

高压均质处理次数对肌原纤维蛋白水溶液结构及理化特性的影响

李雨枫, 薛思雯, 陈 星, 李 鸣, 徐幸莲*

(南京农业大学食品科技学院, 国家肉品质量安全控制工程技术研究中心, 江苏 南京 210095)

摘要: 以鸡肉中的肌原纤维蛋白(myofibrillar proteins, MP)为对象, 研究在103 MPa压力条件下不同高压均质(high pressure homogenization, HPH)处理次数(1~6次)对MP水溶液结构以及理化特性的影响。结果表明: HPH可以显著提高MP在水中的溶解性($P < 0.05$)。随着HPH处理次数的增加, MP在水溶液中的粒径先减小后变大; 表观黏度减小, 流动能力增强; 表面疏水性和活性巯基含量先增加后减少; 圆二色光谱结果显示不同HPH处理次数对MP水溶液的二级结构构象的影响不同; 过多的HPH处理次数会导致MP水溶液中蛋白质聚集, 从而影响其溶解性和稳定性; 经过4次HPH处理的MP水溶液具有较好的溶解性和稳定性。说明通过选择适当次数的HPH处理可以实现对MP在水中溶解性的调控, 为其在食品加工中的应用提供新思路。

关键词: 肌原纤维蛋白; 高压均质; 溶解性; 稳定性; 非热加工

Changes in Structure and Physicochemical Properties of Myofibrillar Proteins Subjected to Different Cycles of High Pressure Homogenization Treatment

LI Yufeng, XUE Siwen, CHEN Xing, LI Ming, XU Xinglian*

(National Center of Meat Quality and Safety Control, College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to elucidate the effect of high pressure homogenization (HPH) cycles on the structure and physicochemical properties of chicken myofibrillar proteins (MPs) in aqueous solutions, HPH treatment was applied to homogenize MP aqueous solutions at a pressure of 103 MPa for 1–6 cycles. The results showed that the solubility of MPs was improved significantly by HPH treatment ($P < 0.05$). As the number of HPH treatment cycles increased, the particle size of MPs in aqueous solutions decreased initially and then increased; the apparent viscosity declined and the flowability rose; both the surface hydrophobicity and reactive sulfhydryl group content increased, followed by a decrease. Circular dichroism showed that different HPH cycles had distinct effects on the secondary structures of MPs. Excessive HPH cycles could lead to the aggregation of MPs in aqueous solutions, thereby affecting its solubility and stability. The solubility and stability of MPs remained quite good after 4 cycles of HPH treatment. Therefore, the aqueous solubility of MPs can be controlled by selecting the appropriate cycles of HPH treatment, which will provide a new idea for its application in food processing.

Keywords: myofibrillar proteins; high pressure homogenization; solubility; stability; non-thermal processing

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180911-111

中图分类号: TS251.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2019)15-0127-08

引文格式:

李雨枫, 薛思雯, 陈星, 等. 高压均质处理次数对肌原纤维蛋白水溶液结构及理化特性的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 127-134. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180911-111. <http://www.spkx.net.cn>

LI Yufeng, XUE Siwen, CHEN Xing, et al. Changes in structure and physicochemical properties of myofibrillar proteins subjected to different cycles of high pressure homogenization treatment[J]. Food Science, 2019, 40(15): 127-134. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180911-111. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2018-09-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671875); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-41)

第一作者简介: 李雨枫(1993—)(ORCID: 0000-0003-2659-7848), 男, 硕士研究生, 研究方向为肉品加工及质量安全控制。

E-mail: yufeng1029@foxmail.com

*通信作者简介: 徐幸莲(1962—)(ORCID: 0000-0003-4507-3214), 女, 教授, 博士, 研究方向为肉品加工及质量安全控制。

E-mail: xlxu@njau.edu.cn

肌肉蛋白营养丰富, 包含人体所需的所有必需和非必需氨基酸, 其消化率远高于大豆蛋白等植物蛋白, 是一种优质的人体蛋白质补充剂^[1-2]。肌原纤维蛋白(myofibrillar proteins, MP)是肌肉蛋白中最主要的蛋白质, 大约占肌肉蛋白的50%左右^[3]。这部分蛋白质由于在高盐浓度溶液中易溶解, 故被称为盐溶蛋白^[4]。在肉品加工中, MP的溶解性会影响蛋白质的稳定性、乳化等功能特性, 所以具有特殊的功能性。但是相比于牛奶、大豆蛋白, 肌肉蛋白在食品加工中利用程度不高, 主要原因是其在水或者低离子强度溶液中不溶解, 从而导致肉制品形态单一。近年来, 为了提高MP的溶解性, 超声波^[5]、蛋白糖基化^[6-7]和低盐洗脱^[8]等新技术被广泛研究。

高压均质(high pressure homogenization, HPH)是一种运用于食品领域中的新型加工技术, 物料在高压作用下, 通过具有特殊内部构造的均质腔, 同时受到高速剪切、高频振荡、空穴作用和对流碰撞等物理作用, 使物料的性质发生一定变化, 从而达到均质、改善加工特性和杀菌的效果^[9-10]。目前已有研究表明, HPH的物理作用能够打破MP高度交联的复杂结构, 对MP进行物化改性, 从而提高MP的水溶性^[11]。同时, 不同次数的HPH处理可以对植物蛋白的蛋白结构、理化特性产生不同的影响, 从而提高植物蛋白在食品加工中的利用程度^[12-18]。但关于HPH处理次数对MP在水中溶解性的影响及其调控规律尚不清楚。作为一种人体蛋白质的重要补充来源, 开展HPH对MP在水中溶解性的调控规律研究很有必要。本实验对MP悬浊液进行不同次数的HPH处理, 并对处理后的MP水溶液溶解性、稳定性、粒径、流变特性、二级结构和三级结构的变化情况进行初步探究, 以期对肉蛋白在食品中的进一步开发利用提供一定的参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

冷冻鸡胸肉 江苏省南京市苏果超市。

三羟甲基氨基甲烷、盐酸、牛血清白蛋白、聚乙二醇辛基苯基醚、丙烯酰胺、双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、考马斯亮蓝R250、溴酚蓝、 β -巯基乙醇、五水硫酸铜、四水合酒石酸钾钠、氢氧化钠、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)、8-苯胺基-1-萘磺酸(8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, ANS)、叠氮化钠(均为分析纯) 南京瑞翼特生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

GM 200粉碎机 德国Retsch仪器有限公司; T25匀浆机 德国IKA仪器有限公司; Mini Debee超高压均质机 美国Bee仪器有限公司; Z5 (130 μm) 金刚石喷嘴

美国Genizer仪器有限公司; J26SXP落地式离心机 美国Beckman仪器有限公司; Nano ZS 90纳米激光粒度仪 英国马尔文仪器有限公司; MCR 301流变仪 澳大利亚Anton Paar有限公司; Dimension Icon原子力显微镜(atomic force microscope, AFM) 德国Bruker有限公司; Imager Scanner III EU-88扫描仪 日本Epson公司。

1.3 方法

1.3.1 MP的提取

根据Stefansson^[8]、Chen Xing^[11]的方法稍作修改, 采用水洗法提取MP。将冷冻的鸡胸肉在4 $^{\circ}\text{C}$ 下解冻12 h后, 去除结缔组织和脂质, 将鸡胸肉在粉碎仪中以3 000 r/min粉碎10 s, 用4 $^{\circ}\text{C}$ 的去离子水将碎肉(100 g)洗涤4次, 用匀浆机均质2 min。将每次洗涤后的肉糜与水(1:100, m/V)静置10 min, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 下18 000 $\times g$ 离心20 min, 回收沉淀物, 在第3次洗涤时, 将离心前的悬浊液用3层纱布过滤以去除结缔组织和脂质。最后一次洗涤、离心后的沉淀物即为MP。所有操作都在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。

1.3.2 HPH处理

提取后的MP质量浓度为60 mg/mL, 在MP中加入4 $^{\circ}\text{C}$ 去离子水将MP质量浓度稀释至5 mg/mL备用, 8 000 r/min匀浆处理2 min。用配备有Z5型号金刚石喷嘴的高压均质机将样品在10³ MPa压力下分别处理1~6次, 以未经过HPH处理的样品为对照组, 处理后将所有样品装入无菌袋保存, 为了防止微生物污染对实验结果产生影响, 添加质量分数0.02%的叠氮化钠作为防腐措施^[19], 所有样品置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮存备用。

1.3.3 溶解度的测定

溶解度的测定根据Chen Xing等^[11]的方法, 并略作修改。将经过处理后的样品在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 使用离心机在20 000 $\times g$ 下离心20 min, 收集上清液, 溶解度以离心后上清液MP质量浓度相对于离心前MP悬浊液质量浓度的百分比表示, 每个样品平行测定3次。

1.3.4 稳定性的测定

将经过处理后的MP水溶液在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置9 d, 在第0、3、6、9天分别测定其溶解度并进行记录, 每个样品平行测定3次。

1.3.5 SDS-PAGE分析

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)采用Khiari等^[20]的方法。将10 μL 经过20 000 $\times g$ 离心后的上清液样品、经过HPH处理的MP悬浊液样品和Marker同时加入到质量分数4%~20%预制分离胶上。使用Mini-PROTEAN II System Cell以120 V恒压电泳1 h。待条带跑至电泳板的最底部时停止电泳, 将胶剥离取出, 放置在染色液中染色1 h, 然后放入乙酸脱色液中脱色11~12 h, 及时更换脱色液。待电泳凝胶的底

色脱为透明时,使用Imager Scanner III扫描仪扫描染色的凝胶,并且通过Quantity One软件进行条带处理分析。

1.3.6 粒径分布的测定

根据Chen Xing等^[11]的方法并略作修改。使用Nano ZS 90纳米激光粒度仪进行测定。将通过0~6次HPH处理的MP水溶液稀释10倍后,分别置于1 cm光程石英比色杯中,并在25℃条件下进行测量,得到平均粒度和粒径分布。

1.3.7 流变特性的测定

使用MCR30流变仪获得样品的流动曲线^[21]。测量间距0.5 mm,测量前将样品在流变仪上平衡30 s以获得25℃的理想温度,在剪切速率1~1 000 s⁻¹范围内记录黏度。

1.3.8 AFM观察

参考Zhong Jian等^[22]的方法,通过使用配备有Si₃N₄悬臂式扫描仪的AFM获得以轻敲模式扫描的AFM图像(SCANASYST-AIR模式、共振频率70 kHz、弹簧系数0.4 N/m),实验在室温(25℃)下进行。线性扫描速率在1 Hz下进行优化,扫描分辨率为每行512个样本。用超纯去离子水将样品稀释至0.05 mg/mL,并将5 mL MP水溶液浇铸在新鲜切割的云母上,并使其在空气中干燥20 min,然后进行AFM观察。所有高度图像都使用Nanoscope分析软件进行“平滑”处理。

1.3.9 表面疏水性的测定

MP在水中表面疏水性的测定根据Cao Yingying等^[23]的方法进行修改。使用ANS测试表面疏水性。向2 mL样品(1 mg/mL)中加入10 μL 15 mmol/L ANS溶液(0.1 mol/L磷酸盐缓冲液,pH 7.0)。避光孵育20 min,使用380 nm的激发波长和410~570 nm的发射波长在5 nm/s扫描速率下测定荧光强度。表面疏水性用荧光强度(a.u.)表示。

1.3.10 活性巯基含量的测定

根据Chen Xing等^[24]的方法进行改进,测定水中MP的活性巯基基团含量。将MP水溶液用去离子水稀释到1 mg/mL,将50 μL 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)溶液(20 mmol/L磷酸盐缓冲液,pH 8.0)中加入4 mL样品(1 mg/mL),并在25℃条件下孵育20 min,并通过Microplate Reader分光光度计在412 nm波长处测定混合物的吸光度。使用13 600 L/(mol·cm)的摩尔消光系数按下式计算巯基含量。

$$\text{巯基含量}/(\mu\text{mol}/100\text{ mg}) = \frac{A_{412\text{ nm}} \times D \times 10^5}{13\ 600 \times \rho}$$

式中: $A_{412\text{ nm}}$ 为吸光度; D 为稀释倍数; ρ 为肌原纤维蛋白质量浓度/(mg/mL)。每个压力水平重复实验3次。

1.3.11 圆二色光谱分析

使用Jasco J-715分光偏振计测量圆二色光谱(circular dichroism, CD)。用去离子水将MP水溶液调整到0.3 mg/mL,随后转移至0.1 cm光径的石英池中。在调节

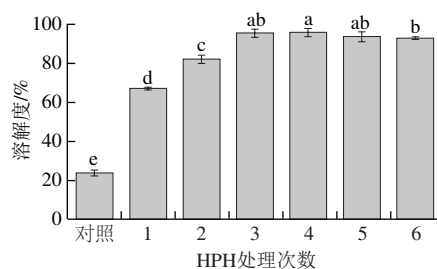
温度下以20 nm/min的扫描速率在200~240 nm的范围内测量分子椭圆率。使用Jasco J-715旋光偏振计提供的蛋白质二级结构计算程序测定 α -螺旋结构的相对含量。

1.4 数据分析

所有数据均重复实验3次,使用SAS软件对数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为显著差异。采用Origin 2017软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 HPH处理次数对MP水溶液溶解度的影响



小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。图2、5、9同。

图1 HPH处理次数对MP水溶液溶解度的影响

Fig. 1 Effect of HPH cycle on aqueous solubility of MPs

由图1可知,未经HPH处理的MP悬浊液呈现较低的溶解度(23.6%),说明MP在水中的溶解性较差^[5,11]。由于HPH在处理过程中会对物料产生高速剪切、空穴作用、对流撞击等机械作用,促使MP蛋白分子结构展开,极性基团和疏水基团更多地暴露出来,导致表面电荷增加,从而提高其溶解性。同时,Chen Xing等^[11]也通过103 MPa、2次HPH处理实现了MP在水或低离子强度溶液中的溶解。在本实验中,随着处理次数的增加,MP水溶液的溶解度持续上升,在4次处理时达到最高(96.1%)。当处理次数达到到5~6次时,MP溶解度增长放缓,甚至出现下降趋势,此时MP溶解度与经过4次处理的样品不存在明显差异。原因可能是蛋白质结构在经过多次HPH处理后进一步展开,导致蛋白质之间接触增加,在疏水作用下,蛋白质重新聚集,使得MP溶解度呈现降低趋势^[18]。

2.2 HPH处理次数对MP水溶液稳定性的影响

稳定性是蛋白质一种很重要的特性,良好的稳定性有利于蛋白质在食品加工中的进一步利用。将HPH处理后的MP水溶液在4℃条件下静置9 d,每隔3 d测定其溶解度,与未经HPH处理的样品进行对比,结果见图2。当HPH处理次数为1~3次时,与第0天相比,样品的溶解度在第9天时显著下降($P < 0.05$),其中经过1次HPH处理的MP水溶液在第9天时仅能保持40.0%的溶解度,原因可能是由于处理次数较少,蛋白质分子结构并未完全被破

坏,蛋白质颗粒大小不一,随着贮藏时间的延长,不同蛋白质分子的颗粒大小以及介质的密度差会导致蛋白质产生沉淀现象^[11],导致水溶液稳定性较差。当HPH处理4~6次时,水溶液在第9天时仍然保持较好的溶解性(90%以上),溶解度与静置初期相比没有明显下降。这可能是由于随着HPH处理次数的增加,蛋白质分子结构被进一步被完全破坏成较小的颗粒,从而提高了MP水溶液的均匀性,在贮藏过程中保持了较好的稳定性^[12]。其中当HPH处理次数为5~6次时,与处理4次相比,稳定性较差,随着处理次数增加,蛋白质可能会进一步聚集,导致蛋白质分子在MP水溶液中分布不均,从而影响其稳定性。

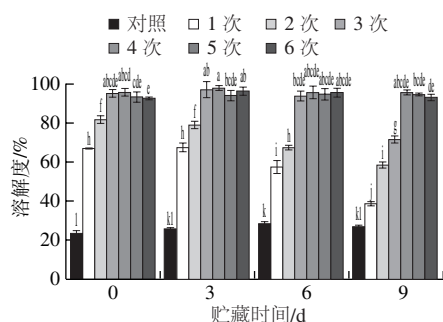
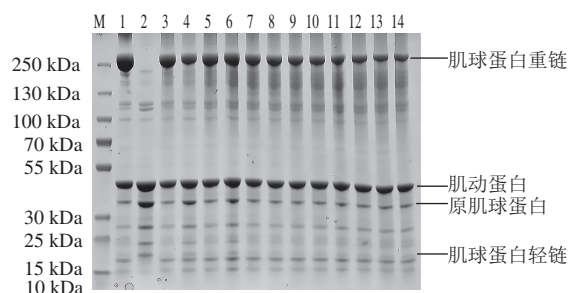


图2 HPH处理次数对MP水溶液稳定性的影响

Fig. 2 Effect of HPH cycle on stability of MPs in water

2.3 SDS-PAGE分析结果



泳道1、3、5、7、9、11、13.分别为处理0~6次的MP悬浊液;泳道2、4、6、8、10、12、14.分别为处理0~6次的MP悬浊液离心后的上清液。

图3 HPH处理后MP水溶液SDS-PAGE图谱

Fig. 3 SDS-PAGE patterns of MPs aqueous solutions undergoing different HPH cycles

由图3可知,未经HPH处理和经过HPH处理的样品蛋白条带中肌球蛋白重链、肌动蛋白、原肌球蛋白和肌球蛋白轻链较为明显。经过离心后的未经HPH处理的样品上清液几乎看不到蛋白条带(泳道2),说明MP在水中具有不溶性,这与之前的相关研究结果^[11,24]相符,证明MP不溶于水。经过20 000×g离心后,HPH处理的样品上清液仍然保留了部分蛋白质(泳道4、6、8、10、12和14),并且与未经离心的蛋白溶液条带相比没有明显差异。以上结果说明HPH实现MPs在水中溶解的同时,MP

没有发生明显的水解现象,因此HPH实现MP在水中的溶解并不是通过多肽的断裂或缩短引起的^[11,25]。

2.4 HPH处理次数对MP在水中颗粒特性的影响

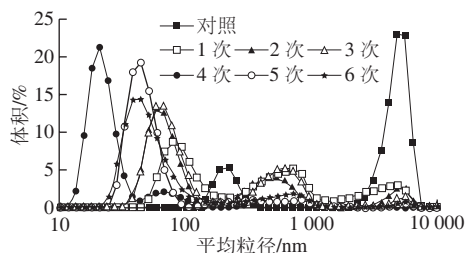


图4 HPH处理次数对MP在水中粒径分布的影响

Fig. 4 Effect of the HPH cycle on particle size distribution of MPs in water

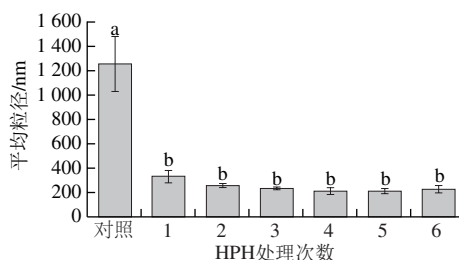


图5 HPH处理次数对MP在水中平均粒径的影响

Fig. 5 Effect of HPH cycle on Z-average of MPs in water

如图4、5所示,与未经处理的样品平均粒径(1 252 nm)相比,经过HPH处理后MP在水中的平均粒径显著下降($P < 0.05$),均为400 nm以下,同时呈现双峰分布,粒径分布变得更加均匀。当样品在高压作用下通过均质机时,高度有序的MP结构被破坏,施加的机械力对其产生随机破裂、解聚或解离等作用^[26],导致粒径减小。HPH处理1~4次时,样品的平均粒径随着处理次数的增加逐渐变小,分别为327、251、227、204 nm,同时粒径分布峰均向小粒径峰移动,其中在HPH处理4次时粒径最小。随着均质次数的增加,处理组的峰与空白组的间距增大,并且在第4次时达到最大,推测是由于样品循环进行HPH处理的过程中,HPH对样品施加反复的物理作用,样品在循环通过喷嘴时,蛋白颗粒的结构持续破坏。当HPH处理次数达到4次及以上时,其粒径分布峰开始向右移动,表现出向大粒径峰分布的趋势,同时,其平均粒径的降低不再显著($P > 0.05$)。有研究表明,当HPH的压力过高、均质次数过多时,可能会引起蛋白质的重新聚合,导致粒径增大^[11,17,27-28]。

2.5 HPH处理次数对MP水溶液流变特性的影响

由图6可知,经过HPH处理后,MP水溶液的表现黏度显著降低,其中未经HPH处理的样品与HPH处理1~2次的样品表现黏度都随着剪切速率的增加而表现出剪切变稀的现象,呈现非牛顿流体状态,说明蛋白溶

液中还保留着一些完整的MP片段，具有高黏度；其中大的蛋白颗粒以及大分子互相纠缠在一起，增加了溶液流动的阻力；随着剪切速率的增加，蛋白纤维之间的连接被破坏，摩擦阻力减小，导致黏度下降。当处理次数为3~6次时，可以看到与前3组相比，表观黏度显著下降，在剪切速率范围内呈现牛顿流体性质。可能是由于HPH次数增加时，蛋白粒径减小，流动性增加，所以呈现较低的表现黏度。HPH处理6次时，蛋白质之间重新聚集，粒径变大，导致其表观黏度较HPH处理5次相比有所增加。

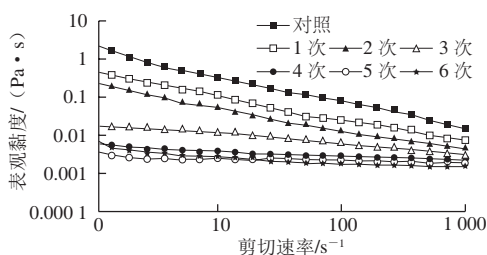
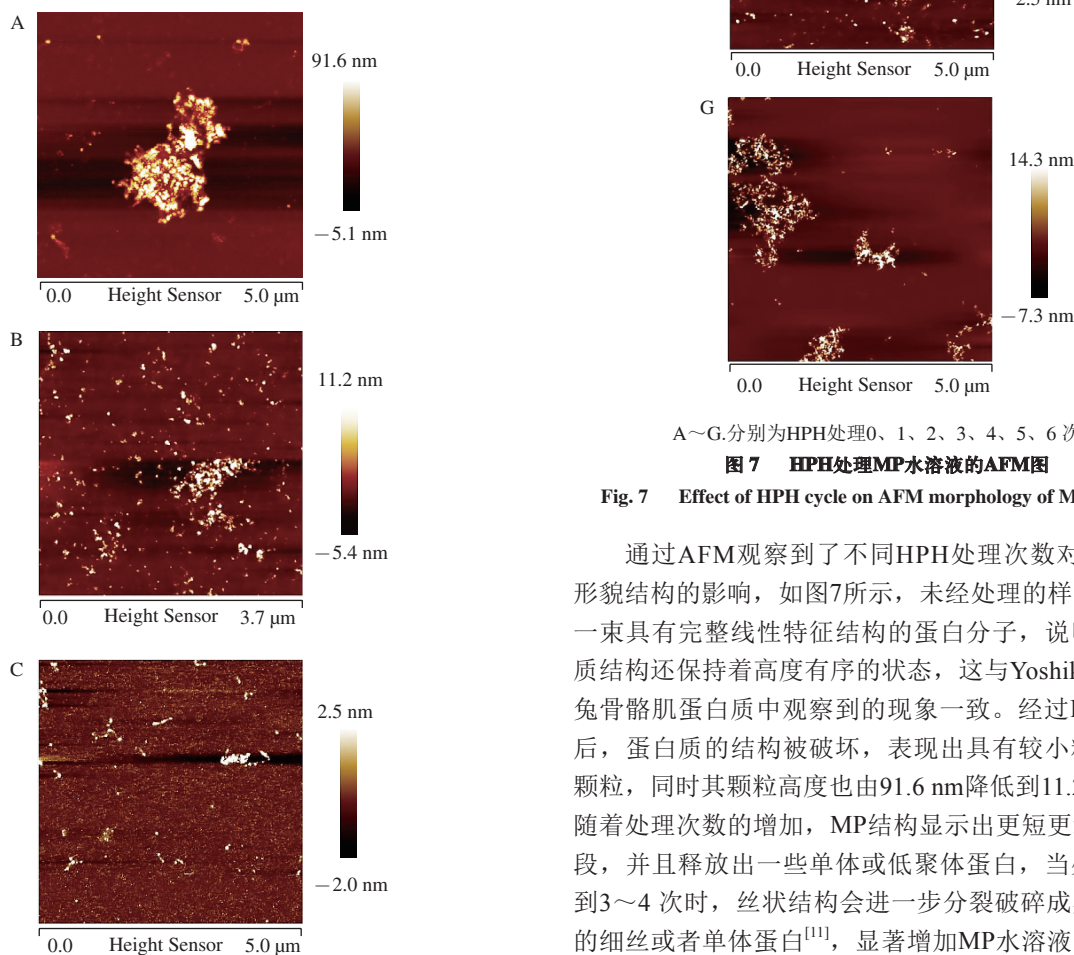


图6 HPH处理次数对MP水溶液流变特性的影响
Fig. 6 Effect of HPH cycle on flowability of MPs in water

2.6 HPH处理次数对MP水溶液形貌结构的影响



A~G.分别为HPH处理0、1、2、3、4、5、6次。
图7 HPH处理MP水溶液的AFM图
Fig. 7 Effect of HPH cycle on AFM morphology of MPs in water

通过AFM观察到了不同HPH处理次数对MP水溶液形貌结构的影响，如图7所示，未经处理的样品中观察到一束具有完整线性特征结构的蛋白分子，说明此时蛋白质结构还保持着高度有序的状态，这与Yoshikawa等^[27]在兔骨骼肌蛋白质中观察到的现象一致。经过HPH处理之后，蛋白质的结构被破坏，表现出具有较小粒径的分散颗粒，同时其颗粒高度也由91.6 nm降低到11.2 nm以下。随着处理次数的增加，MP结构显示出更短更细的丝状片段，并且释放出一些单体或低聚体蛋白，当处理次数达到3~4次时，丝状结构会进一步分裂破碎成具有亚单位的细丝或者单体蛋白^[11]，显著增加MP水溶液的分散性。

当处理次数达4次以上时,如图7E~G所示,由于处理次数过多,蛋白质分子间或分子内的相互作用,形成了一些较大颗粒的不规则聚集物^[11],同时观察到样品的颗粒高度在处理6次时明显增加。

2.7 HPH处理次数对MP水溶液表面疏水性的影响

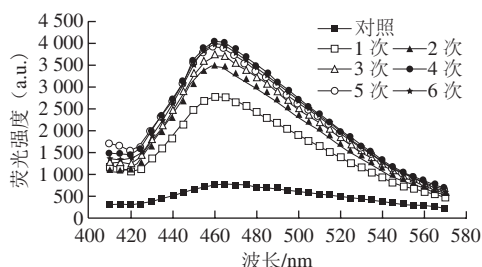


图8 HPH处理次数对MP水溶液表面疏水性的影响

Fig. 8 Effect of HPH cycle on surface hydrophobicity of MPs in water

表面疏水性可以反映蛋白质表面疏水性基团的数量,它决定蛋白质分子间相互作用的能力,对蛋白质结构的稳定性、功能性质及构象具有重要的作用。如图8所示,未经HPH处理样品的疏水基团大多数紧密包埋在球状区域内,疏水基团与ANS之间的接触受到抑制^[28],导致其具有较少的疏水基团。经HPH处理后,MP水溶液的表面疏水基团数量均明显增加,并且随着HPH处理次数的增加呈现先增加后减小的趋势,其中经过4次HPH处理的样品表面疏水性最高。HPH处理时,最初产生的高静压通过氢键和疏水作用导致水穿透蛋白质的内部从而修饰蛋白质的构象,进而破坏MP的三级结构^[25,29]。随着HPH处理次数的增加,MP持续受到高静压、剪切力和空穴作用等机械力反复作用,蛋白质发生去折叠现象,抑制了部分二硫键的产生,促进了蛋白质结构的展开,疏水基团暴露并且相互作用,从而导致表面疏水性持续提高。当HPH处理次数达到4次以上时,可以看到表面疏水性出现下降现象,这可能是因为MP蛋白质结构进一步展开的同时,众多蛋白质分子在疏水作用与二硫键作用下重新聚集^[30],导致疏水基团减少,从而降低其表面疏水性。

2.8 HPH处理次数对MP水溶液活性巯基含量的影响

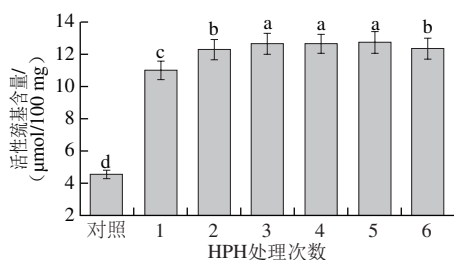


图9 HPH处理次数对MP水溶液活性巯基含量的影响

Fig. 9 Effect of HPH cycle on reactive sulfhydryl group content of MPs in water

巯基是MP中重要的功能基团,其含量变化可以反映出MP空间结构的改变。MP水溶液的活性巯基含量变化如图9所示。经过HPH处理后,与未经处理的样品(4.53 μmol/100 mg)相比,样品的活性巯基含量显著上升($P < 0.05$),说明HPH会导致MP中的巯基暴露在蛋白质表面,这与Liu Wei等^[31]的研究结果一致。活性巯基含量的增加说明HPH可以诱导水中MP结构展开,有研究表明,HPH处理时产生的剧烈机械作用会导致蛋白质结构的改变或者变性^[32]。当MP悬浊液高速通过HPH均质阀门时,会受到强剪切力、湍流和空穴作用等作用力,从而引起胶体颗粒和蛋白质的分离、聚集或重排^[12],导致蛋白质发生变性、结构展开。蛋白质分子展开后可能会诱导巯基以及疏水基团从蛋白质分子内部暴露出来,导致其活性巯基含量增加。随着HPH处理次数的增加,MP水溶液的活性巯基含量也持续增加,说明多次的HPH处理可以显著提升MP水溶液的活性巯基含量。同时,当HPH处理次数为3~5次时,活性巯基含量没有显著性差异($P > 0.05$),然而在HPH处理6次时出现了显著下降。可能是由于当HPH处理达到一定次数后,在强力的机械作用下,蛋白质发生聚集现象,聚集体进一步解折叠,导致暴露的巯基被氧化而重新形成二硫键,从而降低活性巯基含量^[30]。

2.9 HPH处理次数对MP水溶液二级结构组成的影响

表1 CD分析MP水溶液的二级结构组成
Table 1 Secondary structure composition of MPs in water determined by CD

组别	相对含量/%			
	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
对照	58.4	10.8	13.1	17.7
1次	45.8	12.3	15.4	26.5
2次	43.1	13.8	15.8	27.3
3次	41.9	15.8	15.5	26.8
4次	41.4	14.1	15.9	28.6
5次	42.9	15.2	15.8	26.1
6次	43.0	15.0	15.7	26.3

如表1所示,与未经HPH处理的样品相比,所有经过HPH处理后的MP水溶液表现出 α -螺旋相对含量降低、 β -折叠和 β -转角相对含量增加的现象。据报道,热加工和HPH处理会诱导蛋白质部分结构的展开,且后者对结构改变起主导作用^[30],这可能是导致MP水溶液中 α -螺旋相对含量降低的原因,肌球蛋白中 α -螺旋结构的缺失可能导致分子间相互作用的变化,从而破坏蛋白组装过程,导致在水中溶解度增加^[24]。当HPH处理次数为1~4次时,随着处理次数的增加, α -螺旋相对含量持续降低,说明HPH持续对MP水溶液产生的机械作用可以诱导MP结构的不断展开,同时 β -转角相对含量的持续增加也说明

明了蛋白质结构发生了展开和重组^[17]。当HPH处理次数达到4次以上时,可以发现 α -螺旋相对含量有增加趋势;同时反向平行的 β -折叠的结构容易在聚集的蛋白分子中形成,说明蛋白质发生了不溶性的聚集,这与2.6节讨论结果一致。

3 结论

本实验对不同次数的HPH处理对MP水溶液功能特性的影响进行了研究,不同次数的HPH处理对MP水溶液结构与理化性质具有不同的影响。结果表明,经过4次HPH处理的MP水溶液具有较好的溶解性(90%以上),同时HPH处理4~6次的样品在4℃下放置9d后仍具有较好的稳定性;SDS-PAGE结果显示经过HPH处理后几乎没有发生蛋白质降解的现象。随着HPH处理次数的增加,MP水溶液的结构被破坏,粒径先减小后增大,同时表观黏度降低,流动能力得到改善;表面疏水性和活性巯基含量先增加后减少, α -螺旋相对含量呈现先减少后增加的趋势, β -折叠和 β -转角相对含量明显变化;过多次数(4次以上)的HPH处理会引起MP水溶液产生蛋白质聚集现象,从而导致其溶解性以及稳定性的下降。上述研究表明,不同次数HPH处理可以对MP水溶液的功能特性进行调控。在本实验中,经过4次HPH处理的MP水溶液具有较好的理化特性。选择合适的HPH处理次数可以使MP水溶液具有较好的溶解性和稳定性,降低粒径、获得较好的流动性,从而达到改善其加工特性的目的,为其今后在食品工业中的加工应用提供指导思路。

参考文献:

- [1] PEREIRA P M, VICENTE A F. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet[J]. *Meat Science*, 2013, 93(3): 586-592. DOI:10.1016/j.meatsci.2012.09.018.
- [2] WILLIAMS P. Nutritional composition of red meat[J]. *Nutrition & Dietetics*, 2007, 64(Suppl 4): S113-S119. DOI:10.1111/j.1747-0080.2007.00197.x.
- [3] HAYAKAWA T, ITO T, WAKAMATSU J, et al. Myosin is solubilized in a neutral and low ionic strength solution containing L-histidine[J]. *Meat Science*, 2009, 82(2): 151-154. DOI:10.1016/j.meatsci.2009.01.002.
- [4] KRISHNAMURTHY G, CHANG H S, HULTIN H O, et al. Solubility of chicken breast muscle proteins in solutions of low ionic strength[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44(2): 408-415. DOI:10.1021/jf950152r.
- [5] ITO Y, TATSUMI R, WAKAMATSU J I, et al. The solubilization of myofibrillar proteins of vertebrate skeletal muscle in water[J]. *Animal Science Journal*, 2015, 74(5): 417-425. DOI:10.1046/j.1344-3941.2003.00134.x.
- [6] KATAYAMA S, SHIMA J, SAEKI H. Solubility improvement of shellfish muscle proteins by reaction with glucose and its soluble state in low-ionic-strength medium[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(15): 4327-4332. DOI:10.1021/jf011717o.
- [7] SAEKI H, INOUE K. Improved solubility of carp myofibrillar proteins in low ionic strength medium by glycosylation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(9): 3419-3422. DOI:10.1021/jf970302t.
- [8] STEFANSSON G, HULTIN H O. On the solubility of cod muscle proteins in water[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(12): 2656-2664. DOI:10.1021/jf00048a002.
- [9] DUMAY E, CHEVALIER L D, PICART P L, et al. Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 31(1): 13-26. DOI:10.1016/j.tifs.2012.03.005.
- [10] VILLAY A, DE FILIPPIS F L, PICTON L, et al. Comparison of polysaccharide degradations by dynamic high-pressure homogenization[J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 27(2): 278-286. DOI:10.1016/j.foodhyd.2011.10.003.
- [11] CHEN Xing, XU Xinglian, ZHOU Guanghong. Potential of high pressure homogenization to solubilize chicken breast myofibrillar proteins in water[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2016, 33: 170-179. DOI:10.1016/j.ifset.2015.11.012.
- [12] LIU H H, KUO M I. Ultra high pressure homogenization effect on the proteins in soy flour[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52: 741-748. DOI:10.1016/j.foodhyd.2015.08.018.
- [13] SONG X Z, ZHOU C J, FU F, et al. Effect of high-pressure homogenization on particle size and film; properties of soy protein isolate[J]. *Industrial Crops & Products*, 2013, 43(1): 538-544. DOI:10.1016/j.indcrop.2012.08.005.
- [14] 沙小梅, 胡姿姿, 涂宗财, 等. 高压微射流压力对大豆蛋白-大豆多糖体系功能性质的影响[J]. *农业工程学报*, 2016, 32(17): 281-286. DOI:10.11975/j.issn.1002-6819.2016.17.037.
- [15] 姜梅, 董明盛, 芮昕, 等. 高压均质和热处理对豆乳蛋白质溶解性的影响[J]. *食品科学*, 2013, 34(21): 125-130. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201321026.
- [16] 张晶, 丁芳, 邹晴晴, 等. 高压均质对大米蛋白功能特性及物化特性的影响[J]. *食品与机械*, 2016, 32(6): 9-12; 33. DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2016.06.003.
- [17] 雷莉, 赵强, 范婷, 等. 高压微射流处理对白木通籽分离蛋白结构及流变性质的影响[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(2): 145-150; 293.
- [18] 钟俊桢, 刘成梅, 刘伟, 等. 动态高压微射流技术对乳清蛋白性质的影响[J]. *食品科学*, 2009, 30(17): 106-108. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.025.
- [19] BIAN G L, XUE S W, XU Y J, et al. Improved gelation functionalities of myofibrillar protein from pale, soft and exudative chicken breast meat by nonenzymatic glycation with glucosamine[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2018, 53(8): 2006-2014. DOI:10.1111/ijfs.13789.
- [20] KHIARI Z, PIETRASIK Z, GAUDETTE N J, et al. Poultry protein isolate prepared using an acid solubilization/precipitation extraction influences the microstructure, the functionality and the consumer acceptability of a processed meat product[J]. *Food Structure*, 2014, 2(1/2): 49-60. DOI:10.1016/j.foostr.2014.08.002.
- [21] ZHAO Y Y, WANG P, ZOU Y F, et al. Effect of pre-emulsification of plant lipid treated by pulsed ultrasound on the functional

- properties of chicken breast myofibrillar protein composite gel[J]. *Food Research International*, 2014, 58(4): 98-104. DOI:10.1016/j.foodres.2014.01.024.
- [22] ZHONG Jian, LIU Xunwei, WEI Daixu, et al. Effect of incubation temperature on the self-assembly of regenerated silk fibroin: a study using AFM[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 76: 195-202. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.02.045.
- [23] CAO Yingying, XIA Tianlan, ZHOU Guanghong, et al. The mechanism of high pressure-induced gels of rabbit myosin[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2012, 16(39): 41-46. DOI:10.1016/j.ifset.2012.04.005.
- [24] CHEN Xing, XU Xinglian, HAN Minyi, et al. Conformational changes induced by high-pressure homogenization inhibit myosin filament formation in low ionic strength solutions[J]. *Food Research International*, 2016, 85: 1-9. DOI:10.1016/j.foodres.2016.04.011.
- [25] CHEN X, CHEN C G, ZHOU Y Z, et al. Effects of high pressure processing on the thermal gelling properties of chicken breast myosin containing κ -carrageenan[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 40: 262-272. DOI:10.1016/j.foodhyd.2014.03.018.
- [26] WANG T, SUN X, RADDATZ J, et al. Effects of microfluidization on microstructure and physicochemical properties of corn bran[J]. *Journal of Cereal Science*, 2013, 58(2): 355-361. DOI:10.1016/j.jcs.2013.07.003.
- [27] YOSHIKAWA Y, YASUIKE T, YAGI A, et al. Transverse elasticity of myofibrils of rabbit skeletal muscle studied by atomic force microscopy[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1999, 256(1): 13-19.
- [28] 毕爽, 李杨, 隋晓楠, 等. 高压均质对大豆蛋白-磷脂复合体系结构及理化/功能性质的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(5): 148-153. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201705024.
- [29] ZHANG Z, YANG Y, TANG X, et al. Chemical forces and water holding capacity study of heat-induced myofibrillar protein gel as affected by high pressure[J]. *Food Chemistry*, 2015, 188: 111-118. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.04.129.
- [30] 邢贝贝, 张亭亭, 赵强, 等. 高压微射流处理对米谷蛋白热聚集体性质的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(3): 109-115. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171026-309.
- [31] LIU Wei, ZHANG Zhaoqin, LIU Chengmei, et al. The effect of dynamic high-pressure microfluidization on the activity, stability and conformation of trypsin[J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(3): 616-621. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.04.079.
- [32] KEERATI-U-RAI M, CORREDIG M. Effect of dynamic high pressure homogenization on the aggregation state of soy protein[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(9): 3556-3562. DOI:10.1038/nature01654.