

# 云南本地黄牛肉盐溶蛋白热诱导凝胶功能特性的研究

常 青<sup>1</sup>, 黄启超<sup>1</sup>, 胡永金<sup>1</sup>, 葛长荣<sup>2,\*</sup>

(1.云南农业大学食品科学与技术学院, 云南 昆明 650201; 2.云南省动物营养与饲料重点实验室, 云南 昆明 650201)

**摘 要:** 以云南本地黄牛的背最长肌和股二头肌为材料, 采用  $L_9(3^4)$  正交设计研究了不同提取条件对背最长肌和股二头肌的盐溶蛋白热诱导凝胶保水性、蛋白组分及凝胶超微结构的影响。结果表明, 云南本地黄牛背最长肌和股二头肌的盐溶蛋白最佳提取条件均为 NaCl 浓度 0.6mol/L、温度 70℃、pH7.0, 凝胶的保水性分别是 96.21%、96.35%。SDS-PAGE 电泳和扫描电镜显示, 背最长肌和股二头肌在保水性最佳的条件下, 其肌球蛋白含量较高, 同时凝胶的网络比较均匀、细致。而保水性较差, 其肌球蛋白含量比较低, 凝胶网络结构粗糙、疏松、不均匀。

**关键词:** 云南本地黄牛; 背最长肌; 股二头肌; 凝胶特性; 盐酸蛋白

## Study on Heat-induced Gel Properties of Salt Soluble Muscle Protein of Yellow Cattle in Yunnan

CHANG Qing<sup>1</sup>, HUANG Qi-chao<sup>1</sup>, HU Yong-jin<sup>1</sup>, GE Chang-rong<sup>2,\*</sup>

(1.College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2.Animal Nutrition and Feed Laboratory of Yunnan Province, Kunming 650201,China)

**Abstract:** In the process of preparing heat-induced gel of salt soluble protein from *longissimus dorsi* (LD) or *biceps femoris* (BF) of yellow cattle in Yunnan Province, NaCl concentration, temperature and pH affecting the water holding capacity (WHC) of heat-induced gel were optimized through orthogonal test coupled with variance analysis, respectively. The results showed that for both LD and BF, the optimal preparation conditions of heat-induced gel are NaCl concentration 0.6 mol/L, 70 °C and pH 7.0, and the corresponding WHCs of heat-induced gel are 96.21% and 96.35%, respectively. The SDS-PAGE pattern and scanning electron microscope (SEM) image showed that the myosin content in extracted salt soluble protein under the above conditions is higher, and the prepared heat-induced gel network is uniform, dense and smooth.

**Key words:** yellow cattles in Yunnan; *longissimus dorsi* (LD); *biceps femoris* (BF); gel properties; salt soluble protein

中图分类号: TS201.7 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2009)05-0104-05

牛肉是高蛋白、低脂肪、低胆固醇的产品<sup>[1]</sup>, 其蛋白含量(20%)远远高于猪肉(14.54%)和羊肉(16.35%)<sup>[2]</sup>, 这些蛋白质赋予牛肉特有的风味、口感和营养, 特别是盐溶蛋白对牛肉制品的保水性及结构特性起到重要的作用<sup>[3-4]</sup>。随着人们生活质量的提高, 对方便、营养的重组肉制品的需求将会不断增加, 其盐溶蛋白凝胶特性是重组肉制品生产的关键点之一。因此, 对盐溶蛋白凝胶特性的研究已经成为肉类研究中的一个重要课题。

目前国外研究注重了解热诱导凝胶的机理和各种加工条件对形成理想凝胶性能变化的影响。Lavelle 研究了 pH 值对鸡胸、鸡腿肌原纤维蛋白凝胶的影响, 发现 pH

值在 6.0~6.4 范围内, 凝胶的强度与 pH 值呈正相关<sup>[5]</sup>。Lesi ów<sup>[6]</sup>对不同 pH 值条件下鸡胸肉和鸡腿肉的凝胶强度做比较, 发现鸡胸肉最佳凝胶的 pH 值为 6.0, 腿肉的最佳凝胶 pH 值为 5.5。Nayak 等研究发现, 当 NaCl 离子强度从 0% 增加到 4% 时, 鸡胸肉的盐溶蛋白质的溶解性提高了 25%<sup>[7]</sup>。国内, 汪之和等研究了不同的加热温度、加热时间和加热方式对 8 种西非鱼糜冻藏后凝胶特性的影响, 结果显示这些鱼糜基本上在 40~50℃ 加热时具有较强的凝胶强度, 60~70℃ 为凝胶劣化温度段<sup>[8]</sup>。本实验针对云南本地黄牛背最长肌和股二头肌的盐溶蛋白热诱导凝胶保水性进行研究, 并探讨盐溶蛋白组分及

收稿日期: 2008-05-11

基金项目: 云南省科技攻关项目(2004NG04)

作者简介: 常青(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: ws11020024@126.com

\* 通讯作者: 葛长荣(1963-), 男, 教授, 研究方向为动物营养与肉品质调控。E-mail: gcrzal@126.com

其凝胶超微结构与保水性的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

云南本地黄牛由巍山县畜牧局肉牛生产基地提供, 选用3月龄断奶的体重相近、身体健康的牛6头。实验动物采用全日制放牧的饲养方式, 饲养至3周岁屠宰。肉样均选用背最长肌和股二头肌。

十二烷基硫酸钠(SDS)、戊二醛、醋酸异戊酯及标准蛋白(11~250kD)。

### 1.2 仪器与设备

DT5-2型低速自动平衡台式离心机 北京时代北利离心机有限公司; 垂直板电泳仪 美国BIORAD公司; T-25型匀浆机 德国IKA公司; 凝胶成像系统及分析软件 安玛西亚公司; HCP-2临界点干燥仪 日本Hitachi公司; E-1010离子溅射仪 日本Hitachi Science Systems公司; KYKY-EM3200扫描电子显微镜 北京中科科仪技术发展有限责任公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 正交试验

采用正交试验 $L_9(3^4)$ (因素水平见表1)研究热变温度、氯化钠浓度和提取液pH值对云南本地黄牛股二头肌和背最长肌盐溶蛋白热诱导凝胶特性的影响, 通过凝胶保水性的研究, 筛选出盐溶蛋白最佳的提取条件。

表1  $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表  
Table 1 Factors and levels of  $L_9(3^4)$  orthogonal test on extraction conditions of salt soluble protein of LD and BF

水平	因素		
	A 温度(℃)	B NaCl 浓度(mol/L)	C pH
1	60	0.6	6.5
2	70	0.8	7.0
3	80	1.0	7.5

#### 1.3.2 盐溶蛋白热诱导凝胶的制备

将屠宰后牛的股二头肌和背最长肌剔除可见结缔组织和脂肪组织, 分别切成约 $1\text{cm}^3$ 的小块, 通过5mm的筛孔的绞肉机将肉绞碎, 称取40g, 真空包装后在 $-18^\circ\text{C}$ 下冻结, 备用。提取盐溶蛋白时, 首先取分装好的肉样在 $4^\circ\text{C}$ 下解冻至半冻结状态, 然后放入高速组织捣碎机中, 按正交试验设计加入200ml NaCl和10ml  $\text{MgCl}_2$ 溶液, 随后用高速组织捣碎机在8000r/min条件下, 进行匀浆处理30s, 然后调整pH值。匀浆液放入 $4^\circ\text{C}$ 的冰箱中静置24h后, 用单层纱布过滤, 滤液经4000r/min离心5min后, 得到上清液即为盐溶蛋白质溶液。测定

盐溶蛋白溶液的蛋白质含量和蛋白组成。将处理好的盐溶蛋白质溶液量取10ml加入离心管中, 用铝箔封好后, 置于电子恒温水浴锅中加热, 将温度升至所要求的温度为止, 保温30min, 停止加热, 自然冷却至室温, 即得盐溶蛋白质热诱导凝胶。置于 $4^\circ\text{C}$ 下保存, 备用。

#### 1.3.3 盐溶蛋白的SDS-PAGE分析<sup>[9]</sup>

将盐溶蛋白液进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 实验所采用的浓缩胶和分离胶的浓度分别为5%和12%。将盐溶蛋白质溶液浓度稀释到4mg/ml, 每个试样的上样量为 $15\mu\text{l}$ 。电泳时浓缩胶的电压调为80V, 到分离胶后, 将电压调至120V, 直到电泳完毕, 最后进行染色、脱色。

#### 1.3.4 凝胶保水性的计算

参照彭增起等<sup>[10]</sup>的方法略有改动。将盐溶蛋白溶液定量移到10ml离心管中, 用上述方法制备凝胶。取制备好的凝胶经3000r/min离心3min后, 称总重, 再去除离心出的水分, 再称重, 然后计算保水性(WHC)。

$$\text{WHC}(\%) = \frac{W_1 - W}{W_2 - W} \times 100$$

式中:  $W_1$ 为离心管+去水后的胶重(g);  $W_2$ 为离心管+肉汁的总重(g);  $W$ 为离心管的重量(g)。

#### 1.3.5 扫描电子显微镜观察

用单面刀片切取2mm厚的凝胶小片, 放入2.5%的戊二醛缓冲液中,  $4^\circ\text{C}$ 固定3h, 固定好的盐溶蛋白凝胶用0.1mol/L的磷酸缓冲液漂洗3次, 洗去多余的固定液, 吸取磷酸盐缓冲液, 加适量1%的锇酸, 再次固定2h后, 用磷酸缓冲液漂洗1h。然后分别用10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%的乙醇溶液梯度脱水15min, 再用1:1的乙醇-醋酸异戊酯和醋酸异戊酯置换。将处理后的样品放入超临界点干燥仪中干燥, 喷金2.5mm, 最后用扫描电子显微镜下观察凝胶结构并拍照。加速电压为30kV, 放大倍数为3000倍。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同提取条件对云南本地黄牛肌肉盐溶蛋白热诱导凝胶保水性的影响

#### 2.1.1 极差分析

由表1、2可知, 各因素对黄牛股二头肌和背最长肌盐溶蛋白凝胶保水性影响的主次顺序均为 $A > B > C$ , 即温度是主要影响因素, pH值次之, NaCl浓度对保水性的影响最小。

表 1 不同提取条件下云南本地黄牛股二头肌盐溶蛋白凝胶保水性极差分析结果

Table 1 Results and range analysis of orthonal test on extraction conditions of salt soluble protein of BF affecting WHC of its heat-induced gel

试验号	A 温度(°C)	B NaCl 浓度(mol/L)	C pH	保水性(%)
1	60	0.6	6.5	25.73
2	60	0.8	7.0	40.22
3	60	1.0	7.5	33.92
4	70	0.6	7.0	94.64
5	70	0.8	7.5	96.35
6	70	1.0	6.5	56.02
7	80	0.6	7.5	94.43
8	80	0.8	6.5	43.09
9	80	1.0	7.0	95.79
K <sub>1</sub>	99.87	214.80	124.84	
K <sub>2</sub>	247.01	179.66	230.65	
K <sub>3</sub>	233.31	185.73	224.70	
$\overline{K_1}$	33.29	71.60	41.61	
$\overline{K_2}$	82.34	59.89	76.88	
$\overline{K_3}$	77.77	61.91	74.90	
R	49.05	11.71	35.27	
因子主次 A > C > B				
最优组合 A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub>				

表 2 不同提取条件下云南本地黄牛背最长肌盐溶蛋白凝胶保水性极差分析结果

Table 2 Results and range analysis of orthogonal test on extraction conditions of salt soluble protein of LD affecting WHC of its heat-induced gel

试验号	A 温度(°C)	B NaCl 浓度(mol/L)	C pH	保水性(%)
1	60	0.6	6.5	26.07
2	60	0.8	7.0	36.20
3	60	1.0	7.5	27.53
4	70	0.6	7.0	95.09
5	70	0.8	7.5	96.21
6	70	1.0	6.5	50.78
7	80	0.6	7.5	53.18
8	80	0.8	6.5	52.92
9	80	1.0	7.0	95.75
K <sub>1</sub>	89.80	174.34	129.77	
K <sub>2</sub>	242.08	185.33	227.04	
K <sub>3</sub>	201.85	174.06	176.92	
$\overline{K_1}$	29.93	58.11	43.26	
$\overline{K_2}$	80.69	61.78	75.68	
$\overline{K_3}$	67.28	58.02	58.97	
R	50.76	3.76	32.42	
因子主次 A > C > B				
最优组合 A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>				

## 2.1.2 方差分析

由于极差分析方法不能把试验条件的改变引起的数据波动同试验误差引起的数据波动区分开来, 因此不能确定试验的精度, 为了弥补极差分析法的不足, 对正

交试验进行方差分析, 结果见表 3、4。

表 3 不同提取条件下云南本地黄牛股二头肌盐溶蛋白凝胶保水性方差分析结果

Table 3 Variance analysis of orthogonal test results in Table 1

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性	贡献率(%)
A	4405.26	2	2202.63	12.26		59.89
B	235.1	2	117.6	0.65	不显著	3.20
C	2356.11	2	1178.1	6.56		32.03
误差	359.43	2				
总和	7355.9	8				

表 4 不同提取条件下云南本地黄牛背最长肌盐溶蛋白凝胶保水性方差分析结果

Table 4 Variance analysis of orthogonal test results in Table 2

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性	贡献率(%)
A	4151.43	2	2075.7	4.096		61.32
B	27.54	2	13.77	0.027	不显著	0.41
C	1577.4	2	788.7	1.556		23.30
误差	1013.43	2				
总和	6769.8	8				

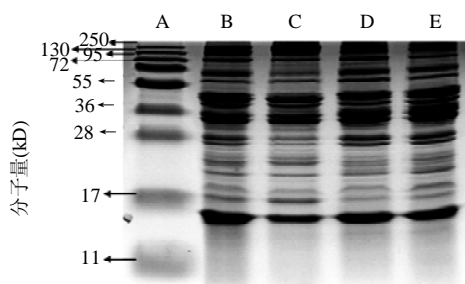
由方差分析表可见, 因素 A、C 的贡献率较高, 因素 B 的贡献率比较低, 但均不显著, 因素作用的主次顺序为 A > C > B。

## 2.1.3 最优工艺条件确定

研究表明, 在一定温度范围内, 其凝胶保水性随着温度的升高而增大, 但当温度达到一定程度时, 保水性就会降低。这是由于温度升高使肽链打开然后又重新聚合形成寡聚体, 最终形成复杂的网络结构, 使凝胶保水性提高。但温度继续上升会使重新形成的复杂网络结构破坏, 从而降低凝胶保水性<sup>[11]</sup>。有报道表明 pH 值与凝胶保水性呈正相关, 由于 pH 值升高, 偏离等电点水平增大, 则静电斥力增大, 使组织结构松散, 保水性就会增大。对于因素 A 和 C, 通过分别比较其 K<sub>1</sub>、K<sub>2</sub>、K<sub>3</sub> 的大小, 确定最优水平分别是 A<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>。对于 NaCl 浓度, 水平改变对试验结果的影响不大, 但考虑到高钠盐肉制品色泽发暗, 质地发硬, 影响产品的可接受性<sup>[12]</sup>, 因此最佳盐溶蛋白提取条件的组合为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>, 即温度为 70℃, NaCl 浓度为 0.6mol/L, pH7.0。

## 2.2 不同提取条件对云南本地黄牛肌肉盐溶蛋白组分的影响

选用股二头肌和背最长肌的凝胶保水性较低(正交试验 1 号组合)和较高(正交试验 5 号组合)的盐溶蛋白质溶液进行 SDS-PAGE 分析, 研究凝胶保水性与形成凝胶的盐溶蛋白质之间的关系。



A. 标准分子量蛋白; B. BF1(表1中的1号组合)盐溶蛋白;  
C. BF5(表1中的5号组合)盐溶蛋白; D. LD1(表2中的1号组合)盐溶蛋白; E. LD5(表2中的5号组合)盐溶蛋白。

图1 不同提取条件下云南本地黄牛背最长肌和股二头肌的盐溶蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE pattern of salt soluble proteins of BF extracted under condition combination NO.1 or 5 in Table 1 and LD extracted under condition combination NO.1 or 5 in Table 2

由图1可以看出,不论是股二头肌还是背最长肌,保水性较高的盐溶蛋白质溶液不仅蛋白含量高,而且蛋白质组分多,尤其是分子量为220kD的肌球蛋白重链,其色泽深且宽。保水性较低的盐溶蛋白质溶液蛋白含量较低,而且电泳图谱中分子量为220kD的蛋白质色泽浅且窄。

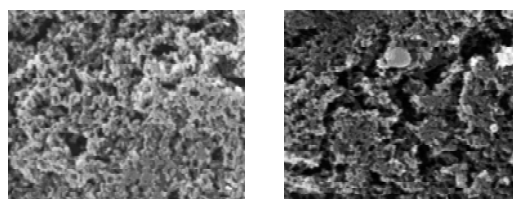
盐溶蛋白主要是指肌原纤维蛋白,肌原纤维蛋白是多种蛋白的一个总称,肌球蛋白是其中重要的一种,分子量为220kD,在重组肉制品的结合性方面起重要作用,同时肌球蛋白是加热后唯一可以形成凝胶的蛋白。除了肌球蛋白,还包括肌动蛋白(约45kD),虽然它在热变性时不会表现出任何黏结性或形成凝胶,但是会影响肌球蛋白凝胶特性<sup>[13]</sup>。另外还有原肌球蛋白(34~36kD)、肌浆蛋白和其他一些蛋白质,对于凝胶的形成有一定的作用。

### 2.3 不同提取条件对云南本地黄牛肌肉盐溶蛋白凝胶超微结构的影响

不论是背最长肌,还是股二头肌,在不同提取条件下制备的盐溶蛋白凝胶结构存在一定的差异。从感官上讲,保水性好的盐溶蛋白凝胶较细腻、均匀,保水性较差的凝胶的组织状态则粗糙、松散。为了更好地分析盐溶蛋白凝胶保水性存在差异的原因,实验选用上述两个样品作扫描电镜观察,从凝胶的微观结构分析不同提取条件下制备的凝胶的组织结构的区别。

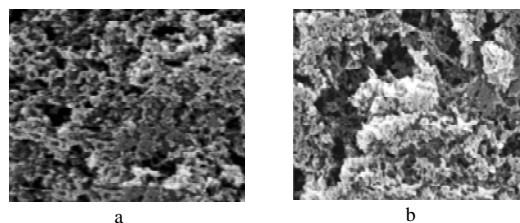
盐溶蛋白受热时蛋白质聚合、连接在一起形成网状的三维立体空间结构,构成了凝胶的骨架,可束缚一定水分。网状结构的差异会导致凝胶组织状态的不同。由NaCl浓度为0.8mol/L、pH值为7.5和热变温度为70℃的处理(正交试验5号组合)制备的股二头肌和背最长肌盐溶蛋白凝胶的保水性最高,分别为96.35%、96.21%,

其组织状态较好,凝胶的网络较均匀、细致、蛋白束平滑(图2a、图3a)。NaCl浓度为0.6mol/L、pH值为6.5和热变温度为60℃的处理(正交试验1号组合)制备的股二头肌和背最长肌盐溶蛋白凝胶的保水性分别是25.73%、26.07%,凝胶网状结构粗糙、疏松、不均匀(图2b、图3b)。对比图2a和图2b、图3a和图3b可知,采用正交试验5号组合制备的盐溶蛋白凝胶网状结构均匀、细致,通过毛细管力和电荷的相互作用能够束缚较多的水分,这样的凝胶的保水性也随之增加;采用正交试验1号组合所制备的盐溶蛋白凝胶组织疏松,不均匀,其网格较大,不能存留大量的水分。



a、b 分别为表1中5号、1号试验所得盐溶蛋白的热诱导凝胶。

图2 云南本地黄牛股二头肌盐溶蛋白凝胶扫描电镜照片  
Fig.2 Scanning electron images of heated-induced gel of salt soluble proteins of BF extracted under condition combination NO.1 or 5 in Table 1



a、b 分别为表2中5号、1号试验所得盐溶蛋白的热诱导凝胶。

图3 云南本地黄牛背最长肌盐溶蛋白凝胶扫描电镜照片  
Fig.3 Scanning electron images of heated-induced gel of salt soluble protein of LD extracted under condition combination NO.1 or 5 in Table 2

## 3 结 论

本实验研究了云南本地黄牛背最长肌和股二头肌的盐溶蛋白热诱导凝胶保水性,探讨盐溶蛋白组分及其凝胶超微结构与保水性的关系。结果表明,盐溶蛋白最佳提取条件为:NaCl浓度均为0.6mol/L,温度为70℃,pH7.0。SDS-PAGE图谱表明,在保水性最佳的条件下背最长肌和股二头肌,盐溶蛋白质组分多,尤其是分子量为220kD的肌球蛋白,其色泽深且宽;另外,其凝胶的超微结构分析中,组织状态较好,凝胶的网络较均匀、细致、蛋白束平滑。

## 参考文献:

- [1] 王光亚. 食物成分表[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992.
- [2] 佩肯 G C, 弗里兰·格雷夫斯 J H. 美国烹饪[M]. 沙建塾, 译. 北京: 中国商业出版, 1998.
- [3] 杨龙江, 南庆贤. 肌肉蛋白质的热诱导凝胶特性及其影响因素[J]. 肉类工业, 2001(10): 39-42.
- [4] MACFARLANE J J, SCHMIDT G R, TURNER R H. Binding of meat pieces: a comparison of myosin, actomyosin and sarcoplasmic proteins as binding agents[J]. J Food Sci, 1977, 42: 1603-1606.
- [5] NORTHCUTT J K, LAVELLE C L, FOEGEDING E A. Changes in gel fracture properties during the isolation of myofibrils[J]. J Food Sci, 1993, 58(5): 983-986.
- [6] LESIOW T, XIONG Y L. Chicken muscle homogenate gelation properties: effect of pH and muscle fiber type[J]. Meat Sci, 2003, 64: 399-403.
- [7] NAYAK R, KENNEY P B, SLIDER S. Protein extractability of turkey breast and thigh muscle with varying sodium chloride solutions as affected by calcium, magnesium and zinc chloride[J]. J Food Sci, 1996, 61: 1149-1154.
- [8] 汪之和, 范秀娟, 顾红梅, 等. 加热条件对几种西非鱼种鱼糜凝胶特性的影响[J]. 食品与生物技术, 2002, 21(1): 33-57.
- [9] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-110.
- [10] 彭增起, 王晓燕, 魏瑞兰, 等. 肌肉蛋白质凝胶的黏度和持水力之间的相关性[J]. 肉类研究, 1997(2): 14-15.
- [11] SAMEJIMA K, HASHIMOTO Y. Heat gelation properties and protein extractability of beef myofibrils[J]. J Food Sci, 1985, 52: 1495-1498.
- [12] 周光宏. 畜产品加工学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [13] SAMEJIMA K, HASHIMOTO Y, YASUI T, et al. Heat gelling properties of myosin, actin, actomyosin and myosin-subunits in a saline model system[J]. J Food Sci, 1969, 34: 242-250.