



添加山茶油对肌原纤维蛋白凝胶特性的影响

韩柯颖, 冯潇, 杨玉玲[✉], 李珊珊, 魏苏萌, 陈玉敏

南京财经大学食品科学与工程学院/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心/江苏高校粮油质量安全控制及深加工重点实验室, 南京 210023

摘要:【目的】研究山茶油添加对凝胶中肌原纤维蛋白(myofibrillar protein, MP)特性的影响以及结构与凝胶特性间的关系, 为其在鸡肉糜类制品中的应用提供理论依据。【方法】取鸡胸肉于4℃下提取MP, 在添加山茶油条件下测定其流变特性, 水浴加热制成凝胶后测定其硬度、保水性和水分分布特性的变化; 通过扫描电镜、激光拉曼光谱、表面疏水性(S_0 -ANS)、总巯基含量、差示扫描量热法(DSC)等分析, 探讨山茶油对MP凝胶微观结构、二级和三级结构以及热变性的影响, 并分析山茶油添加量、凝胶特性和MP结构之间的相关性, 揭示山茶油添加促使凝胶特性改变的原因。【结果】MP凝胶的硬度、保水性和束缚水的百分比(PT_{21})随着山茶油添加量的增加而显著提高($P < 0.05$), 在4%时分别达到最大值116.60 g、95.77%和80.05%, 5%时有所下降。山茶油添加量为4%时, MP加热过程中的储能模量(G')最高, 凝胶弹性最大, 此时扫描电镜下的MP混合凝胶网络结构均匀、致密, 表面粗糙度最低。山茶油的添加(0-5%)影响MP的二级结构, 其 α -螺旋含量从39.94%显著降低至26.07%($P < 0.05$), β -折叠含量从22.04%显著升高至27.40%($P < 0.05$), β -转角和无规则卷曲含量呈上升趋势。山茶油添加量增加到4%时, MP凝胶的表面疏水性达到最高水平, 总巯基含量最低。结果表明山茶油的添加促进MP分子内部疏水性氨基酸残基暴露和分子间二硫键的生成, 三级结构发生变化, 更高的 β -折叠含量和疏水相互作用增强MP分子间的聚集和交联。相关性分析表明, 山茶油添加量与MP凝胶特性及蛋白质构象的变化显著相关($P < 0.05$)。DSC结果表明添加的山茶油能与MP相互作用, 降低MP的变性热焓。【结论】添加山茶油对MP凝胶特性和结构有显著影响。添加山茶油改变MP的微环境并与MP发生作用, 使MP更容易变性并导致其二级结构展开以及三级结构改变, 进而改善MP凝胶特性。当山茶油添加量为4%时, 混合凝胶特性和三维网状结构最佳。

关键词: 山茶油; 肌原纤维蛋白; 凝胶特性; 结构

Effects of Camellia Oil on the Properties of Myofibrillar Protein Gel

HAN KeYing, FENG Xiao, YANG YuLing[✉], LI ShanShan, WEI SuMeng, CHEN YuMin

College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics/Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety/Key Laboratory of Grains and Oils Quality Control and Processing, Nanjing 210023

Abstract: 【Objective】The effects of camellia oil addition on the properties and the relationship between the properties and structure of myofibrillar protein (MP) gel were studied. The purpose of the research was to provide a theoretical basis for the application of camellia oil in chicken products. 【Method】The MP was extracted from chicken breast at 4℃. The MP heat-induced gels in different camellia oil addition were prepared. The changes of hardness, water holding capacity (WHC), moisture distribution of MP gel and rheological properties of MP were measured. Furthermore, the effects of camellia oil on the microstructure, secondary structure were determined by scanning electron microscopy (SEM) and Raman spectroscopy, respectively. Surface hydrophobicity and total sulfhydryl content were used to study the tertiary structure of MP in gels. Meanwhile, the differential

收稿日期: 2021-02-22; 接受日期: 2021-04-13

基金项目: 国家自然科学基金(32001643, 31371798)、江苏省自然科学基金(SBK2020040148)

联系方式: 韩柯颖, E-mail: hankeying97@163.com. 冯潇, E-mail: fengxiao@nufe.edu.cn. 韩柯颖和冯潇为同等贡献作者。通信作者杨玉玲, E-mail: yulingy@sina.com

scanning calorimetry (DSC) was applied to characterize the thermal properties of MP. Finally, the correlation between camellia oil addition, gel properties and MP structures were analyzed. 【Result】After 4% camellia oil addition, the hardness, WHC and the area fraction of bound water (PT_{21}) of MP gel increased and reached to maximum values of 116.60 g, 95.77% and 80.05%, respectively. However, those values decreased as camellia oil addition increased to 5%. For camellia oil content of 4%, the storage modulus (G') and elasticity of MP were the highest, while the surface roughness was the lowest. Meanwhile, MP gels showed more uniform, and compact network structure compared with other groups. It was also found that secondary structure of MP was significantly affected by camellia oil addition (0-5%). The α -helix content decreased from 39.94% to 26.07%, and the β -sheet content increased from 22.04% to 27.40% with increased camellia oil addition ($P<0.05$). The content of β -turn and random coil showed increasing trends. The S_0 -ANS of MP reached the highest value, and the total sulfhydryl content was the lowest after 4% camellia oil addition. The results showed that the addition of camellia oil promoted the exposure of hydrophobic amino acid residues in protein molecules and the formation of disulfide bond, and changed the tertiary structure of MP in gels. The enhanced aggregation and cross-linking between MP molecules were due to the higher β -sheet content and hydrophobic interaction. The correlation analysis indicated that camellia oil addition was significantly correlated with the changes in the gel properties and protein structure ($P<0.05$). The results of DSC showed that camellia oil could interact with MP and reduce the denaturation enthalpy of MP. 【Conclusion】The camellia oil addition had a significant effect on the gel properties and structures of MP. The addition of camellia oil changed the microenvironment of MP and interacted with MP, which made the degeneration of MP easier. The secondary structure of MP was unfolded and the tertiary structure was affected after camellia oil addition, which improved the properties of MP gel. When camellia oil concentration was 4%, the properties and three-dimensional network structure of MP composite gel were the best.

Key words: camellia oil; myofibrillar protein; gel properties; structure

0 引言

【研究意义】以鸡肉为原料的糜类肉制品品质主要由肌原纤维蛋白(myofibrillar protein, MP)的凝胶特性决定^[1]。脂肪作为肉制品的重要原料之一,直接影响肉制品的弹性、嫩度和风味。用植物油代替动物脂肪生产肉制品,有效降低饱和脂肪酸和胆固醇含量的同时,还能够较好地保持肉制品的风味和整体可接受性^[2]。山茶油是富含茶多酚、山茶甙等多种生理活性物质的功能性植物油,能够有效改善心脑血管疾病,降低癌症的发病率^[3]。研究山茶油添加对 MP 热诱导凝胶特性的影响,并探讨其特性变化的调控机制,为利用山茶油制备功能性肉制品提供理论依据。【前人研究进展】有研究者探讨了在肉制品中添加植物油替代动物油脂的可行性,证实了适当添加植物油对肉类凝胶的性质有改善作用。不同的油脂对凝胶结构和持水性的影响不同^[4]。添加橄榄油的猪肉 MP 复合凝胶强度显著高于添加花生油的处理^[5],用棕榈油替代猪背膘可显著增强猪肉糜凝胶的硬度和保水性^[6],菜籽油与魔芋胶复合后应用于低脂肉制品中能提高产品的硬度^[7]。猪油和花生油通过物理包覆能促进猪肉 MP 复合凝胶的保水性和脂质稳定性^[8]。大豆油添加后的鸡肉 MP 复合凝胶硬度、弹性和咀嚼度得到显著增强^[9]。ZHOU 等^[10]研究发现脂肪的加入不仅显著提高了 MP

凝胶的质构特性,还能诱导 MP 分子结构产生变化。SHAO 等^[11]采用拉曼光谱法研究添加不同脂质的肉糜制品中蛋白质结构的变化,观察到 α -螺旋结构的减少和 β -折叠结构含量的增加,这一转变涉及蛋白质中氢键重排和疏水基团的暴露,证实了脂质能够改变蛋白质分子结构。作为我国特有的一种食用植物油,山茶油中不皂化物含量少,富含的单不饱和脂肪酸是脂质过氧化物的抑制剂,因此具有强抗氧化作用和良好的储存稳定性^[12]。同时,山茶油中富含多种维生素、微量元素以及特定的生理活性物质等,能有效预防心脑血管疾病和肿瘤、降低胆固醇和血脂^[13]。因此,山茶油具有很高的营养价值和保健功能,可作为替代动物脂肪的良好油脂应用于肉制品生产和加工。【本研究切入点】目前已经确证添加适量的花生油等几种植物油能改善 MP 的凝胶特性,而山茶油是具有保健功能的食用油,但国内外尚未见添加山茶油条件下鸡肉 MP 凝胶特性和结构变化规律的相关报道。【拟解决的关键问题】MP 中加入不同浓度预乳化的山茶油乳液后经热诱导形成混合凝胶,研究山茶油添加对 MP 凝胶特性(硬度、保水性、水分分布特性和流变特性)的影响并获得最佳的山茶油添加浓度;研究山茶油添加对 MP 的凝胶微观结构和二级结构及三级结构的影响,并通过研究茶树油添加量、凝胶特性和 MP 结构的关系,揭示山茶油改变凝胶特性的内在原因。

1 材料与amp;方法

试验于2020年5—10月在南京财经大学粮油质量检测工程技术研究中心进行。

1.1 材料与试剂

重2 kg左右的60日龄AA (Arbor Acres) 型商业肉鸡, 购于南京本地养鸡场。现场屠宰后取鸡胸肉, 加液氮冷冻密封运输至南京财经大学, 储存于-18℃以下, 1个月内使用。山茶油购于杭州久晟生物科技有限公司。牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 购于国药集团化学试剂有限公司, 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

T10 Basic高速剪切均质器, 德国IKA公司; Avanti J-26XP 高效冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; TA. XT. Plus.质构仪, 英国 Stable Micro System 公司; Anton Paar MCR302 流变仪, 奥地利安东帕有限公司; NM120-Analyst 低场核磁共振仪, 上海纽迈电子科技有限公司; DSC 8000 型差示扫描热量仪, 美国 Perkin-Elmer 公司; TM 3000 扫描电子显微镜, 日本日立公司; LABRAM 800 型激光拉曼光谱仪, 法国 Jobin Yvon 公司; U-3900 紫外分光光度仪, 日本日立公司; F-7000 荧光光谱仪, 日本日立公司。

1.3 试验方法

1.3.1 MP 的提取 取冷冻鸡胸肉在4℃下解冻20 min, 剔除表面结缔组织和脂肪, 切碎后参考杨玉玲等^[14]的方法在低温下提取MP, 4℃下保存并于3 d内用完。蛋白质浓度采用双缩脲法进行测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白^[15]。

1.3.2 山茶油-MP 混合样品溶液和凝胶的制备 取适量的山茶油加入MP中, 用磷酸盐缓冲液 (10 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄、0.6 mol·L⁻¹ KCl, pH 6.0) 溶解为1 mg·mL⁻¹的MP溶液, 以14 500 r/min 转速下高速剪切均质60 s后制得新鲜的乳化液。取适量乳化液加入MP溶液体系中, 充分混合均匀后, 得到溶胶体系, 其中蛋白质质量浓度为50 mg·mL⁻¹, 山茶油质量浓度分别达到1%、2%、3%、4%、5%, 同时做不加山茶油乳化液的空白对照组, 此系列溶液用于流变特性的测定和DSC热变性分析。取混合溶液样品置于水浴锅中, 从20℃以1℃·min⁻¹的速率加热至65℃, 65℃下保温20 min后冷却至室温, 随后在4℃下保存8—10 h制备成凝胶, 用于凝胶特性、微观结构和拉曼光谱的测定。将MP浓度为50 mg·mL⁻¹的混合溶液样品用磷

酸盐溶液稀释至1 mg·mL⁻¹, 用于表面疏水性和总巯基含量的测定。

1.3.3 硬度的测定 MP凝胶样品的硬度采用配置P/6探头的质构仪在室温下穿刺5 mm测定。测试条件为: 测试速率: 1 mm·s⁻¹; 感应模式: 自动; 感应力: 5 g。所有测试重复5次。

1.3.4 保水性的测定 凝胶样品称重后采用离心法测定其保水性 (water holding capacity, WHC), 在4℃、10 000×g条件下离心10 min, 除去离出液体。记录离心后凝胶的重量占离心前凝胶重量的百分比, 为其保水性。所有测试重复5次。

1.3.5 水分布特性的测定 取1 g MP样品, 采用核磁共振分析仪的CPMG序列进行水分布特性的测定。测试参数设置如下: 测试温度, 32℃; 质子共振频率, 19 MHz; 采样频率, 100 kHz; 模拟增益, 20.0 db; 累加次数, 4; 90°脉宽, 14 μs; 180°脉宽, 26 μs; 回波次数, 15 000; 等待时间, 3 000 ms; 重复扫描次数, 8; 谱宽: 200 kHz。每组样品重复6次, 取平均值。记录束缚水弛豫时间相应的峰面积比, 以PT₂₁表示。

1.3.6 流变特性的测定 取2 mL MP溶液样品置于流变仪平板上, 设定动态流变条件^[14]: 直径50 mm平行板, 狭缝0.5 mm, 应变2%, 频率0.1 Hz。升温速率1℃·min⁻¹, 升温范围20—80℃。仪器自动记录储能模量 (G') 随温度变化曲线。

1.3.7 微观结构的观察 将凝胶样品用2.5%的戊二醛固定后用磷酸盐缓冲液清洗 (0.1 mol·L⁻¹ KH₂PO₄, pH 7.0), 不同梯度乙醇进行脱水处理后冷冻干燥。对冻干样品进行喷金镀膜处理后, 使用扫描电镜在1 500放大倍数下进行观察^[16]。

1.3.8 拉曼光谱分析 凝胶样品中MP的二级结构含量通过拉曼光谱仪测定, 参考ZHANG等^[17]的方法进行参数设置, 获取的拉曼光谱范围在400—2 000 cm⁻¹。测试结果用各二级结构占总二级结构含量的百分比表示。

1.3.9 表面疏水性测定 将MP凝胶样品 (1 mg·mL⁻¹) 分别稀释至0.5、0.25和0.125 mg·mL⁻¹, 采用ANS荧光探针法^[16]进行测定。以荧光强度对蛋白浓度作直线, 其初始斜率即为蛋白质的表面疏水性指标 (S₀-ANS)。

1.3.10 巯基含量测定 MP凝胶样品总巯基含量的测定参考LIU等^[18]的方法并稍作修改。MP样品与总巯基试剂充分混匀后在40℃下静置25 min。使用磷酸

盐缓冲液作为参考,于 412 nm 下测定样品吸光值,摩尔消光系数为 $13\,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。

1.3.11 热稳定性的测定 利用差示扫描量热法 (DSC) 测定 MP 样品的变性情况。称取 20 mg MP 样品,准确记录每组样品重量,置于不锈钢铝坩埚内密封,用于 DSC 测试。以空坩埚作为空白对照,样品以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率从 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 升温至 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。用 Pyris-11 软件计算各变性峰的变性温度 (T_d) 和焓变 (ΔH)。

1.4 统计分析

用 SPSS 软件对数据进行方差分析和相关性分析,若方差分析效应显著则用邓肯多范围试验 (Duncan multiple range test) 进行多重比较 ($P<0.05$)。

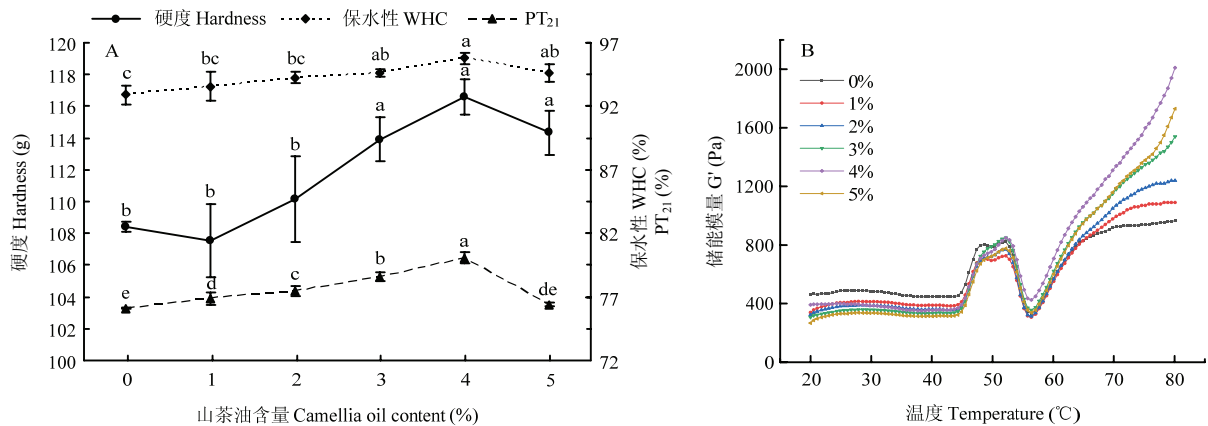
2 结果

2.1 山茶油添加量对 MP 凝胶硬度、保水性、水分布特性和 MP 流变特性的影响

不同山茶油添加条件下的 MP 凝胶硬度、保水性、 PT_{21} 和 MP 的储能模量 (G') 变化如图 1 所示。

随着山茶油含量从 1% 增加到 4%,MP 凝胶的硬度逐渐增加,在 4% 时到最大值 (116.60 g),随后在 5% 时下降至 114.33 g 。凝胶保水性从 92.92% (0) 显著上升至 95.77% (4%) ($P<0.05$),随后稍有降低至 94.63% (5%)。凝胶体系中有不同类型的水分子,包括结合水、束缚水和自由水。束缚水反映位于凝胶结构内部的水,占水分分布比例最大且最为重要,因此本试验测定了束缚水在凝胶中的含量。 T_{21} 代表束缚水的弛豫时间, PT_{21} 代表其峰面积比^[19]。 PT_{21} 随着山茶油含量增加至 4% 时呈显著性增加的趋势 ($P<0.05$),在 4% 时达到最大值 (80.05%)。表明添加 4% 山茶油时凝胶的硬度和保水性最佳,束缚水占总水分比例最大,浓度过高反而会导致三者降低。

MP 溶液加热形成凝胶的过程中,山茶油含量对 MP 的 G' 影响显著,在 $50\text{--}55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内呈现第一个峰值,表明肌球蛋白重链逐渐发生变性^[8]。当继续升高温度至 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$,MP 的 G' 值迅速增加,4% 山茶油处理组的 G' 呈现最大值,这反映了凝胶弹性的增加。



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same as below

图 1 山茶油添加对 MP 凝胶硬度、保水性、 PT_{21} 和 MP 储能模量 (G') 的影响

Fig. 1 Effects of camellia oil addition on hardness, water holding capacity and PT_{21} of MP gel and storage modulus (G') of MP

2.2 山茶油添加量对 MP 凝胶微观结构的影响

如图 2 所示,未添加山茶油的凝胶结构疏松、无序、多孔且孔隙较大。与对照组相比,添加山茶油的 MP 混合凝胶呈现出更加均匀且致密的网状结构。随着山茶油浓度的增加 (1%—4%),MP 凝胶结构中蜂窝状网孔的孔径逐渐降低,凝胶的丝状物表面出现球

形颗粒并逐渐增多,不规则的球状或棒状聚集块充分展开,粗糙度逐渐降低,凝胶结构变得平整且致密。添加 4% 山茶油的混合凝胶呈现均匀、细致的网络结构。5% 的山茶油浓度导致 MP 凝胶结构遭到破坏,不够均匀且有较多的脂肪颗粒附着在丝状物表面,导致混合凝胶的保水性和硬度有所下降。

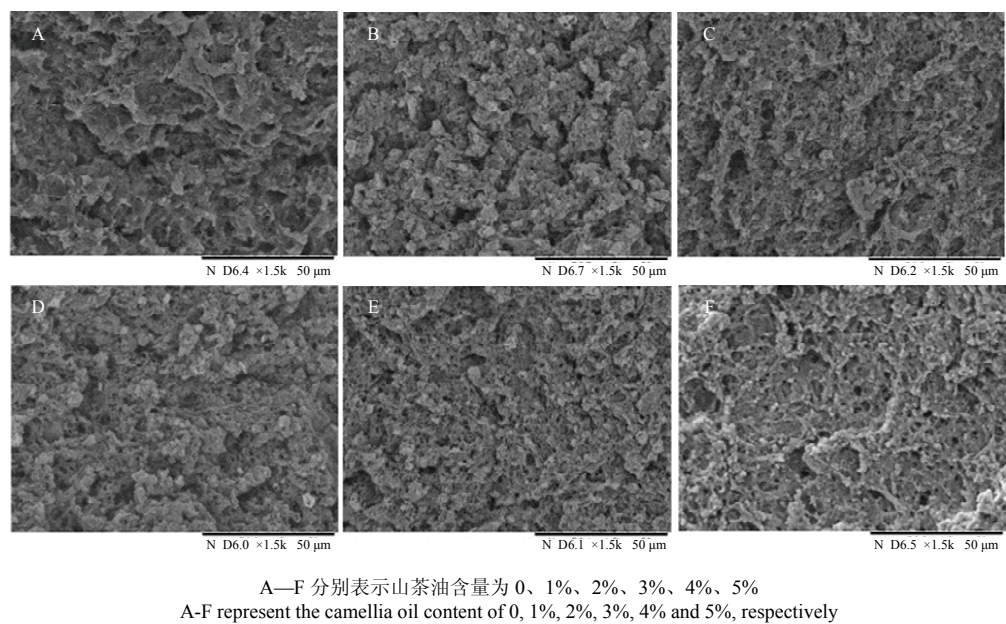


图 2 山茶油添加对 MP 凝胶微观结构的影响（电镜照片 1500 倍）
Fig. 2 Effect of camellia oil addition on microstructure (SEM micrographs at 1500×) of MP gel

2.3 山茶油添加量对 MP 二级结构的影响

随着山茶油浓度的增加（0—5%），其混合凝胶 MP 分子中的 α -螺旋含量由 39.94%显著降低至 26.07%（ $P<0.05$ ）。而 β -折叠结构含量由 22.04%显著上升至 27.40%（ $P<0.05$ ）； β -转角结构含量显著增加（ $P<0.05$ ），在 5%山茶油含量时达最大值；而无规则卷

曲结构含量从 18.25%（0）逐渐上升至最大值 21.39%（3%）后无显著性变化（ $P>0.05$ ）（表 1）。 α -螺旋和 β -折叠结构含量分别呈现增加和降低的趋势，表明山茶油添加改变了 MP 分子结构，由于蛋白-油脂和蛋白-蛋白侧链之间的相互作用增强，导致 α -螺旋结构逐渐展开，形成了更多的 β -折叠、 β -转角或无规则卷曲结构。

表 1 山茶油添加对 MP 凝胶二级结构的影响
Table 1 Effect of camellia oil addition on secondary structure of MP gel

山茶油含量 Camellia oil content (%)	α -螺旋 α -helix (%)	β -折叠 β -sheet (%)	β -转角 β -turn (%)	无规则卷曲 Random coil (%)
0	39.94±0.91a	22.04±0.32d	19.77±0.40e	18.25±0.63b
1	36.52±1.19b	23.13±1.00c	20.41±0.42e	19.94±2.53ab
2	33.85±0.74c	24.55±0.34b	21.93±0.61d	19.67±0.45ab
3	30.49±0.92d	25.05±0.28b	23.06±0.52c	21.39±1.06a
4	28.35±0.46e	26.63±0.95a	23.96±0.35b	21.06±0.59a
5	26.07±0.76f	27.40±0.08a	25.22±0.40a	21.31±0.70a

不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。下同
Different letters (a-f) indicate significant difference ($P<0.05$). The same as below

2.4 山茶油添加量对 MP 三级结构的影响

蛋白质三级结构的形成是在二级结构基础上，分子进一步折叠成紧密的三维空间结构^[20]。MP 分子的表面疏水性（ S_0 -ANS）和二硫键（S-S）与巯基（SH）

之间的转换可以表征蛋白三级结构的变化^[20-21]。
2.4.1 表面疏水性 如图 3 所示，与未添加山茶油的 MP 凝胶相比，混合凝胶中 MP 的 S_0 -ANS 随着山茶油的添加而呈显著升高的趋势（ $P<0.05$ ），在 4%时达

到最大值 771.71，随后在 5%时显著降低至 718.64 ($P<0.05$)。这一变化趋势与凝胶硬度和保水性（图 1）一致，表明蛋白-蛋白或蛋白-油脂的作用增强，从而导致蛋白质的疏水性微环境发生变化。而当山茶油添加量达 5%时，油脂颗粒的疏水性脂肪酸长链虽然增多，但并未增强蛋白质的表面疏水性，这可能是由于过量的油脂使蛋白质中的疏水性基团被覆盖或包埋，并没有导致蛋白质三级结构进一步展开。

2.4.2 总巯基含量与二硫键 总巯基含量包括暴露在蛋白质表面和包埋在蛋白质内部的巯基，总巯基的减少通常反映了 MP 中二硫键的生成。山茶油的添加使凝胶中 MP 的总巯基含量明显下降 ($P<0.05$)，4% 时达最小值（图 3）。这反映在油脂的诱导下，MP 的三级结构不断展开，内部巯基暴露并生成了大量二硫键，从而稳定了蛋白质的三级空间结构。当山茶油浓度升高至 5%时，总巯基含量有所增加，说明加入过多的油脂对 MP 新结构具有去稳作用。

2.5 相关性分析

表 2 显示了山茶油添加量、MP 凝胶特性和结构之间的相关性。山茶油添加量与硬度、保水性以及 β -折叠结构含量呈显著的正相关 ($P<0.05$)，与 α -螺旋结构和总巯基含量呈极显著的负相关 ($P<0.01$)，表明山茶油添加量显著影响凝胶特性、二级结构和三级结构。

蛋白质二级结构与 MP 凝胶特性之间存在关联，MP 凝胶的硬度与 α -螺旋呈显著负相关 ($P<0.05$)，与 β -折叠呈显著正相关 ($P<0.05$)。MP 在 65℃下的

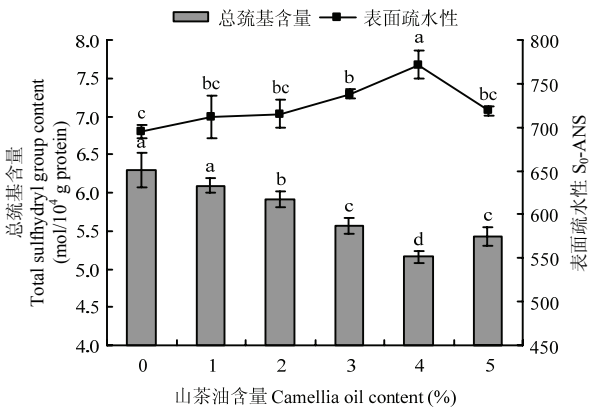


图 3 山茶油添加对 MP 凝胶的表面疏水性和总巯基含量的影响

Fig. 3 Effects of camellia oil addition on the S_0 -ANS and total sulfhydryl content of MP gels

G' 值与 α -螺旋呈显著负相关 ($P<0.05$)。表面疏水性与保水性、 PT_{21} 呈极显著正相关 ($P<0.01$)。总巯基含量与凝胶硬度、保水性和 65℃下的 G' 值呈极显著负相关 ($P<0.01$)。这一结果表明山茶油主要通过调控 MP 凝胶中蛋白质二级结构和三级结构的转变导致凝胶特性发生显著变化。

2.6 山茶油添加对 MP 变性温度和变性热焓的影响

如表 3 所示，MP 样品在不同山茶油添加量的处理下都显示出两个吸热变性峰，即肌球蛋白 (T_{d1}) 和肌动蛋白 (T_{d2})。山茶油的添加对 MP 样品的肌球蛋白吸热变性峰的起始温度 (T_{Onset}) 无显著性的影响

表 2 山茶油添加量、MP 凝胶特性和结构之间的相关性

Table 2 The correlation analysis between gel properties and structures of MP with camellia oil addition

	山茶油添加量 Camellia oil content	硬度 Hardness	保水性 WHC	PT ₂₁ PT ₂₁	储能模量(65℃) G'(65℃)	α -螺旋 α -helix	β -折叠 β -sheet	表面疏水性 S ₀ -ANS	总巯基 Total SH
山茶油添加量 Camellia oil content	1								
硬度 Hardness	0.889*	1							
保水性 WHC	0.846*	0.919**	1						
PT ₂₁	0.437	0.711	0.833*	1					
G' (65℃)	0.804	0.971**	0.939**	0.819*	1				
α -螺旋 α -helix	-0.997**	-0.896*	-0.865*	-0.482	-0.815*	1			
β -折叠 β -sheet	0.994**	0.886*	0.871*	0.463	0.810	-0.989**	1		
表面疏水性 S ₀ -ANS	0.644	0.848*	0.933**	0.956**	0.935**	-0.675	0.664	1	
总巯基 Total SH	-0.928**	-0.973**	-0.966**	-0.727	-0.960**	0.939**	-0.932**	-0.879*	1

*表示显著性相关 ($P<0.05$)，**表示极显著性相关 ($P<0.01$)

* indicate significant correlation ($P<0.05$), ** indicate extremely significant correlation ($P<0.01$)

表 3 不同山茶油添加处理下 MP 样品 DSC 特性的变化
Table 3 Changes of DSC characteristics of MP samples under different camellia oil addition treatments

山茶油含量 Camellia oil content (%)	T _{d1}			T _{d2}		
	T _{Onset} (°C)	T _{End} (°C)	ΔH (J·g ⁻¹)	T _{Onset} (°C)	T _{End} (°C)	ΔH (J·g ⁻¹)
0	55.14±0.54a	62.89±0.22a	0.183±0.007a	70.50±0.35b	71.89±1.05a	0.023±0.003a
1	54.73±0.43a	62.69±0.11ab	0.158±0.013b	70.97±0.06a	72.19±0.25a	0.024±0.004a
2	54.64±0.03a	62.31±0.12b	0.152±0.004b	70.97±0.06a	72.24±0.10a	0.022±0.003a
3	54.54±0.03a	62.34±0.42ab	0.155±0.017b	70.81±0.02ab	72.08±0.32a	0.021±0.001a
4	54.45±0.04a	62.30±0.42b	0.154±0.006b	70.77±0.21ab	71.90±0.27a	0.023±0.003a
5	54.39±0.10a	62.37±0.28ab	0.143±0.011b	68.41±0.12c	71.42±0.55a	0.023±0.001a

T_{d1}: 肌球蛋白; T_{d2}: 肌动蛋白; T_{Onset}: 起始温度; T_{End}: 终止温度; ΔH: 热焐值
T_{d1}: Myosin; T_{d2}: Actin; T_{Onset}: The onset temperature; T_{End}: The end temperature; ΔH: Enthalpy

($P>0.05$), 而终止温度 (T_{End}) 略有下降。与未添加山茶油的对照组相比, 添加山茶油后 MP 中肌球蛋白吸热变性峰的 T_{End} 值逐渐下降, 但在 2%—5% 范围内无显著性变化 ($P>0.05$)。对照组中 MP 样品肌球蛋白的变性峰热焐值 (ΔH) 为 $0.183 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$; 添加山茶油后, MP 样品中肌球蛋白的 ΔH 显著下降至 $0.143 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ (5%) ($P<0.05$)。山茶油的添加对肌动蛋白吸热变性峰的 T_{Onset} 有显著性影响 ($P<0.05$), 从 70.97°C (1%) 逐渐降低至 68.41°C (5%), 而对 T_{End} 和 ΔH 无显著性影响 ($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 山茶油影响 MP 凝胶特性和微观结构

蛋白质凝胶的品质可以通过硬度、保水性、水分分布和流变特性等特性反映。本试验结果表明适量浓度山茶油 (0—4%) 的加入能够显著改善 MP 凝胶硬度 ($P<0.05$), 过量的山茶油导致凝胶硬度下降。WU 等^[8]研究发现加入预乳化的花生油 (15%) 显著增强 MP (2%) 的凝胶硬度。适量添加亚麻籽油、菜籽油能够增强肉类蛋白凝胶的硬度^[22-23]。ZHOU 等^[24]研究发现添加鸡脂显著提高 MP 在加热过程中的 G' 值, 在 0.20% 添加条件下蛋白质凝胶过程中的粘弹性最佳。ZHOU 等研究^[10]发现添加一定量的猪油或山茶油均能使蛋白获得更高的 G' 值, 增强了凝胶性质。

MP 凝胶的保水性和 PT_{21} 随着山茶油浓度的增加逐渐升高, 在 4% 时达到最大值后呈下降趋势, 说明 MP 中加入山茶油显著影响其凝胶保水性和水分分布特性。王莉莎等研究^[25]表明添加一定量的玉米油、橄榄油、米糠油均能增加 MP 乳化复合凝胶的持水力。邵

俊花^[26]研究发现脂肪的添加增大了弛豫时间 T_{21} 的峰面积比。这些变化趋势与本试验结果相似, 而含量差异可能是脂肪中的不饱和脂肪酸成分不同所致。

观察 MP 凝胶的微观结构发现, 蛋白质主要通过纤维网状交联, 山茶油在预乳化阶段经高速剪切后形成小的油脂颗粒, 并由盐溶性的 MP 膜层包覆, 作为填充物占据在蛋白质空间网络的空隙处, 在热诱导之后均匀地分散在凝胶基质中^[27]。山茶油-MP 复合凝胶的结构更加有序、细腻。添加 4% 山茶油的 MP 凝胶网络中孔径最小, 粗糙度最低, 呈现均匀、紧凑且致密的网状结构。此时蛋白质三级结构展开程度最大, 分子的表面疏水性和二硫键交联增强, 分子有序结构的适度展开使凝胶具有良好的网状结构。因此, 山茶油添加对 MP 凝胶的微观结构有显著的调节作用, 且与硬度和保水性的变化趋势一致, 这表明凝胶微观结构影响凝胶特性。当山茶油含量进一步增加至 5%, 凝胶结构中网孔稍有增大且分布不均匀, 多余的油脂无法被蛋白基质稳定地包埋在凝胶基质中, 以球状颗粒附着在丝状物表面。这是由于 MP 凝胶的表面疏水性和二硫键含量降低, 蛋白质分子间参与凝胶形成作用力的减弱对微观网络结构产生不利影响。庄涛^[5]报道在猪肉 MP 体系中加入橄榄油和花生油乳化液后, 颗粒填充分布均匀, 结构变得致密且紧实。而由于油脂的黏稠度不同, 橄榄油乳液的填充效果更好。ZHOU 等^[24]研究发现脂肪含量的增加 (0.05%—0.20%) 使凝胶的粗糙度下降并形成良好的网状结构; 而过多的脂肪添加则会增加凝胶的粗糙度, 同时导致其质构特性下降。不同种类的油脂对凝胶结构和特性的改善程度不同, XIONG 等^[28]将此现象归结为油脂的理化性质差异。

3.2 山茶油影响 MP 二级结构和三级结构

山茶油的加入致使 MP 分子结构不同程度地展开, α -螺旋结构展开后形成 β -折叠或其他二级结构。在肉糜蛋白质中添加大豆油或橄榄油后, 其蛋白质的 α -螺旋含量降低而 β -折叠含量也显著增加^[5,25], 这与本研究得到的变化趋势一致。

蛋白质分子的表面疏水性反映其三级结构的展开程度和分子间的聚集能力。本研究中 MP-山茶油混合凝胶的表面疏水性指标 S_0 -ANS 随着山茶油含量增加而逐渐上升, 在 4% 时达到最大值后又降低。这表明随着山茶油的添加, MP 在溶液中形成疏水性的微环境逐渐增多, 诱导蛋白质分子三级结构充分展开和更多的内部疏水性氨基酸残基暴露。这些展开的疏水基团有利于凝胶致密网络结构的形成。当山茶油添加到 5% 时, 多余的油脂吸附在暴露的疏水性基团表面, 部分暴露的疏水基团被油脂包埋, 同时油脂和蛋白质之间的疏水相互作用产生一定的空间位阻, 导致蛋白质分子三级结构无法再深度展开, 进而影响凝胶的质构特性。MENG 等^[29]也发现添加矿物油或玉米油可以诱导 MP 内部疏水基团的暴露, 增强其表面疏水性。HOWELL 等^[30]报道了玉米油的存在可以诱导溶菌酶的疏水基团暴露。

通过测定总巯基含量能反映二硫键的变化。二硫键的形成对 MP 展开后形成新的三级结构和其在加热过程中的凝胶结构具有稳定作用。添加 5% 的山茶油导致总巯基含量增加, 意味着二硫键的减少。这可能是山茶油和蛋白质的聚集覆盖了部分巯基, 无法形成更多的二硫键。同时, 过量的山茶油导致二硫键发生断裂, 对蛋白质展开重排后形成的新结构具有去稳作用。ZHOU 等^[24]发现 MP 溶液和凝胶中的总巯基含量随鸡脂肪含量的增加而显著降低, 促进了蛋白质凝胶形成牢固的网络结构, 这与本试验研究结果一致。二硫键参与了热诱导乳化凝胶的形成, 能够维持脂肪颗粒的稳定和网状结构的交联, 防止凝胶形成过程中油脂的游离渗漏^[31], 对维持良好的凝胶特性做出贡献^[25]。

3.3 山茶油添加引起 MP 凝胶特性变化的原因

一般认为, MP 热诱导凝胶形成的过程是其在加热的条件下发生变性, 蛋白质分子展开与重排的结果。因此, 蛋白质分子高级结构变化是形成热诱导凝胶的关键。本研究发现, 山茶油添加量与凝胶的硬度、保水性以及 β -折叠结构含量呈显著的正相关; 蛋白质二级、三级结构变化与凝胶特性也显著相关。用 DSC 测

定 MP 样品时发现, 其肌球蛋白的热变性峰分布在 54—63℃, 肌动蛋白的热变性峰集中在 68—73℃。山茶油添加量在 1%—5% 的范围内对肌球蛋白变性峰的起始温度没有影响, 但导致终止温度和热焓值 (ΔH) 显著下降。这表明山茶油的添加与 MP 的主要成分肌球蛋白发生相互作用, 引起 MP 分子结构发生变化, 通过降低肌球蛋白的变性热焓而使 MP 更容易变性。HE 等^[32]利用 DSC 法研究了高压处理对花生分离蛋白热变性温度的影响。蔡路昀等^[33]研究了不同提取方法对鳕鱼骨胶原蛋白热变性温度的影响, 而未涉及对 ΔH 的影响研究。

在热诱导过程中, 山茶油的添加使 MP 周围的疏水性微环境发生变化, 诱导分子三级结构进一步展开, 内部的疏水性氨基酸残基等基团逐渐暴露, 疏水残基定向移动到油滴表面会发生构象重排; 同时, 蛋白质分子间的二硫键发生聚集, 相邻的蛋白质分子间的相互作用增强以及蛋白-油脂间紧密结合^[34], 使山茶油能更稳定地存在于凝胶基质中, 进而改善 MP 凝胶三维网状结构。而良好致密的凝胶三维网状结构能更好地保留水分, 并具有更强的抗压能力。

综上所述, 添加山茶油改变 MP 的微环境, 并与 MP 发生作用, 使 MP 更易变性并导致其二级结构展开以及三级结构改变, 进而影响 MP 凝胶特性。不少学者的研究都发现了蛋白质凝胶特性与其结构有关。KANG 等^[35]发现 β -折叠的增加和 α -螺旋的降低是法兰克福香肠的硬度和保水性增强的原因。BEATTIE^[36]和 LIU^[37]等的研究结果表明蛋白质在热处理过程中, α -螺旋结构阻碍蛋白质的凝胶化, 而 β -折叠或无规卷曲则促进了蛋白质凝胶网络的形成, 增强了凝胶的质构特性和保水性。

4 结论

山茶油含量显著影响 MP 凝胶特性和微观结构, 凝胶硬度、保水性和 PT_{21} 随着山茶油添加而显著增强, MP 溶液加热形成凝胶过程中的 G' 值逐渐升高。添加 4% 山茶油的 MP 具有最佳的凝胶特性和均匀细密的微观网络结构, 此时 MP 和山茶油的比例为 1 : 0.8。山茶油添加 (0—4%) 使蛋白质二级结构中 α -螺旋转变为 β -折叠、 β -转角和有序卷曲, 促进 MP 分子三级结构逐渐展开, 分子内疏水性基团暴露, 表面疏水性和二硫键交联增加, 使蛋白-蛋白与蛋白-油脂间相互作用增强, 形成更加均匀稳定的凝胶网络结构, 最大限度地保留凝胶空间中的水分。而当过多的山茶油参与

MP 凝胶形成时, 蛋白质中的疏水性基团被覆盖或包埋, 二硫键含量降低。凝胶基质中多余油脂形成的空间阻碍作用导致蛋白质分子展开度降低, 参与凝胶形成的作用力减弱而降低硬度、保水性和微观结构的均匀性。

参考文献 References

- [1] XIONG Y L. CHEMICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTICS OF MEAT[Protein functionality. Reference Module in Food Science, Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition), 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00088-X>.
- [2] CHOI Y S, CHOI J H, HAN D J, KIM H Y, LEE M A, KIM H W, JEONG J Y, KIM C J. Characteristics of low-fat meat emulsion systems with pork fat replaced by vegetable oils and rice bran fiber. *Meat Science*, 2009, 82(2): 266-271.
- [3] ZHOU X X, JIANG S, ZHAO D D, ZHANG J Y, GU S Q, PAN Z Y, DING Y T. Changes in physicochemical properties and protein structure of surimi enhanced with camellia tea oil. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 84: 562-571.
- [4] WU M G, XIONG Y L, CHEN J. Rheology and microstructure of myofibrillar protein-plant lipid composite gels: Effect of emulsion droplet size and membrane type. *Journal of Food Engineering*, 2011, 106(4): 318-324.
- [5] 庄涛. 植物油和非肉蛋白预乳化对肌原纤维蛋白凝胶性能和蛋白结构的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2016.
ZHUANG T. Effect of pre-emulsification of vegetable oil and non-meat protein on the properties and protein structure of myofibrillar protein gel [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2016. (in Chinese)
- [6] 朱东阳, 康壮丽, 何鸿举, 胡明明, 黄清吉, 马汉军, 赵改名, 徐幸莲, 王虎虎. 猪血浆蛋白乳化棕榈油对猪肉糜凝胶特性的影响. *食品科学*, 2018, 39(5): 71-75.
ZHU D Y, KANG Z L, HE H J, HU M M, HUANG Q J, MA H J, ZHAO G M, XU X L, WANG H H. Effect of pre-emulsified palm oil with porcine plasma protein on gel characteristics of pork meat batters. *Food Science*, 2018, 39(5): 71-75. (in Chinese)
- [7] YOUSSEF M K, BARBUT S. Fat reduction in comminuted meat products-effects of beef fat, regular and pre-emulsified canola oil. *Meat Science*, 2011, 87(4): 356-360.
- [8] WU M G, XIONG Y L, CHEN J, TANG X Y, ZHOU G H. Rheological and microstructural properties of porcine myofibrillar protein-lipid emulsion composite gels. *Journal of Food Science*, 2009, 74(4): 207-217.
- [9] ZHAO Y Y, WANG P, ZOU Y F, LI K, KANG Z L, XU X L, ZHOU G H. Effect of pre-emulsification of plant lipid treated by pulsed ultrasound on the functional properties of chicken breast myofibrillar protein composite gel. *Food Research International*, 2014, 58: 98-104.
- [10] ZHOU X X, CHEN H, LYU F, LIN H H, ZHANG Q, DING Y T. Physicochemical properties and microstructure of fish myofibrillar protein-lipid composite gels: Effects of fat type and concentration. *Food Hydrocolloids*, 2019, 90: 433-442.
- [11] SHAO J H, ZOU Y F, XU X L, WU J Q, ZHOU G H. Evaluation of structural changes in raw and heated meat batters prepared with different lipids using Raman spectroscopy. *Food Research International*, 2011, 44(9): 2955-2961.
- [12] 沈建福, 姜天甲. 山茶油的营养价值与保健功能. *粮食与食品工业*, 2006, 13(6): 6-8, 21.
SHEN J F, JIANG T J. Nutritional value and health care function of *Camellia* seed oil. *Cereal and Food Industry*, 2006, 13(6): 6-8, 21. (in Chinese)
- [13] 毛方华, 王鸿飞, 周明亮. 山茶油的功能特性. *食品科技*, 2010, 35(1): 181-185.
MAO F H, WANG H F, ZHOU M L. Functional properties of *Camellia oleifera* seed oil. *Food Science and Technology*, 2010, 35(1): 181-185. (in Chinese)
- [14] 杨玉玲, 游远, 彭晓蓓, 陈银基. 加热对鸡胸肉肌原纤维蛋白结构与凝胶特性的影响. *中国农业科学*, 2014, 47(10): 2013-2020.
YANG Y L, YOU Y, PENG X B, CHEN Y J. Influence of heating on structure and gel properties of myofibrillar proteins from chicken breast muscle. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(10): 2013-2020. (in Chinese)
- [15] GORNALL A G, BARDAWILL C J, DAVID M M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 1949, 177(2): 751-766.
- [16] 王静宇, 杨玉玲, 康大成, 汤晓智, 张兴, 马云, 倪文溪. 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. *中国农业科学*, 2017, 50(12): 2349-2358.
WANG J Y, YANG Y L, KANG D C, TANG X Z, ZHANG X, MA Y, NI W X. Effects of ultrasound on chemical forces and water holding capacity study of heat-induced myofibrillar protein gel. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(12): 2349-2358. (in Chinese)
- [17] ZHANG Z Y, YANG Y L, YANG X Z, CHEN Y J, YOU Y. Effects of ionic strength on chemical forces and functional properties of heat-induced myofibrillar protein gel. *Food Science and Technology Research*, 2015, 21(4): 597-605.
- [18] LIU R, ZHAO S M, XIE B J, XIONG S B. Contribution of protein conformation and intermolecular bonds to fish and pork gelation

- properties. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(5): 898-906.
- [19] ZHANG Z Y, REGENSTEIN J M, ZHOU P, YANG Y L. Effects of high intensity ultrasound modification on physicochemical property and water in myofibrillar protein gel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, 34: 960-967.
- [20] 王璋, 许时婴, 汤坚. 食品化学. 北京: 中国轻工业出版社, 2008.
- WANG Z, XU S Y, TANG J. *Food Chemistry*. Beijing: China Light Industry Press, 2008. (in Chinese)
- [21] ZHANG Z Y, YANG Y L, ZHOU P, ZHANG X, WANG J Y. Effects of high pressure modification on conformation and gelation properties of myofibrillar protein. *Food Chemistry*, 2017, 217: 678-686.
- [22] DEBUSCA A, TAHERGORABI R, BEAMER S K, PARTINGTON S, JACZYNSKI J. Interactions of dietary fibre and omega-3-rich oil with protein in surimi gels developed with salt substitute. *Food Chemistry*, 2013, 141: 201-208.
- [23] ALEJANDRE M, ASTIASARÁN I, ANSORENA D, BARBUT S. Using canola oil hydrogels and organogels to reduce saturated animal fat in meat batters. *Food Research International*, 2019, 122: 129-136.
- [24] ZHOU L, YANG Y L, WANG J Y, WEI S M, LI S S. Effects of low-fat addition on chicken myofibrillar protein gelation properties. *Food Hydrocolloids*, 2019, 90: 126-131.
- [25] 王莉莎, 崔洪君, 武雅琴, 包海蓉. 植物油与肌原纤维蛋白乳化复合凝胶的结构特性. *食品与发酵工业*, 2019, 45(9): 96-102.
- WANG L S, CUI H J, WU Y Q, BAO H R. Structural properties of emulsified composite gels of vegetable oil and myofibrillar protein. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(9): 96-102. (in Chinese)
- [26] 邵俊花. 猪肉蛋白质构象变化与保油保水性关系研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- SHAO J H. Study on relationship between structural changes and water/fat-binding capacity of pork meat proteins [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [27] 吴满刚. 脂肪和淀粉对肌原纤维蛋白凝胶性能的影响机理[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- WU M G. Mechanism of gelation of myofibrillar protein composites containing emulsified lipid droplets [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010. (in Chinese)
- [28] XIONG Y L, BLANCHARD S P, MEANS W J. Properties of broiler myofibril gels containing emulsified lipids. *Poultry Science*, 1992, 71(9): 1548-1555.
- [29] MENG G T, CHAN J C K, ROUSSEAU D, LI-CHAN E C Y. Study of protein lipid interactions at the bovine serum albumin/oil interface by Raman microspectroscopy. *Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53: 845-852.
- [30] HOWELL N K, HERMAN H, LI-CHAN E C Y. Elucidation of protein-lipid interactions in a lysozyme-corn oil system by Fourier transform Raman spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(3): 1529-1533.
- [31] KIM K H, RENKEMA J M S, VAN VLIET T. Rheological properties of soybean protein isolate gels containing emulsion droplets. *Food Hydrocolloids*, 2001, 15: 295-302.
- [32] HE X H, LIU H Z, LIU L, ZHAO G L, WANG Q, CHEN Q L. Effects of high pressure on the physicochemical and functional properties of peanut protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 2014, 36: 123-129.
- [33] XU X L, HAN M Y, FEI Y, ZHOU G H. Raman spectroscopic study of heat-induced gelation of pork myofibrillar proteins and its relationship with textural characteristic. *Meat Science*, 2011, 87(3): 159-164.
- [34] 蔡路昀, 史航, 曹爱玲, 周小敏, 张宇昊, 赵元晖, 励建荣. 鲮鱼骨胶原蛋白的结构及流变学特性. *中国食品学报*, 2020, 20(3): 66-73.
- CAI L Y, SHI H, CAO A L, ZHOU X M, ZHANG Y H, ZHAO Y H, LI J R. The structure and rheological characteristics of collagen from flounder bone. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(3): 66-73. (in Chinese)
- [35] KANG Z L, WANG P, XU X L, ZHU C Z, LI K, ZHOU G H. Effect of beating processing, as a means of reducing salt content in frankfurters: A physico-chemical and Raman spectroscopic study. *Meat Science*, 2014, 98(2): 171-177.
- [36] BEATTIE R J, BELL S J, FARMER L J, MOSS B W, PATTERSON D. Preliminary investigation of the application of Raman spectroscopy to the prediction of the sensory quality of beef silverside. *Meat Science*, 2004, 66(4): 903-913.
- [37] LIU R, ZHAO S M, XIONG S B, XIE B J, QIN L H. Role of secondary structures in the gelation of porcine myosin at different pH values. *Meat Science*, 2008, 80(3): 632-639.

(责任编辑 赵伶俐)