

# 真空熟制咸鸭蛋“黑圈”产生的原因分析

李秋雨<sup>1,2</sup>, 刘红梅<sup>3</sup>, 李彦<sup>4</sup>, 戴幽<sup>1</sup>, 李慧中<sup>1</sup>, 刘焱<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128) (2. 湖南省发酵食品工程技术中心, 湖南长沙 410128)  
(3. 芷江侗族自治县农业农村局, 湖南怀化 419100) (4. 长沙理工大学化学与食品工程学院, 湖南长沙 410128)

**摘要:** 为确定真空熟制咸鸭蛋蛋黄黑圈现象发生的原因, 对真空熟制咸鸭蛋黑圈部位和未变色部位以及非黑圈蛋黄的相应部位进行理化分析, 在初步确定与黑圈形成有关的物质后进一步研究这些物质的变化。结果表明: 黑圈蛋中黑圈部位蛋白质含量降低, 分子质量为 36 ku 处的蛋白质电泳条带变浅, 蛋黄颗粒的微观结构混乱无章, 蛋白质的变化使黑圈部位 pH 值由 6.20 变为 7.90, 从而导致色素的颜色由黄色变为黄绿色; 硫含量在非黑圈蛋蛋黄中分布均匀, 而在黑圈蛋中, 黑圈部位硫含量为 5.17 mg/100 g, 高于未变色部位的 2.31 mg/100 g; S<sup>2-</sup>与蛋黄成分的呈色反应表明, 其只与含金属离子的卵黄高磷蛋白有呈色反应, 可以使正常蛋黄颜色变黑, 黑圈蛋黄颜色加深, 促进黑圈的形成; Fe、Zn、Cu 在黑圈蛋中含量均有一定程度的增加, 且均与 S<sup>2-</sup>有呈色反应, 但只有 Fe 与 S<sup>2-</sup>的呈色符合黑圈的特征色, 进一步研究发现 Fe 含量与蛋黄黑圈程度呈正相关; 综上, 黑圈的形成是在蛋白质、Fe、S<sup>2-</sup>以及色素的共同作用下导致的。

**关键词:** 咸鸭蛋; “黑圈”现象; 蛋白质; 金属离子; 硫离子

文章编号: 1673-9078(2021)09-234-241

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.9.0032

## Analysis of the Causes of the "Black Circles" in the Vacuum Cooked Salted Duck Eggs

LI Qiu-yu<sup>1,2</sup>, LIU Hong-mei<sup>3</sup>, LI Yan<sup>4</sup>, DAI You<sup>1</sup>, LI Hui-zhong<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(2. Hunan Provincial Research Center of Engineering of Technology for Fermentative Food, Changsha 410128, China)

(3. Zhijiang Dong Autonomous County Bureau of Agriculture and Rural Areas, Huaihua 419100, China) (4. School of Chemistry and Food Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410128, China)

**Abstract:** In order to determine the cause of the “black circle” phenomenon in the yolk of vacuum cooked salted duck eggs, the physico-chemical analyses were carried out on the black circle parts of the eggs with black circles and the corresponding parts of the non-black circle in the yolk of vacuum-cooked salted duck eggs in. The changes in the substances related to the formation of black circle were further studied after a preliminary determination. The results showed that the protein content of the black circle in the eggs with black circles decreased, the protein electrophoresis band at the molecular mass of 36 kDa became lighter, the microstructure of the egg yolk particles was in a mess, and the change of protein altered the pH value of the black circle region from 6.20 to 7.90, causing the change of the pigment color from yellow to yellow-green; The sulfur content is evenly distributed in the yolk of the non-black circled egg, while the sulfur content of the black circle part in the black circled egg was 5.17 mg/100 g, which is higher than that of the non-colored part (2.31 mg/100 g); The color reaction of S<sup>2-</sup> with egg yolk components indicated that it only led to a color reaction with metal ion-containing phosvitin, which can make the color of normal egg yolk turn black, darkening the egg yolk color, and promoting the formation of dark circles; The contents of Fe, Zn, and Cu in the black circled egg all

引文格式:

李秋雨,刘红梅,李彦,等.真空熟制咸鸭蛋“黑圈”产生的原因分析[J].现代食品科技,2021,37(9):234-241,+215

LI Qiu-yu, LIU Hong-mei, LI Yan, et al. Analysis of the causes of the "black circles" in the vacuum cooked salted duck eggs [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(9): 234-241, +215

收稿日期: 2021-01-09

项目基金: 公益性行业(农业)科研专项项目(201303084)

作者简介: 李秋雨(1995-),女,硕士研究生,研究方向:禽蛋制品加工与贮藏;E-mail: 1312477873@qq.com

通讯作者: 刘焱(1970-),女,博士,教授,研究方向:动物性食品加工与贮藏;E-mail: 759673079@qq.com

increased to a certain extent, and all exhibited a color reaction with  $S^{2-}$ , although only the color resulting from the reaction between Fe and  $S^{2-}$  was in accordance with the characteristic color of the black circle. Further studies revealed the positive correlation between the Fe content and the degree of yolk black circle. In summary, the formation of black circle was caused by the combined action of protein, Fe,  $S^{2-}$  and pigment.

**Key words:** salted duck eggs; "black circle" phenomenon; protein; metal ion; sulfide ion

咸蛋又称腌蛋、盐蛋,是一种风味特殊、食用方便的传统蛋制品,因其质地细软、松沙、蛋白粉嫩雪白、蛋质丰润鲜红、食味鲜美、可口、营养丰富,深受消费者喜爱<sup>[1-3]</sup>。近年来,随着现代生活节奏的加快,人们对方便食品的需求越来越多,而咸蛋传统的消费习惯(即买腌制好的咸蛋,回家洗去泥糠或黑灰再煮制食用)不受欢迎,大多数咸蛋加工企业会在咸蛋腌制成熟后将咸蛋清洗干净再真空包装后进行杀菌处理加工成真空熟制咸蛋再销售。真空熟制咸蛋具有开袋即食、食用方便的特点,符合生活节奏快的当代人的需求,其产量也越来越大<sup>[4]</sup>。但真空熟制咸蛋的工业化生产中存在一个普遍且严重的问题:“黑圈”现象,即靠近蛋清的蛋黄颜色有一部分由黄色或橙黄色变为暗黄绿色,严重的甚至变为黑色,这种现象俗称“黑圈”。咸蛋黄发生“黑圈”现象,不仅影响咸蛋黄的外观,使消费者对其品质产生质疑,更影响了产品的商业价值,不利于咸鸭蛋的销售,从而限制了咸蛋产业的扩大发展,解决咸鸭蛋“黑圈”现象迫在眉睫。虽然有不少研究人员从工艺上来改进咸蛋的品质,但收效甚微。还有不少研究中涉及到了咸蛋黄的颜色、蛋白质状态、脂肪、金属离子变化等各个方面,但并没有关于咸蛋“黑圈”现象的直接研究。因此,本课题以真空熟制咸鸭蛋为研究对象,对黑圈蛋黄的黑圈部位及非黑圈蛋黄的相应部位进行理化分析,初步确定与黑圈形成有关的物质及其变化规律,探索真空熟制咸鸭蛋“黑圈”现象形成的原因,为解决熟制咸蛋发生“黑圈”问题提供重要的理论依据,这对促进咸蛋加工业的发展具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

腌制成熟的咸鸭蛋(65~75 g/个),由湖南洞庭湖蛋业食品有限公司提供;低分子量蛋白质 Marker (15~180 ku)、BCA 蛋白定量试剂盒,上海雅酶生物科技有限公司;除金属离子的卵黄高磷蛋白纯品, sigma-aldrich 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;其他所有试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.2 主要仪器设备

真空冷冻干燥机(Alpha1-2),德国 Martin Christ 技术公司;扫描电子显微镜(JSM-6380LV),日本电子;紫外分光光度计(UV-2450),日本岛津公司;原子吸收分光光度计(AA-7000),岛津企业管理(中国)有限公司;旋转蒸发器(RE-52C),巩义予华有限公司;测色色差计(CR-400),日本柯尼卡美能达公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 试验设计

##### 1.2.1.1 理化成分及其性质的测定

对黑圈蛋蛋黄的黑圈部位、未变色部位、同一批次非黑圈蛋蛋黄的相应部位的水分含量<sup>[5]</sup>、蛋白质含量<sup>[6]</sup>、脂肪含量<sup>[7]</sup>、盐分<sup>[8]</sup>、色素、硫离子、铁(Fe)<sup>[9]</sup>、铜(Cu)<sup>[10]</sup>、锌(Zn)<sup>[11]</sup>、铅(Pd)<sup>[12]</sup>、锰(Mn)<sup>[13]</sup>和硒(Se)<sup>[14]</sup>以及 pH<sup>[15]</sup>值进行对比分析,测定黑圈蛋各部位的蛋白质组分并观察蛋白质微观结构变化,确定与黑圈形成有关的物质变化规律,找出与黑圈形成可能有关的影响因素。每个指标的测定分别取 20 个“黑圈”蛋和非“黑圈”蛋。

##### 1.2.1.2 与黑圈形成有关的纯物质呈色反应

(1) 蛋黄的各个组成成分与硫离子的呈色反应  
分离蛋黄的组成成分(色素、脂肪、水溶性蛋白质、蛋黄颗粒、高密度脂蛋白、卵黄高磷蛋白)将其与 5%的  $Na_2S$  进行反应,观察各组成成分颜色的变化。

##### (2) 金属离子与硫离子间的呈色反应

分别取浓度为 5  $\mu\text{g/g}$ 、10  $\mu\text{g/g}$ 、50  $\mu\text{g/g}$ 、100  $\mu\text{g/g}$  的  $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Pd^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  以及  $Se^{2+}$ , 将其与质量浓度为 10%的  $Na_2S$  溶液反应,观察其颜色的变化。

##### (3) 不同 pH 对色素颜色的影响

取 20 mL 丙酮提取的色素粗提液于烧杯中,用 0.1 mol/L 的 NaOH 和 0.1 mol/L 的盐酸调节其 pH,使色素粗提液的 pH 分别为 6、7、8,观察色素粗提物颜色的变化。

##### 1.2.1.3 影响咸蛋黄颜色变化的因素

##### (1) 金属离子与黑圈程度的相关性研究

根据蛋黄黑圈程度的不同,将蛋黄样品分为四个层次(黑:  $\Delta E^*=65\sim75$ 、较黑:  $\Delta E^*=55\sim65$ 、微黑:  $\Delta E^*=50\sim55$  微黑、未变黑:  $\Delta E^*=45\sim50$ )进行取样。将试验样品分别置于研钵中,研磨均匀,然后对不同

黑圈程度样品的色度值及金属离子(Fe、Cu、Zn、Pd、Mn 和 Se)的含量进行测定,并对黑圈程度与金属离子含量的关系进行相关性分析,以探究金属离子对鸭蛋黄“黑圈”现象的影响。

### (2) 硫离子对咸蛋黄颜色变化的影响

取 5 g 非黑圈蛋蛋黄于康卫氏皿的内室,外室分别放置以下溶液: a: 5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S、b: 5% Na<sub>2</sub>S+HCl、c: 5% CdSO<sub>4</sub>,另取黑圈蛋的黑圈部位 5 g,置于康卫氏皿的内室,外室分别放置以下溶液: d: 5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S、e: 5% Na<sub>2</sub>S+HCl、f: 5% CdSO<sub>4</sub>,观察咸蛋黄颜色的变化,探究硫离子对咸蛋黄颜色变化的影响。

## 1.2.2 测定方法

### 1.2.2.1 色素的提取与测定

色素粗提物的制备参照孙丹丹等<sup>[16]</sup>、安晓宁<sup>[17]</sup>的方法进行。将得到的色素提取物溶于丙酮,定容于 100 mL 容量瓶中,在 450 nm 波长处测吸光度值。

### 1.2.2.2 硫离子的测定

参考李树青等<sup>[18]</sup>的测定方法进行。

### 1.2.2.3 金属离子的测定

通过原子吸收分光光度计采用火焰原子吸收法进行测定。空心阴极灯电流 12 mA,狭缝宽 0.2 nm,助燃器乙炔-空气火焰。

### 1.2.2.4 蛋白质组分的变化

采用 SDS-PAGE 凝胶电泳进行分析。参考王世东等<sup>[19]</sup>的方法。

### 1.2.2.5 微观结构的变化

采用电子扫描显微镜进行分析。参照邱思<sup>[20]</sup>的方法并稍作修改:分别取黑圈蛋的黑圈部位与非黑圈部位,冷冻干燥,裱涂 200Å 金钼合金,用扫描电子显

微镜进行研究。

### 1.2.2.6 咸蛋黄各个成分分离方法

#### (1) 脂肪的提取

将蛋黄与适量的石油醚混合,4 °C 下浸泡过夜,过滤,蒸发浓缩,即得脂肪样品。

#### (2) 蛋黄浆质蛋白、高密度脂蛋白和卵黄高磷蛋白的分离提取

将蛋黄与 10 倍质量的蒸馏水混合,4 °C 下浸泡过夜,过滤,将滤液冻干,即得蛋黄浆质蛋白。高密度脂蛋白和卵黄高磷蛋白的分离提取参照于智慧<sup>[21]</sup>的方法进行

### 1.2.2.7 黑圈色度的测定

分离熟制黑圈蛋的黑圈部位,搅拌均匀,立即测其色差值(ΔE\*)。其中,ΔE\*=[(ΔL\*)<sup>2</sup>+(Δa\*)<sup>2</sup>+(Δb\*)<sup>2</sup>]<sup>1/2</sup>,ΔE\*表示样品的总色差,其值越大表明样品间的色差越大,ΔL\*、Δa\*、Δb\*的负正分别表示样品颜色的深浅、绿红、蓝黄<sup>[22,23]</sup>。每个样品测量 5 次,取其平均值。

## 1.2.3 数据处理

数据采用平均值±标准偏差的表示方式,并用 DPS 19.0 进行统计学分析,通过 Duncan 多重分析进行组间显著性检验,显著水平为 p<0.05;利用 Origin 8.5 软件进行绘制试验结果图。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑圈蛋与非黑圈蛋理化特性对比分析

#### 2.1.1 黑圈蛋与非黑圈蛋不同部位理化成分分析

表 1 咸蛋各部位成分对比分析(不含金属离子)

Table 1 Comparative analysis of various parts of salted eggs (without metal ions)

含量	黑圈蛋		非黑圈蛋	
	A	B	A <sub>0</sub>	B <sub>0</sub>
水分/%	29.54±0.09 <sup>a</sup>	25.51±0.12 <sup>d</sup>	28.18±0.02 <sup>b</sup>	26.35±0.06 <sup>c</sup>
蛋白质/%	18.67±0.10 <sup>c</sup>	24.46±0.23 <sup>a</sup>	21.31±0.04 <sup>b</sup>	21.28±0.09 <sup>b</sup>
盐分/%	2.15±0.02 <sup>b</sup>	1.60±0.03 <sup>c</sup>	2.20±0.02 <sup>a</sup>	1.54±0.01 <sup>d</sup>
脂肪/%	47.18±0.03 <sup>a</sup>	42.17±0.17 <sup>c</sup>	46.99±0.12 <sup>a</sup>	43.27±0.08 <sup>b</sup>
硫离子/(mg/100 g)	5.17±0.08 <sup>a</sup>	2.31±0.07 <sup>b</sup>	2.31±0.06 <sup>b</sup>	2.30±0.02 <sup>b</sup>
色素/(mg/g)	0.11±0.02 <sup>a</sup>	0.09±0.00 <sup>ab</sup>	0.10±0.01 <sup>ab</sup>	0.10±0.01 <sup>b</sup>

注: A、B、A<sub>0</sub>、B<sub>0</sub>分别表示黑圈蛋蛋黄的黑圈部位、未变色部位、同一批次非黑圈蛋蛋黄的相应部位;结果以“平均值±标准偏差”形式表示,同行中右肩 a、b、c、d 表示显著差异(p<0.05),下同。

由表 1 可知,A、A<sub>0</sub>、B、B<sub>0</sub>的水分、盐分、脂肪及色素虽存在显著性差异(p<0.05),但其在黑圈蛋与非黑圈蛋各部位中的分布情况相似,均为 A(A<sub>0</sub>)>B(B<sub>0</sub>)。因此,仅从含量上分析无法判断水分、

盐分、脂肪及色素是否与黑圈的形成有关。在非黑圈蛋中,蛋白质及硫离子含量无显著性差异(p>0.05)。然而,在黑圈蛋中,A 部位蛋白质含量为 18.67%,B 部位蛋白质含量为 24.46%,差异显著(p<0.05),A

部位较 B 部位硫离子含量高 2.86 mg/100 g。造成以上现象的原因可能是蛋白质的水解，部分含硫氨基酸的

分解造成的。综上分析可以推测，黑圈的形成很可能与蛋白质及硫离子含量的变化有关。

表 2 黑圈蛋与非黑圈蛋不同部位金属离子的含量

Table 2 The content of metal ions in different parts of black circle eggs and non-black circle eggs

金属元素 含量/(μg/g)	黑圈蛋		非黑圈蛋	
	A	B	A <sub>0</sub>	B <sub>0</sub>
Fe	106.82±0.10 <sup>a</sup>	82.43±0.15 <sup>b</sup>	81.18±0.15 <sup>b</sup>	107.07±0.13 <sup>a</sup>
Cu	1.55±0.10 <sup>a</sup>	0.61±0.13 <sup>d</sup>	1.16±0.11 <sup>b</sup>	0.90±0.11 <sup>c</sup>
Zn	37.59±0.10 <sup>b</sup>	33.86±0.14 <sup>c</sup>	31.03±0.11 <sup>d</sup>	40.86±0.12 <sup>a</sup>
Pb	4.50±0.10 <sup>a</sup>	4.50±0.11 <sup>a</sup>	4.37±0.12 <sup>a</sup>	4.84±0.12 <sup>a</sup>
Mn	1.26±0.10 <sup>a</sup>	1.26±0.11 <sup>a</sup>	1.23±0.11 <sup>a</sup>	1.24±0.11 <sup>a</sup>
Se	0.79±0.11 <sup>a</sup>	0.77±0.10 <sup>a</sup>	0.80±0.11 <sup>a</sup>	0.80±0.11 <sup>a</sup>

### 2.1.2 黑圈蛋与非黑圈蛋不同部位金属离子含量对比分析

由表 2 可知，六种金属离子中，Pb、Mn 和 Se 在黑圈蛋和非黑圈蛋中的各部位分布均匀，无显著差异 ( $p>0.05$ )，由此初步推断 Pb、Mn 和 Se 对黑圈的呈色无贡献；Fe、Cu、Zn 三种金属元素在咸蛋黄各部位的分布均存在显著差异 ( $p<0.05$ )，其中 Fe 和 Zn 在非黑圈蛋中的分布为  $B_0>A_0$ ，而在黑圈蛋中的分布与之相反；Cu 在黑圈蛋与非黑圈蛋中分布相同，均为  $A(A_0)>B(B_0)$ ，在黑圈蛋中，Cu 的含量差为 0.94 μg/g，在非黑圈中，Cu 的含量差为 0.26 μg/g。综上，在黑圈蛋中 Fe、Cu、Zn 均有一定的外迁。造成以上现象的原因可能是咸鸭蛋蛋清部位的 pH 值达 8.0 左右，羧基偏多，蛋清部位则处于负电位，从而导致原本处于咸蛋黄内部游离的金属离子外迁聚集在蛋黄膜处<sup>[24,25]</sup>。而聚集在蛋黄膜处游离的金属离子，可能会与含硫氨基酸提供的活性基结合生成黑青色的物质，从而产生了所谓的“黑圈”现象。因此可初步判断咸蛋黄“黑圈”现象与 Fe、Cu、Zn 有关。有研究表明蛋黄中的卵黄高磷蛋白对金属阳离子有强大的吸附能力，蛋黄中几乎所有的金属离子都结合在卵黄高磷蛋白上<sup>[26,27]</sup>。由此可以推测黑圈中游离的金属离子可能来自于蛋黄中的卵黄高磷蛋白。

### 2.1.3 “黑圈”蛋与非“黑圈”蛋不同部位 pH 值对比分析

由图 1 可知，“黑圈”蛋黑圈部位 pH 值与未变色部位差异明显 ( $p<0.05$ )，黑圈部位的 pH 值达到 7.9 左右，呈碱性，而未变色部位蛋黄 pH 值呈弱酸性，而同批次非“黑圈”蛋蛋黄却不存在这一差异性，pH 均为弱酸性 ( $p>0.05$ )，蛋清部位 pH 值最大。孙秀秀<sup>[28]</sup>等研究表明腌制过程，咸蛋黄的 pH 值由中性向酸性发展，此研究结果与“黑圈”蛋的黑圈部位 pH 值结果相反，由此推测，pH 的异常与黑圈的形成有关。

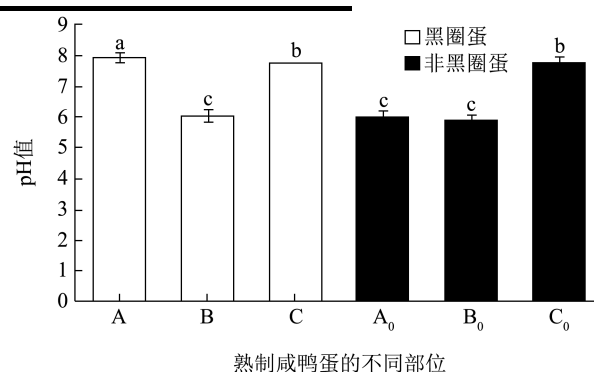


图 1 熟制咸鸭蛋各部位 pH 值分布情况

Fig.1 The pH value distribution of each part of cooked salted duck eggs

注：A、B、C 和 A<sub>0</sub>、B<sub>0</sub>、C<sub>0</sub> 分别表示黑圈蛋蛋黄的黑圈部位、未变色部位、蛋清部位，同一批次非黑圈蛋蛋黄的相应部位。

### 2.1.4 SDS-PAGE 凝胶电泳分析结果

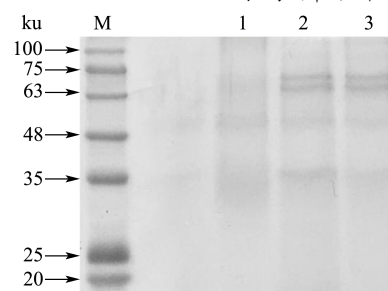


图 2 黑圈蛋咸蛋黄各部位的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE electrophoresis of salted egg yolk of black circle egg

注：M: Marker; 1: 蛋清; 2: 未变色咸蛋黄; 3: 黑圈咸蛋黄。

由图 2 可知，咸蛋黄黑圈部位与未变色部位的小分子蛋白质条带均较浅，大分子蛋白质条带均较深，这可能是由于随着腌制时间的延长，碱和盐的作用促进了热诱导凝胶中蛋白质分子的聚合<sup>[29]</sup>。与未变色蛋黄相比，黑圈部位咸蛋黄蛋白质条带在分子量为 36 ku

处条带较浅,说明黑圈部位小分子蛋白质发生溶解,导致蛋白质含量降低。以上研究表明咸蛋黄黑圈的形成很大程度上与蛋白质的溶解有关,这与前文的猜测一致。

### 2.1.5 电子扫描电镜分析结果

从图3可以明显看出,黑圈部位咸蛋黄分子的蛋黄颗粒结构混乱、无序,但未变色部位咸蛋黄颗粒结构均匀,两者形成了鲜明的对比。造成这一现象的原因可能是黑圈部位的蛋白质之间的作用力如二硫键、疏水作用和巯基等被破坏,从而破坏了蛋白质的空间结构<sup>[30-33]</sup>。研究表明,二价或多价金属离子对蛋白质分子聚合的影响显著,其可以减少凝胶网络交联,导致网络结构的疏松和不均匀<sup>[34,35]</sup>。蛋白质凝胶网络骨架的形成依赖于氢键、疏水相互作用和一些静电相互作用等非共价键和二硫键等共价键<sup>[36]</sup>,而这些共价键的交换反应均与金属离子有很大关系。因此,黑圈部位的微观结构呈现不规则无秩序的网状,很可能是由于金属离子在黑圈部位的聚集影响了蛋白质之间的相互作用。

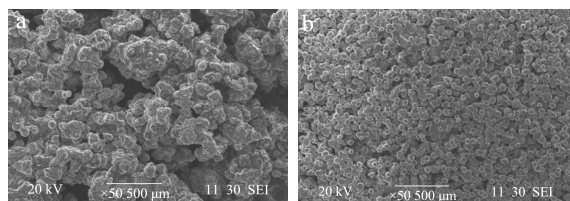


图3 黑圈蛋黄黑圈部位与未变色部位电镜图

Fig.3 Electron micrograph of the black circle and the non-discolored part of the egg yolk

注:(a)黑圈部位电镜图;(b)未变色部位的电镜图。

## 2.2 纯物质模拟验证试验结果分析

### 2.2.1 蛋黄成分与硫离子的呈色反应结果分析

表3 蛋黄各部分成分与硫离子的呈色反应

Table 3 Color reaction of various components of egg yolk with sulfide ion

蛋黄组成成分	是否发生呈色反应
色素	否
脂肪	否
蛋黄浆质蛋白	否
高密度脂蛋白	否
含金属离子的卵黄高磷蛋白	是
不含金属离子的卵黄高磷蛋白	否

从表3可知,咸蛋黄中分离出的色素、脂肪、蛋黄浆质蛋白与硫离子均无呈色反应,只有含金属离子的卵黄高磷蛋白与硫离子有呈色反应,颜色呈现极深的墨绿色,而向不含金属离子的卵黄高磷蛋白中加入

Na<sub>2</sub>S 则无颜色变化。这说明黑圈的呈色过程是硫离子与卵黄高磷蛋白组分中的金属离子结合的结果。

### 2.2.2 金属离子与硫离子的呈色反应结果分析

由表4可知,Zn<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>的浓度低于100 μg/g 时与硫离子不呈色,浓度为高于100 μg/g 时为暗橙黄色,与黑圈蛋的黑圈部位的特征色不相符,结合蛋黄中 Zn<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>的含量低于50 μg/g,可知 Zn<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>对黑圈的呈色无贡献。而 Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>即使浓度低于10 μg/g,仍与 S<sup>2-</sup>反应呈暗黄绿色。由此可以确定金属铁离子参与了黑圈的呈色。

表4 金属离子与硫离子的呈色反应

Table 4 Color reaction of metal ions and sulfide ions

金属离子种类	金属离子浓度/(μg/g)			
	10	50	100	150
Zn <sup>2+</sup>	不呈色	不呈色	暗橙黄色	暗橙黄色
Pb <sup>2+</sup>	不呈色	不呈色	暗橙黄色	暗橙黄色
Cu <sup>2+</sup>	不呈色	不呈色	暗橙黄色	暗橙黄色
Fe <sup>2+</sup>	暗黄绿色	暗黄绿色	暗黄绿色	暗黄绿色
Fe <sup>3+</sup>	暗黄绿色	暗黄绿色	暗黄绿色	暗黄绿色

### 2.2.3 不同 pH 与色素的呈色反应结果分析

鸭蛋中主要的色素为类胡萝卜素,其主要由玉米黄质及叶黄素组成。由表5可知,pH 值对色素的呈色有一定的影响,当 pH 为中性或者酸性时,两种色素的颜色均无明显的变化,而当 pH 为8时,色素由黄色变为黄绿色。由此确定色素对黑圈的呈色有一定的贡献。

表5 不同 pH 与色素的呈色反应

Table 5 Color reaction of different pH and pigment

pH 值	色素种类	
	玉米黄质	叶黄素
6	不呈色	不呈色
7	不呈色	不呈色
8	黄绿色	黄绿色

## 2.3 黑圈形成原因结果分析

### 2.3.1 金属离子与黑圈程度的相关性分析结果

由表6可知,黑圈的颜色越深,ΔL\*、Δa\*、Δb\* 越小,ΔE\* 越大;不同黑圈程度的蛋黄中的金属离子含量均存在显著性差异(p<0.05),且随着色差(ΔE\*) 的增大,蛋黄中铁离子的含量降低,其他金属离子的变化则无任何规律。由表7可知,Fe 的含量与咸蛋黄“黑圈”的色度之间有明显的线性关系,黑圈颜色越深(ΔE\* 越大),Fe 的含量越高,而其他金属离子如 Cu 和 Zn 等的分布情况与咸蛋黄“黑圈”的色度之间则无明显的线性关系。结合表2的结论,由此可以确定,黑圈的形成与金属铁离子有关。

表 6 不同黑圈层次中金属离子的含量及颜色

Table 6 The distribution of metal ions in different black circle levels

检测指标		黑圈程度			
		1	2	3	4
色度	$\Delta L^*$	-69.92±0.13 <sup>d</sup>	-57.95±0.10 <sup>c</sup>	-50.31±0.21 <sup>b</sup>	-45.33±0.23 <sup>a</sup>
	$\Delta a^*$	1.08±0.13 <sup>a</sup>	2.05±0.11 <sup>b</sup>	4.18±0.25 <sup>c</sup>	6.17±0.12 <sup>d</sup>
	$\Delta b^*$	-6.33±0.08 <sup>d</sup>	-3.48±0.77 <sup>c</sup>	6.45±0.11 <sup>b</sup>	16.45±0.01 <sup>a</sup>
	$\Delta E^*$	70.22±0.14 <sup>a</sup>	58.09±0.43 <sup>b</sup>	50.90±0.23 <sup>c</sup>	48.61±0.11 <sup>d</sup>
金属离子含量/( $\mu\text{g/g}$ )	Fe	120.47±0.01 <sup>a</sup>	111.77±0.01 <sup>b</sup>	105.261±0.01 <sup>c</sup>	98.517±0.01 <sup>d</sup>
	Zn	38.86±0.01 <sup>b</sup>	42.47±0.01 <sup>a</sup>	31.884±0.10 <sup>d</sup>	36.77±0.11 <sup>c</sup>
	Pb	4.54±0.01 <sup>c</sup>	4.46±0.03 <sup>d</sup>	4.875±0.01 <sup>a</sup>	4.628±0.01 <sup>b</sup>
	Mn	1.26±0.01 <sup>a</sup>	1.24±0.01 <sup>b</sup>	1.248±0.01 <sup>ab</sup>	1.239±0.01 <sup>b</sup>
	Cu	1.18±0.01 <sup>b</sup>	0.87±0.01 <sup>d</sup>	1.498±0.01 <sup>a</sup>	1.126±0.01 <sup>c</sup>
	Se	0.79±0.01 <sup>a</sup>	0.77±0.00 <sup>b</sup>	0.791±0.00 <sup>a</sup>	0.794±0.01 <sup>a</sup>

注: 表中 1、2、3、4 表示黑圈的程度; 1 为很黑, 2 为较黑, 3 为微黑, 4 为正常蛋黄。

表 7 金属离子含量与黑圈程度相关性分析

Table 7 Correlation analysis of metal ion content and degree of black circle

金属离子	L*		a*		b*		E*	
	相关系数/r	显著性	相关系数/r	显著性	相关系数/r	显著性	相关系数/r	显著性
Fe	-0.99	$p < 0.01$	-0.98	$p < 0.05$	-0.96	$p < 0.05$	0.97	$p < 0.05$
Zn	-0.48	$p > 0.05$	-0.54	$p > 0.05$	-0.54	$p > 0.05$	0.50	$p > 0.05$
pb	0.51	$p > 0.05$	0.50	$p > 0.05$	0.49	$p > 0.05$	-0.54	$p > 0.05$
Mn	-0.85	$p > 0.05$	-0.71	$p > 0.05$	-0.67	$p > 0.05$	0.85	$p > 0.05$
Cu	0.23	$p > 0.05$	0.30	$p > 0.05$	0.30	$p > 0.05$	-0.25	$p > 0.05$
Se	0.39	$p > 0.05$	0.63	$p > 0.05$	0.68	$p > 0.05$	-0.34	$p > 0.05$

表 8 咸蛋黄在不同气体环境中颜色的变化情况

Table 8 The color change of salted egg yolk in different gas environments

时间/h	气体环境					
	a	b	c	d	e	f
0	橙黄色	橙黄色	橙黄色	暗黄绿色	暗黄绿色	暗黄绿色
1/12	开始变黑	开始变黑	同上	颜色加深	颜色加深	同上
1/6	完全变黑	基本变黑	同上	完全变黑	基本变黑	同上
1/2	同上	完全变黑	同上	同上	完全变黑	同上
1	同上	同上	同上	同上	同上	同上
6	同上	同上	同上	同上	同上	开始褪色
12	同上	同上	同上	同上	同上	完全褪色且无黄色沉淀产生
24	同上	同上	同上	同上	同上	黄色
36	同上	同上	同上	同上	同上	黄色
48	同上	同上	同上	同上	同上	黄色

### 2.3.2 硫离子对咸蛋黄颜色变化的影响

由表 8 中 a、b 的结果可知, 正常颜色的蛋黄由特有的黄色变为黑圈的特征色暗黄绿色, 这表明硫离子可能参与了黑圈的呈色过程; d、e 的结果发现, 黑圈部位的颜色加深, 变为灰黑色, 进一步表明硫离子对黑圈的呈色有贡献。处于 f 环境中黑圈部位的蛋黄颜

色褪变为正常蛋黄颜色, 但  $\text{CdSO}_4$  液体表面无黄色沉淀  $\text{CdS}$  的生成, 这表明黑圈的褪色与  $\text{H}_2\text{S}$  的逸出无关。为进一步验证硫离子对黑圈的呈色有贡献, 向完全褪色的黑圈中滴加少量 5%  $\text{Na}_2\text{S}$ , 蛋黄恢复原有的特征暗黄绿色, 综上所述可以确定硫离子参与了黑圈的呈色过程。结合前文的研究可以推断出黑圈形成的过程是蛋

黄内的部分蛋白质发生溶解,使得蛋黄 pH 由弱酸性向弱碱性发展,从而导致蛋黄内的铁离子由蛋黄内部向蛋黄外部迁移,由于蛋黄膜的阻碍,铁离子聚集在黑圈部位,其与黑圈部位由于蛋白质溶解产生的硫离子反应生成蓝绿色的硫化亚铁,蓝绿色的硫化亚铁与色素的颜色复配为肉眼观察到的暗黄绿色甚至为灰绿色。因此,在咸蛋腌制过程中,向腌制料中加入一定量的金属螯合剂如 EDTA-2Na,可有效的预防咸蛋黑圈现象的产生。

### 3 结论

通过对黑圈蛋与非黑圈蛋各部理化成分及黑圈蛋各部位蛋白质组分和微观结构的差异,初步判断与黑圈形成有关的物质为蛋白质、硫离子及 Fe、Zn、Cu 等金属离子,然后通过对咸蛋黑圈反应模型的建立及金属离子与黑圈程度的相关性分析,进一步确定硫离子、蛋白质以及铁离子和色素对黑圈的呈色有贡献。由此得到,真空熟制咸蛋黄黑圈形成的原因是在硫离子、铁离子以及蛋白质的共同作用下形成的。

### 参考文献

- [1] 咎沛清,程裕东,金银哲.咸鸭蛋快速腌制工艺及咸蛋清综合利用研究进展[J/OL].食品与机械:1-6[2020-10-08].  
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1183.TS.20200616.1157.002.html>  
ZAN Pei-qing, CHENG Yu-dong, JIN Yin-zhe. Research progress on rapid pickling process of salted duck eggs and comprehensive utilization of salted duck eggs white [J/OL]. Food and Machinery: 1-6[2020-10-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1183.TS.20200616.1157.002.html>
- [2] 陶志云,胡艳,朱春红.鸭蛋中总氨基酸和游离氨基酸含量的比较分析[J].江苏农业科学,2013,41:297-299  
TAO Zhi-yun, HU Yan, ZHU Chun-hong. Comparative analysis of total amino acid and free amino acid content in duck eggs [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41: 297-299
- [3] 普蕊.几种天然香料对咸鸭蛋品质、风味与脂质氧化的影响研究[D].武汉:华中农业大学,2018  
PU Rui. Study on the effects of several natural spices on the quality, flavor and lipid oxidation of salted duck eggs [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018
- [4] 全其根,宁静,徐艺青,等.咸蛋黄快速腌制方法的研究[J].食品科学,2008,3(9):155-157  
TONG Qi-gen, NING Jing, XU Yi-qing, et al. Study on rapid salting methods of egg yolk [J]. Food Science, 2008, 3(9):

- 155-157
- [5] 中华人民共和国卫生部.GB 5009.3-2016 食品中水分的测定[S]  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 Determination of Moisture in Food [S]
- [6] 中华人民共和国卫生部.GB/T 5009.5-2016 食品中蛋白质的测定[S]  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 Determination of Protein in Food [S]
- [7] 中华人民共和国卫生部.GB 5009.6-2016 食品中脂肪的测定[S]  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 Determination of Fat in Food [S]
- [8] 中华人民共和国卫生部.GB 5009.44-2016 食品中氯化物的测定[S]  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 Determination of Chloride in Food [S]
- [9] 中华人民共和国卫生部.GB 5009.90-2016 食品中铁的测定[S]  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 Determination of Iron in Food [S]
- [10] 中华人民共和国卫生部.GB 5009.13-2017 食品中铜的测定[S]  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 Determination of Copper in Food [S]
- [11] 中华人民共和国卫生部.GB 5009.14-2017 食品中锌的测定[S]  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 Determination of Zinc in Food [S]
- [12] 中华人民共和国卫生部.GB 5009.12-2017 食品中铅的测定[S]  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 Determination of Lead in Food [S]
- [13] 中华人民共和国卫生部.GB 5009.242-2017 食品中锰的测定[S]  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 Determination of Manganese in Food [S]
- [14] 中华人民共和国卫生部.GB 5009.93-2017 食品中硒的测定[S]  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 Determination of Selenium in Food [S]
- [15] 中华人民共和国卫生部.GB 5009.237-2016 食品pH值的测定[S]  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 Food pH Measurement [S]

- [16] 孙丹丹,柳且明,李东东.市售鸡蛋中类胡萝卜素含量的检测及稳定性研究[J].广东饲料,2013,22(10):21-23  
SUN Dan-dan, LIU Qie-ming, LI Dong-dong. Detection and stability study of carotenoid content in eggs sold in the market [J]. Guangdong Feed, 2013, 22(10): 21-23
- [17] 安晓宁.长白山特产鸡蛋中类胡萝卜素的分离鉴定及稳定性研究[D].长春:吉林大学,2013  
AN Xiao-ning. Study on isolation, identification and stability of carotenoids in Changbai mountain special eggs [D]. Changchun: Jilin University, 2013
- [18] 李树清,黄鹏,王庆玉.皮蛋加工贮存过程中蛋黄颜色变化机理研究[J].食品科学,1992,2:18-22  
LI Shu-qing, HUANG peng, WANG Qing-yu. Study on the mechanism of egg yolk color change during storage and processing of preserved eggs [J]. Food Science, 1992, 2: 18-22
- [19] 王世东,赵墩,胡玉立,等.立显蛋白染色液在 SDS-PAGE 中检测微量蛋白的应用[J].中国生物制品学杂志,2019,32(7):803-805  
WANG Shi-dong, ZHAO Dun, HU Yu-li, et al. Application of fluorescent staining buffer in test for trace protein in SDS-PAGE [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2019, 32(7): 803-805
- [20] 邱思.咸蛋黄制备过程中理化指标变化规律的研究[J].食品工业,2011,32(11):53-55  
QIU Si. The research on some properties of salted yolk [J]. Food Industry, 2011, 32(11): 53-55
- [21] 于智慧.鸡蛋高密度脂蛋白对脂质代谢的影响及机制研究[D].武汉:华中农业大学,2019  
YU Zhi-hui. Study on the effect and mechanism of egg high density lipoprotein on lipid metabolism [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019
- [22] 徐姣姣.减压腌制咸蛋及腌制后蛋黄理化性质的变化[D].天津:天津科技大学,2015  
XU Jiao-jiao. Salted egg pickled under reduced pressure and the change of physicochemical properties of egg yolk after pickling [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2015
- [23] Inanoglu S, Gustavo V Barbosa-Cánovas, Patel J, et al. Impact of high-pressure and microwave-assisted thermal pasteurization on inactivation of *Listeria innocua* and quality attributes of green beans [J]. Journal of Food Engineering, 2021, 288: 110162
- [24] 邵萍.酸浸减压法腌制咸蛋及其蛋白和脂质变化研究[D].天津:天津科技大学,2017  
SHAO Ping. Study on salted egg pickled by acid leaching and decompression method and its protein and lipid changes [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2017
- [25] Dou H, Magnusson E, Choi J, et al. Study on aggregation behavior of low density lipoprotein in hen egg yolk plasma by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled with multiple detectors [J]. Food Chemistry, 2016, 192: 228-234
- [26] 李再新,梁仁明,郑姣,等.蛋黄中卵黄高磷蛋白的提取优化及其磷酸肽制备[J].天然产物研究与开发,2015,27(3):485-489  
LI Zai-xin, LIANG Ren-ming, ZHENG Jiao, et al. Isolation of egg yolk phosphoprotein and preparation of its phosphopeptides [J]. Natural Product Research and Development, 2015, 27(3): 485-489
- [27] 张晓维.卵黄高磷蛋白的分离纯化、结构表征及功能特性研究[D].武汉:华中农业大学,2014  
ZHANG Xiao-wei. Study on the separation, purification, structure characterization and functional properties of phosphoprotein [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014
- [28] 孙秀秀,何立超,杨海燕,等.间歇超声辅助加快咸蛋腌制速度工艺优化[J].食品工业科技,2018,39(22):204-211  
SUN Xiu-xiu, HE Li-chao, YANG Hai-yan, et al. Intermittent ultrasound assisted in speeding up the pickling speed of salted eggs [J]. Food Industry Technology, 2018, 39(22): 204-211
- [29] 马磊.不同离子及蒸煮作用对蛋清凝胶品质的影响及涂膜保鲜蛋制品方法的研究[D].南京:南京农业大学,2016  
MA Lei. Study on the effect of different ions and cooking on the quality of egg white gel and the method of coating fresh egg products [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural College, 2016
- [30] Bao Z, Kang D, Li C, et al. Effect of salting on the water migration, physicochemical and textural characteristics, and microstructure of quail eggs [J]. LWT, 2020, 132: 109847
- [31] Wang R, Ma Y, Ma Z, et al. Changes in gelation, aggregation and intermolecular forces in frozen-thawed egg yolks during freezing [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 105947
- [32] Naderi N. Development of a fractionation process for the preparation of a folate-enriched protein extract from hen egg yolks [D]. Université Laval, 2015
- [33] Bao Z, Kang D, Li C, et al. Effect of salting on the water migration, physicochemical and textural characteristics, and microstructure of quail eggs [J]. LWT, 2020, 132: 109847