

# 剪切条件下制备的肉糜中脂肪微粒的 微观结构特点

朱 易<sup>1</sup>, 汪张贵<sup>2</sup>, 彭增起<sup>1,\*</sup>, 靳红果<sup>1</sup>, 王蓉蓉<sup>1</sup>, 姚 瑶<sup>1</sup>, 张雅玮<sup>1</sup>, 王复龙<sup>1</sup>  
(1. 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095; 2. 蚌埠学院生物与食品科学系, 安徽 蚌埠 233030)

**摘 要:** 研究在剪切条件下制备的肉糜中脂肪微粒分布规律及微观结构特点。以猪背最长肌为原料, 绞碎斩拌 3min 后再加入背膘斩拌 5min。分别用光学显微镜和电子显微镜对肉糜和凝胶进行电镜观察。结果表明: 在剪切过程中, 背膘被剪切成大小形状各不相同的液态脂肪滴和固态脂肪颗粒, 有的脂肪滴和脂肪颗粒能够聚集成脂肪微粒簇。其表面都包被着一层蛋白膜, 或单独地或相互交联分散在蛋白基质中。

**关键词:** 剪切乳化; 脂肪微粒; 透射电镜; 扫描电镜; 微观结构

## Microscopic Structure Properties of Fat Particles in Meat Batters Prepared under Shearing Conditions

ZHU Yi<sup>1</sup>, WANG Zhang-gui<sup>2</sup>, PENG Zeng-qi<sup>1,\*</sup>, JIN Hong-guo<sup>1</sup>, WANG Rong-rong<sup>1</sup>,  
YAO Yao<sup>1</sup>, ZHANG Ya-wei<sup>1</sup>, WANG Fu-long<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Department of Biotechnology and Food Science, Bengbu College, Bengbu 233030, China)

**Abstract:** The distribution regularity and microstructure of fat particle in meat batters were investigated. Porcine *longissimus* muscle was used as raw material. After grinding and chopping for 3 min, the mash was chopped with pork fat for 5 min. Light microscope and electron microscope were used to observe the meat batter and the gel. The results showed that the fat was shearing into liquid fat droplets and solid fat granules of different sizes and shapes, some fat droplets and fat granules could even be aggregated into fat particle clusters. They were all covered with a layer of protein film and dispersing in the protein matrix individually or by a coalescent way.

**Key words:** shear emulsification; fat particle; transmission electron microscope; scanning electron microscope; microstructure

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0073-05

1985 年, Ockerman<sup>[1]</sup>建立并完善了用电导率研究肌肉蛋白和植物油间乳化能力的方法。此后不少学者<sup>[2-5]</sup>纷纷采用电导率法来研究肌肉蛋白和植物油间乳化特性, 在此基础上提出了水包油型乳化学说和蛋白基质物理固定乳化学说。然而, 肉类工业生产中的肉糜通常是以肌肉组织(瘦肉)、脂肪组织(肥膘)、食盐和水等多种成分为原料经混合剪切斩拌而成的, 几乎不采用植物油。剪切条件下的肉糜是一个复杂的乳化体系, 其中多数脂肪微粒粒径大于  $50\mu\text{m}$ <sup>[6-8]</sup>, 超过经典乳化理论对分散相直径大小要求( $R < 50\mu\text{m}$ )<sup>[9]</sup>, 其乳化稳定性可能受到各

种因素影响。直接用以植物油为分散相建立的水包油型乳化学说或蛋白基质物理镶嵌固定学说来诠释其稳定性或乳化机制是不完善的。

本研究通过光学显微镜、透射电子显微镜(TEM)和扫描电子显微镜(SEM)观察肉糜和凝胶中脂肪微粒分布及微观结构, 为探明肌肉和固体脂肪在剪切条件下的乳化机理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

收稿日期: 2011-03-14

基金项目: 安徽省高等学校优秀青年人才基金重点项目(2012SQRL214ZD)

作者简介: 朱易(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为畜产品加工与质量控制。E-mail: zhuyi8907@yahoo.com.cn

\* 通信作者: 彭增起(1956—), 男, 教授, 博士, 研究方向为畜产品加工与质量控制。E-mail: zqpeng@njau.edu.cn

### 1.1.1 原料肉

猪肉及猪背膘均购于浙江青莲食品有限公司。将猪肉及背膘绞碎后-20℃备用,使用前在0~4℃解冻8~10h。

### 1.1.2 试剂

苏丹IV 美国Sigma公司;溴酚蓝 上海国药集团有限公司;氯化钠、磷酸氢二钾、丙酮、无水乙醇、2.5%戊二醛、四氧化锇等均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

Stephan UMC-5C型乳化混合机 德国Stephan机械有限公司;Hanna-211型pH计 意大利Hanna有限公司;Olympus BX41生物显微镜 日本Olympus公司;S-3000N型扫描电镜、H-7650型透射电镜 日本Hitachi公司;HH-42快速恒温水浴箱 常州国华电器有限公司;MM-12型绞肉机 广东省韶关市新通力食品机械有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 肉糜的制备

取200g部分解冻的瘦肉样置于乳化混合机内,加入400mL 0.6mol/L NaCl-0.015mol/L  $K_2HPO_4$ 溶液(pH6.6, 4℃)后,在3000r/min剪切速率下真空斩拌3min,然后再添加150g猪背膘(4℃),最后在3000r/min剪切速率条件下真空斩拌5min,即可得到肉糜。肉糜的斩拌终点温度不超过12℃。

#### 1.3.2 肉糜中脂肪微粒的光学显微镜观察

取1滴刚稀释好的肉糜乳状液放在洁净干燥的载玻片(事先用无水乙醇处理过)一端,按照制作血涂片方法制作乳状液涂片,置于4℃冰箱中晾干。晾干后的涂片先用1%溴酚蓝染色溶液浸渍染色3min,用水洗掉多余的染色液后再用0.1%苏丹IV染色液浸渍染色3min,用水洗掉多余染色液,4℃条件下晾干。采用光学生物显微镜观察,用高清晰度数码相机(DP12)拍摄典型的肉乳状液图像。

#### 1.3.3 肉糜中脂肪微粒的透射电镜观察

取6份少量肉糜置于2.5%戊二醛溶液中在4℃条件下固定48h,切成1mm<sup>3</sup>(1mm×1mm×1mm)左右大小样品,用0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.2)漂洗数次,接着用1%四氧化锇固定,再用0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.2)漂洗数次,乙醇梯度脱水,之后用Epon812环氧树脂进行包埋,最后用超薄切片机切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色,使用透射电子显微镜观察和拍照。选择最富有代表性图片作为实验观察结果。

#### 1.3.4 肉糜凝胶中脂肪微粒的扫描电镜观察

取6份适量肉糜置于50mL带有塑料盖的聚乙烯塑料离心管中,500×g条件下离心3min,去除肉糜中大气泡,再在70℃条件下水浴加热30min,取出迅速放入冰

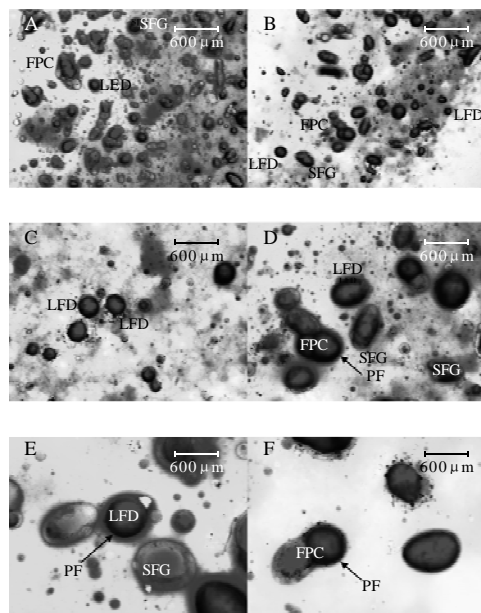
屑中冷却至室温,转移到4℃条件下贮藏12h,制得凝胶。

取6份1cm<sup>3</sup>(1cm×1cm×1cm)左右大小的凝胶样品,用液氮迅速冷冻断裂成小碎片后,置于2.5%戊二醛溶液中在4℃条件下固定72h,然后用0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.2)漂洗数次,接着用1%四氧化锇固定,用0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.2)漂洗数次,然后分别用30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%乙醇梯度脱水,每次10min,100%乙醇重复脱水3~4次。采用二氧化碳临界点干燥法用醋酸戊酯置换样品中的脱水剂(乙醇),在置换过程中同时干燥。用银粉导电胶固定样品于样品台上,最后在高真空镀膜机内给样品表面镀一层金属膜。在扫描电镜下进行微观观察,选择最富有代表性的进行拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 肉糜中脂肪微粒的光学显微镜观察

为更好地区别稀释后的肉糜中肌肉蛋白质和脂肪两种成分,采用溴酚蓝(蛋白质染色剂)和苏丹IV(脂肪染色剂)2种染色试剂对肉糜涂片复合染色后观察。肉糜涂片经过溴酚蓝和苏丹IV复合染色后,脂肪被苏丹IV染色液染成红色,而盐(水)溶性蛋白质、小片段状肌肉组织和结缔组织等则被溴酚蓝染色液染成蓝色。复合染色后的光学显微镜图见图1。



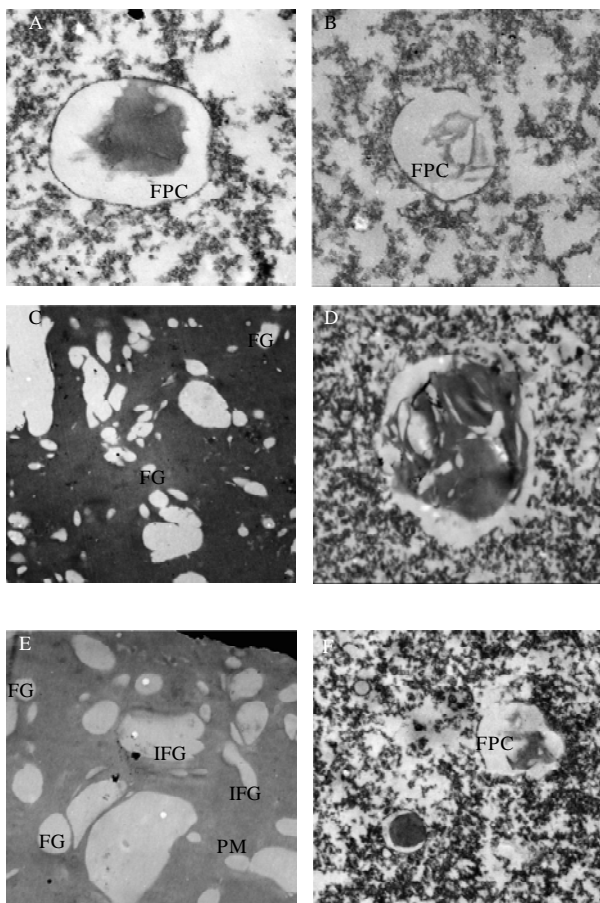
A、B.×40倍;C、D.×100倍;E、F.×200倍;黑色部分代表蛋白质;灰色代表脂肪;SFG为固态脂肪颗粒;LFD为液态脂肪滴;FPC为脂肪微粒簇;PF为蛋白膜。

图1 肉糜光学显微镜图

Fig.1 Image of meat batters examined under light microscope

由图1可知,脂肪微粒(灰色部分)在形状、大小和明亮程度等方面各不相同,其表面包被着一层蛋白膜(蓝膜)分散在蛋白质基质(图中黑色部分)中。脂肪微粒有各种形状,如规则的球形、椭球形、棒状结构和不规则形状等都较为常见。在存在形式上,主要有液态脂肪滴和固态脂肪颗粒。其中,大多数液态脂肪滴为规则的球形、椭球形或近似球形,而固态脂肪颗粒通常表现为不规则形状。质地比较柔软的脂肪组织(脂肪细胞)在剪切过程中由于摩擦产生的瞬间高温可使刀片周围一些质地较柔软的脂肪组织融化,从而释放出液态脂肪滴,而质地比较硬的脂肪组织被剪切成形状和大小不同的固态脂肪颗粒。此外,整个系统中还有不少的脂肪微粒簇(2个或2个以上脂肪微粒聚集在一起)。在大小上,脂肪粒径大小不一,绝大多数脂肪微粒大小在几到十几微米范围内,也有粒径小于 $1\mu\text{m}$ ,或达到几十上百微米的。

## 2.2 肉糜中脂肪微粒的透射电镜观察



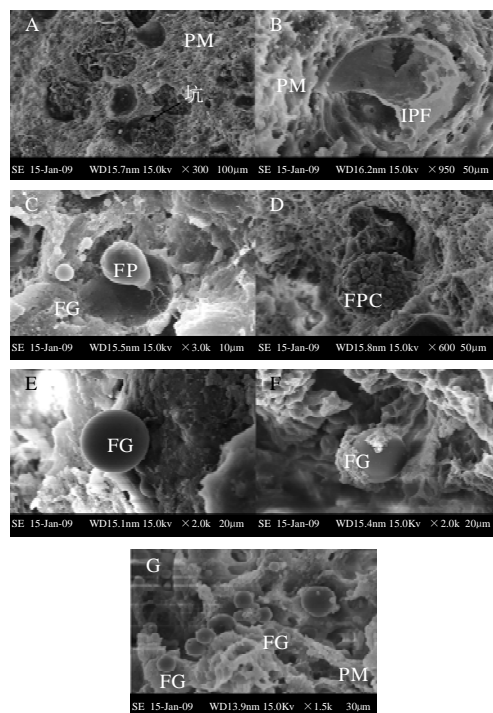
FG. 脂肪球; IFG. 不规则脂肪球; FPC. 脂肪微粒簇; PM. 蛋白基质; A.  $\times 6000$ 倍; B.  $\times 8000$ 倍; C.  $\times 2000$ 倍; D.  $\times 2500$ 倍; E.  $\times 3000$ 倍; F.  $\times 4000$ 倍。

图2 肉糜的透射电镜图

Fig.2 Image of meat batters examined under transmission electron microscope

由于蛋白质的密度要大于脂肪,在用透射电镜观察时,投射到蛋白质上的电子被散射的多,而投射到荧光屏上的电子少,因此图2中呈暗像的为蛋白质,明像的为脂肪。可以看出,脂肪微粒表面的蛋白膜颜色明显要比蛋白质基质暗,颜色越暗表明其密度越大,说明蛋白膜的蛋白浓度要高于蛋白基质。蛋白膜的厚度经测量大多数在 $80\sim 160\text{nm}$ 范围内,不同大小脂肪微粒周围蛋白膜厚度一般不同,即使对于同一个脂肪微粒来说,周围的一圈蛋白膜也有薄有厚,这可能与脂肪微粒表面性质有关,表现出对蛋白质吸引能力的差异。有的脂肪微粒表面的蛋白膜有一定的缺损,可能是由于剪切时间过长温度过高而导致内部压力过大,致使蛋白膜破损,脂肪外溢(图2B)。有一种结构复杂的脂肪微粒簇,它主要是由几个大小和形状不同脂肪微粒聚集而成的“球中球”,即蛋白膜中有脂肪,脂肪中又有蛋白膜。有的排列比较稀疏,看上去像松散的泡沫结构(图2D)。出现这些特殊结构的原因可能在于:随着剪切时间延长,脂肪微粒表面蛋白膜被破坏,被破坏的部分蛋白膜在剪切条件下可能会离开脂肪微粒,伴随着脂肪滴(球)或脂肪颗粒破裂释放出脂肪,达到内外压力差平衡。而游离出的脂肪在对脂肪或蛋白质的亲和力等作用下,向周围同样脱离、部分脱离蛋白膜或表面依然覆盖着蛋白膜的脂肪微粒靠近接触,就形成了“球中球”这种特殊的结构。

## 2.3 肉糜凝胶中脂肪微粒的扫描电镜观察



A.  $\times 300$ 倍; B.  $\times 950$ 倍; C.  $\times 3000$ 倍; D.  $\times 600$ 倍; E.  $\times 2000$ 倍; F.  $\times 2000$ 倍; G.  $\times 1500$ 倍; FG. 脂肪球; FP. 脂肪颗粒; PM. 蛋白基质; IPF. 不完整蛋白质膜; FPC. 脂肪微粒簇。

图3 肉糜凝胶扫描电镜图

Fig.3 Image of meat batters examined under scanning electron microscope

由图3可知,肉糜凝胶中存在着很多脂肪微粒,粒径大小及微粒形状与之前肉糜的观察结果基本一致。凝胶中脂肪微粒表面的蛋白膜与蛋白基质相比明显要细致光滑很多。脂肪微粒本应被蛋白基质包被,但在制样的处理过程中,由于液氮迅速冷冻断裂而导致脂肪微粒与蛋白凝胶基质分离,脂肪微粒裸露出来(图3E),对应的蛋白凝胶基质上留下一个个的“坑”(图3A)。也有脂肪微粒与蛋白基质并未分离完全,蛋白膜表面还残留着蛋白基质的情况(图3F)。一些粒径比较大的脂肪微粒在加热形成凝胶过程中体积过分膨胀,为了释放内部大量热量,其表面蛋白膜破裂,游离出脂肪,最后遗留下少量不完整的蛋白膜(图3B)。有的脂肪微粒表面蛋白膜一端向外延伸,以一根比较长的“蛋白丝”与蛋白基质连接,这可能是蛋白基质与蛋白膜间相互作用的一种特殊形式(图3C)。

在分布特点上,有的脂肪微粒单独地分布在蛋白凝胶基质中,有的相互“依偎”在一起分布在基质中(图3G);有的被蛋白凝胶基质部分或全部包埋,好像物理镶嵌固定在蛋白质凝胶基质中;有的小脂肪球则黏附在大脂肪颗粒上面等。这些说明了凝胶中存在(膜)蛋白-(膜)蛋白和(膜)蛋白-蛋白基质等相互作用,从而维持着脂肪微粒的稳定性。

### 3 讨 论

通过对剪切乳化条件下肉糜的光学显微镜和透射电镜观察发现,肉糜中存在各种脂肪微粒,包括液态脂肪滴、固态脂肪颗粒及脂肪颗粒簇等,这之前许多学者<sup>[10-13]</sup>研究的添加植物油的肌肉蛋白乳化体系不同,后者的乳化体系中只有液态脂肪滴这一种脂肪微粒。本次研究中发现无论是单个固态脂肪颗粒、液态脂肪滴(球)还是脂肪微粒簇,其周围都包被着一层较厚蛋白膜,或单独或交联在一起分布在蛋白基质中。在添加植物油的肌肉蛋白乳化体系中也曾发现脂肪滴表面存在蛋白膜, Jones 等<sup>[13]</sup>研究发现,在油-水界面形成蛋白膜早期,游离肌球蛋白分子以相对完整单体形式存在于油水界面上,重链朝向油相,轻链朝向水相,其他蛋白质分子主要通过疏水力作用、共价键和氢键等形式实现蛋白质-蛋白质相互作用,然后随着其他肌原纤维蛋白沉积而逐渐加厚,最后形成了一个半刚性蛋白膜。

在添加植物油的肉糜热诱导凝胶中曾发现同样存在蛋白膜结构, Barbut 等<sup>[14]</sup>用扫描电镜观察发现煮制后凝胶中的脂肪球表面存在蛋白膜包被现象。 Borchert 等<sup>[12]</sup>研究发现肉糜凝胶中脂肪球表面也存在蛋白膜包被,且有的蛋白膜表面存在小洞或孔隙。而本实验通过对剪切乳化条件下的肉糜热诱导凝胶的扫描电镜观察发现凝胶中同样存在大小形状不一的脂肪滴(球)和脂肪颗粒。这

些脂肪滴(球)或脂肪颗粒表面都包被着一层蛋白膜,分布在蛋白凝胶基质中,这些现象与之前肉糜的观察结果基本吻合。表明热诱导凝胶网络结构中脂肪微粒的性状及分布特点受加热前肉糜中脂肪微粒的影响。究其原因可能在于:蛋白膜本身具有一定的韧性和弹性,在加热过程中具有“自我调节”和“整合”内部空间的能力,使脂肪微粒表现多种形状。当然,蛋白膜的这种“自我调节”能力是有限度的。当内部压力超过蛋白膜的“自我调节”能力时,蛋白膜就会破裂游离出脂肪滴。由此可见,蛋白膜在维持剪切乳化条件下的肉糜及其凝胶中脂肪微粒稳定性方面都具有重要的作用。

在本实验中,肌肉组织经剪切萃取出的蛋白质、纤维碎片、肌原纤维及胶原纤丝间发生相互作用,形成一种高度黏稠乳化体系。被覆盖着一层蛋白膜的脂肪微粒不像经典乳状液中油滴那样悬浮在纯的或均匀透明水相体系中,它们不能脱离黏度大的蛋白基质而单独存在。因而,肉糜中脂肪微粒会受到黏度大蛋白基质固定作用。通过扫描电镜对凝胶的观察发现,有的脂肪微粒部分或全部被蛋白凝胶基质包埋,物理镶嵌固定在蛋白凝胶基质中;有的脂肪球表面蛋白膜外还黏附着比较多的蛋白凝胶基质。另外,还发现有一根较长的蛋白丝将脂肪球表面的蛋白膜与蛋白凝胶基质相连,这些现象都说明了蛋白凝胶基质对脂肪微粒的稳定也具有一定作用。在对添加植物油的肌肉蛋白乳化体系的研究中,同样有一些学者<sup>[15-19]</sup>认为肉糜中脂肪球被蛋白基质物理镶嵌固定其中,从而得以相对稳定存在。 Hermansson 等<sup>[18]</sup>研究认为脂肪球表面蛋白膜是整个蛋白凝胶基质结构的一部分,它是膜蛋白和基质蛋白间物理性连接相互作用的一种特殊方式。有不少学者<sup>[20-21]</sup>研究认为在肉糜煮制过程中,肌原纤维蛋白聚集形成蛋白凝胶基质,能够物理镶嵌固定住脂肪球。

本研究在剪切过程中,背膘被剪切成大小形状各不相同的液态脂肪滴(球)和固态脂肪颗粒,有的脂肪滴(球)和脂肪颗粒能够聚集形成脂肪微粒簇。它们表面都包被着一层蛋白膜,或单独地或相互交联分散在蛋白基质中。在剪切乳化条件下,热诱导凝胶网络结构中脂肪微粒的性状及分布特点受加热前肉糜中脂肪微粒的影响;无论是在肉糜还是其凝胶中,脂肪微粒的稳定是其表面的蛋白膜和蛋白基质共同作用的结果。

### 参考文献:

- [1] OCKERMAN H W. Emulsifying capacity and stability. Quality control of post mortem muscle tissue[D]. Columbus, OH: The Ohio State University, 1985.
- [2] ZORBA Ö, KURT Ş. Optimization of emulsion characteristics of beef, chicken and turkey meat mixtures in model system using mixture design [J]. Meat Science, 2006, 73(4): 611-618.

- [3] KARAKAYA M. Assessment of the attributes of meat emulsion of various species with oil and fat in a model system[D]. Ataturk University, 1990.
- [4] ZORBA Ö, GÖKALP H Y, YETIM H, et al. Salt phosphate and oil temperature effects on emulsion capacity of fresh or frozen meat and sheep tail fat[J]. *Journal of Food Science*, 1993, 58(3): 492-496.
- [5] ZORBA Ö, GÖKALP H Y, YETIM H, et al. Model system evaluations of the effects of different levels of  $K_2HPO_4$ , NaCl and oil temperature on emulsion stability and viscosity of fresh or frozen turkish style meat emulsions[J]. *Meat Science*, 1993, 34: 145-161.
- [6] THENO D M, SCHMIDT G R. Microstructural comparison of three commercial frankfurters[J]. *Journal of Food Science*, 1978, 43: 845-848.
- [7] BARBUT S. Importance of fat emulsification and protein matrix characteristics in meat batter stability[J]. *Journal of Muscle Foods*, 1995, 6: 161-177.
- [8] van den OORD A H A, VISSER P R. State and distribution of fat in finely comminuted meat products (frankfurter type sausage)[J]. *Die Fleischwirtschaft*, 1973, 53: 1427-1430.
- [9] 阚建全. 食品化学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [10] HANSEN L J. Emulsion formation in finely comminuted meat systems [J]. *Food Technology*, 1960, 14: 565-571.
- [11] HELMER R L, SAFFLE R L. Effect of chopping temperature on the stability of sausage emulsions[J]. *Food Technology*, 1963, 17: 115-119.
- [12] BORCHERT L L, GREASER M L, BARD J C, et al. Electron microcopy of a meat emulsion[J]. *Journal of Food Science*, 1967, 32: 419-421.
- [13] JONES K W, MANDIGO R W. Effects of chopping temperature on the microstructure of meat emulsions[J]. *Journal of Food Science*, 1982, 47: 1930-1935.
- [14] BARBUT S. Microstructure of reduced salt meat batters as affected by polyphosphates and chopping time[J]. *Journal of Food Science*, 1988, 53: 1300-1304.
- [15] LEE C M. Microstructure of meat emulsions in relation to fat stabilization [J]. *Food Microstructure*, 1985, 4: 63-72.
- [16] GORDON A, BARBUT S. The role of the interfacial protein film in meat batter stabilization[J]. *Food Structure*, 1990, 9: 77-81.
- [17] GORDON A, BARBUT S. Effect of chemical modification on the microstructure of raw meat batters[J]. *Food Structure*, 1991, 10: 241-246.
- [18] HERMANSSON A M, HARBITZ O, LANGTON M. Formation of two types of gels from bovine myosin[J]. *Journal of Science and Food Agriculture*, 1986, 37: 69-84.
- [19] GORDON A, BARBUT S. Effect of chemical modification on the stability, texture and microstructure of cooked meat batters microstructure [J]. *Food Structure*, 1992, 11: 133-146.
- [20] LEE C M, HAMPSON J W, ABDOLLAHI A. Effect of plastic fats on thermal stability and mechanical properties of fat-protein gel products[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1981, 48: 983-987.
- [21] ACTON J C, DICK R L. Protein-protein interactions in processed meats[C]. *Meat Conf, Recip: Proc Annu*, 1984, 37: 36-42.