同盐浓度下罗非鱼肌球蛋白热诱导凝胶的形成及机理[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(8): 93–98.
ZHU PH, QI HH, LI T, *et al.* Formation and mechanism of heat-induced gel of tilapia myosin at different salt concentration [J]. Food Ferment Ind, 2018, 44(8): 93–98.

- [24] BEKHIT E, HOLMAN B, GITERU SG, *et al.* Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review [J]. Trends Food Sci Technol, 2021, 109: 280–302.
- [25] 王静宇, 杨玉玲, 康大成, 等. 超声波对肌原纤维蛋白热诱导凝胶化学作用力与保水性的影响[J]. 中国农业科学, 2017, 50(12): 2349–2358.
- WANG JY, YANG YL, KANG DC, *et al.* Effects of ultrasound on chemical forces and water holding capacity study of heat-induced myofibrillar protein gel [J]. Sci Agric Sin, 2017, 50(12): 2349–2358.
- [26] 任丽娜. 白鲢鱼肉肌原纤维蛋白冷冻变性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- REN LN. Study on frozen denaturation of myofibrillar protein of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) muscle [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [27] NA N, WANG Z, FAN H, *et al.* Gel properties and molecular forces of lamb myofibrillar protein during heat induction at different pH values [J]. Process Biochem, 2014, 49(4): 631–636.
- [28] BAO Y, BOEREN S, ERTBJERG P. Myofibrillar protein oxidation affects filament charges, aggregation and water-holding [J]. Meat Sci, 2018, 135: 102–108.
- [29] SAGUER E, ALVAREZ P, ISMAIL AA. Heat-induced denaturation/aggregation of porcine plasma and its fractions studied by FTIR spectroscopy [J]. Food Hydrocolloid, 2012, 27(1): 208–219.
- [30] ULRICHS T, DROTLEFF AM, TERNES W. Determination of heat-induced changes in the protein secondary structure of reconstituted livetins (water-soluble proteins from hen's egg yolk) by FTIR [J]. Food Chem, 2015, 172(4): 909–920.
- [31] 康鹏, 雷晓民, 葛武鹏, 等. 不同巴氏杀菌处理对绵羊乳总蛋白及乳清蛋白二级结构的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(23): 9219–9225.
- KANG P, LEI XM, GE WP, *et al.* Effects of different pasteurization treatments on the secondary structure of total proteins and whey protein in sheep milk [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(23): 9219–9225.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



施晓予, 硕士, 主要研究方向为肉类贮藏及加工。

E-mail: 1003314178@qq.com



刘少伟, 博士, 教授, 主要研究方向为食品加工及贮藏。

E-mail: swliu@ecust.edu.cn