

冷冻-解冻肌原纤维蛋白结构评价技术研究进展

李 阳^{1,2}, 白根朋^{1,2}, 潘一玲^{1,2}, 张月美^{1,2*}, 曹锦轩^{1,2*}

[1. 老年营养与健康教育部重点实验室(北京工商大学), 北京 100048; 2. 北京工商大学食品与健康学院, 北京 100048]

摘 要: 肌肉类食品在加工和运输中常常经历冷冻-解冻的过程, 严重破坏肌原纤维蛋白的结构与功能特性, 进而降低肌肉食品的食用价值。因此, 评价肌原纤维蛋白冷冻-解冻过程中结构特性的变化对于监测冻融肌肉食品的加工食用价值具有重要意义。本文针对现代检测技术在评价冻融肌原纤维蛋白结构特性方面的研究进展和应用情况进行了系统总结和分析, 主要介绍了光谱学技术、显微镜技术、核磁共振技术、蛋白组学和分子动力学模拟等技术的研究应用现状。此外, 比较了上述不同检测技术的优缺点, 并对现代检测技术在评价肌原纤维蛋白品质特性方面的未来发展方向进行了展望, 未来需进一步优化相关检测技术, 使其操作更简单、更易实施, 以期在冷冻肉品生产和加工工业化中推广应用并提供技术支持, 旨在为提高冷冻肌肉食品品质提供科学参考。

关键词: 肌肉食品; 冻融; 肌原纤维蛋白; 现代检测技术

Research progress in evaluation technology of structural characteristics of frozen-thawed myofibrillar proteins

LI Yang^{1,2}, BAI Gen-Peng^{1,2}, PAN Yi-Ling^{1,2}, ZHANG Yue-Mei^{1,2*}, CAO Jin-Xuan^{1,2*}

[1. Key Laboratory of Geriatric Nutrition and Health (Beijing Technology and Business University), Ministry of Education, Beijing 100048, China; 2. School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China]

ABSTRACT: Muscle foods often undergo freezing-thawing process during processing and transportation, which can severely damage structural and functional characteristics of myofibrillar proteins and thereby reduce edible value of muscle foods. Therefore, it is of great significance to evaluate the changes of structural characteristics of myofibrillar proteins during the freezing-thawing process aiming to monitor the processing and nutritional value of frozen-thawed muscle foods. This paper provided systematic summary and analysis of the research progress and application of modern detection techniques in evaluating the structural characteristics of frozen-thawed myofibrillar proteins, mainly introduced the current research and application status of spectroscopic techniques, microscopy techniques, nuclear magnetic resonance techniques, proteomics, and molecular dynamics simulations. Additionally, compared the advantages and disadvantages of the aforementioned detection techniques and discussed the future development directions of modern detection techniques in evaluating the quality characteristics of myofibrillar proteins. In the future, it is necessary to further optimize the relevant detection techniques to make their operations simpler and more feasible to implement, in order to promote their application and provide technical support in the industrial production and processing of

基金项目: 国家自然科学基金项目(32201945)、北京市教育委员会科学研究计划项目(KM202310011010)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (32201945), and the Research and Development Program of Beijing Municipal Education Commission (KM202310011010)

*通信作者: 张月美, 博士, 副教授, 主要研究方向为畜产品蛋白质化学特性。E-mail: zhangyuemei@btbu.edu.cn

曹锦轩, 博士, 教授, 主要研究方向为畜产品加工与资源功能化利用。E-mail: caojinxuan@btbu.edu.cn

*Corresponding author: ZHANG Yue-Mei, Ph.D, Associate Professor, College of Beijing Technology and Business University. No.11, Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100048, China. E-mail: zhangyuemei@btbu.edu.cn

CAO Jin-Xuan, Ph.D, Professor, College of Beijing Technology and Business University. No.11, Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100048, China. E-mail: caojinxuan@btbu.edu.cn

frozen meat production, thus aiming to improve the quality of frozen muscle foods by providing scientific references.

KEY WORDS: muscle foods; freezing-thawing; myofibrillar proteins; modern detection technology

0 引言

肌肉食品是人们日常饮食中不可或缺的重要组成部分,然而,在加工和运输过程中,肉类很容易发生细菌腐败和化学变质^[1]。因此,为了保证肌肉食品的质量安全,通常会采用冷冻保鲜的方式来保存。在长期冷冻过程中,肌肉自身内源酶的活性和各类生物化学反应速率会降低,腐败微生物的繁殖也会受到抑制,从而有效延长肌肉类食品的货架期^[2]。

然而,由于冷链系统不完善,肌肉食品在被消费者食用之前常常经历反复冷冻-解冻的循环过程。肌原纤维蛋白是肌肉组织的基本组成成分,主要由肌球蛋白、肌动蛋白和肌动球蛋白等组成^[3]。研究发现,反复冻融过程中,肌原纤维蛋白容易发生氧化变性,导致 Ca^{2+} -ATP 酶活性下降^[4]、羧基^[5]和巯基^[6]含量升高、盐溶解度^[7]和凝胶特性^[8]降低等变化,进而导致肌原纤维蛋白结构与品质劣化,造成大量汁液流失^[9-10],最终影响肌肉食品的食用品质^[11]。因此,评价肌原纤维蛋白冷冻-解冻过程中结构与品质功能特性的变化对于监测冻融肌肉食品的加工食用价值具有重要科学意义。

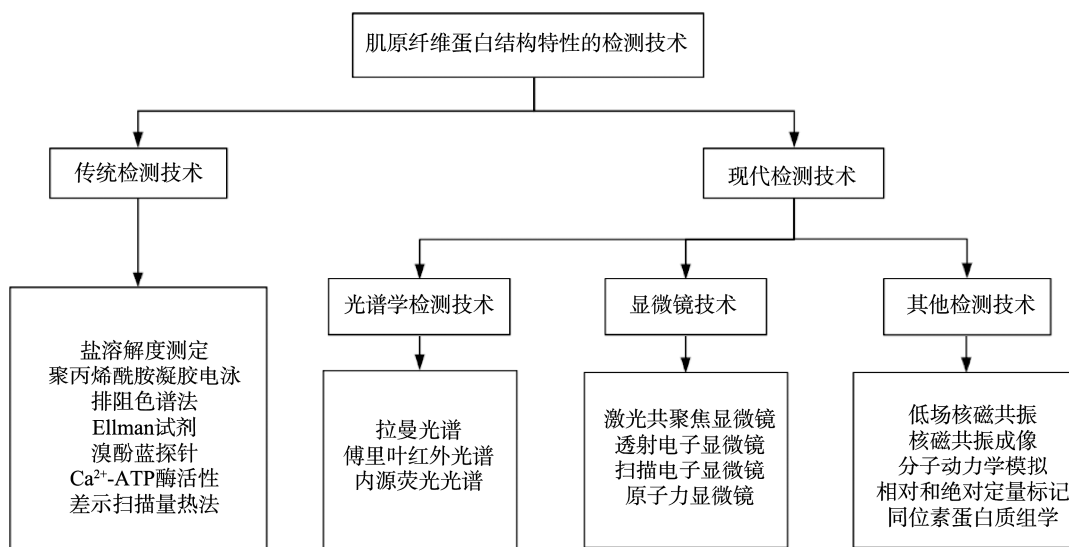
目前,已有多种技术手段可用于检测肌原纤维蛋白的结构与品质特性。图 1 总结分析了一系列用于评价冻融肌原纤维蛋白品质特性的检测技术。传统检测技术如溴酚蓝探针、差示扫描量热法、Ellman 试剂等,已比较成熟,但存在检测时间长、成本高、操作复杂的缺点。随着现代科技的发展,近些年来开发出一系列现代检测技术,如光谱学

技术[拉曼光谱法^[12]、傅里叶红外光谱法(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)^[13]、内源荧光光谱法^[14]等]、显微镜技术[激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)^[15]、透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)^[16]、扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)^[17]、原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)^[18]等]和低场核磁共振技术(lowfield nuclear magnetic resonance, LF-MNR)^[19]、核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)^[20]、分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟^[21]、相对和绝对定量同位素标记(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)蛋白质组学技术^[22]等,研究表明,这些现代检测技术的应用可以对肌原纤维蛋白样品结构内部的变化进行更加精准的评价。本文总结分析了国内外评价冻融肌原纤维蛋白结构功能特性技术的研究进展和应用情况,并展望了肌原纤维蛋白特性检测技术在未来的发展方向,以期对肌肉食品质量安全提供更精确、快速、可靠的检测手段。

1 传统检测技术

1.1 溴酚蓝探针

表面疏水性可以反映蛋白质表面疏水氨基酸的分布情况,与蛋白质的功能性质密切相关,通常用溴酚蓝与蛋白质中疏水氨基酸的结合强度来表示蛋白质表面的疏水性及构象的变化^[23]。溴酚蓝(bromophenol blue, BPB)是常用的指示剂和染色剂。在检测肌原纤维蛋白理化性质时往往



注: ATP为三磷酸腺苷(adenosine triphosphate)。

图1 冻融肌原纤维蛋白结构特性的传统和现代检测技术

Fig.1 Traditional and modern detection techniques for structural characteristics of frozen-thawed myofibrillar proteins

采用 BPB 作为探针, 通过测定 595 nm 下蛋白样品的吸光度来检测蛋白质表面疏水性变化。ZHANG 等^[24]使用 BPB 在测定鲢鱼鱼糜肌原纤维蛋白的表面疏水性时发现, 冷冻储藏过程中蛋白表面疏水氨基酸逐渐暴露, 蛋白质的构象发生明显变化, 在冷冻贮藏时间达到 3 个月时, 鱼糜表面疏水性达到最大值。许丹等^[25]研究显示, 虾肉肌原纤维蛋白在冻藏条件下的表面疏水性呈递增趋势, 并在 60 d 时达到最大值。ZHANG 等^[26]利用 BPB 探针快速冷冻与慢速冷冻猪肉在 -3°C 条件下贮存的肌原纤维蛋白表面疏水性变化进行对比分析, 结果表明快速冷冻的肌原纤维蛋白表面疏水性较低, 表现出较好的肌原纤维蛋白特性。

目前, 已有诸多学者开展有关肌原纤维蛋白表面疏水性测定的相关研究, 除 BPB 探针外, 还包括荧光探针法、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)结合法等。然而, 荧光探针法在测定疏水性时通常需要将肌原纤维蛋白溶解在 0.6 mol/L 氯化钾中, 但对于肌原纤维蛋白来说, 由于其溶解度非常低, 因此高离子浓度的缓冲液中很难保留其大部分天然结构。然而, 溶液中的离子强度对 BPB 与蛋白质中疏水氨基酸的结合强度并没有显著影响。因此, BPB 探针法为荧光探针法在溶液中测定蛋白质表面疏水性提供了有价值的补充。

1.2 差示扫描量热法

差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)是一种用于分析物质热学特性的技术, 通过测量蛋白质与参照物在不同温度下的吸放热量差异来评价蛋白质的变性行为^[27]。在冻融肌原纤维蛋白变性分析中, DSC 是一种常用的方法, 通过测量热转变温度和焓变, 可以分析蛋白质的变性情况^[28]。陈清敏^[29]研究了反复冻融牛肉肌原纤维蛋白 DSC 曲线的变化, 结果显示, 冻融次数越多, 肌球蛋白的变性程度越大。肖宇等^[30]发现, 冻融会导致羊肉肌原纤维蛋白变性, 而肌球蛋白对冻融作用的敏感性高于肌动蛋白, 并且随冻融次数的增多, 二者的变性程度均显著增大。

DSC 技术被广泛应用于肌原纤维蛋白变性程度的评价, 然而, 由于 DSC 处理单一试样的时间较长, 制样和试样之间的间隔难以控制, 可能会导致肌肉蛋白在此期间出现不同程度的变性。因此, DSC 技术存在较为明显的缺点, 难以准确地反映反复冻融后蛋白质的变性情况, 需要进一步优化样品制备和处理流程以缩短制样和试样之间的间隔, 优化冷却和加热速率, 调整扫描范围和扫描速度等参数, 以缩短整个实验的时间。

1.3 Ellman 试剂

Ellman 试剂, 也称为 5-5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(dorsal tegmental noradrenergic bundle, DTNB), 是一种

广泛用于测量蛋白质巯基含量的试剂。在弱碱性环境中, DTNB 能与含有巯基的物质发生反应, 生成亮黄色的 2-硝基-5-巯基苯甲酸, 通过朗伯-比尔定律在 412 nm 波长处对吸光度进行定量^[31], 可精确测定不同物质的巯基活性, 从硫化氢的气体分子到蛋白类有机大分子。相比于其他巯基检测技术, DTNB 更为稳定, 并且适用于近紫外区有吸收且强度较大的溶液中巯基含量的测定。吴晨燕等^[32]采用 DTNB 探针分析了反复冻融后鱼肉肌原纤维蛋白巯基含量的变化, 结果表明, 随着冻融次数的增加, 超高压和滚揉处理的鱼肉蛋白总巯基含量逐渐降低, 氧化程度进一步加强。张龙腾等^[33]采用 DNTB 探针测定反复冻融过程中鲢鱼鱼糜蛋白巯基含量, 结果显示, 冻融次数越多, 巯基含量的下降越明显。

测定肌原纤维蛋白总巯基含量的变化是评价蛋白质氧化程度的重要依据之一。虽然 DTNB 法可以被广泛认可为测量蛋白质巯基含量的试剂, 但其操作环境受限。2-硝基-5-巯基苯甲酸在弱碱的环境下才有较强吸附能力, 且在高 pH 的环境下不稳定。因此, 反应体系的 pH 一般控制在 7.4~8.0 的条件下较为适宜。

2 现代检测技术

近年来, 为了提高肌原纤维蛋白结构特性评价结果的准确性, 研究人员开发了一系列现代检测技术, 以帮助更好地评价冷冻-解冻过程中肌原纤维蛋白结构及其他品质指标之间的复杂关系。目前的现代检测技术主要包括光谱学技术(拉曼光谱法、FTIR、内源荧光光谱法等)、显微镜技术(CLSM、TEM、SEM、AFM 等)和 LF-MNR、MRI、MD 模拟、iTRAQ 蛋白质组学技术等。表 1 对以上现代检测技术的优缺点及其在不同肌肉中的应用情况进行了系统的总结概括。

2.1 光谱学技术

2.1.1 拉曼光谱法

拉曼光谱可以通过光子与样品非弹性碰撞而导致散射光子的频率和方向发生变化, 从而获得蛋白质特定的光谱信号^[34]。蛋白质的某些官能团有其特殊的拉曼光谱信号, 通过分析蛋白多肽的主链结构、侧链微环境等可以有效获取蛋白质空间结构信息, 从而得到蛋白质的二级结构信息。蛋白质肽键的特征振动带主要包括酰胺 I 带(1600~1700 cm^{-1})、酰胺 II 带(1500~1600 cm^{-1})和酰胺 III 带(1200~1300 cm^{-1}), 其中酰胺 I 带和 III 带被广泛应用于表征蛋白质构象的变化, 如 α -螺旋、 β -折叠、转角和无规则卷曲等^[35], 这些特征振动带在拉曼光谱中能够呈现出较强的信号。因此, 拉曼光谱可以作为一种有效的方法来研究蛋白质的空间结构和二级结构信息, 进而评估冻融肌肉食品的品质变化。

表 1 现代检测技术在评价冻融肌原纤维蛋白结构方面的优缺点及其在不同肌肉中的应用
Table 1 Advantages and disadvantages of modern detection techniques in evaluating structural characteristics of frozen-thawed myofibrillar proteins and their application in different muscles

现代检测技术	优点	缺点	肌原纤维蛋白结构与品质	在不同肌肉中的应用	
光谱学技术	拉曼光谱法	分辨率高; 可同时检测多组分气体样品, 节约时间成本; 可以远程无损分析 ^[34]	研究复杂体系信息易复杂; 拉曼散射强度弱 ^[35]	二级结构	草鱼 ^[12,36-37] 、牛肉 ^[38]
	FTIR	应用范围广; 扫描速度快; 检测重现性好; 操作简单 ^[39]	设备体积大; 价格昂贵; 测量气体样品时易受干扰 ^[34]	二级结构	大黄鱼 ^[13] 、斑点叉尾鲷鱼 ^[32]
	内源荧光光谱法	灵敏度高; 分析速度快; 无损分析 ^[40]	分析的体系受限	三级结构	鲢鱼 ^[24] 、镜鲤 ^[41] 、猪肉 ^[14,42]
显微镜技术	CLSM	探测样品内部结构; 获得三维立体图像; 无损分析 ^[43]	穿透力有限; 分辨率较低; 染色较复杂 ^[44]	微观结构	牛肉 ^[18] 、猪肉 ^[45] 、大黄鱼 ^[13,46]
	TEM	分辨率高; 可探测内部结构; 可以获得立体丰富信息 ^[47]	对样品有破坏性; 操作条件真空; 采样率低 ^[48]	微观结构	猪肉 ^[16,49]
	SEM	应用范围广; 放大倍数高; 扫描速度快; 分辨率高 ^[48]	制样烦琐, 对样品有破坏性; 无法探测内部结构 ^[50]	微观结构	鲢鱼 ^[17] 、小龙虾 ^[51] 、猪肉 ^[52] 、兔肉 ^[53] 、鸡肉 ^[54]
	AFM	获得三维图像; 无损分析; 对环境要求度不高, 直接成像 ^[55]	样品在液体中成像时固定困难 ^[56]	微观结构	牛肉 ^[18] 、镜鲤 ^[57] 、猪肉 ^[58] 、鱼肉 ^[59]
其他检测技术	LF-NMR	无损分析; 样品需要量少; 准确度高; 实时获取数据 ^[59]	价格昂贵; 依赖高强度场	水分分布	鱼丸 ^[19] 、牛肉 ^[20,60] 、猪肉 ^[61]
	MRI	可对不透明的样品进行检测; 样品需要量少; 重复性较好 ^[62]	成本较高; 分辨率低; 需要大量计算 ^[63]	水分分布	鱼丸 ^[19] 、猪肉 ^[64] 、牛肉 ^[65]
	MD	无需实验就能够解决与模型系统特性相关的具体问题 ^[21]	对生物大分子模拟过程十分有限 ^[66]	微观结构	海鲈鱼 ^[21] 、鲢鱼 ^[67]
iTRAQ 蛋白质组学技术	灵敏度高; 精确度高; 对任何类型的蛋白质都可以进行鉴定和分析 ^[68]	使用原理和操作方法较为复杂, 试剂昂贵 ^[68]	蛋白质差异化表达	羊肉 ^[22] 、小龙虾 ^[51] 、三文鱼 ^[69]	

汪少芸等^[36]研究发现, 与新鲜的草鱼鱼糜相比, 经过 5 次反复冻融后鱼糜蛋白质的二级结构发生显著变化, 表现为 β -折叠含量下降、无规则卷曲含量增加。YANG 等^[37]研究表明, 随着冻融循环次数的增加, 草鱼鱼糜蛋白质二级结构中无规则卷曲的含量从 27.80% 逐渐增加到 31.54%, α -螺旋减少。

拉曼光谱技术能够直接反映蛋白质空间构象的变化, 为研究反复冻融诱导的肌原纤维蛋白变性现象提供了有效的评价技术手段。拉曼光谱可以对不同状态的样品进行检测, 同时, 无需对样品进行预处理, 避免了样品在预处理过程中受到外界因素的干扰, 但拉曼光谱的设备较为昂贵, 在其工厂化应用方面受到一定限制。

2.1.2 傅里叶红外光谱法

FTIR 是一种将傅里叶变换与红外光谱分析相结合的检测技术, 用于鉴定蛋白质的二级结构。由于分子是以特定频率振荡的原子构成的, 当一束红外线照射到试样上时, 原子会吸收光子的能量, 并使其发生跃迁, 即入射光的光子能量刚好满足两个振动能级之差。傅立叶变换技术可用于获得相应的红外光谱, 通过进一步分析红外光谱, 可以最终

确定蛋白质的二级结构^[70]。FTIR 技术结合傅里叶变换和红外光谱分析可以鉴定蛋白质的二级结构, 判断冷冻-解冻过程对肌原纤维蛋白结构性质的影响。不同研究表明^[32,37], 通过 FTIR 技术可以观察到肌原纤维蛋白 α -螺旋含量随着冻融循环次数的增加而下降, 无规则卷曲含量增加或 β -折叠含量轻微增加。除了反复冻融, ZHANG 等^[71]也曾通过 FTIR 技术探究盐浓度和 H_2O_2 浓度等因素对肌原纤维蛋白二级结构的影响。

随着科技的发展和研究方法的改进, 研究者们对肌原纤维蛋白变性过程中微观结构变化的研究越来越深入, FTIR 技术具有操作简单、应用范围广泛等特点, 可以检测固体或液体状态蛋白样品的细微结构变化^[12], 使其在检测肌原纤维蛋白二级结构变化方面发挥着不可替代的作用, 但也存在设备体积大, 价格昂贵等问题。

2.1.3 内源荧光光谱法

当一定波长的光线照射到某个物体上时, 它会发出比入射光更长的光, 称为荧光。荧光光谱技术是指在各个领域中应用和研究荧光光谱的相关方法。内源性荧光是指含有芳

香族氨基酸(色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸)残基的蛋白质在 280 nm 或 295 nm 的激发光的激发下产生的荧光^[15]。这 3 种含有芳香族氨基酸的内源荧光光谱是蛋白质荧光的主要来源,被广泛应用于研究蛋白质结构、折叠动力学和蛋白质分子之间的相互作用。内源荧光光谱技术通过激发色氨酸残基,可以监测蛋白质的氨基酸残基及其周边微环境的变化,从而鉴定肌原纤维蛋白的三级结构信息。目前研究表明,反复冻融处理导致肌原纤维蛋白的荧光强度下降,进而破坏其三级结构,如 WAN 等^[41]研究了反复冻融对镜鲤鱼肉的影响,而 ZHANG 等^[24]则观察到在冻藏期间,鲢鱼鱼糜肌原纤维蛋白荧光强度的逐渐降低。

内源荧光光谱检测速度快、灵敏度高,可以有效判断冻融肌肉样品肌原纤维蛋白三级结构的变化情况。但内源荧光光谱分析体系受限,且容易受相互元素干扰和叠加峰的影响。

2.2 显微镜技术

2.2.1 激光共聚焦显微镜

CLSM 是一种高度集成化的光学显微镜,通过观察样品和组织内部细微结构,从而获得清晰的电子计算机断层扫描影像,并且可以测量和分析细胞的形态学参数和荧光强度等。因此,该技术在细胞学、动植物学、生物化学、食品学等研究领域广泛应用。在常规光学显微镜的基础上,CLSM 将激光作为点光源,聚焦能力强,可以大幅度减少扫描面积。同时,采用共轭焦距处理方法可以有效去除离焦点较远的杂散光,从而提高成像质量。通过快速扫描技术和 Z 轴步进技术,能够实现三维图像的光学切片^[72]。

目前,CLSM 技术被广泛应用于分析肌肉蛋白组织在冻融过程中微观结构的变化。通过对样品进行分层扫描,从而获得组织的表现形态,并对其进行二维和三维图像构建。TAN 等^[15]通过 CLSM 观察大黄鱼肉肌原纤维蛋白的聚集程度时发现,与未冻融的样品相比,冻融后样品的肌原纤维蛋白明显聚集。PAN 等^[45]通过观察猪肉肌原纤维蛋白在不同温度和储存时间下 CLSM 图像来判断蛋白质的降解程度,结果表明,新鲜蛋白质样品在水中均匀稳定地分散,随着冻藏温度的降低,蛋白质的聚集和絮凝程度逐渐降低。

CLSM 检测技术具有三维成像、非侵入性等优点,为研究蛋白质结构、组织形态和微观结构变化提供了有力的工具。然而,该技术仍存在一些缺陷,如分辨率较低,穿透力较差等,因此在将其广泛应用于肌原纤维蛋白微观结构的检测上,还有诸多问题需要解决。

2.2.2 透射电子显微镜

TEM 是一种高分辨率的电子光学仪器,能够可靠地探测样品内部结构。主要由电子光学系统、真空控制系统和电源系统 3 个基本部分组成。TEM 的工作原理是以短波长的电子束作为光源对样品进行聚焦成像,然而电子穿透能力是有限的,因此,TEM 技术主要适用于对薄样品的研究。TEM 具有分辨率高和性能优异等特点,近年来被广泛

应用于材料化学成分及结构分析。近期,陈骋等^[73]利用 TEM 技术对耗牛肉肌肉组织中肌原纤维蛋白的超微结构进行观察,研究发现,未冷冻的对照组肌原纤维蛋白组织结构良好,Z、M 线排列整齐。而在经历一次冻融后,其微观结构发生了变化,Z 线排列不规则,M 线变得不明显,蛋白部分降解。在进行两次冻融循环后,肌肉组织的损伤更为严重,肌原纤维蛋白出现大量的断裂和溶解。

TEM 技术可以用于对肌肉蛋白组织在冻融过程中微观结构的变化进行研究,为相关领域的科学研究和生产实践提供了有力的支持。但 TEM 应用的条件较为苛刻,需要在真空条件下使用,并且会对样品进行破坏,采样率较低。因此,未来肌原纤维蛋白微观结构检测技术应该向操作简单化、智能化、无损分析的方向发展。

2.2.3 扫描电子显微镜

SEM 可通过电子束扫描并采集样品表面发出的次级电子信号进行成像,主要由电子光学系统、信号收集以及图像显示系统和真空控制系统 3 个基本部分组成。SEM 技术的工作原理是利用极细的电子束在样品表面扫描并激发出次级电子信号,通过探测器收集并转换成光信号,再通过光电倍增管和放大器转换成电信号,最终生成高质量的扫描图像^[19]。该技术可广泛应用于生物、材料等领域的结构表征和成像研究,是现代科学研究和生产实践中不可或缺的重要工具。

近些年来,SEM 技术被广泛应用于监测肌原纤维蛋白微观结构的变化,以此来评价冻融对肌肉蛋白的影响。LAN 等^[74]利用 SEM 观察太平洋白虾的冻融循环过程,比较了第 2、4、6、8 次冻融循环后的样品与新鲜虾体的显微结构,结果表明,新鲜试样的横断面组织较好,第 2 次冻融循环时肌原纤维蛋白未见显著改变,而第 4 次及以上冻融周期后肌原纤维断裂,蛋白完整性发生改变。TIAN 等^[75]利用 SEM 观察两次冻融循环银鱼凝胶体系内部结构的变化时,发现对照组蛋白网络明显破损,而没食子儿茶素和没食子酸处理的样品则损伤较小,蛋白结构更完整。

与光学显微镜相比,SEM 具有更高的分辨率和更快的扫描速度,因此在检测肌肉组织微观结构方面应用广泛。但是,SEM 技术存在制样烦琐和无法准确探测内部结构的缺点,因此,SEM 常用于观察固体样品表面的微观结构,有时可以将 TEM 和 SEM 结合使用,可以得到比较全面的分析结果。

2.2.4 原子力显微镜

AFM 是一种纳米级的显微技术。微悬臂对微弱力十分敏感,其一端被固定,另一端带有一个细小的针头,在采用光栅式扫描的情况下,AFM 通过激光束在微悬臂末端的反射来探测微悬臂的形变,微悬臂把激光光束反射到光电检测器上,通过光电检测器把激光转换成电子信号,然后输入电脑,经过处理后,获得样品的形态和其他表面信息^[22]。AFM 技术可以高精度地获取样品表面的三维图像信息,具有空间分辨率高、应用范围广泛、制作方法简单、试验环境多样等优点。与其他显微仪器相比,AFM 在生物

学、化学、药学、材料学和医学等领域得到广泛的应用。

近年来, AFM 技术被逐渐应用于监测肌原纤维蛋白在冷冻-解冻过程中的结构变化信息。HU 等^[76]通过 AMF 技术表征智利竹鱼肌原纤维蛋白样品在不同冻融循环过程中可溶性聚集体的大小, 结果表明, 蛋白交联程度随着冻融循环次数的增加而增加, 且在贮藏过程中, 冻融时间越长, 肌原纤维蛋白的交联速度越快。LI 等^[57]则运用 AFM 技术观察了冻融循环下肌原纤维蛋白的表面形貌图像, 结果表明, 肌原纤维蛋白表面的凹凸区域高度、粗糙度和不规则性均随着冻融循环次数的增加而显著增加。WANG 等^[58]通过 AFM 观察了不同解冻方式对猪肉肌原纤维蛋白凝胶表面粗糙程度的影响, 结果表明, 新鲜肌原纤维蛋白凝胶表面光滑, 而解冻样品肌原纤维蛋白凝胶表面粗糙且不规则。此外, 微波解冻和水浸解冻诱导的蛋白凝胶表面形态的破坏比超声波解冻和真空解冻更严重。

AFM 技术被认为是评价蛋白结构表面粗糙程度的重要工具, 能够直观地反映出肌原纤维蛋白在冻融循环过程中形成的结构聚集体的分子大小, 为研究冻融导致肌原纤维蛋白变性的机理提供了有效的技术手段。因此, AFM 技术具有广泛的应用前景和研究价值, 不过需要注意的是, 利用 AFM 技术进行高质量成像, 需对其进行正确地处理, 选取合适的操作环境和加载力, 不应对其样品进行损伤。

2.3 其他现代检测技术

2.3.1 低场核磁共振/核磁共振成像

NMR 是指在恒定磁场与交变磁场的共同作用下, 具有固定磁距的原子核(如 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{31}P 、 ^{19}F 、 ^{15}N 、 ^{129}Xe 等)通过吸收或发射电磁波的方式引起原子核跃变, 从而形成核磁共振信号的技术。当前, 以氢核(^1H)为研究对象的核磁共振技术被广泛应用^[77]。根据分辨率的不同, NMR 可以分为高场 NMR 和低场 NMR 两种类型。高场 NMR 主要用于样品的化学性质检测, 而 LF-NMR 则用于检测样品的物理性质, 其恒定磁场强度不超过 0.5 T ^[78]。弛豫过程是指氢质子从激发态恢复到初始态的过程, 此过程所需时间称为弛豫时间。弛豫时间分为纵向弛豫(自旋-晶格)和横向弛豫(自旋-自旋)两种形式, 分别用 T_1 和 T_2 表示。研究表明弛豫时间会受到氢质子所处的环境和状态的影响。在肌肉食品水分分布的研究中, 常用横向弛豫时间 T_2 来表示, 因为相较于 T_1 , T_2 对多种相态的存在更加敏感^[34]。水分分布的稳定性会对 T_2 产生影响, 当水和其他分子紧密结合时, 其水分状态越稳定, T_2 越小; 反之, 水分流动性越好, T_2 越大。因此, 分析弛豫谱中 T_2 波峰的位置与大小, 可以判断样品中水分的分布情况。

MRI 是一项无创检测技术, 可通过不侵入被诊断者体内的方式获取被测样品的内部图像。MRI 技术是将电磁技术与信息学、物理学和控制学等多种学科相结合而形成的一种新技术, 已广泛应用于生物化学、医药和食品等多个领域。MRI 成像可分为结合水成像、自由水成像以及质

子密度成像 3 种^[35]。MRI 具有无损、高分辨率和对任意层面的分析能力, 在食品领域中常用于分析肌肉食品加工、储存和运输过程中内部水分的分布及迁移情况。

近年来, LF-NMR 和 MRI 技术被广泛应用于监测肌原纤维蛋白在冷冻-解冻循环过程中内部结构水分子的变化情况。例如, 蓝蔚青等^[79]利用 LF-NMR 和 MRI 技术表征冻融循环次数对大目金枪鱼肌原纤维蛋白内部水分子的影响。LF-NMR 分析结果表明, 冻融循环过程中鱼肉肌原纤维蛋白中的不可移动水向自由水转变, 循环次数越多, 自由水含量越高, 导致汁液流失越严重, 这一结果与 MRI 分析结果一致。李靖等^[64]则通过 LF-NMR 和 MRI 技术共同测定冷冻猪背最长肌蛋白内部水分子的变化情况。LF-NMR 分析结果显示, 随着冻藏时间的延长, 样品中不易流动水的含量显著降低, 自由水含量增加。MRI 成像结果显示, 随着时间的增加, 样品中水分分布从均匀分布到中间信号低、边缘信号强, 最后又逐渐恢复到均匀状态。庞之列等^[61]在研究解冻猪肉时也发现, 低场核磁共振弛豫时间中不易流动水的峰面积显著降低。FRELKA 等^[80]则采用 MRI 技术对鸡胸肉的冻融损伤状况进行评价, 并成功地应用 MRI 技术降低了冻融滥用导致的不良效应。

总的来说, 研究者们通常结合 MRI 与 LF-NMR 技术共同表征冻融肌原纤维蛋白中水分子的分布情况, MRI 与 LF-NMR 技术对样品的需求量少, 重复性高, 且可以对样品进行无损分析, 以客观、准确地评价肌原纤维蛋白在反复冻融过程中的品质变化, 但设备价格昂贵, 且依赖高强度, 不利于应用推广。

2.3.2 分子动力学模拟

MD 模拟是一种利用计算机模拟蛋白质结构和动力学的方法, 该技术能够直观地观察蛋白质结构在不同环境下的变化情况, 并及时提供蛋白质构象变化的信息。通过模拟原子与分子间的相互作用及其对微观与宏观行为的影响, MD 模拟能够从时间和空间尺度上对生物分子体系进行研究, 无需进行实验操作即可解决模型系统特性的问题^[81]。相较于 FTIR、MRI、NMR 等技术测定肌原纤维蛋白结构的冻融影响, MD 模拟具有更高的效率和较低的成本, 且能够实时监测蛋白质构象在分子水平上的变化情况。近些年来, MD 模拟技术被逐渐应用于评价冻融对肌原纤维蛋白结构和功能特性的影响^[63]。

例如, 张文娣^[21]利用 MD 模拟探究不同解冻方式对鱼肉蛋白质构象的影响, 从分子的角度分析蛋白质二级结构的波动变化, 结果显示, 微波解冻处理组肌原纤维蛋白结构发生显著变化, 二级结构变得松散。LUO 等^[67]利用 MD 模拟探究膜分离鲢鱼水解物对冰晶生长的抑制机理, 以预测其可能的结合位点, 并模拟其与水或冰之间的相互作用, 最终, 研究发现多肽的存在抑制了冰晶的形成和生长, 从而抑制了肌肉蛋白质在冻结过程中的变性劣化现象。

分子模拟和机器学习等计算方法可以预测冻融过程中肌原纤维蛋白的结构和性质变化。随着科技的发展,在不久的将来,分子动力学模拟技术将会在生物大分子的研究中占据主导地位,使得实验室无法完成的研究顺利进行,但蛋白质内部结构较为复杂,会因外界条件的变化而变化,MD模拟技术的应用受到了限制。因此,为了满足实验的需求,需要不断地完善计算机软件,做到理论与实践相结合。

2.3.3 相对和绝对定量同位素标记技术

iTRAQ 技术是一项用于检测蛋白质差异化表达的高通量技术,能够同时对蛋白质的功能进行深入分析,并实现对基因组中蛋白质种类的定性和定量鉴定。该技术使用多个同位素标记试剂对蛋白质多肽 N 端或赖氨酸侧链进行标记,然后采用高分辨率串联质谱分析,可以同时检测多达 8 个不同样品,定量鉴定各样品中蛋白质的差异表达情况。iTRAQ 技术具有灵敏度高、准确性高和可靠性强的优点^[82],已成为一种非常成熟的蛋白质组学分析技术,广泛应用于差异蛋白组学研究领域^[68]。

马聪聪^[69]利用 iTRAQ 技术探究了冻融三文鱼的新鲜度机理,共发现 38 个差异蛋白,与未冻融三文鱼新鲜度实验结果对比,发现有 7 种共同蛋白表现出不稳定性,外界条件的变化极易引起蛋白分子变化,说明即使在 -18°C 的冷冻条件下,三文鱼的肌原纤维蛋白仍会发生部分降解。古明辉^[22]通过 iTRAQ 技术结合液相色谱与串联质谱联用分析山羊肌原纤维蛋白在冻融过程中的变化,共发现了 159 种差异蛋白,与未冻融组进行对比分析发现,冻融一次和冻融两次的山羊肌肉 II 型胶原蛋白含量降低,这与山羊肉嫩度变化密切相关。SHI 等^[83]同样采用 iTRAQ 技术分析冻融泥虾肌肉中肌原纤维蛋白的变化情况,共检测到 226 个差异蛋白,并通过对其品质的进一步研究发现,关键差异蛋白及其相关机制与泥虾品质的改变密切相关。

近些年蛋白质组学的发展十分迅速,无论在基本理论还是技术方法方面都取得了巨大的进步,iTRAQ 技术以其独特的优势得到了比较广泛的应用,它可以克服凝胶电泳的局限性,能对任何分子量大小的蛋白质进行鉴定分析,并与高灵敏度、高精度的质谱和多维液相色谱技术以及生物信息学分析技术进行联合使用,以期更准确地识别冻融过程对肌原纤维蛋白结构和功能特性的影响。但 iTRAQ 试剂几乎可以和所有蛋白结合,容易被样品中的污染物所干扰,因此,样品的预处理需要严格把控。此外,iTRAQ 试剂昂贵,限制了此技术的推广。

3 总结与展望

肌肉食品是我国人民日常饮食中最主要的动物蛋白来源之一,备受广大消费者的青睐。目前肌肉食品的贮藏方式通常以冻藏为主,然而,反复冷冻-解冻过程容易诱导肌原纤维蛋白发生氧化变性劣化的现象,严重影响食品品

质。因此,检测肌原纤维蛋白结构特性的变化被认为是评价解冻肌肉食品品质的重要方向。

本文系统地分析了现代检测技术在评价冻融肌原纤维蛋白结构特性方面的研究进展和应用情况。与 BPB 探针、DSC 和 DTNB 探针等传统检测技术相比,现代检测技术具有很多优势,如拉曼光谱可远程无损分析样品,FTIR 扫描速度快,CLSM 能够观察样品深层结构,AFM 可以获得高分辨率的三维图像信息,LF-NMR 和 MRI 技术对样品需求量较少,MD 模拟技术无需实验操作即可对蛋白质的分子结构特性进行分析等。尽管如此,这些检测技术目前仍存在一些不足之处,如 FTIR 技术价格昂贵,CLSM 技术的穿透力和分辨率受限,TEM 在应用时需要真空环境且对样品有破坏性,SEM 技术制样较烦琐,LF-NMR 和 MRI 技术的设备成本较高等。

目前,国内的新技术和仪器商品化水平较低,大部分仍处于实验室研究阶段,无法满足实际生产和快速检验的需求。因此,许多肉品生产企业仍主要采用传统检测技术来评价冻融对肌原纤维蛋白品质的影响,而现代检测技术的应用还不够广泛。现代检测技术虽然弥补了传统检测技术的部分缺陷,但仍存在诸多问题需要解决。为了满足肉品加工企业实际生产过程的需求,未来需要进一步优化相关检测技术,使其操作更简单、更易实施。同时,依据各种现代检测方法的特点以及肌肉类食品原料及其加工制品的结构特性与研究目的,可以考虑选择合适的检测技术或多种技术联合使用,有助于提高肌原纤维蛋白结构与品质功能特性的检测效率和准确性,从而进一步提高冷冻肌肉食品的质量和水平。

肌原纤维蛋白在冷冻-解冻过程中极易发生结构变化,进而影响品质特性。大量研究表明^[84-85],冷冻-解冻过程对肌原纤维蛋白的品质起着至关重要的作用。因此,未来可以集中于优化冷冻速率、解冻温度、时间等工艺参数,并探索超声波处理、电场处理等辅助冷冻-解冻技术对肌原纤维蛋白影响的改善作用。同时,可以探索新型的保鲜和改良技术,以延长冻融肌原纤维蛋白保鲜期,例如利用纳米技术、高压处理、等离子体处理等方法对肌原纤维蛋白进行改性,有效改善冻融过程对肌原纤维蛋白结构的影响,提高肌肉及肌肉类食品的质地和营养品质,以期在冷冻肉品生产和加工工业化中推广应用并提供技术支持。

参考文献

- [1] 夏秀芳,孔保华,郭园园,等.反复冷冻-解冻对猪肉品质特性和微观结构的影响[J].中国农业科学,2009,42(3):982-988.
XIA XF, KONG BH, GUO YY, *et al.* Effect of freeze-thawing cycles on the quality properties and microstructure of pork muscle [J]. *Sci Agric Sin*, 2009, 42(3): 982-988.
- [2] 丁一,黄莉,夏秀芳,等.冻藏对肌原纤维蛋白结构特性与功能特性的影响[J].包装与食品机械,2013,31(4):55-59.
DING Y, HUANG L, XIA XF, *et al.* Effect of frozen storage on the structure and function of myofibrillar protein [J]. *Packag Food Mach*,

- 2013, 31(4): 55–59.
- [3] LIU HT, ZHANG H, LIU Q, *et al.* Filamentous myosin in low-ionic strength meat protein processing media: Assembly mechanism, impact on protein functionality, and inhibition strategies [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2021, 112: 25–35.
- [4] 罗永康. 鲢鱼肉冻藏期间理化特性的变化[J]. *肉类研究*, 1996, 4: 16–19.
- LUO YK. Effect of frozen storage on the salt-soluble protein of silver carp muscle [J]. *Meat Res*, 1996, 4: 16–19.
- [5] ZHANG B, FANG CD, HAO GJ, *et al.* Effect of kappa-carrageenan oligosaccharides on myofibrillar protein oxidation in peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during long-term frozen storage [J]. *Food Chem*, 2018, 245: 254–261.
- [6] ZHANG LT, SHAN YK, HONG H, *et al.* Prevention of protein and lipid oxidation in freeze-thawed bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) fillets using silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fin hydrolysates [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 123(C): 109050.
- [7] TENG XY, CONG XH, CHEN LP, *et al.* Effect of repeated freeze-thawing on the storage quality of pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. *J Food Meas Charact*, 2022, 16(6): 1–9.
- [8] 夏秀芳, 李芳菲, 田佳艺, 等. 低温冻藏对肌原纤维蛋白凝胶特性的影响[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(1): 163–170.
- XIA XF, LI FF, TIAN JY, *et al.* Effect of the low temperature freezing storage on gel property of myofibril protein [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2019, 19(1): 163–170.
- [9] CHEN QM, XIE YF, XI JZ, *et al.* Characterization of lipid oxidation process of beef during repeated freeze-thaw by electron spin resonance technology and Raman spectroscopy [J]. *Food Chem*, 2018, 243: 58–64.
- [10] 曹新桥. 反复冻融对鸭胸肉品质的影响[J]. *肉类工业*, 2022, (9): 13–18.
- CAO XQ. Effect of repeated freezing and thawing on the quality of duck breast meat [J]. *Meat Ind*, 2022, (9): 13–18.
- [11] 乔鑫, 潘丽, 刘莹, 等. 反复冻融对羊肉蛋白质氧化及其品质影响的研究[J]. *食品科技*, 2021, 46(9): 109–115.
- QIAO X, PAN L, LIU Y, *et al.* Effect of repeated freezing and thawing on protein oxidation and quality of mutton [J]. *Food Sci Technol*, 2021, 46(9): 109–115.
- [12] 高文宏, 叶瑞森, 潘廷跳, 等. 基于拉曼光谱解析冻藏过程中鱼糜蛋白的结构变化[J]. *食品科学*, 2018, 39(24): 71–77.
- GAO WH, YE RS, PAN TT, *et al.* Analysis of structural changes of surimi proteins during frozen storage by Raman spectroscopy [J]. *Food Sci*, 2018, 39(24): 71–77.
- [13] TAN MT, YE JX, XIE J. Freezing-induced myofibrillar protein denaturation: Role of pH change and freezing rate [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2021, 152: 112381.
- [14] ZHANG MC, LI FF, DIAO XP, *et al.* Moisture migration, microstructure damage and protein structure changes in porcine longissimus muscle as influenced by multiple freeze-thaw cycles [J]. *Meat Sci*, 2017, 133: 10–18.
- [15] TAN MT, DING ZY, XIE J. Freezing-induced myofibrillar protein denaturation: Contributions of freeze-concentration and role of cellobiose [J]. *J Food Eng*, 2022, 329: 111076.
- [16] 包鹏起. 外源性赖氨酸、精氨酸对冷冻猪背长肌(*Longissimus muscles*)保水性的影响及机理研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2021.
- BAO PQ. Study on the effect of exogenous lysine and arginine on the water holding capacity of the frozen porcine *Longissimus lumborum* and its mechanism [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2021.
- [17] DING JJ, ZHAO XY, LI XX, *et al.* Effects of different recovered sarcoplasmic proteins on the gel performance, water distribution and network structure of silver carp surimi [J]. *Food Hydrocolloid*, 2022, 131: 107835.
- [18] GAO YF, LUO C, ZHANG JY, *et al.* Konjac glucomannan improves the gel properties of low salt myofibrillar protein through modifying protein conformation [J]. *Food Chem*, 2022, 393: 133400.
- [19] FAN LX, RUAN DN, SHEN JD, *et al.* The role of water and oil migration in juiciness loss of stuffed fish ball with the fillings of pig fat/meat as affected by freeze-thaw cycles and cooking process [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2022, 159: 113244.
- [20] 钱书意, 李侠, 孙圳, 等. 不同冻结温度下牛肉的肌原纤维蛋白变性性与肌肉持水性[J]. *食品科学*, 2018, 39(15): 24–30.
- QIAN SY, LI X, SUN Z, *et al.* Myofibrillar protein denaturation and water-holding capacity of beef frozen at different temperatures [J]. *Food Sci*, 2018, 39(15): 24–30.
- [21] 张文娣. 基于物化特性、空间效应及分子动力学模拟研究不同解冻方式对海鲈鱼品质的影响[D]. 锦州: 渤海大学, 2021.
- ZHANG WD. Effects on the quality of sea bass by different thawing treatments based on physicochemical characteristics, spatial effects and molecular dynamics simulation [D]. Jinzhou: Bohai University, 2021.
- [22] 古明辉. 猕猴桃多酚对冷藏和冻融过程中羊肉品质的影响及蛋白组学分析[D]. 西安: 陕西师范大学, 2021.
- GU MH. Effects of kiwifruit polyphenols on the quality of lamb meat during refrigeration and freeze-thaw processes and proteomics analysis [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2021.
- [23] WANG XJ, MUHOZA B, WHANG XW, *et al.* Comparison between microwave and traditional water bath cooking on saltiness perception, water distribution and microstructure of grass carp meat [J]. *Food Res Int*, 2019, 125: 108521.
- [24] ZHANG LT, LI Q, HONG H, *et al.* Prevention of protein oxidation and enhancement of gel properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi by addition of protein hydrolysates derived from surimi processing by-products [J]. *Food Chem*, 2020, 316(C): 126343.
- [25] 许丹, 韩悦, 郑斌, 等. 基于组织蛋白酶催化的不冻液冻结中华管鞭虾中肌原纤维蛋白氧化分析[J]. *食品科学*, 2023, 44(4): 71–77.
- XU D, HAN Y, ZHENG B, *et al.* Myofibrillar protein oxidation in immersion-frozen red shrimp (*Solenocera crassicornis*) during frozen storage: Analysis based on changes of endogenous enzyme activity [J]. *Food Sci*, 2023, 44(4): 71–77.
- [26] ZHANG YM, MAGRO A, PUOLANNE E, *et al.* Myofibrillar protein characteristics of fast or slow frozen pork during subsequent storage at -3 C [J]. *Meat Sci*, 2021, 176: 108468.
- [27] WATSON ES, O'NEILL MJ, YUSTIN J, *et al.* A differential scanning calorimeter for quantitative differential thermal analysis [J]. *Anal Chem*, 2002, 36(7): 1233–1238.
- [28] LEYVA-POORRAS C, CRUZ-ALCANTAR P, ESPINOSA-SOLÍS V, *et al.* Application of differential scanning calorimetry (DSC) and modulated differential scanning calorimetry (MDSC) in food and drug industries [J]. *Polymers*, 2019, 12(1): 5.
- [29] 陈清敏. 反复冻融牛肉品质变化评价技术的适用性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- CHEN QM. The applicability study of techniques in evaluating the quality changes of repeated freeze-thaw beef [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [30] 肖宇, 古明辉, 张昊阳, 等. 羊肉冻融过程中蛋白质变性的 DSC 热学分析[J]. *食品与生物技术学报*, 2022, 41(9): 30–36.
- XIAO Y, GU MH, ZHANG HY, *et al.* DSC thermal analysis of protein denaturation in mutton during freezing-thawing process [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2022, 41(9): 30–36.
- [31] 张雪霁. 总硫基检测试剂比色法研究进展[J]. *化学分析计量*, 2021, 30(9): 99–103.
- ZHANG XJ. Progress of ellman method [J]. *Chem Anal Meterage*, 2021, 30(9): 99–103.
- [32] 吴晨燕, 杨梅, 王珂莉, 等. 反复冻融过程中开背调味鱼品质及蛋白质特性的变化[J]. *食品科学*, 2021, 42(9): 206–213.
- WU CY, YANG M, WANG KL, *et al.* Changes in the quality and protein properties of seasoned fish during repeated freeze-thaw cycles [J]. *Food Sci*, 2021, 42(9): 206–213.

- [33] 张龙腾, 洪惠, 罗永康, 等. 鱼糜副产物酶解物对冻融鲢鱼鱼糜品质的影响[J]. 肉类研究, 2019, 33(10): 1-7.
ZHANG LT, HONG H, LUO YK, *et al.* Effect of addition of hydrolysates derived from surimi processing byproducts on quality changes of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi after multiple freeze-thaw cycles [J]. Meat Res, 2019, 33(10): 1-7.
- [34] LIU KL, HE YS, WANG Z, *et al.* Progress in determination of protein secondary structure by Fourier infrared spectroscopy and Raman spectroscopy [J]. Food Ferment Ind, 2023, 49(10): 293-298.
- [35] 杨雪凡, 张维, 顾欣哲, 等. 拉曼光谱在食品加工及品质控制中的应用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(19): 361-368.
YANG XF, ZHANG W, GU XZ, *et al.* The application of raman spectroscopy in quality control and food processing [J]. Food Ind Sci Technol, 2020, 41(19): 361-368.
- [36] 汪少芸, 李晓贞, 陈旭, 等. 鱼源抗冻多肽对鱼糜肌原纤维蛋白的冻融保护作用[J]. 广东海洋大学学报, 2023, 43(1): 78-86.
WANG SY, LI XZ, CHEN X, *et al.* Cryoprotective effect of fish-derived antifreeze peptides on surimi myofibrillar protein during freeze-thaw cycles [J]. J Guangdong Ocean Univ, 2023, 43(1): 78-86.
- [37] YANG FJ, JIANG WT, CHEN X, *et al.* Investigation on the quality regulating mechanism of antifreeze peptides on frozen surimi: From macro to micro [J]. Food Res Int, 2023, 163: 112299.
- [38] CHEN QM, XIE YF, YU H, *et al.* Application of raman spectroscopy in a correlation study between protein oxidation/denaturation and conformational changes in beef after repeated freeze-thaw [J]. Int J Food Sci Technol, 2021, 57(1): 719-727.
- [39] 杜谷, 王坤阳, 冉敬, 等. 红外光谱/扫描电镜等现代大型仪器岩石矿物鉴定技术及其应用[J]. 岩矿测试, 2014, 33(5): 625-633.
DU G, WANG KY, RAN J, *et al.* Application of IR/SEM and other modern instruments for mineral identification [J]. Rock Miner Anal, 2014, 33(5): 625-633.
- [40] 尹燕霞, 向本琼, 佟丽. 荧光光谱法在蛋白质研究中的应用[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(2): 33-36, 40.
YIN YX, XIANG BQ, TONG L. The application of studying fluorescence spectroscopy on protein [J]. Exp Technol Manage, 2010, 27(2): 33-36, 40.
- [41] WAN W, FENG J, WANG H, *et al.* Influence of repeated freeze-thaw treatments on the oxidation and degradation of muscle proteins from mirror carp (*Cyprinus carpio* L.), based on myofibrillar protein structural changes [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 226: 454-462.
- [42] LI JG, MA XY, WANG Y, *et al.* Effects of immersion freezing on the conformational changes of myofibrillar proteins in pork under ultrasonic power densities of 0, 15, 30 and 45 W/L-1 [J]. Int J Food Sci Technol, 2022, 57(5): 2896-2905.
- [43] 马亢, 周庆峰, 施传信, 等. 激光共聚焦显微镜技术进展[J]. 农学报, 2016, 6(6): 30-35.
MA K, ZHOU QF, SHI CX, *et al.* The progress of confocal laser scanning microscope [J]. J Agric, 2016, 6(6): 30-35.
- [44] 陈晨, 陆乃彦, 范大明, 等. 激光共聚焦扫描显微镜技术在不同食品体系中的应用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(17): 4581-4586.
CHEN C, LU NY, FAN DM, *et al.* Application of confocal laser scanning microscope in food system [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(17): 4581-4586.
- [45] PAN N, BAI X, KONG BH, *et al.* The dynamic change in the degradation and *in vitro* digestive properties of porcine myofibrillar protein during freezing storage [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 234: 123682.
- [46] TAN MT, DING ZY, MEI J, *et al.* Effect of cellobiose on the myofibrillar protein denaturation induced by pH changes during freeze-thaw cycles [J]. Food Chem, 2021, 373(PB): 131511.
- [47] 李桢祺, 尹明雨, 王红丽, 等. 水产品肌肉组织微观结构变化及其检测方法研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 278-286.
LI ZZ, YIN MY, WANG HL, *et al.* Research progress on the micro-structure changes and its detection methods for aquatic product muscle tissue [J]. Food Sci, 2023, 44(9): 278-286.
- [48] 张保林, 弋楠, 朱蓉英, 等. 透射电镜与扫描电镜分析[J]. 无线互联科技, 2016, (23): 25-26.
ZHANG BL, YI N, ZHU RY, *et al.* Analysis of transmission electron microscope and scanning electron microscope [J]. Wireless Net Technol, 2016, (23): 25-26.
- [49] ZHANG MC, LI FF, DIAO XP, *et al.* Moisture migration, microstructure damage and protein structure changes in porcine longissimus muscle as influenced by multiple freeze-thaw cycles [J]. Meat Sci, 2017, 133: 10-18.
- [50] 傅场, 吴序嘉, 祁少海, 等. 普通扫描电子显微镜、环境扫描电子显微镜和激光共聚焦扫描电子显微镜在组织工程学中的应用[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2016, 11(4): 305-309.
FU Y, WU XJ, QI SH, *et al.* Application of ordinary scanning electron microscope, environmental scanning electron microscope and laser scanning confocal electron microscope in tissue engineering [J]. Chin J Int Repair Wound Healing (Electron Ed), 2016, 11(4): 305-309.
- [51] LI XH, LI SG, SHI GP, *et al.* Quantitative proteomics insights into gel properties changes of myofibrillar protein from *Procambarus clarkii* under cold stress [J]. Food Chem, 2022, 372: 130935.
- [52] LI FF, DU X, WANG B, *et al.* Inhibiting effect of ice structuring protein on the decreased gelling properties of protein from quick-frozen pork patty subjected to frozen storage [J]. Food Chem, 2021, 353: 129104.
- [53] WANG ZM, HE Z, LI HJ. The effect of repeated freeze-thaw cycles on the meat quality of rabbit [J]. World Rabbit Sci, 2018, 26(2): 165-177.
- [54] JI HF, HOU XZ, ZHANG LW, *et al.* Effect of ice-temperature storage on some properties of salt-soluble proteins and gel from chicken breast muscles [J]. Cyta-J Food, 2021, 19(1): 521-531.
- [55] 朱杰, 孙润广. 原子力显微镜的基本原理及其方法学研究[J]. 生命科学仪器, 2005, (1): 22-26.
ZHU J, SUN RG. Introduction to atomic force microscope and its manipulation [J]. Life Sci Inst, 2005, (1): 22-26.
- [56] 陈耀文, 林月娟, 张海丹, 等. 扫描电子显微镜与原子力显微镜技术之比较[J]. 中国体视学与图像分析, 2006, (1): 53-58.
CHEN YW, LIN YJ, ZHANG HD, *et al.* The comparison of SEM and AFM techniques [J]. Chin J St Image Anal, 2006, (1): 53-58.
- [57] LI FF, WANG B, KONG BH, *et al.* Decreased gelling properties of protein in mirror carp (*Cyprinus carpio*) are due to protein aggregation and structure deterioration when subjected to freeze-thaw cycles [J]. Food Hydrocolloid, 2019, 97(C): 105223.
- [58] WANG B, DU X, KONG BH, *et al.* Effect of ultrasound thawing, vacuum thawing, and microwave thawing on gelling properties of protein from porcine longissimus dorsi [J]. Ultrason Sonochem, 2020, 64: 104860.
- [59] 杨赫鸿, 李沛军, 孔保华, 等. 低场核磁共振技术在肉品科学研究中的应用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 400-405.
YANG HH, LI PJ, KONG BH, *et al.* Application of low field nuclear magnetic resonance in meat science [J]. Food Ind Sci Technol, 2012, 33(13): 400-405.
- [60] QIAN SY, LI X, WANG H, *et al.* Effect of sub-freezing storage (-6, -9 and -12°C) on quality and shelf life of beef [J]. Int J Food Sci Technol, 2017, 53(9): 2129-2140.
- [61] 庞之列, 殷燕, 李春保. 解冻猪肉品质和基于 LF-NMR 技术的检测方法[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 219-223.
PANG ZL, YIN Y, LI CB. Applicability of LF-NMR to detect quality of thawed pork [J]. Food Sci, 2014, 35(24): 219-223.
- [62] 王小荃. 基于磁共振技术的牛肉冷冻贮藏品质无损检测方法研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2019.
WANG XH. Nondestructive method for beef quality measurement during frozen and chilling storage based on magnetic resonance technology [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2019.
- [63] VAGADIA BH, VANGA SK, SINGH A, *et al.* Effects of thermal and electric fields on soybean trypsin inhibitor protein: A molecular modelling study [J]. Innov Food Sci Emerg, 2016, 35: 9-20.
- [64] 李靖, 袁乙平, 刘婷, 等. 基于低场核磁共振技术的冷冻猪背最长肌品

- 质变化研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 149–155.
- LI J, YUAN YP, LIU T, *et al.* Research on the change of quality of pork longissimus dorsi during the frozen period based on low field nuclear magnetic resonance technology [J]. Food Mach, 2019, 35(5): 149–155.
- [65] 马莹, 杨菊梅, 王松磊, 等. 基于 LF-NMR 及成像技术分析牛肉贮藏水分含量变化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(2): 278–284.
- MA Y, YANG JM, WANG SL, *et al.* Analysis of water content in beef storage by LF-NMR and imaging technique [J]. Food Ind Sci Technol, 2018, 39(2): 278–284.
- [66] 刘冠辰. 分子动力学模拟及在生物大分子模拟领域的应用[J]. 吉林化工学院学报, 2015, 32(11): 112–116.
- LIU GC. Basic principle of molecular dynamics and application in the filed of biologic molecules simulation [J]. J Jilin Inst Chem Technol, 2015, 32(11): 112–116.
- [67] LUO W, YUAN CZ, WU JH, *et al.* Inhibition mechanism of membrane-separated silver carp hydrolysates on ice crystal growth obtained through experiments and molecular dynamics simulation [J]. Food Chem, 2023, 414: 135695.
- [68] 谢秀枝, 王欣, 刘丽华, 等. iTRAQ 技术及其在蛋白质组学中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(7): 616–621.
- XIE XZ, WANG X, LIU LH, *et al.* iTRAQ technology and its application in proteomics [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2011, 27(7): 616–621.
- [69] 马聪聪. 基于蛋白质组学的三文鱼物种鉴别及新鲜度变化机理研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2020.
- MA CC. Identification of salmon species and the mechanism of freshness change based on proteomics [D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science & Technology, 2020.
- [70] 陈乃鹏. 傅里叶变换红外光谱对酒的鉴定综述[J]. 当代化工研究, 2019, (6): 22–24.
- CHEN NP. Review on identification of wine by fourier transform infrared spectroscopy [J]. Mod Chem Res, 2019, (6): 22–24.
- [71] ZHANG M, LI CL, ZHANG YP, *et al.* Impact of salt content and hydrogen peroxide-induced oxidative stress on protein oxidation, conformational/morphological changes, and micro-rheological properties of porcine myofibrillar proteins [J]. Food Chem, 2022, 370: 131074.
- [72] 王春梅. 激光扫描共聚焦显微镜技术[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2004.
- WANG CM. Development of confocal microscopy and its application [M]. Xian: Fourth Military Medical University Press, 2004.
- [73] 陈骋, 韩玲, 余群力, 等. 冻融对牦牛肉色、微观结构和蛋白质降解的影响[J]. 农业机械学报, 2015, 46(10): 290–297.
- CHEN C, HAN L, YU QL, *et al.* Impact of freeze-thaw cycles on color, microstructure and protein degradation of yak meat [J]. Trans Chin Soc Agric Mach, 2015, 46(10): 290–297.
- [74] LAN WQ, HU XY, SUN XH, *et al.* Effect of the number of freeze-thaw cycles number on the quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): An emphasis on moisture migration and microstructure by LF-NMR and SEM [J]. Aqu Fish, 2020, 5(4): 193–200.
- [75] TIAN ZH, JIANG X, XIAO NY, *et al.* Assessing the gel quality and storage properties of hypophthalmichthys molitrix surimi gel prepared with epigallocatechin gallate subject to multiple freeze-thaw cycles [J]. Foods, 2022, 11(11): 1612.
- [76] HU CL, XIE J. The effect of multiple freeze-thaw cycles on protein oxidation and quality of *Trachurus murphyi* [J]. J Food Process Pres, 2021, 45(12): e15998.
- [77] 阮榕生. 核磁共振技术在食品和生物体系中的应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009.
- RUAN RS. Application of nuclear magnetic resonance technology in food and biological systems [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2009.
- [78] 陈珊珊, 李然, 俞捷, 等. 永磁低场核磁共振分析仪原理和应用[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(10): 49–53.
- CHEN SS, LI R, YU J, *et al.* The principle and application of nuclear magnetic resonance analyst instrument in low-field [J]. Life Sci Inst, 2009, 7(10): 49–53.
- [79] 蓝蔚青, 孙雨晴, 肖蕾, 等. 冻融循环对大目金枪鱼质构与蛋白质特性变化的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(7): 240–246.
- LAN WQ, SUN YQ, XIAO L, *et al.* Effects of freeze-thaw cycles on texture properties and protein properties in big-eye tuna (*Thunnus obesus*) [J]. Food Sci, 2021, 42(7): 240–246.
- [80] FRELKA JC, PHINNEY DM, YANG X, *et al.* Assessment of chicken breast meat quality after freeze/thaw abuse using magnetic resonance imaging techniques [J]. J Sci Food Agric, 2019, 99(2): 844–853.
- [81] KAEPLU M, MCCAMMON JA. Molecular dynamics simulations of biomolecules [J]. Nat Struct Biol, 2002, 9(9): 646–652.
- [82] XIA L, SHENG L, PING D, *et al.* iTRAQ-based comparative proteome analysis for molecular mechanism of defense against acute ammonia toxicity in pacific white shrimp *litopenaeus vannamei* [J]. Fish Shellfish Immun, 2018, 74: 52–61.
- [83] SHI J, ZHANG LT, LEI YT, *et al.* Differential proteomic analysis to identify proteins associated with quality traits of frozen mud shrimp (*Solenocera melanthero*) using an iTRAQ-based strategy [J]. Food Chem, 2018, 251: 25–32.
- [84] 谭明堂, 谢晶, 王金锋. 解冻方式对鲑鱼品质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(13): 94–101.
- TAN MT, XIE J, WANG JF. Effects of different thawing methods on quality of squid [J]. Food Sci, 2019, 40(13): 94–101.
- [85] 刘磊, 夏强, 曹锦轩, 等. 不同解冻方法对鹅腿肉理化特性和品质的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(15): 256–261.
- LIU L, XIA Q, CAO JX, *et al.* Influence of different thawing methods on physicochemical properties and quality of goose thigh meat [J]. Food Sci, 2020, 41(15): 256–261.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介



李 阳, 硕士研究生, 主要研究方向为畜产品蛋白质化学特性。
E-mail: liyang10162022@163.com



张月美, 博士, 副教授, 主要研究方向为畜产品蛋白质化学特性。
E-mail: zhangyuemei@btbu.edu.cn



曹锦轩, 博士, 教授, 主要研究方向为畜产品加工与资源功能化利用。
E-mail: caojinxuan@btbu.edu.cn