

熟制咸蛋黄黑圈形成因素及蛋白质的变化分析

张闽兰¹, 杨滔¹, 刘友², 张超逸¹, 沈清武¹, 刘焱^{1*}

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410000)

(2. 湖南洞庭湖蛋业食品有限公司, 湖南益阳 413000)

摘要: 为探究真空包装的熟制咸蛋黄黑圈形成的因素以及蛋白质变化规律。首先确定蛋清与蛋黄体系对咸蛋黄黑圈形成的作用, 其次分析比较了新鲜鸭蛋、生成蛋、熟制咸蛋、黑圈咸蛋四种样品的蛋清、外部蛋黄、内部蛋黄蛋白质以及 Pv (Phosvitin, 卵黄高磷蛋白) 理化性质的变化。结果表明: 咸蛋黄黑圈的形成是在灭菌之后的贮藏过程中逐渐形成的, 是蛋清、蛋黄体系共同作用的结果; 鸭蛋腌制之后蛋清中卵白蛋白质降解; 熟制咸蛋蛋清总巯基较新鲜鸭蛋减少了 31.62 $\mu\text{mol/g}$, 蛋清空间结构发生改变; 熟制咸蛋外部蛋黄 Pv 含量由 2.21 mg/g 减少至 0.11 mg/g, 铁还原能力 0.20 增加至 0.51; 黑圈咸蛋外部 Pv 螯合金属能力由 79.64% 降低至 71.26%, 外部蛋黄 Pv 结构逐渐形成更稳定的 β 结构。确定腌制环节以及熟制环节是真空熟制咸蛋黄黑圈产生的关键环节, 为后续通过控制腌制以及熟制条件减少咸蛋黄黑圈的产生提供理论基础。

关键词: 真空熟制咸蛋; 黑圈; 卵黄高磷蛋白; 蛋白降解; 铁还原能力

文章编号: 1673-9078(2025)02-272-281

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.2.1387

Factors Influencing Black Circle Formation and Changes in Proteins in Yolks of Cooked Salted Eggs

ZHANG Minlan¹, YANG Tao¹, LIU You², ZHANG Chaoyi¹, SHEN Qingwu¹, LIU Yan^{1*}

(1.College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410000, China)

(2.Hunan Dongting Lake Egg Industry Food Co. Ltd., Yiyang, 413000, China)

Abstract: To investigate the factors influencing the formation of dark circles in vacuum-packed cooked salted egg yolks and the changes in protein patterns. First, the role of egg white and yolk on black circle formation in salted eggs was determined; second, the changes in the physicochemical properties of the egg white, external yolk, internal yolk proteins, and phosvitin (Pv) in the yolks of fresh duck eggs, raw salted eggs, cooked salted eggs, and cooked salted eggs with black circles in the yolks were assessed. The results showed that black circle formation in salted egg yolks occurred gradually during storage after sterilization because of the combined actions of factors in the egg white and yolk. Ovalbumin degraded after the fresh duck eggs were salted. The total sulfhydryl content in the egg white in cooked salted eggs decreased by 31.62 $\mu\text{mol/g}$ compared to that of fresh duck eggs. Additionally, the spatial structure of the egg white changed. Furthermore, the Pv content of the external yolk of salted eggs decreased from 2.21 to 0.11 mg/g, and the iron-reducing capacity increased from 0.20 to

引文格式:

张闽兰,杨滔,刘友,等.熟制咸蛋黄黑圈形成因素及蛋白质的变化分析[J].现代食品科技,2025,41(2):272-281.

ZHANG Minlan, YANG Tao, LIU You, et al. Factors influencing black circle formation and changes in proteins in yolks of cooked salted eggs [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(2): 272-281.

收稿日期: 2023-11-21

基金项目: 湖南家禽产业技术体系; 公益性行业(农业)科研专项项目(201303084)

作者简介: 张闽兰(2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 动物源食品加工与贮藏研究, E-mail: 424011620@qq.com

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

0.51. The metal chelating capacity of Pv in the external yolk in cooked salted eggs with black circles decreased from 79.64% to 71.26%. The Pv structure in the external yolk gradually formed a stable β -structure. These results indicate that the salting and cooking processes are key stages in black circle formation in vacuum-packed cooked salted eggs, providing a theoretical basis for reducing black circle formation in yolks in salted eggs by controlling the salting and cooking conditions.

Key words: vacuum-packed cooked salted egg; black circles; phosvitin; protein degradation; iron-reducing capacity

咸鸭蛋是中国传统的腌制蛋品之一，以独特的风味和口感满足广大市场需求^[1]。咸鸭蛋是由新鲜的鸭蛋通过草灰包裹^[2,3]、盐水腌制液浸泡^[4]、盐泥涂布^[5]等方法腌制而成的一种产品。真空熟制咸鸭蛋产品的便利满足了当下快节奏生活的需求，但是在真空熟制咸鸭蛋产品中出现一种“黑圈”现象，常常以青黑晕甚至是黑晕的状态出现在咸蛋黄表面，让消费者误以为是产品腐败问题而影响销售。其在高温杀菌冷却环节形成黑圈的前体物质，在贮藏后大量积累^[6]，前期实验发现，在真空熟制咸蛋灭菌后未贮藏时并未观察到黑圈现象，在贮藏 7 d 后可明显观察到咸蛋黄外部呈现出黑环。

在不合理条件下加工的鸡蛋蛋黄外部也会出现与真空熟制咸蛋“黑圈”的相似的绿膜，鸡蛋蛋黄上的绿膜的呈现是因为生成了硫化亚铁，李秋雨等^[7]通过纯化学物质模拟验证 S^{2-} 是真空熟制咸蛋黄黑圈的特征离子，禽蛋蛋白质中含有丰富的硫元素，加热处理下蛋清中的硫比蛋黄中的硫更容易逸出。部分学者认为鸡蛋绿膜是硫-铁-卵黄高磷蛋白相互作用的结果^[8]，卵黄高磷蛋白是蛋黄蛋白质磷酸化程度较高的蛋白质，极易与 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 等金属离子结合，蛋黄中 95% 铁元素与卵黄高磷蛋白结合后形成稳定的 β 构象。目前较多研究集中在新鲜鸡蛋在煮制后形成绿膜的影响因素的分析，相关报道仅仅是推测真空熟制咸蛋黄黑圈与形成与铁结合硫离子相关^[7]，并未对咸鸭蛋加工过程中黑圈形成的影响因素以及黑圈形成机制进行深入研究。

本研究对咸蛋黑圈形成的因素以及咸蛋加工四个环节中蛋清、外部蛋黄、内部蛋黄部位蛋白质降解、蛋白质氧化、蛋白质分子间作用力、卵黄高磷蛋白含量、金属螯合能力以及铁还原能力等指标进行分析，确定咸蛋“黑圈”形成的关键环节，揭示咸蛋黑圈形成与蛋白之间的关系，为更有效地抑制咸蛋“黑圈”的形成，控制咸蛋品质提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜鸭蛋、黄泥、食盐，均由洞庭湖蛋业食品有限公司提供。

5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)、四硼酸钠、碳酸钠、甘氨酸、尿素、乙醇、乙酸、氯化钠、 β -巯基乙醇，以上均为分析纯，购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Multiskan GO 全波长酶标仪，美国赛默飞世尔公司；Bante 920 型 pH 计，上海般特仪器制造有限公司；DF-101S 型恒温水浴锅，巩义市予华仪器有限责任公司；TGL-16M 型冷冻高速离心机，湘仪离心机仪器有限公司；IRAffinity-1 型傅里叶红外光谱分析仪，日本岛津公司；LGJ-25E 型冷冻干燥机，四环福瑞科仪科技发展（北京）有限公司。

1.3 方法

1.3.1 咸蛋黑圈形成过程条件模拟

表 1 真空包装熟制咸蛋黑圈形成过程模拟条件

Table 1 Simulation conditions of black circle formation process of cooked salted eggs in vacuum packaging

编号	包装方式	灭菌条件	贮藏条件
A	全蛋真空包装		冷却后立即打开
B			37 °C 放置 7 d 后打开
C	分离咸蛋蛋黄，将蛋黄真空包装	120 °C， 20 min	37 °C 放置 7 d 后打开
D			分离蛋黄真空包装 37 °C 放置 7 d 打开
E	全蛋真空包装		打开真空包装、37 °C 放置 7 d 打开

将腌制成熟的咸蛋按照表 1 中条件进行处理，依次经过包装、灭菌以及贮藏之后，观察咸蛋黄黑圈现象。

1.3.2 不同硫离子浓度下蛋黄呈色分析

用 1 mg/mL 柠檬酸试剂调节蛋黄 pH 值分别为 6、7、8、9、10，备用，向蛋黄样品中依次加入 1 mL 浓度为 0、2.5、5、10、15、20、50、100 mg/g Na₂S，直接观察蛋黄呈色现象。

1.3.3 不同铁离子浓度对蛋清呈色分析

用 1 mg/mL 柠檬酸试剂调节蛋清 pH 值分别为 6、7、8、9、10，向不同 pH 值蛋清样品中依次加入 FeCl₃ 溶液，使样品中铁质量浓度为 0、5、10、30、50、70、90 μg/g，加热后直接观察蛋清呈色现象。

1.3.4 咸蛋样品制备

挑选完整新鲜的鸭蛋，采用泥包法（黄泥、食盐、水质量比为 5:3:2）腌制鸭蛋，腌制 35 d 后，经清洗、晾干、真空包装、高温杀菌、冷却、贮藏。分离不同加工环节（新鲜鸭蛋、生咸蛋、熟制咸蛋、黑圈咸蛋）蛋清、外部蛋黄以及内部蛋黄部位，将以上分离后的样品冷冻干燥，备用。

1.3.5 SDS-PAGE凝胶电泳分析

称取咸蛋冻干样品至 10 mL 离心管中，加入蛋白提取液，在 25 °C 下静置 1 h，4 500 r/min 离心 10 min，上清液为待测蛋白样品，将制备的蛋白样品透析 48 h 后置于 4 °C 下备用。调整蛋白样品浓度为 1 mg/mL，准确吸取 500 μL 待测样品，加入 100 μL 上样缓冲液，沸水煮沸 5 min，10 000 r/min 离心 3 min。电泳条件为：采用 5% (m/V) 浓缩胶和 10% (m/V) 分离胶，进样量 10 μL，进入浓缩胶电压 80 V，进入分离胶电压 120 V，使用考马斯亮蓝 R-250 水浴染色后用脱色液（乙醇、冰乙酸、蒸馏水体积比为 3:1:6）脱色，直至条带清晰可见。

1.3.6 TCA-可溶性肽含量测定

参考 Gao 等^[9]的测定方法，并稍做修改，准确称量 1 g（准确至 0.01 g）冻干咸蛋样品向其中加入 29 mL 质量浓度为 0.05 g/mL 三氯乙酸溶液，4 °C 下放置 1 h，8 000 r/min 的转速离心 5 min，取上清液 1 mL，再加入福林酚试剂 1 mL 与 5 mL 0.4 mol/L 碳酸钠试剂，40 °C 水浴 20 min。随后离心取上清液，于波长 660 nm 处测吸光值，同时用标准酪氨酸试剂配制标准曲线，根据标准曲线计算 TCA-可溶性肽含量。

1.3.7 巯基测定

巯基含量的测定参考李明洁^[10]的方法测定，并

稍作修改。准确称量咸蛋样品 0.20 g（准确 0.01 g）加入 9 mL PBS 溶液，8 000 r/min 离心 10 min，采用考马斯亮蓝法测定上清液中蛋白质浓度。吸取 1 mL 上清液至 10 mL 离心管中加入 20 μL Ellman 试剂，经漩涡迅速混合后在 37 °C 恒温震荡 30 min，随后以 9 000 r/min 转速离心 10 min，在波长 412 nm 处测定游离巯基，并以不加 Ellman 试剂的溶液作对照，每组样品测定 3 次，取平均值。取 1 mL 上清液至 10 mL 离心管中加入 4 mL Tris-Gly-8 M Urea 溶液，加入 20 μL Ellman 试剂，测定方法同游离巯基，测定总巯基。巯基计算公式：

$$S = \frac{73.53 \times A \times D}{C} \quad (1)$$

式中：

S——巯基含量，μmol/g；

73.53——Ellman 试剂的摩尔消光系数；

A——添加 Ellman 试剂时样品的吸光度与未加 Ellman 试剂时样品的吸光度的差值；

D——样品稀释系数；

C——样品蛋白质的最终质量浓度，mg/mL。

1.3.8 分子间作用力测定

准确称量咸蛋样品 0.50 g（准确至 0.01 g），分别加入试剂 S1（0.6 mol/L NaCl），震荡混匀，4 °C 静置 1 h，以转速 10 000×g 离心 25 min，取上清液至 4 °C 保存备用。向离心后的沉淀中加入试剂 S2（1.5 mol/L Urea+0.6 mol/L NaCl），4 °C 静置 1 h，在 10 000×g 转速下离心 25 min，取上清液至 4 °C 保存备用。向离心后的沉淀中加入试剂 S3（8 mol/L Urea+0.6 mol/L NaCl）4 °C 静置 1 h，10 000×g 离心 25 min，取上清液至 4 °C 保存备用。向离心后的沉淀中加入试剂 S4（0.5 mol/L β-巯基乙醇+8 mol/L Urea+0.6 mol/L NaCl）4 °C 静置 1 h，10 000 r/min 离心 25 min，取上清液至 4 °C 保存备用。采用考马斯亮蓝法测定上清液中蛋白质含量，溶解于 S1 的蛋白质质量分数为离子键的贡献，溶解于 S2 的蛋白质质量分数为氢键的贡献，溶解于 S3 的蛋白质质量分数为疏水相互作用力的贡献，溶解于 A4 的蛋白质质量分数为二硫键的贡献。

1.3.9 卵黄高磷蛋白的提取

参考张晓维^[11]的方法略作修改，取一定质量的冻干蛋黄样品，在样品中加入 4 倍质量的 4 °C 蒸馏水混合，搅拌 1 h 后，再在 4 °C 下用 10 000 r/min

的转速离心 20 min, 收集沉淀。接着将取得的沉淀与等质量的 0.17 mol/L NaCl 溶液混合搅拌 1 h, 离心 20 min, 取下层蛋黄颗粒沉淀。用质量体积比 (g/mL) 为 10 的 1.74 mol/L 的 NaCl 溶液与沉淀搅拌混匀, 接着将溶液的 pH 调至 4.0, 再加入 PEG6000 (聚乙二醇) 使其质量比为 3%, 搅拌 1 h, 离心取得上清液。将上清液用透析袋在蒸馏水的环境中透析、冷冻干燥, 所得即为 Pv 粗提物, 采用考马斯亮蓝法测定粗提物中蛋白质含量。

1.3.10 卵黄高磷蛋白金属螯合能力测定

卵黄高磷蛋白螯合金属离子能力的测定参照卢君^[12]的方法并稍作修改。用 PBS 缓冲液将 Pv 粗提物配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白溶液备用, 取 1 mL 蛋白样品至 10 mL 离心管中, 加入 50 μL 1 mmol/L 的 FeCl_2 溶液, 然后加入 5 mL 蒸馏水, 静置 2 min, 最后加入 4 mL 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Ferrozine 试剂, 室温下反应 10 min 后于 562 nm 波长处测定吸光值。

1.3.11 卵黄高磷蛋白铁还原能力测定

将 Pv 配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白溶液, 取 1 mL 加入 1 mL PBS 溶液混匀后再加入 1 mL 质量体积比为 1% 铁氰化钾溶液混匀, 50 $^{\circ}\text{C}$ 静置 20 min, 加入 1 mL 质量体积比为 10 wt.% TCA 溶液, 10 000 r/min 离心 10 min, 取 1 mL 上清液加入 0.5 mL 质量体积比为 0.1% FeCl_3 溶液, 充分混匀, 在波长 700 nm 处测定吸光度值。

1.3.12 卵黄高磷蛋白二级结构测定

称取冻干的 Pv 蛋白样品, 按质量比 1:100 加入溴化钾, 充分研磨并将其压成薄片后进样。设置波长为 4 000~400 cm^{-1} , 分辨率设置 4 cm^{-1} , 扫描 64 次, 扣除溴化钾背景。使用 OMINC 6.0 和 Peak Fit 4.12 软件分析红外光谱图, 计算蛋白质二级结构含量。

1.4 数据分析

将所有实验重复三次进行统计分析, 实验结果表示为平均值 \pm 标准差, 并用 DPS 软件进行显著性检验统计学分析。

2 结果与讨论

2.1 咸蛋不同包装与贮藏方式下咸蛋黑圈现象分析

探究不同包装与贮藏方式下咸蛋黑圈出现的情况, 由图 1 可知通过真空包装灭菌咸蛋中 A 组未

出现黑圈现象, 只有 B 组 (将腌制成熟的咸蛋真空包装灭菌后贮藏 7 d) 和 E 组 (真空包装灭菌后打开包装贮藏 7 d) 中咸蛋出现了黑圈, 真空包装咸蛋在灭菌后并不会立即出现黑圈, 说明咸蛋黑圈的形成是在咸蛋灭菌后的贮藏过程中逐渐形成的。C、D 组将分离的咸蛋黄单独真空包装灭菌不会产生黑圈, 说明蛋清在黑圈的形成过程中有着重要作用。Tinkler 等^[13]在实验中发现了同样的现象, 当单独沸水加热蛋黄时蛋黄没有变色, 而在加热蛋清蛋黄混合物时发生了变色, 蛋清在热处理禽蛋中支持蛋黄的色变是必要的。

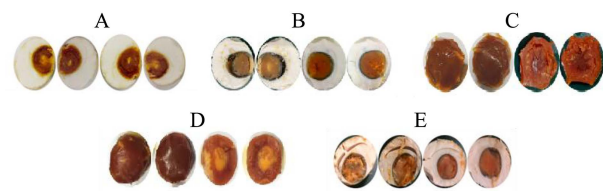


图 1 咸蛋不同包装与贮藏方式下咸蛋黑圈现象分析

Fig.1 Analysis of black circle phenomenon of salted egg under different packaging and storage methods of salted egg

2.2 咸蛋蛋清及蛋黄在不同离子中的呈色分析

禽蛋中铁主要是以三价态形式存在, 向不同 pH 值蛋清中添加不同浓度的 FeCl_3 , 发生不同程度的呈色现象。未加热蛋清并未发生明显类似与咸蛋黑圈的色变, 而加热后出现类似与咸蛋黑圈的现象, 说明热处理是咸蛋黑圈形成的外部条件之一。由图 2 可知, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下, 当 pH 值为 8、 FeCl_3 浓度达到 30 $\mu\text{g}/\text{g}$ 时, 蛋清呈现明显灰色, 在 120 $^{\circ}\text{C}$ 下, pH 值为 7、 Fe^{3+} 浓度 30 $\mu\text{g}/\text{g}$ 时, 蛋清呈现明显灰色, 且色变程度随着铁离子浓度以及 pH 值增大而加深。由图 3 可知, 未添加硫离子的蛋黄在 100 $^{\circ}\text{C}$ 以及 120 $^{\circ}\text{C}$ 加热时, 蛋黄在 pH 值为 9 以上蛋黄发生色变。向蛋黄中添加硫离子与蛋黄接触直接色变, 不需要再借助其他外部条件 (如加热) 发生色变, 硫离子浓度低于 5.0 mg/g , pH 值低于 9 时, 蛋黄不会发生明显色变, 说明蛋黄中硫元素当在 pH 值在强碱性环境下通过加热可逸出, 而前期实验发现咸蛋加工的整个环节中蛋黄 pH 值最高为 7.42, 可排除色变部位硫来源于蛋黄的可能。综上, 说明蛋清是咸蛋产生黑圈的硫源, 蛋黄是咸蛋产生黑圈的铁源, 蛋清产生的硫源可直接与蛋黄中铁源发生呈色现象, 热处理过程是蛋清产生硫源的重要环节。

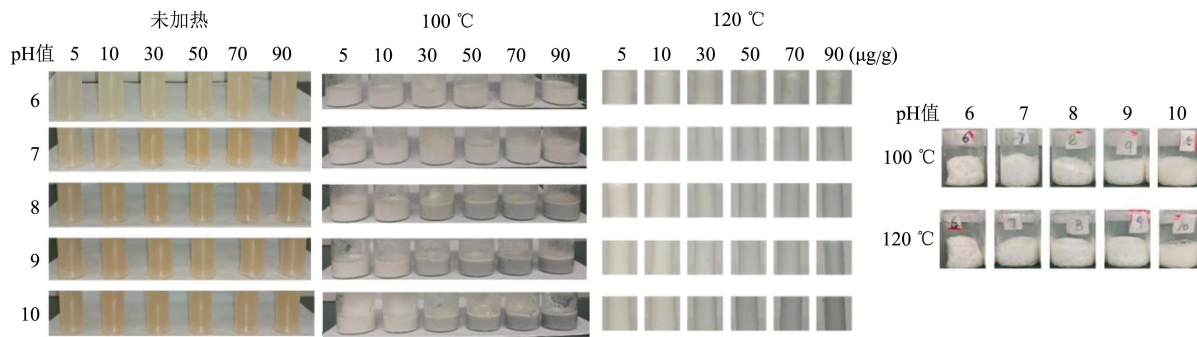


图 2 蛋清在不同铁离子浓度下的呈色现象

Fig.2 Coloration of egg white at different iron ion concentrations

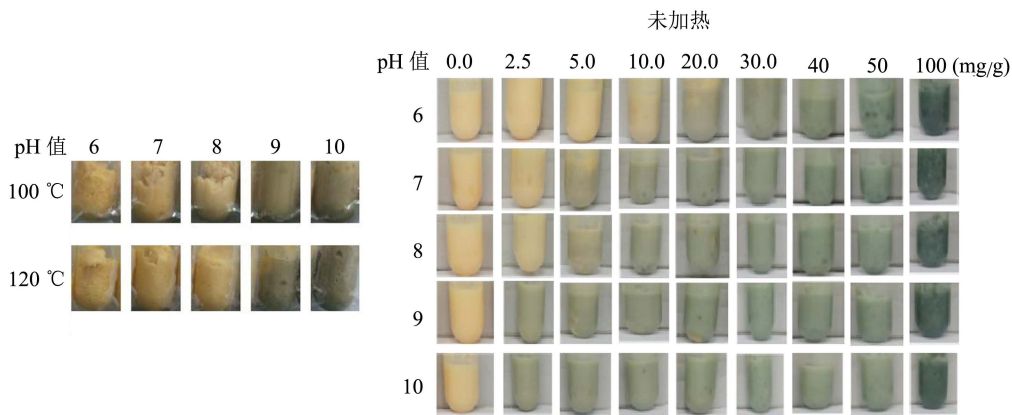


图 3 蛋黄在不同硫离子浓度下的呈色现象

Fig.3 Coloration of the egg yolk at different sulfur ion concentrations

2.3 咸蛋黑圈形成过程中蛋白组成变化

通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 由图 4a 可知, 经过腌制后的蛋清中部分卵白蛋白 (45 ku) 降解, 生咸蛋蛋清中卵白蛋白条带明显变窄^[14], 高浓度盐作用下卵清蛋白更容易发生降解, 在长时间的腌制过程中蛋清中以自然形式存在的 N-卵白蛋白逐渐转化为耐热的 S-卵白蛋白^[15,16], 蛋清常温贮藏 28 d 后 S-卵白蛋白含量高达 92.9%^[17]。高温处理会导致蛋清蛋白溶液中除卵白蛋白外的可溶性蛋白发生显著变化, 卵转铁蛋白是蛋清中最容易发生变性的蛋白质, 卵类黏蛋白含量减少会降低热稳定性^[18], 熟制咸蛋与黑圈咸蛋蛋清中卵转铁蛋白 (78 ku)、卵类黏蛋白 (35 ku 附近) 条带变浅可能是蛋白降解。不同加工环节蛋黄均呈现相似的蛋白模式, 熟制咸蛋外部蛋黄高密度脂蛋白 (105 ku) 蛋白条带变窄, 研究报道 35 ku、45 ku 处分别为 α -Pv 和 β -Pv^[19], 图 4b 结果显示熟制咸蛋经过高温灭菌后咸蛋外部蛋黄 Pv 蛋白条带变浅,

高温高压处理使蛋黄中 Pv 降解, 结合的金属离子形成游离态。

2.4 咸蛋黑圈形成过程中 TCA-可溶性肽含量变化

TCA-可溶性肽含量变化可反应蛋白质的降解情况, 图 5 结果显示, 咸蛋清不同加工环节 TCA-可溶性肽均有显著差异, 经过腌制和熟制蛋清中 TCA-可溶性肽含量降低, 说明在腌制及灭菌过程中 TCA-可溶性肽发生降解, 贮藏过程中食盐的渗透作用依旧在进行, 蛋白质降解, 黑圈咸蛋蛋清中可溶性肽含量增加了 0.86 mg/g。生咸蛋蛋黄中的可溶性肽发生降解, 且外部蛋黄中可溶性肽降解程度较内部蛋黄高, 外部蛋黄降低了 0.64 mg/g, 内部蛋黄降低了 0.28 mg/g。高温高压处理加剧了蛋黄中蛋白键断裂, 熟制咸蛋蛋黄中可溶性肽含量增加, 黑圈咸蛋蛋黄中可溶性肽含量减少, 外部蛋黄可溶性肽降解程度高, 可溶性肽进一步断裂为咸蛋黑圈的形成提供条件。

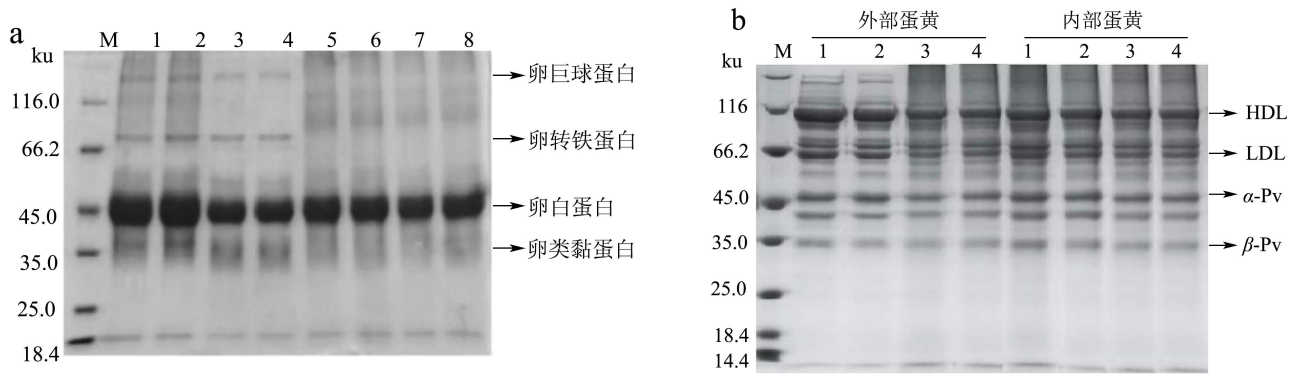


图4 咸蛋黑圈形成过程中蛋白质 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

Fig.4 SDS-PAGE gel electrophoresis analysis of proteins during the formation of black circles in salted eggs

注：a（蛋清）泳道 1、2 为新鲜鸭蛋，泳道 3、4 为生咸蛋，泳道 5、6 为熟制咸蛋，泳道 7、8 为黑圈咸蛋，b（蛋黄）泳道 1 为新鲜鸭蛋，泳道 2 为生咸蛋，泳道 3 为熟制咸蛋，泳道 4 为黑圈咸蛋。M：标准蛋白；HDL：高密度脂蛋白；LDL：低密度脂蛋白。

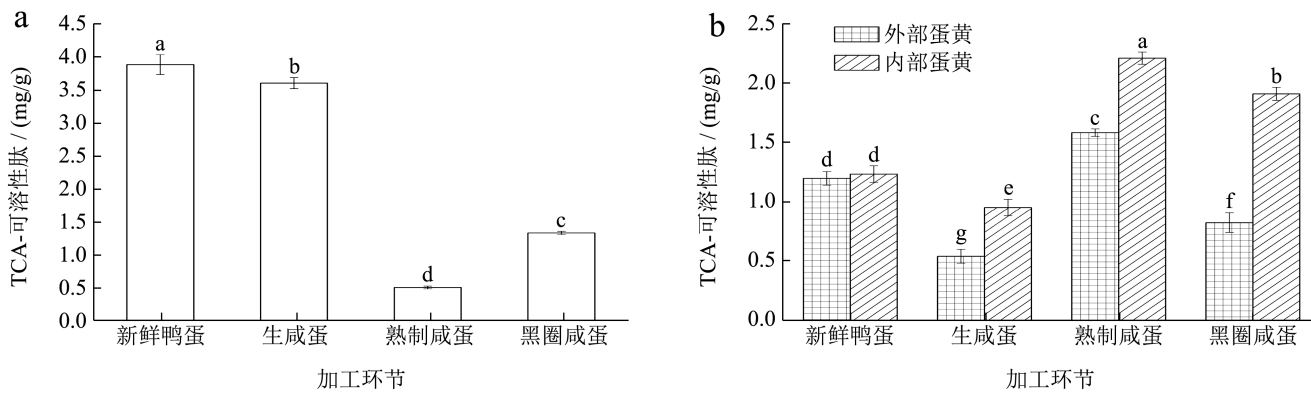


图5 咸蛋黑圈形成过程中 TCA-可溶性肽含量变化

Fig.5 Changes in TCA-soluble peptide content during the formation of black circles in salted eggs

注：不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

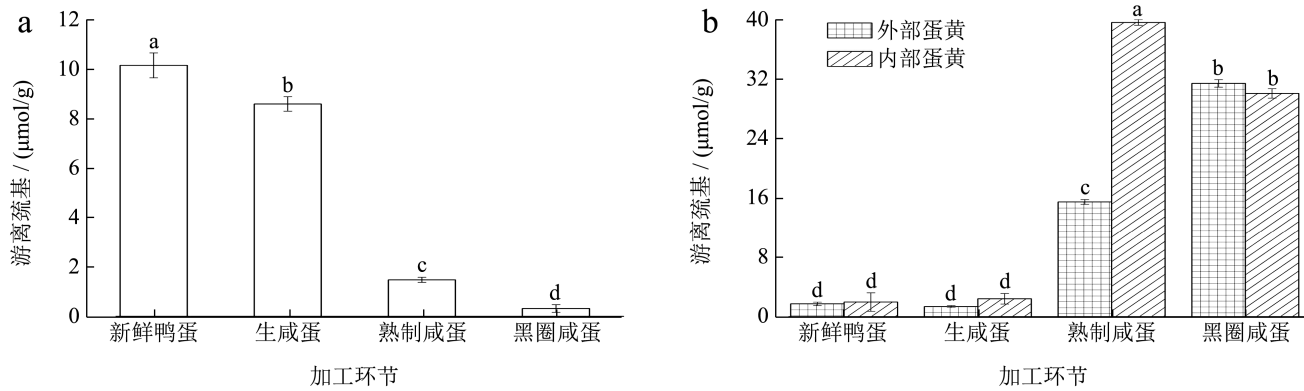


图6 咸蛋黑圈形成过程中游离巯基含量变化

Fig.6 Changes in surface free sulfhydryl content during the formation of black circles in salted eggs

2.5 咸蛋黑圈形成过程中游离巯基变化

如图6所示，不同加工环节蛋清中游离巯基有显著差异，黑圈咸蛋蛋清游离巯基从 10.18 $\mu\text{mol/g}$

减少至 0.32 $\mu\text{mol/g}$ ，减少了 9.86 $\mu\text{mol/g}$ ，卵白蛋白是蛋清中唯一有游离巯基的蛋白质^[20]，卵白蛋白降解以及结构变化可能导致游离巯基减少^[21]，在

腌制、高温高压灭菌、贮藏过程中，蛋清蛋白受到 NaCl、压力、温度的影响发生变性、蛋白质聚集，游离巯基被埋藏至蛋白内部，游离巯基减少。熟制咸蛋内部蛋黄游离巯基高于外部蛋黄，黑圈咸蛋内外蛋黄没有显著差异，外部蛋黄游离巯基增加了 15.93 $\mu\text{mol/g}$ ，内部蛋黄游离巯基减少了 9.54 $\mu\text{mol/g}$ ，外部蛋黄游离巯基数量增加，是蛋白质结构展开的结果^[22]。

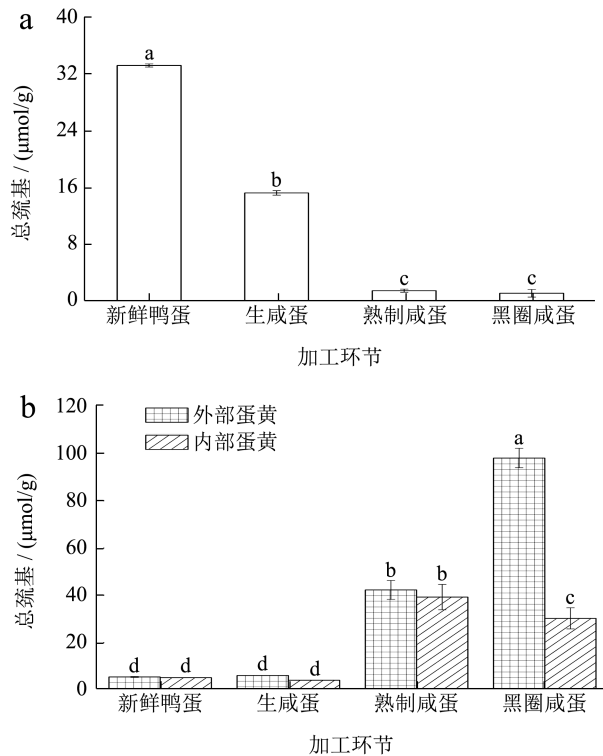


图 7 咸蛋黑圈形成过程中总巯基含量变化

Fig.7 Changes in total sulfhydryl content during the formation of black circles in salted eggs

2.6 咸蛋黑圈形成过程中总巯基变化

总巯基是指蛋白质分子表面巯基以及折叠在蛋白质分子内部的巯基，总巯基数量变化可以衡量蛋白质的氧化程度^[23]。前期实验发现咸蛋加工过程中蛋清始终呈现碱性，半胱氨酸在碱性条件下易发生解离^[24]，巯基更容易氧化形成二硫键，咸蛋总巯基含量减少。如图 7 所示，熟制咸蛋蛋清总巯基含量从 15.26 $\mu\text{mol/g}$ 降低至 1.56 $\mu\text{mol/g}$ ，高压条件下巯基更容易发生氧化。熟制咸蛋和黑圈咸蛋蛋清中的总巯基含量没有显著差异，说明在贮藏过程中蛋清中含硫氨基酸没有发生氧化、

降解。熟制咸蛋外部以及内部蛋黄总巯基含量分别增加至 42.21、39.19 $\mu\text{mol/g}$ ，可能蛋黄蛋白质热处理使蛋白结构破坏，蛋白质降解，半胱氨酸含量增加，黑圈咸蛋外部蛋黄总巯基含量显著高于内部蛋黄，是外部蛋黄出现黑圈的重要原因，因为金属离子与巯基发生反应生成蛋白盐沉淀。

2.7 咸蛋黑圈形成过程中分子间作用力变化

表 2 结果显示，在不同加工环节蛋清中离子键占主导作用。腌制过程中 Na^+ 和 Cl^- 会破坏有蛋白分子间的离子相互作用^[25]，生咸蛋蛋清离子键减少至 16.71%。蛋清中卵白蛋白等蛋白质在腌制、加热和凝聚的过程中，蛋白质多肽链部分伸展，使氢键断裂^[26,27]，生咸蛋与熟制咸蛋氢键作用力减弱，氢键数量越高蛋白质稳定性越差^[28]，说明咸蛋加工过程中蛋清蛋白质稳定性逐渐增强。二硫键是指蛋白质分子内部两个半胱氨酸残基的巯基通过脱氢氧化而结合形成的一种共价键^[29,30]，生咸蛋蛋清二硫键降低了 1.47%，王晶^[31]发现在长时间贮藏过程中卵白蛋白、溶菌酶中二硫键发生断裂，与本实验结果一致。表 3 结果显示，新鲜蛋黄内部蛋黄氢键作用力比外部蛋黄低 1.30%，经过腌制生咸蛋蛋黄氢键作用力增强，蛋白质稳定性降低，疏水作用力增加与陈颜红等^[32]研究结果一致。热诱导是咸蛋加工过程中二硫键增加的主要原因，热处理下巯基发生氧化形成二硫键过程中巯基发生氧化形成二硫键，咸蛋二硫键含量增加，是黑圈咸蛋蛋白质的主要分子间作用力。

表 2 咸蛋黑圈形成过程中蛋清蛋白质分子间作用力变化

Table 2 Changes in the intermolecular forces of proteins during the formation of black circles in salted eggs

加工环节	S1	S2	S3	S4
新鲜鸭蛋	19.14 ± 0.29 ^a	5.50 ± 0.28 ^a	2.06 ± 0.16 ^a	1.78 ± 0.08 ^a
生咸蛋	16.71 ± 0.69 ^b	1.71 ± 0.22 ^b	0.23 ± 0.05 ^b	0.31 ± 0.10 ^d
熟制咸蛋	3.23 ± 0.15 ^c	0.96 ± 0.12 ^c	0.39 ± 0.08 ^b	1.40 ± 0.12 ^b
黑圈咸蛋	3.81 ± 0.10 ^c	1.01 ± 0.15 ^c	0.11 ± 0.02 ^b	1.07 ± 0.07 ^c

注：不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。S1：离子键作用力；S2：氢键作用力；S3：疏水键作用力；S4：二硫键作用。表 3 同。

表 3 咸蛋黑圈形成过程中蛋黄蛋白质分子间作用力变化

Table 3 Changes in the intermolecular forces of proteins during the formation of black circles in salted eggs

不同加工环节		S1	S2	S3	S4
外部蛋黄	新鲜鸭蛋	12.85 ± 0.24 ^b	2.94 ± 0.22 ^b	0.26 ± 0.13 ^c	0.04 ± 0.02 ^c
	生咸蛋	10.63 ± 0.55 ^d	7.78 ± 0.52 ^a	1.72 ± 0.23 ^a	0.05 ± 0.02 ^c
	熟制咸蛋	0.25 ± 0.06 ^c	0.14 ± 0.08 ^d	0.41 ± 0.08 ^c	2.41 ± 0.08 ^b
	黑圈咸蛋	0.40 ± 0.08 ^c	0.19 ± 0.02 ^d	0.78 ± 0.23 ^b	2.47 ± 0.76 ^b
内部蛋黄	新鲜鸭蛋	13.83 ± 0.41 ^a	1.64 ± 0.87 ^c	0.18 ± 0.05 ^c	0.02 ± 0.01 ^c
	生咸蛋	11.86 ± 0.23 ^c	8.28 ± 0.39 ^a	0.67 ± 0.05 ^b	0.04 ± 0.02 ^c
	熟制咸蛋	0.32 ± 0.06 ^c	0.22 ± 0.09 ^d	0.39 ± 0.02 ^c	2.70 ± 0.09 ^a
	黑圈咸蛋	0.28 ± 0.08 ^c	0.20 ± 10.05 ^d	0.38 ± 0.01 ^c	2.45 ± 0.09 ^b

表 4 咸蛋黑圈形成过程中Pv二级结构变化

Table 4 Changes in the secondary structure of Pv during the formation of black circles in salted eggs

不同加工环节		α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲
外部蛋黄	新鲜鸭蛋	22.21 ± 1.84 ^a	23.34 ± 1.43 ^a	42.47 ± 3.16 ^b	11.97 ± 2.65 ^a
	生咸蛋	21.69 ± 1.52 ^a	21.84 ± 0.32 ^{ab}	47.20 ± 0.26 ^a	9.26 ± 1.14 ^{bc}
	熟制咸蛋	20.64 ± 0.72 ^{ab}	21.17 ± 0.83 ^{ab}	48.80 ± 1.07 ^a	9.39 ± 0.90 ^{bc}
	黑圈咸蛋	21.89 ± 0.73 ^a	20.53 ± 0.38 ^b	48.95 ± 0.90 ^a	8.64 ± 0.05 ^{bc}
内部蛋黄	新鲜鸭蛋	22.78 ± 0.85 ^a	21.20 ± 0.72 ^{ab}	47.45 ± 1.26 ^a	8.57 ± 0.20 ^{bc}
	生咸蛋	21.90 ± 1.29 ^a	22.08 ± 1.24 ^{ab}	46.54 ± 1.37 ^a	9.48 ± 1.35 ^{bc}
	熟制咸蛋	19.33 ± 0.28 ^b	21.27 ± 0.34 ^{ab}	49.18 ± 0.79 ^a	10.22 ± 0.80 ^{ab}
	黑圈咸蛋	21.79 ± 0.84 ^a	21.34 ± 1.04 ^{ab}	49.40 ± 1.31 ^a	7.47 ± 0.67 ^c

注：不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.8 咸蛋黑圈形成过程中Pv含量变化

根据张晓维^[1]的方法提取咸蛋中 Pv，提取的咸蛋中与高密度脂蛋白通过钙磷桥结合的 Pv，外部蛋黄 Pv 的蛋白粗提物含量低于内部蛋黄，说明卵黄颗粒中大量 Pv 从颗粒中溶出。对咸蛋黑圈形成过程中 Pv 粗提物含量进行测定，结果如图 8 所示，生咸蛋内部蛋黄中大部分 Pv 在氯化钠作用下从黄颗粒中解离出来，熟制咸蛋外部蛋黄 Pv 含量从 2.21 mg/g 降低至 0.11 mg/g，减少了 2.1 mg/g，内部蛋黄从 3.25 mg/g 降低至 1.88 mg/g，减少了 1.37 mg/g，说明生咸蛋外部蛋黄中 Pv 热稳定性更差，Pv 含量减少可能是在热处理下部分蛋白发生降解，Pv 在温度高于 110 °C 时开始降解^[33,34]，虽然经过高温和压力作用，Pv 依旧保持较高结合铁的能力。黑圈咸蛋内部蛋黄 Pv 减少，高压蒸煮过程中会使蛋黄中水分、盐分减

少^[35]，但是在真空包装条件下水分和盐分不易损失，经过贮藏后 NaCl 随着水分向咸蛋内部迁移，使内部蛋黄颗粒中钙磷桥断裂，使颗粒中的 Pv 含量减少。

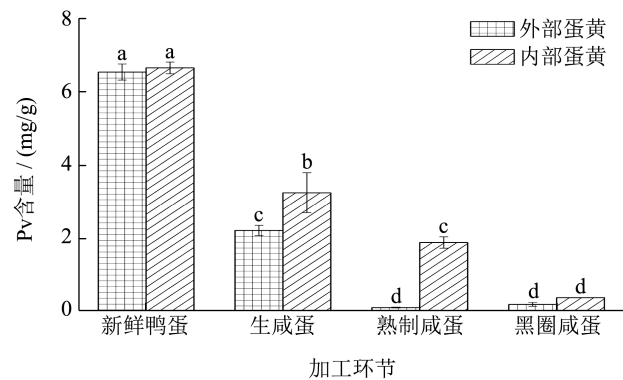


图 8 咸蛋黑圈形成过程中 Pv 粗提物含量变化

Fig.8 Changes in the crude extract content of Pv during the formation of black circles in salted eggs

2.9 咸蛋黑圈形成过程中Pv螯合金属能力及铁还原能力变化

对咸蛋黑圈形成过程中Pv螯合金属能力及铁还原能力进行测定,结果如图9所示,不同加工环节内部蛋黄Pv金属螯合能力没有显著差异,新鲜鸭蛋外部蛋黄Pv金属螯合能力为79.64%,黑圈咸蛋外部蛋黄Pv金属螯合能力降低至71.26%,且与新鲜鸭蛋外部蛋黄有显著差异,说明黑圈咸蛋外部蛋黄Pv暴露的金属配位键更少,黑圈咸蛋内外蛋黄Pv金属螯合能力没有显著差异。新鲜鸭蛋和腌制咸蛋内外蛋黄Pv铁还原能力没有显著差异,熟制咸蛋外部蛋黄Pv铁还原能力显著高于内部蛋黄($P<0.05$),熟制咸蛋外部蛋黄Pv通过螯合铁离子,加速二价铁离子氧化,可减弱亚铁参与芬顿反应抑制羟基自由基的形成^[36],外部蛋黄更容易出现黑圈。

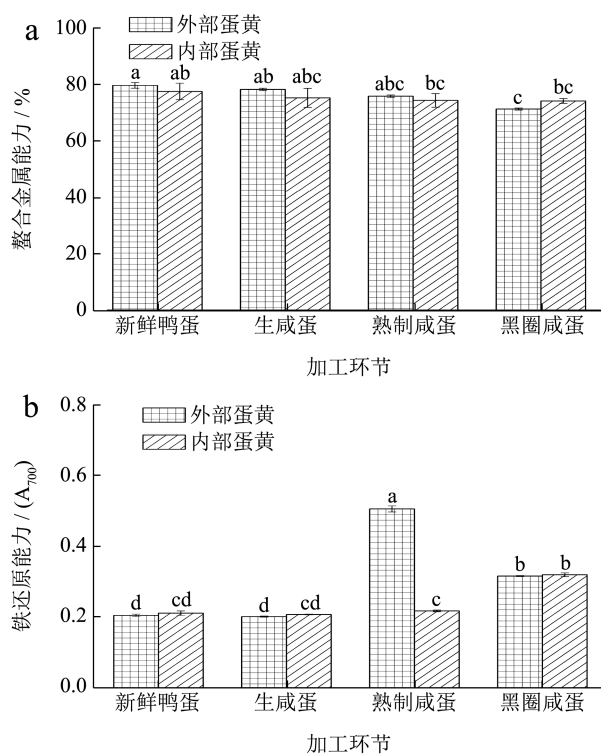


图9 咸蛋黑圈形成过程中Pv螯合金属能力及铁还原能力变化

Fig.9 Changes in chelating metal capacity and iron-reducing capacity of Pv during the formation of salted egg black ring

2.10 咸蛋黑圈形成过程中Pv二级结构变化

对蛋白质酰胺I带分析,将1600~1640 cm^{-1} 的范围归于 β -折叠部位,1640~1650 cm^{-1} 归于无

规则卷曲部分,1650~1660 cm^{-1} 归于 α -螺旋成分,1660~1700 cm^{-1} 归于 β -转角部分^[37]。铁与Pv结合后会形成更稳定的 β 构象^[8]。根据表4发现,不同加工环节,外部及内部Pv均含有较多的 β -折叠和 β -转角结构,张晓维^[11]发现含有在不金属离子的Pv二级结构中含有更多的 β 构象,黑圈形成过程中,外部Pv β -转角结构相对含量由42.47%增加至48.95%,结合2.9中分析Pv金属螯合能力不断减弱,Pv结构发生变化,推测在咸蛋加工过程中外部蛋黄Pv释放铁。黑圈形成过程中外部Pv分子结构由无规则卷曲向 β 结构转化,意味着外部Pv结构由松散向紧密转化。

3 结论

本实验通过对真空包装后熟制咸蛋黑圈形成的因素以及加工过程中蛋白质变化分析可知,在咸蛋黑圈的形成过程中,蛋清、蛋黄分别是黑圈物质中硫的来源以及铁的来源。在腌制环节,卵白蛋白以及可溶性肽降解,同时外部蛋黄Pv降解,Pv二级结构逐渐向紧密的 β 构象转化,Pv释放金属铁离子,蛋白质降解是咸蛋黄黑圈前体物质积累的主要途径。熟制环节是咸蛋黄黑圈形成的重要环节,热处理促使蛋清中含硫氨基酸以及蛋白质降解,生成硫化物,蛋清中的巯基含量不断降低,此时外部蛋黄Pv铁还原能力达到最强,抑制亚铁离子参与芬顿反应,游离的金属铁离子与蛋清中硫化物结合呈现出咸蛋黑圈现象。总之,确定了黑圈形成的关键环节为咸蛋腌制以及熟制过程,可为进一步研究咸蛋黑圈控制技术提供理论基础。

参考文献

- [1] LI X Y, CHEN S P, YAO Y, et al. The quality characteristics formation and control of salted eggs: A review [J]. Foods, 2022, 11(19): 2949.
- [2] 潘康,冯泉,李蓉,等.盐水法和包灰法腌制咸蛋理化性质的比较[J].食品与生物技术学报,2011,30(4):542-548.
- [3] 吕蕙.稻秸微灰的制备及其对咸蛋品质的影响[J].武汉:华中农业大学,2019.
- [4] 张晓维,郑萍,高洁,等.3种方法腌制咸蛋理化性质的对比[J].食品研究与开发,2020,41(12):108-116.
- [5] 孙静,李开耀,向俊,等.泥腌、水腌咸蛋的理化指标和滋味品质差异分析[J].食品安全质量检测学报,2021, 12(21):8342-8350.
- [6] 侯水生.国家水禽产业技术体系取得的重要成果及其应

- 用[J].水禽世界,2014,4:6-9.
- [7] 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.
- [8] ALBRIGHT K J, GORDON D T, COTTERILL O J. Release of iron from phosvitin by heat and food additives [J]. *Journal of Food Science*, 1984, 49(1): 78-81.
- [9] GAO B H, HU X B, XUE H, et al. The changes of umami substances and influencing factors in preserved egg yolk: pH, endogenous protease, and proteinaceous substance [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 998448.
- [10] 李明洁.鸭蛋腌制过程中蛋清蛋白品质、风味及其热凝胶脱盐的研究[J].南宁:广西大学,2022.
- [11] 张晓维.卵黄高磷蛋白的分离纯化、结构表征及功能性研究[J].武汉:华中农业大学,2014.
- [12] 卢君.鲤鱼卵卵黄高磷蛋白的分离纯化和性质研究[J].长沙:湖南农业大学,2014.
- [13] TINKLER C K, SOAR M C. Formation of ferrous sulphide in eggs during cooking [J]. *Journal of the Franklin Institute*, 1920, 14(2): 114-119.
- [14] 汪前,邱静,邹礼根.鸭蛋腌制前后蛋清蛋白特性差异分析[J].食品科技,2023,48(4):70-74.
- [15] 王晶,马美湖.鸡蛋贮藏过程中蛋白质的变化机理及其研究方法[J].中国家禽,2013,35(3):46-48.
- [16] 杨晓盼,刘丽莉,黄正迪,等.常温贮藏期间鸡蛋清流变特性和蛋白质成分的变化[J].浙江农业学报,2021,33(3): 526-533.
- [17] OMANA D A, LIANG Y, KAV N N V, et al. Proteomic analysis of egg white proteins during storage [J]. *Proteomics*, 2011, 11(1): 144-153.
- [18] LIU X, MA L L, ZHONG M Z, et al. Formation mechanism of high-viscosity gelatinous egg white among “Fenghuang Egg”: Phenomenon, structure, and substance composition [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 217: 803-813.
- [19] 刘瑜,殷涌光,刘静波,等.卵黄高磷蛋白的功能性质及其制备方法研究[J].食品科学,2006,12:863-866.
- [20] ROSTAMABADI H, CHAUDHARY V, CHHIKARA N, et al. Ovalbumin, an outstanding food hydrocolloid: Applications, technofunctional attributes, and nutritional facts, A systematic review [J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 139: 144-153.
- [21] VAN D P I, VAN L A, HENDRICKX M E G. Changes in sulfhydryl content of egg white proteins due to heat and pressure treatment [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(14): 5726-5733.
- [22] XUE H, LIY H L, ZHANG G W, et al. Formation mechanism of salted egg yolk mudding during storage: Protein oxidation, gel structure, and conformation [J]. *Food Chemistry*, 2023, 413: 135632-135632.
- [23] BAO Z J, 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.
- [24] 马冬雪,赵栩宁,赵阳国.海水养殖生境中柠檬酸杆菌降解半胱氨酸产生硫化物的机制研究[J].微生物学报,2023, 63(8):3026-3040.
- [25] GAO X J, GUO W B, WU N, et al. Effects of salt and heat treatment on the physicochemical properties, microstructure, secondary structure, and simulated in vitro gastrointestinal digestion of duck egg white [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(14): 6093-6103.
- [26] 邵瑶瑶,赵燕,徐明生,等.金属离子对蛋白质凝胶化行为的影响研究进展[J].食品科学,2017,38(5):299-304.
- [27] CHEN Z Y, LI J K, TU Y G, et al. Changes in gel characteristics of egg white under strong alkali treatment [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 45: 1-8.
- [28] 金承昊,冯宙,姜舟婷. α 螺旋结构影响蛋白质稳定性的模拟研究[J].中国计量大学学报,2023,34(2):265-270.
- [29] 王静宇,胡新,刘晓艳,等.肌原纤维蛋白热诱导凝胶特性及化学作用力研究进展[J].食品与发酵工业,2020, 46(8):300-306.
- [30] NEGAR G, MOHSEN L. Effect of processing on aggregation mechanism of egg white proteins [J]. *Food Chemistry*, 2018, 252: 126-133.
- [31] 王晶.鸡蛋贮藏期间三种蛋白质结构与功能性质的变化研究[J].武汉:华中农业大学,2014.
- [32] 陈颜红,王修俊,于沛,等.咸鸭蛋腌制过程中蛋黄凝聚变化分析[J].中国食品学报,2023,23(4):377-389.
- [33] XU L L, ZHAO Y, XU M S, et al. Changes in aggregation behavior of raw and cooked salted egg yolks during pickling [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 80: 68-77.
- [34] 马杰,张士瑾.卵黄蛋白的结构和功能[J].鲁东大学学报(自然科学版),2012,28(3):252-260,275.
- [35] YANG N, JIN Y M, XU Y, et al. Effect of pressure cooking on physicochemical properties of salted eggs [J]. *RSC Advances*, 2016, 6(99): 97089-97095.
- [36] ISHIKAWA S I, YANO Y, ARIHARA K, et al. Egg yolk phosvitin inhibits hydroxyl radical formation from the fenton reaction [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68(6): 1324-1331.
- [37] 王红妮,刘会平,刘平伟,等.糟蛋减压加工过程中蛋黄蛋白质二级结构的变化研究[J].现代食品科技,2013,29(6): 1262-1265.