

草菇对牛肉蛋白结构的修饰效应

沈双伟^{1,2,3}, 青正龙^{1,2,3}, 林伟玲⁴, 张贤斌⁴, 刘学铭², 林耀盛², 唐道邦², 王旭莘², 程镜蓉^{2*}, 朱明军^{1,3,5*}
(1.喀什大学生命与地理科学学院, 新疆喀什 844000) (2.广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610) (3.叶尔羌绿洲生态与生物资源研究高校重点实验室, 新疆喀什 844000) (4.中山市黄圃镇农业服务中心, 广东中山 528429)
(5.华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 该研究以牛肉糜及其蛋白为对象, 比较了草菇粉(5%, *m/m*)处理前后牛肉肉糜的理化性质、蛋白溶解性、肌原纤维蛋白的结构、聚集状态及流变特性等的变化, 以解析草菇对牛肉糜品质的影响机理。结果显示: 草菇会有效降低肉糜的蒸煮损失率, 但造成肉糜的pH值和挥发性盐基氮含量提高, 产品色泽变暗。其中, 草菇处理48 h后肉糜样品蒸煮损失最低(3.44%), 较对照组减少约4.48倍。与此同时, 随着处理时间的延长, 蛋白溶解性先降低后增加, 肌原纤维蛋白的羧基化及巯基向二硫键的转化程度逐渐提高, α -螺旋的含量由34.50%降低至29.50%。草菇处理后, 蛋白质的降解与聚集程度提高, 凝胶流变性能得到显著改善。上述研究结果表明, 草菇中的内源成分可能通过促进蛋白质氧化和水解, 来影响肉糜制品的风味和质构等品质。该研究结果有助于解析食用菌对肉制品品质的影响机理, 并为食用菌在新型风味肉制品开发中的应用提供理论依据。

关键词: 草菇; 牛肉蛋白; 肌原纤维蛋白; 氧化

文章编号: 1673-9078(2022)07-247-255

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.7.1084

Modification Effect of *Volvariella volvacea* on Protein Structure of Beef

SHEN Shuangwei^{1,2,3}, QING Zhenglong^{1,2,3}, LIN Weiling⁴, ZHANG Xianbin⁴, LIU Xueming², LIN Yaosheng²,
TANG Daobang², WANG Xuping², CHENG Jingrong^{2*}, ZHU Mingjun^{1,3,5*}

(1.College of Life and Geographic Sciences, Kashi University, Kashi 844000, China) (2.Sericultural and Agri-food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China) (3.The Key Laboratory of Ecology and Biological Resources in Yarkand Oasis at Colleges & Universities under the Department of Education of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Kashi University, Kashi 844000, China)
(4.Zhongshan Huangpu Town Agricultural Service Center, Zhongshan 528429, China)
(5.School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In this study, the physicochemical properties of beef paste and the solubility, structure, aggregation state, and rheological properties of myofibrillar protein were compared before and after *Volvariella volvacea* (Vv) powder (5%, *m/m*) treatment, in order to analyze the mechanism of straw mushroom on beef paste quality. The results showed that Vv effectively reduced the cooking loss rate of beef paste, but increased the pH value and volatile base nitrogen content of meat, and darkened the color of meat. Among them, the cooking loss of beef paste samples was the lowest (3.44%) after 48 h of treatment, which was 4.48 times lower than that of the control group. At the same time, with the

引文格式:

沈双伟,青正龙,林伟玲,等.草菇对牛肉蛋白结构的修饰效应[J].现代食品科技,2022,38(7):247-255

SHEN Shuangwei, QING Zhenglong, LIN Weiling, et al. Modification effect of *Volvariella volvacea* on protein structure of beef [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(7): 247-255

收稿日期: 2021-09-28

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目(2019B151210018); 清远市科技计划项目(DZXQY031); 广州市科技计划项目(201807010080)

作者简介: 沈双伟(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工, E-mail: shuangwei_shen@163.com; 共同第一作者: 青正龙(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工, E-mail: 506007299@qq.com

通讯作者: 程镜蓉(1988-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 农产品加工, E-mail: chengjingrong@gdaas.cn; 共同通讯作者: 朱明军(1969-), 男, 博士, 教授, 天山学者特聘教授, 研究方向: 发酵工程, E-mail: mjzhu@scut.edu.cn

extension of treatment time, protein solubility decreased first and then increased, the degree of carbonylation and conversion of sulfhydryl group to disulfide bond gradually increased, and the content of α -helix gradually unwound from 34.50% to 29.50%. After treatment, the degree of protein degradation and aggregation was increased, and the gel rheology was significantly improved. These results indicate that the endogenous components of Vv may affect the flavor and texture of meat products by promoting protein oxidation and hydrolysis. The above research results are helpful to analyze the influence mechanism of edible fungi on the quality of meat products, and provide theoretical basis for the application of Vv in the development of new flavor meat products.

Key words: straw mushroom; beef protein; myofibrillar protein; oxidation

肉糜是肉制品加工中最为常见的原料之一, 主要由蛋白质、脂肪颗粒、碳水化合物、水和盐组成^[1]。肉糜加工方便, 是生产香肠、肉饼、肉脯、肉丸等肉制品的重要原料。肌原纤维蛋白(myofibrillar protein, MP)作为肌肉中含量最高的蛋白质, 约占肉蛋白总含量的55%~60%, 是肉制品加工过程中较为重要的一类结构蛋白。其结构和功能特性会直接影响到肉制品的感官性质。此外, MP具有优良的凝胶特性, 在维持肉制品较好的质构特性和感官品质中发挥重要作用^[2]。然而, 肉制品在加工贮藏的过程中会不可避免的发生蛋白质氧化。其中, MP的氧化程度直接影响着肉制品的质构、风味及加工特性^[3]。研究表明, MP的过度氧化会造成肉及肉制品品质的下降, 如: 保水性降低、蒸煮损失增大、凝胶性能下降、蛋白质的消化率降低等^[4-6]; 然而, 适度氧化却有助于促进蛋白质相互交联, 提高风味物质吸附或释放能力, 改善产品的质构和风味。Shen等^[7]提出适度的氧化可以诱导MP部分解折叠, 进一步提高MP的盐溶性和凝胶硬度, 促进MP凝胶与某些醛和酮类等风味物质的结合。伏慧慧等^[8]发现某些肉制品中的蛋白适度氧化对其质构、滋味、风味及色泽会产生积极的促进作用。

食用菌, 因其味道鲜美且富含纤维, 对肉制品风味及质构等品质的影响备受关注。草菇作为一种重要的热带亚热带菇类, 是世界上第三大栽培食用菌。其营养丰富, 味道鲜美, 作为风味补充剂近年来在肉制品(如草菇腊肠、草菇肉酱等)中被广泛应用。近期有研究表明^[9], 食用菌对肉制品风味的影响并不是二者风味的简单叠加, 其与肉制品组分(如蛋白质、脂质)的相互作用很有可能是促成风味物质合成的重要途径。当前, 人们主要关注食用菌对肉制品风味的影响, 但对相关机理的探究较少。本课题组在前期探索中发现^[10], 草菇对肉糜组分的相互作用可能是影响肉糜质构和风味的重要因素。鉴于此, 本研究以牛肉糜蛋白为对象, 进一步探索草菇对牛肉糜蛋白质的结构及功能的影响, 以期对食用菌改善肉糜品质的机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料

草菇为光柄菇科真菌草菇(*Volvariella volvacea* (Bull.:Fr.) Sing.)的子实体, 牛肉(水牛, *Bubalus bubalis*)为牛外脊肌肉, 草菇和牛肉均购自广州市澳之星超市; 超纯水, 美国Milli-Q纯水仪; SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X), 上海碧云天生物公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

PB-10 数字 pH 计, 德国 Sartorius 集团; UltraScan VIS 色度仪, 美国 Hunter Lab 公司; SKD-100 自动凯氏定氮仪, 上海沛欧分析仪器有限公司; Jasco J-1500-150CD 光谱仪, 日本东京 Jasco 公司; AR1500EX TA 流变仪, 美国 NewCastle 公司; T25D 均质机, 德国 IKA 集团。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备

1.3.1.1 草菇粉末的制备

草菇使用蒸馏水冲洗两次, 去除菌体上肉眼可见的异物, 使用热风干燥箱 45 °C 干燥至恒重。干燥的食用菌使用 BJ-300 高速破碎机磨成粉末, 为防止破碎机过热对食用菌造成影响, 每破碎 10 s 后暂停机器, 待机器温度降至室温后再次破碎。破碎后的草菇过 20 目的聚乙烯筛, 随后使用密封袋密封, 保存于 4 °C 备用。

1.3.1.2 草菇牛肉糜的制备

牛外脊肉使用配备有 6 mm 直径孔板的绞肉机绞碎成肉糜。样品分为 2 个组: 不添加食用菌干粉的肉糜(Control); 添加 5% (m/m) 草菇干粉的肉糜(5% Vv)。样品组分如下: 牛肉糜 1000 g, 牛板油 100 g, 水 50 g, 盐 20 g, 复合磷酸盐 4 g, 食用菌干粉 50 g。将牛肉糜和其它配料放入搅拌机中搅拌(30 min)后, 于 4 °C 静置腌制, 在 0、12、24、36 和 48 h 五个时间

点分别取样进行实验。

1.3.2 草菇对牛肉糜理化性质的影响

pH 值: 参照国标 GB 5009.237-2016^[11]对肉糜的 pH 值进行测定。取 1 g 样品与 9 mL 0.1 mol/L 的 KCl 溶液混合, 10000 r/min 均质 1 min 后使用 pH 计进行测定, 每个样品测试三次, 结果表示为平均值±标准差。

蒸煮损失: 使用模具将样品 (m_1) 制成厚 1 cm, 直径为 5 cm 的肉饼, 75 °C 水浴 25 min, 用流水将样品冷却至室温后在 4 °C 放置过夜。去除模具, 使用吸水纸去除样品表面水分, 然后记录样品质量 (m_2)。每个样品测试三次, 结果表示为平均值±标准差。计算公式如下:

$$\text{蒸煮损失} / \% = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$$

色度: 使用模具将样品制成厚度为 1 cm, 直径为 5 cm 肉饼, 80 °C 水浴 20 min 后, 自然冷却至室温。使用 Ultrascan-VIS 色度计对样品色度进行定量, 以确定样品的亮度 (L^*)、红色 (a^*) 和黄色 (b^*) 值, 标准白板读数为 ($L^*=99.44$, $a^*=-0.09$, $b^*=0.35$)。从每个实验组中抽取三个样品进行评估。结果表示为平均值±标准差。

挥发性盐基氮 (Volatile basic nitrogen, TVB-N): 按照国标 GB 5009.228-2016^[12]中自动凯氏定氮仪法测定。每个样品测试三次, 结果表示为平均值±标准差。

1.3.3 肉糜总蛋白水溶性测定

根据 Vissessanguan 等^[13]的方法略作修改, 测定样品总蛋白水溶性。溶剂有: S1: 0.6 mol/L KCl; S2: 20 mmol/L Tris, pH=8; S3: 20 mmol/L Tris, pH=8, 含有 1% (m/V) SDS; S4: 20 mmol/L Tris, pH=8, 含有 1% (m/V) SDS 和 8 mol/L 尿素; S5: 20 mmol/L Tris, pH=8, 含有 1% (m/V) SDS, 8 mol/L 尿素和 2% (V/V) β -巯基乙醇; S6: 0.5 mol/L NaOH。取 2 g 样品与 18 mL 上述溶液混合, 室温下 10000 r/min 均质 1 min 后 4 °C 静置 2 h。均质后的样品匀浆在 10000 r/min 下离心 15 min, 上清液使用中速滤纸过滤, 保留滤液。取 4 mL 滤液, 加入 1 mL 预冷的 50% TCA, 4 °C 静置 2 h 后 4000 r/min 离心 15 min, 保留沉淀。沉淀使用 S6 溶解结果, 以各部分蛋白含量占 S6 的百分比表示。

如无特别说明, 本实验中的蛋白含量均采用双缩脲法^[14]测定。

1.3.4 肌原纤维蛋白的提取

牛肉肌原纤维蛋白 (MP) 的提取依据 Park 等^[15]的方法略作修改。牛外脊肉剔除可见的脂肪和结缔组

织后, 使用搅碎机将其破碎成肉糜。称取 25 g 肉糜加入 100 mL 的僵直液 (0.1 mol/L NaCl, 23.1 mmol/L Na_3PO_4 , 4.3 mmol/L MgCl_2 , 1.1 mmol/L EDTA-2Na; pH=7), 10000 r/min 均质 1 min 后 4000 r/min 离心 5 min, 保留沉淀。再次加入 100 mL 僵直液, 重复上述步骤三次, 最后保留沉淀。沉淀中加入 100 mL 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液, 使用上述条件均质并离心, 重复操作 3~5 次, 每次保留上清液。所得上清液经两层纱布过滤, 收集所有滤液, 调整滤液 pH 至 6.25 左右, 静置 10 min (以出现絮状沉淀为准), 4000 r/min 离心 5 min, 收集膏状残留物, 所得膏状沉淀视为纯化后的 MP, 加入 0.6 mol/L PBS (含 0.6 mol/L NaCl, pH=7) 溶液 5~10 mL 溶解沉淀。所得 MP 置于 100 mL 离心杯中均质, 混匀后保存于碎冰中备用, 并于 48 h 内使用。

1.3.5 MP 羰基含量的测定

羰基含量的测定基于 2,4-二硝基苯肼 (DNPH) 法^[16]并略作修改。2 g 样品加入 18 mL 生理盐水后 10000 r/min 均质两次 (30 s/次)。取 2 份样品均质溶液 (0.1 mL), 一份加入 0.5 mL 2 mol/L 的 HCl (组 A), 另一份加入 0.5 mL 2 mol/L 的 HCl (含有 0.02 mol/L 的 DNPH) (组 B), 然后 37 °C 水浴 15 min, 加入 0.5 mL 20% 的三氯乙酸溶液, 旋涡振荡混匀, 然后 10000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清, 沉淀使用 1 mL 乙醇和乙酸乙酯混合物 ($V/V=1:1$) 清洗 3 次后再次 10000 r/min 离心 5 min, 最后所得沉淀用 1 mL 6 mol/L 的盐酸胍溶液溶解 (37 °C, 水浴 15 min), 使用去离子水稀释 5 倍, 在 370 nm 测 OD 值。计算公式如下:

$$\text{羰基含量} / (\text{nmol} / \text{mg pro}) = \frac{5 \times 10^6 \times A_{370}}{2.1 \times 10^4 \times C_{\text{pro}}}$$

式中:

A_{370} — $A_{\text{组A}} - A_{\text{组B}}$;

C_{pro} —蛋白浓度;

摩尔消光系数—21000 L/(mol·cm)。

1.3.6 MP 巯基含量测定

样品巯基含量的测定依照 Ellman 的方法^[17]并略作修改。0.5 mL 样品均质液加入 2.5 mL Tris-Gly-尿素 (pH=8.0), 充分振荡混匀, 实验组加入 20 μL Ellman 试剂, 对照组中加 20 μL Tris-Gly 溶液, 37 °C 水浴 15 min, 10000 r/min 离心 5 min, 使用分光光度计测定上清液在 412 nm 处吸光值。摩尔消光系数 13.6×10^3 L/(mol·cm), 计算公式如下:

$$\text{巯基含量} / (\text{nmol} / \text{mg pro}) = 75.53 \times A_{412} \times \frac{\text{反应体积}}{\text{样品体积}} / C_{\text{pro}}$$

式中:

$$73.53=10^6/13.6 \times 10^3;$$

$$A_{412}=A_{\text{实验组}}-A_{\text{对照组}};$$

C_{pro} ——蛋白浓度。

1.3.7 MP 二级结构测定

采用圆二色谱评价食用菌对牛肉糜 MP 二级结构的影响。用蒸馏水将 MP 稀释至 0.1 mg/mL, 取 200 μ L 稀释后的蛋白溶液加入石英比色皿 (1 mm) 中。使用 J-1500-150 CD 色谱仪在 24 $^{\circ}$ C (± 1 $^{\circ}$ C) 下扫描。扫描波长: 190~260 nm, 扫描速度为 5 nm/min。每个样品扫描三次, 结果为三次扫描的平均值并扣除相应溶剂背景。在获得 CD 谱后, 利用二级结构分析软件 CNDD (CD 谱反褶积 2.1; <http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdm/>) 对实验数据进行分析, 所用的参考蛋白为标准蛋白 SP175 (平均氨基酸残基为 110 g/mol) [18], 波长计算范围为 200~250 nm。每个样品测定三次重复, 计算结果表示为平均值 \pm 标准差。

1.3.8 十二烷基苯磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析

食用菌对牛肉糜 MP 的影响采用 SDS-PAGE 进行分析 [19]。浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 12%。将 MP 稀释为浓度 5 mg/mL 的蛋白溶液, 取 0.4 mL 上述浓度蛋白溶液加入 0.1 mL 上样缓冲液, 漩涡混匀后, 沸水浴 5 min, 取出于冰水浴中降温至室温后进行上样, 上样量为 10 μ L。采用恒压模式, 第一阶段电压为 40 V, 第二阶段电压为 80 V, 待蓝色指示带位移动至凝胶底部, 停止电泳。凝胶使用考马斯亮蓝 G250 染色, 随后用脱色液褪色并拍照。

1.3.9 MP 流变特征

根据 Wu 等 [20] 描述的方法略加修改, 对添加草菇后牛肉糜的 MP 流变特性进行测试。将 MP 稀释为 15 mg/mL, 取 2 mL 稀释后的 MP 溶液装载于流变仪平台上进行测试。模式: 振荡加热模式; 加热速率: 2 $^{\circ}$ C

/min; 温度范围: 25 $^{\circ}$ C~75 $^{\circ}$ C。利用储能模量 (G') 和 $\text{Tan}\delta$ (G'' (损耗模量)/ G') 表征 MP 溶液在凝胶转变过程中的粘弹性变化。

1.4 数据分析

实验均设置 3 组平行, 数据结果为平均值 \pm 标准差。使用 SPSS 19.0 统计软件程序做出分析。使用 Anova 和 Duncan 的多重范围检验来进行显著性差异分析, 其中 $p < 0.05$ 才认定有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 草菇对牛肉糜理化性质的影响

腌制前后样品的 TVB-N 值、蒸煮损失、pH 值和色度详见表 1。TVB-N 通常指在食品生产和贮藏过程中, 由于酶或微生物的作用, 蛋白质分解产生的碱性含氮物质 [21]。其中添加草菇后肉糜的 TVB-N 值为 13.15~16.74 mg/100 g (0~48 h), 明显高于对照组的 4.24~7.55 mg/100 g 样品 (0~48 h)。在内源性酶或微生物的作用下, 肉制品的 TVB-N 值随着时间的延长而增加。草菇处理后, 牛肉糜的 TVB-N 值迅速增加, 甚至超过了草菇本身的 TVB-N 值 (3.47 mg/100 g 样品) 和对照组的 TVB-N 值之和。这可能是因为草菇中丰富的蛋白酶 [22] 导致了牛肉糜中的蛋白质降解, 从而产生了额外的碱性含氮物质所致。

添加草菇后牛肉糜的蒸煮损失率 (0 和 48 h 分别为 4.86% 和 3.44%) 显著低于对照组 (0 和 48 h 分别为 21.5% 和 15.42%)。这可能是因为食用菌中丰富的膳食纤维有助于肉糜水分的保持 [23]。与此同时, 草菇的处理使牛肉糜的 pH 值增加, 造成肉糜蛋白间的负电荷增加, 蛋白质之间的排斥力增加从而提高肉糜的保水能力 [24]。

表 1 草菇对牛肉糜理化性质的影响

Table 1 The effect of *Volvariella volvacea* on the physicochemical of beef paste

项目	Control (0 h)	Control (48 h)	5% Vv (0 h)	5% Vv (48 h)	Vv
TVB-N/(mg/100 g)	4.24 \pm 0.12 ^b	7.55 \pm 0.34 ^c	13.15 \pm 0.08 ^d	16.74 \pm 0.1 ^c	3.47 \pm 0.11 ^a
蒸煮损失/%	21.5 \pm 0.42 ^d	15.42 \pm 0.72 ^c	4.86 \pm 0.03 ^b	3.44 \pm 0.25 ^a	-
pH 值	5.75 \pm 0.02 ^b	5.94 \pm 0.01 ^c	5.85 \pm 0.01 ^a	6.15 \pm 0.01 ^d	-
L^*	48.75 \pm 2.1 ^b	46.05 \pm 1.32 ^b	47.76 \pm 1.82 ^b	38.78 \pm 1.08 ^d	-
a^*	21.45 \pm 2.61 ^c	24.75 \pm 0.39 ^d	18.11 \pm 2.26 ^b	13.5 \pm 0.63 ^a	-
b^*	23.77 \pm 2.2 ^a	25.53 \pm 0.63 ^b	26.35 \pm 1.83 ^b	29.3 \pm 0.7 ^c	-

注: Control 为未添加草菇牛肉糜; 5% Vv 为添加 5% (m/m) 草菇的牛肉糜; Vv 为草菇, 质量与 5% Vv 中草菇质量相同。不同小写字母代表同一指标不同处理组数据的显著差异 ($p < 0.05$)。

随着腌制时间的延长, 实验组和对照组的 pH 值均有所升高。实验组的 pH 值 (0 和 48 h 分别为 5.85

和 6.15) 显著高于对照组 (0 和 48 h 分别为 5.7 和 5.94), 这与之前的研究相一致。Choe 等 [25] 在乳化香肠中加入

金针菇 (*Flammulina velutipes*) 后产品的 pH 值由 6.08 提高至 6.33, 差异显著。Bao 等人^[26]也发现在牛肉和鱼肉中添加食用菌提取液, 产品的 pH 值得到提高。一方面, 该现象可能源于草菇中含有较丰富的碱性物质, 如精氨酸。另一方面, 草菇内源酶会促使牛肉草糜蛋白降解, 产生的碱性含氮物质导致 pH 值升高。

草菇处理同样会导致牛肉糜色度发生变化。与对照组相比, 添加 5% Vv 组的肉糜红度 (a^* 值) 下降, 黄度 (b^* 值) 增加。这可能是草菇粉自身色泽所致, 而草菇处理 48 h 后肉糜的亮度 (L^* 值) 和 a^* 值下降, b^* 值上升, 且较对照组 (48 h) 有显著差异 ($p < 0.05$)。这说明草菇中的多酚氧化酶促进了牛肉糜的氧化, 影响了牛肉糜的颜色^[27]。此外, Millard 反应和脂质过氧化导致肉糜的非酶褐变^[28], 也可能是造成 b^* 值升高和 L^* 值、 a^* 值的降低的重要成因。

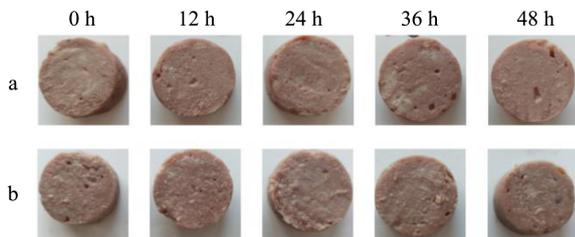


图 1 不同腌制时间下肉糜的颜色变化

Fig.1 Color changes of minced meat at different curing times

注: (a) 对照组, (b) 草菇添加组。

2.2 草菇对牛肉糜总蛋白水溶性的影响

肉糜样品随草菇处理时间的延长在不同溶液中的溶解度如图 2 所示。S1 是 0.5 mol/L 的 KCl 溶液, 蛋白在盐溶液中的溶解度常常随蛋白结构的改变而变化。添加草菇后, 牛肉糜蛋白溶解度随腌制时间的延长而降低, 超过 36 h 后出现增长。这表明草菇的加入改变了肉糜蛋白的结构和溶解度。S2 是 20 mmol/L 的 Tris 溶液, S3 在 S2 的基础上添加了 1% 的 SDS, SDS 作为一种阴离子表面活性剂, 能够破坏蛋白间的氢键并削弱疏水作用力^[29]。所有样品在 S3 溶液中的溶解度明显高于 S2, 这是因为肉糜蛋白中的氢键被破坏, 疏水作用力被削弱, 因此牛肉糜蛋白的溶解度增加。其中, 添加草菇后牛肉糜蛋白在 S3 中的溶解度显著低于对照组。这可能是因为草菇增强了牛肉糜蛋白质之间的氢键和疏水作用力, 使其溶解度相对较低。S4 在 S3 溶液的基础上增加了 8 mol/L 的尿素, 高浓度的尿素可以进一步破坏蛋白间的氢键和疏水性, 使蛋白质的溶解度提高^[13]。从图 2 中可以看出, 对照组在 S3 和 S4 中的溶解度差异相对较小, 这表明对照组中的氢键或疏水作用力大部分已经被 SDS 破坏, 因此尿素

对对照组中牛肉糜的蛋白溶解度影响相对较小。然而, 实验组在 S4 中的溶解度显著高于 S3, 并且实验组在 S4 中的溶解度与对照组在 S4 中溶解度差异不大, 这是因为高浓度的尿素使蛋白间氢键或疏水作用力被彻底破坏, 使实验组和对照组的溶解度位于同一水平。上述研究结果进一步表明草菇与蛋白的相互作用会强化蛋白质分子间的氢键和疏水作用力。

在 S4 的基础上, S5 中加入了具有强还原性的 β -巯基乙醇, 这使蛋白质的氢键和疏水作用力被破坏, 同时分子内及分子间的二硫键也被削弱^[13]。与 S4 相比, 样品在 S5 中的溶解度显著增加, 这是蛋白质中二硫键的断裂、蛋白结构展开导致的^[30]。值得注意的是, 添加草菇后, 牛肉糜蛋白在 S5 中的溶解度在 36 h 前显著低于对照组, 这可能是因为草菇的添加使蛋白分子内形成更多的二硫键, 造成蛋白的聚集和溶解度的下降。

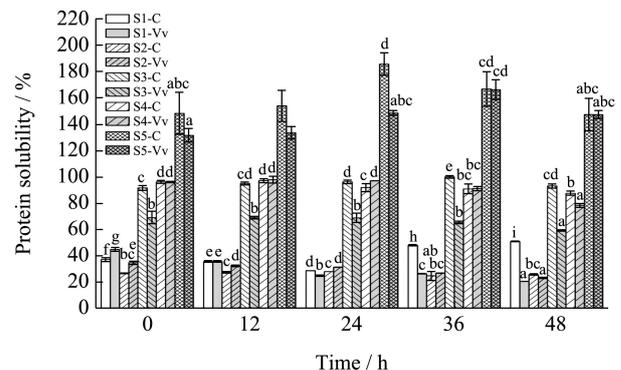


图 2 草菇对牛肉糜蛋白水溶性的影响

Fig.2 The effect of *Volvariella volvacea* on solubility of beef protein

注: C: 无添加的牛肉糜样品; Vv: 添加有 5% (m/m) 草菇的牛肉糜样品。不同小写字母代表相同时间内不同处理组数据的显著差异 ($p < 0.05$)。

2.3 草菇对 MP 氨基酸侧链的影响

蛋白质中羰基的含量常被用于表示蛋白质氧化程度^[30], 羰基形成的方式有: 肽键的断裂、外源性羰基的引入、氨基酸侧链的氧化等^[31]。如图 3a 所示, 在腌制初期 (0~12 h) 对照组的羰基含量与实验组之间没有显著变化。12 h 后实验组 MP 的羰基含量开始快速上升, 并显著高于对照组, 表明草菇促进了肉糜蛋白的氧化。一方面, 这可能是因为草菇中丰富的蛋白酶使 MP 更多活性基团暴露, 造成羰基化程度提高。另一方面, 草菇成熟过程中体内会自发表达产生丙二醛 (MDA) 等氧化物^[22], 机械损伤会促使草菇 NADPH 氧化酶表达^[32], 造成 MP 的氨基酸侧链被修饰, 从而导致羰基含量的增加。

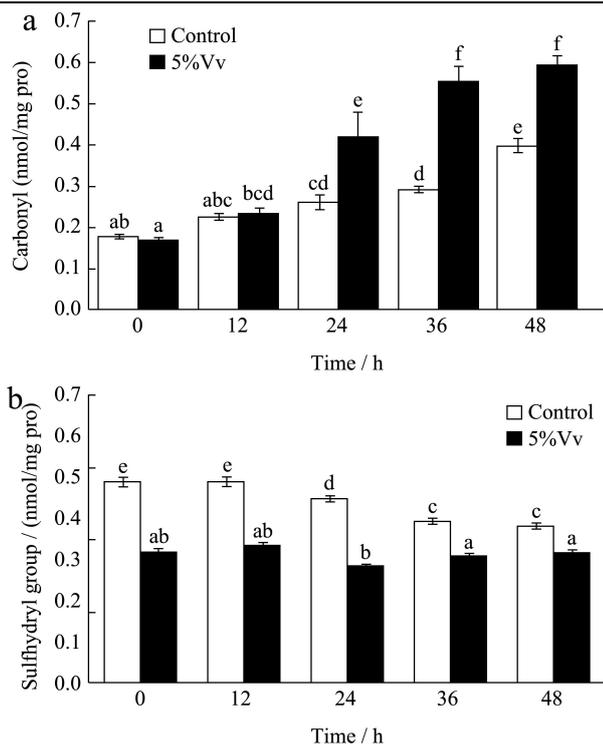


图3 草菇对牛肉糜MP氧化的影响

Fig.3 The effect of *Volvariella volvacea* on the oxidation of beef protein

注: (a) 羰基; (b) 巯基。Control: 未添加草菇的牛肉糜; 5% Vv: 添加有 5% (m/m) 草菇的牛肉糜样品。不同小写字母代表不同处理组数据的显著差异 ($p < 0.05$)。

MP 多肽链中巯基具有还原性, 很容易被活性氧 (ROS) 等氧化物攻击而转变为二硫键等。因此, 蛋白质中巯基含量的变化被广泛用于衡量蛋白质的氧化程度^[30]。如图 3b 所示, 样品中的巯基含量随腌制时间延长而下降, 这说明蛋白质氧化的发生^[33]。添加草菇后牛肉糜 MP 的巯基含量在整个腌制周期都显著低于对照组。这表明草菇使肉糜 MP 的氧化程度升高。

表 2 MP 二级结构的变化

Table 2 Changes of the MP secondary structure

项目	含量/%			
	Control (0 h)	Control (48 h)	5% Vv (0 h)	5% Vv(48 h)
α -螺旋	34.50%	31.80%	31.00%	29.50%
β -折叠	16.20%	18.10%	18.90%	20.20%
β -转角	16.10%	16.50%	16.70%	17.10%
无规则卷曲	34.20%	36.70%	36.10%	37.30%

注: Control: 牛肉糜MP; 5%Vv: 添加草菇后牛肉糜MP。

2.5 草菇对 MP 凝胶电泳 (SDS-PAGE) 的影响

不同腌制时间下样品蛋白的变化采用 SDS-PAGE

Alnoumani 等^[34]在研究双胞菇对牛肉糜的影响中发现, 4%双胞菇粉未使牛肉糜中巯基显著下降, 这主要是因为食用菌干燥过程中使促氧化物浓度升高, 促进了肉糜的氧化。

2.4 草菇对肉糜 MP 二级结构的影响

使用 CD 色谱对 MP 的二级结构变化进行分析。如图 4 所示, 样品的 MP 在 208 nm 和 222 nm 处有两个负峰, 这与蛋白质 α -螺旋结构肽键的 $N-\pi^*$ 转移有关^[35]。对照组和实验组随着腌制时间的延长, 都表现出了 α -螺旋含量下降, 而 β -折叠、 β -转角和无规卷曲均出现不同程度的增加。与对照组比较, 实验组的 α -螺旋含量下降更为明显。值得注意的是, 实验组在 0 h 时 α -螺旋甚至低于草菇处理 48 h 后 MP 的 α -螺旋, 而 β -折叠、 β -转角和无规卷曲均高于对照组, 这表明草菇促进了肉糜蛋白的氧化。因此, 实验组 α -螺旋含量的降低可能是由于草菇中存在的氧化物攻击 MP 多肽链的氨基酸残基并破坏其氢键造成 α -螺旋解旋所致^[36], 使得 α -螺旋向 β -折叠、 β -转角和无规卷曲转变^[37]。

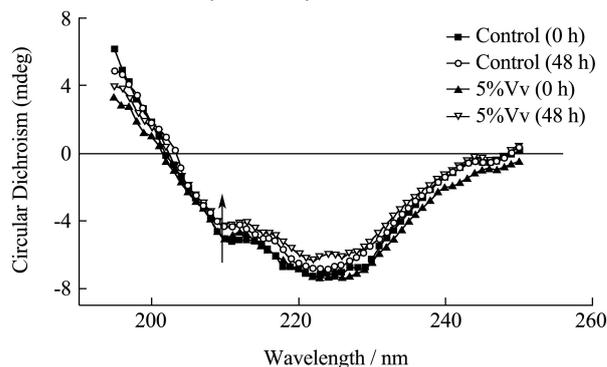


图4 MP 圆二色谱图

Fig.4 Circular dichroism of MP

进行分析。MP 作为一种复合蛋白, 主要由肌球蛋白重链 (MHC) 和肌动蛋白 (Actin) 等组成^[38]。如图 5 所示, 空白组各泳道条带间随着腌制时间的延长未见明显变化, 而草菇处理后随着腌制时间的延长, 蛋白样品在 8~10 泳道 (24~48 h) 点样孔中有大分子聚合

物出现。这可能随着腌制时间的延长,氧化程度逐渐加深,诱发蛋白分子聚集导致的。相较于空白组,实验组 175~270 ku 间的 MHC 和 95~130 ku 间的 α -Actin 随着腌制时间的延长更加暗淡模糊,可能是由于草菇中丰富的蛋白酶诱发蛋白质水解导致的。这也可以从实验组 16 ku 附近出现的条带得以证实。综上,草菇会诱发牛肉糜 MP 的酶解与氧化聚集。

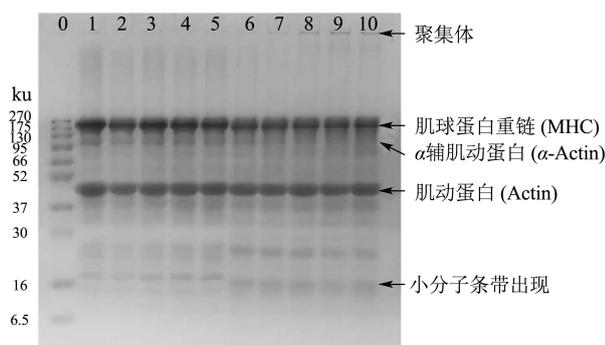


图5 MP SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE Electrophoretogram of myofibrillar protein

注: 0 泳道为标准蛋白 (6.5~270 ku); 1-5 泳道为牛肉糜 MP (0、12、24、36、48 h); 6-10 泳道为添加草菇后牛肉糜 MP (0、12、24、36、48 h)。

2.6 草菇对 MP 流变性能的影响

储能模量 (G') 是指材料在发生形变时, 由于弹性形变而引起储存能量的大小变化, 反映材料弹性大小^[20]。 G' 的值在 40 °C 左右时开始增加, 并随着温度的升高而稳定上升 (图 6)。这主要是由于 MP (尤其是肌球蛋白) 结构的变化和蛋白间相互作用造成的^[39]。当温度上升至 75 °C 时, G' 值从大到小依次为 5% Vv 组 (48 h)、对照组 (48 h)、对照组 (0 h) 和 5% Vv 组 (0 h)。腌制初期, 添加草菇后肉糜 MP 的 G' 值低于对照组, 这可能是草菇中丰富的蛋白酶使肉糜 MP 部分酶解, 对热凝胶结构造成了破坏。然而, 随着腌制时间延长, 处理 48 h 后实验组的 G' 值高于对照组, 这是因为肉糜蛋白的氧化程度增加, 形成了蛋白交联增多所致。Kang 等^[40]的研究表明, 适当的氧化使蛋白间二硫键增多, β -折叠上升, 导致蛋白相互交联, 从而提高了蛋白凝胶的稳定性。张海璐等^[41]通过氧化体系对羊肉凝胶进行处理后, 同样发现肉凝胶弹性有所提升。

$\text{Tan}\delta$ (G''/G') 是耗能模量 (G'') 与储能模量 (G') 的比值, 代表着蛋白质凝胶形成过程中“粘度”与“弹性”的相对分布, 即 $\text{Tan}\delta$ 值越大, 材料的粘度越大或弹性越小^[42]。样品的 $\text{Tan}\delta$ 值从升温伊始便开始降低, 这表明随着温度的升高, 样品 MP 溶液黏度开始增加。

根据 Samejima 等^[43]的论述, 当温度大于 30 °C 时肌球蛋白的结构“体积”增加, 从而产生了更粘稠的溶胶, 因此 $\text{Tan}\delta$ 值呈现降低的趋势。随着温度继续升高, MP 形成凝胶所需的温度 (即 $\text{Tan}\delta=1$ 时的温度) 从低到高的顺序依次为 5% Vv 组 (0 h)、5% Vv 组 (48 h)、对照组 (0 h) 和对照组 (48 h)。该现象表明草菇处理的肉糜 MP 形成凝胶所需温度相较于空白组更低, 说明草菇处理后的 MP 更易形成凝胶。这可能是因为草菇的加入, 草菇处理后 MP 分子内的二硫键, 从而使 MP 溶液形成凝胶所需能量更低^[44]。

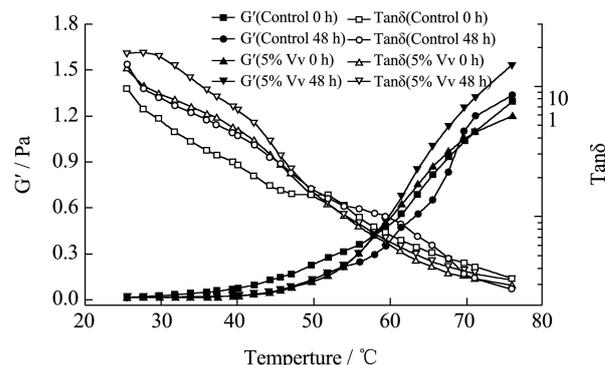


图6 草菇对 MP 流变特征的影响

Fig.6 The effect of *Volvariella volvacea* on rheological characteristics of MP

3 结论

本研究探讨了草菇对牛肉糜蛋白结构及功能特性的影响。研究发现草菇可有效降低肉糜的蒸煮损失率, 其中富含的蛋白酶和精氨酸等物质会促使牛肉糜的 pH 值、色度、TBV-N 值等理化性质发生改变。草菇与肉糜蛋白的相互作用会促进蛋白质的氧化和降解, 造成蛋白质巯基向二硫键的转化及 α -螺旋结构的解旋, 提高蛋白质的凝胶性能。此研究从蛋白质氧化水解层面为解析草菇对牛肉糜结构及风味的影响提供了一定的理论基础, 由于脂质氧化同样是肉制品风味形成的重要因素, 草菇内源物对肉糜脂质氧化的调节作用及风味物质的形成规律还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Biesalski H K. Meat as a component of a healthy diet - are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? [J]. Meat Science, 2005, 70(3): 509-524
- [2] 李亚丽, 许玉娟, 徐幸莲. 多酚对肌原纤维蛋白结构与功能特性的影响研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(19): 296-306
- LI Yali, XU Yujuan, XU Xinglian. Research progress on the effect of polyphenols on the structural and functional

- properties of myofibrillar protein [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(19): 296-306
- [3] 刘昊天,殷小钰,汪海棠,等.基于蛋白氧化行为的肉及肉制品品质提升及劣变机制研究进展[J].食品科学,2020,41(21): 230-237
- LIU Haotian, YIN Xiaoyu, WANG Haitang, et al. Quality improvement and deterioration of meat and meat products based on the protein oxidation: a review of recent research [J]. Food Science, 2020, 41(21): 230-237
- [4] 李侠,李银,张春晖,等.高氧气调包装对不同品种冷却猪肉贮藏品质及持水性的影响[J].农业工程学报,2016,32(2): 236-243
- LI Xia, LI Yin, ZHANG Chunhui, et al. Influence of high oxygen modified atmosphere packaging on different breeds of chilled pork meat quality and water holding capacity during storage [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32(2): 236-243
- [5] Xia M, Chen Y, Guo J, et al. Effects of oxidative modification on textural properties and gel structure of pork myofibrillar proteins [J]. Food Research International, 2019, 121: 678-683
- [6] Sante-Lhoutellier V, Aubry L, Gatellier P. Effect of oxidation on in vitro digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(13): 5343-5348
- [7] Shen H, Stephen Elmore J, Zhao M, et al. Effect of oxidation on the gel properties of porcine myofibrillar proteins and their binding abilities with selected flavour compounds [J]. Food Chemistry, 2020, 329: 127032
- [8] 伏慧慧,马雪莲,普莉雯,等.干腌牛肉加工过程中蛋白质变化对品质的影响[J].食品与发酵工业,2021,47(9):223-230
- FU Huihui, MA Xuelian, PU Liwen, et al. The effect of protein changes on the quality of dry-cured beef during processing [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(9): 223-230
- [9] Wang X, Zhou P, Cheng J, et al. Use of straw mushrooms (*Volvariella volvacea*) for the enhancement of physicochemical, nutritional and sensory profiles of Cantonese sausages [J]. Meat Science, 2018, 146: 18-25
- [10] Qing Z, Cheng J, Wang X, et al. The effects of four edible mushrooms (*Volvariella volvacea*, *Hypsizygus marmoreus*, *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus*) on physicochemical properties of beef paste [J]. LWT, 2021, 135: 110063
- [11] GB 5009.237-2016,食品安全国家标准 食品 pH 值的测定 [S]
- GB 5009.237-2016, National Food Safety Standard - Determination of pH Value in Food [S]
- [12] GB 5009.228-2016,食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定[S]
- GB 5009.228-2016, National Food Safety Standard - Determination of Total Volatile Base Nitrogen in Food [S]
- [13] Visessanguana W, Benjakulb S, Riebroyb S, et al. Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to Nham characteristics [J]. Meat Science, 2004, 66: 579-588
- [14] 宋宏新,薛建龙,刘立新,等.采用蛋白质定量方法检测掺假牛乳比较研究[J].食品工业,2015,36(4):210-214
- SONG Hongxin, XUE Jianlong, LIU Lixin, et al. Comparative study of methods to detect protein content of adulterate milk [J]. The Food Industry, 2015, 36(4): 210-214
- [15] Park D, Xiong Y L, Alderton A L, et al. Biochemical changes in myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(12): 4445-4451
- [16] Georgioua C, Zisimopouloua D, Argyropouloua V, et al. Protein and cell wall polysaccharide carbonyl determination by a neutral pH [J]. Redox Biology, 2018, 17: 128-142
- [17] Ellman G. Tissue sulfhydryl groups [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 82: 70-77
- [18] 黄汉昌,姜招峰,朱宏吉.紫外圆二色光谱预测蛋白质结构的研究方法[J].化学通报,2007,7:501-506
- HUANG Hanchang, JIANG Zhaofeng, ZHU Hongji. The methods of protein conformation predicted by UV-circular dichroism [J]. Chemistry, 2007, 7: 501-506
- [19] Li C, Arakawa T. Application of native polyacrylamide gel electrophoresis for protein analysis: bovine serum albumin as a model protein [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 125: 566-571
- [20] Wu M G, Xiong Y L, Chen J, et al. Rheological and microstructural properties of porcine myofibrillar protein-lipid emulsion composite gels [J]. Journal of Food Science, 2009, 74(4): 207-217
- [21] 邵家丽,郑健琨.牛肉不同储存条件下挥发性盐基氮变化的研究[J].现代食品,2020,12:217-219
- SHAO Jiali, ZHENG Jiankun. Study on the change of volatile basic nitrogen in beef under different storage conditions [J]. Modern Food, 2020, 12: 217-219
- [22] 赵妍,查磊,陈明杰,等.草菇 4 °C贮藏期间的品质及生理生化研究[J].分子植物育种,2018,16(21):7179-7186
- ZHAO Yan, ZHA Lei, CHEN Mingjie, et al. Morphological

- and physiological indexes of straw mushroom (*Volvariella volvacea*) during storage at 4 °C [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(21): 7179-7186
- [23] Trebušak T, Levart A, Salobir J, et al. Effect of ganoderma lucidum (*Reishi mushroom*) or *Olea europaea* (olive) leaves on oxidative stability of rabbit meat fortified with n-3 fatty acids [J]. *Meat Science*, 2014, 96(3): 1275-1280
- [24] Hamm R. The influence of pH on the protein net charge in the myofibrillar system [J]. *American Meat Science Association*, 2001: 1335-1337
- [25] Choe J, Lee J, Jo K, et al. Application of winter mushroom powder as an alternative to phosphates in emulsion-type sausages [J]. *Meat Science*, 2018, 143: 114-118
- [26] Bao H, Ushio H, Ohshima T. Antioxidative activity and antidiscoloration efficacy of ergothioneine in mushroom (*Flammulina velutipes*) extract added to beef and fish meats [J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 56(21): 10032-10040
- [27] Pierpoint W. o-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides [J]. *The Biochemical Journal*, 1969, 112(5): 609-616
- [28] Lu F, Bruheim I, Jacobsen C. Maillard reaction and lipid peroxidation contribute to non-enzymatic browning in krill-based products: a model study on proposed mechanisms [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2015, 117(4): 421-430
- [29] Roussel H, Cheftel J C. Mechanisms of gelation of sardine proteins: influence of thermal processing and of various additives on the texture and protein solubility of kamaboko gels [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, 25(3): 260-280
- [30] Lund M, Heinonen M, Baron C, et al. Protein oxidation in muscle foods: a review [J]. *Molecular Nutrition Food Research*, 2011, 55(1): 83-95
- [31] Wang L, Zhang M, Bhandari B, et al. Effects of malondialdehyde-induced protein modification on water functionality and physicochemical state of fish myofibrillar protein gel [J]. *Food Research International*, 2016, 86: 131-139
- [32] Yan J, Tong Z, Liu Y, et al. The NADPH oxidase in *Volvariella volvacea* and its differential expression in response to mycelial ageing and mechanical injury [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2019, 51(6): 1-8
- [33] Berardo A, Claeys E, Vossen E, et al. Protein oxidation affects proteolysis in a meat model system [J]. *Meat Science*, 2015, 106: 78-84
- [34] Hatouf A, Akyol A, Lilian W. Lipid and protein antioxidant capacity of dried *Agaricus bisporus* in salted cooked ground beef [J]. *Meat Science*, 2017, 129: 9-19
- [35] Kelly S M, Jess T J, Price N C. How to study proteins by circular dichroism [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2005, 1751(2): 119-139
- [36] Kang J, Liu Y, Xie M X, et al. Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2004, 1674(2): 205-214
- [37] Jia G, Nirasawa S, Ji X, et al. Physicochemical changes in myofibrillar proteins extracted from pork tenderloin thawed by a high-voltage electrostatic field [J]. *Food Chemistry*, 2018, 240: 910-916
- [38] Lee K, Kim H, Kim S, et al. Effects of mushroom extract on textural properties and muscle protein degradation of bovine longissimus dorsi muscle [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2017, 81(3): 558-564
- [39] Egelandsdal B, Fretheim K, Samejima K. Dynamic rheological measurements on heat-induced myosin gels: Effect of ionic strength, protein concentration and addition of adenosine triphosphate or pyrophosphate [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2010, 37(9): 915-926
- [40] Kang Z, Wang P, Xu X, et al. Effect of a beating process, as a means of reducing salt content in Chinese-style meatballs (kung-wan): a dynamic rheological and Raman spectroscopy study [J]. *Meat Science*, 2014, 96(2): 669-674
- [41] 张海璐, 黄翔, 杨燃, 等. 蛋白质氧化对羊肉糜流变与凝胶特性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(8): 8-13
ZHANG Hailu, HUANG Xiang, YANG Ran, et al. Effect of protein oxidation on rheological and gelation properties of mutton batters [J]. *Food Science*, 2020, 41(8): 8-13
- [42] 孙迪. 不同脂肪对肌原纤维蛋白乳化液稳定性及肉糜凝胶特性的影响[D]. 锦州: 渤海大学, 2019
SUN Di. Effects of fats on the stability of myofibrillar protein emulsions and gel properties of meat batters [D]. Jinzhou: Bohai University, 2019
- [43] Samejima K, Ishioroshi M, Yasui T. Relative roles of the head and tail portions of the molecule in heat-induced gelation of myosin [J]. *Journal of Food Science*, 1981, 46(5): 1412-1418
- [44] Smyth A B, Smith D M, O'Neill E. Disulfide bonds influence the heat-induced gel properties of chicken breast muscle myosin [J]. *Journal of Food Science*, 1998, 63(4): 584-587

