

摘要

肌原纤维蛋白 (Myofibrillar protein, MP) 是肌肉的主要组分, 具有优质的氨基酸组成、高生物价值、高消化率、低致敏性等营养特性。结构方面, MP 通常呈现天然柔性长链状, 且含有丰富的侧链功能基团, 可作为一种优异生物组件, 应用于功能性食品胶体材料的构建。目前, MP 结构设计及其功能拓展是肉品加工领域的科学前沿。MP 具备较强的热聚集能力, 易于形成热不可逆凝胶, 这一特性是众多凝胶类肉制品的形成基础, 如果能够实现 MP 向热可逆凝胶的拓展, 将有助于进一步促进 MP 的开发利用, 丰富其应用场景。本课题借助蛋白质-谷氨酰胺酶 (Protein-glutaminase, PG) 对 MP 进行了靶向脱酰胺作用, 成功实现了 MP 的热可逆凝胶化, 探究了 MP 热可逆凝胶的相关特征, 并进一步解析了热可逆凝胶的形成机制。

本研究的主要内容和结论如下:

1、蛋白浓度与 PG 处理时间是实现 MP 热可逆凝胶化的决定因素。MP (2.5%, W/W) 经 PG 处理 12 h 后, 呈现出热可逆凝胶特性, 其热可逆性可保持 5 次加热-冷却循环; MP 蛋白浓度的增加会使凝胶强度增加, 浓度过高 (>3%) 时, 则形成热不可逆聚集或凝胶, 无法产生热可逆现象, 低浓度 (1%) 蛋白在长时间 (16 h) 的酶反应处理之后, 将无法形成凝胶; 脱酰胺肌原纤维蛋白 (Deamidation myofibrillar protein, DMP) 热可逆凝胶的持水性高达 95% 以上, 其白度值低于传统热诱导凝胶; 通过扫描电镜观察发现, DMP 热可逆凝胶微结构相较 MP 热诱导凝胶具有明显差异, 呈现出均匀、连续的三维网络结构, 胶链光滑紧凑。

2、通过原子力显微镜和透射电子显微镜观察发现, 类肌球蛋白尾部螺旋卷曲结构 (Coiled-coil, CC) 的盘绕与解离是 DMP 在热可逆凝胶化动态演变过程中的重要结构基础; 圆二色谱 $\theta_{222}/\theta_{208}$ 比例可评估 α 螺旋的超分子组装状态, 经脱酰胺后, MP 的 $\theta_{222}/\theta_{208}$ 值从 1.35 下降到 1.05, 说明 DMP 的 α 螺旋结构主要以双螺旋卷曲的盘绕状态存在; 加热-冷却循环可诱发双螺旋—单螺旋—无规则线圈的动态可逆转变。加热时, DMP 双螺旋卷曲结构发生解离, 同时, 蛋白结构展开, DMP 的 α 螺旋含量从 50.7% 下降至 14.1%, 随后的冷却可重新提升 DMP 的 α 螺旋含量, 与此同时, 诱发 DMP 双螺旋卷曲结构的重新组装; 流变仪结果反映 DMP 在加热过程中发生了肌球蛋白蛋白头部交联结构, 随后表现出热可逆冷致凝胶化行为; SDS-PAGE 电泳图谱分析发现 DMP 发生共价聚集程度低于 MP, 疏水相互作用在 DMP 凝胶网络的形成和稳定过程中起主导。

3、DMP 的热可逆凝胶特性与 CC 结构的可逆组装有关。关联结果表明, 凝胶化起始温度和 CC 转变温度之间具有良好的对应关系; CC 组装经三氟乙醇 (TFE) 特异性抑制后, DMP 热可逆凝胶能力发生了丢失, 证实 CC 的温度响应性动态组装在 DMP 热可逆凝胶的形成中起着关键作用。相关结果可拓展天然 CC 可逆凝胶化的分子基础, 同时,

可为新型肌肉蛋白制品的创制提供理论依据。

关键词：肌原纤维蛋白；热可逆凝胶；卷曲螺旋结构；酶法脱酰胺；蛋白质-谷氨酰胺酶

Abstract

Myofibrillar protein (MP) is the main component of muscle and has favorable nutritional characteristics including a superb amino acid composition, high biological value, high digestibility, and low allergenicity. Structurally, MP usually presents a natural flexible long chain shape and is rich in side chain functional groups, which can be used as an excellent biological component for the construction of functional food colloidal materials. Currently, the design of MP structures and their functional expansion are at the forefront of science in meat processing. MP has strong thermal aggregation ability and is easy to form thermally irreversible gels. This characteristic is the basis for the formation of many gel-like meat products, and if the expansion of MP to thermally reversible gels can be realized, it will help further promote the development and utilization of MP and enrich its application scenarios. In this study, we successfully achieved the thermoreversible gelation of MP by targeting deamidation of MP with protein-glutaminase (PG), investigated the characteristics of thermoreversible gelation of MP, and further analyzed the mechanism of thermoreversible gel formation.

The following are the study's key contents and conclusions:

1. Protein concentration and PG treatment time are the determining factors for achieving thermally reversible gelation of MP. MP (2.5%, W/W) exhibited thermally reversible gel properties after 12 h of PG treatment, and its thermal reversibility could be maintained for 5 heating-cooling cycles. An increase in MP protein concentration leads to an increase in gel strength; at too high a concentration (>3%), thermally irreversible aggregates or gels are formed and thermally reversible phenomena cannot be produced, and low concentrations (1%) of protein will not form gels after a long enzymatic reaction treatment (16 h). Deamidation myofibrillar protein (DMP) thermally reversible gels with water holding capacity of more than 95% and lower whiteness values than conventional thermally induced gels. It was observed by scanning electron microscopy that the microstructure of DMP thermally reversible gels was significantly different compared to MP thermally induced gels, showing a uniform and continuous three-dimensional network structure with smooth and compact gel chains.

2. Coiling and dissociation of the helical coiled-coil (CC) structure of the myosin-like tail was found to be an important structural basis for the dynamic evolution of DMP during thermally reversible gelation by atomic force microscopy (AFM) and transmission electron microscopy (TEM). The $\theta_{222}/\theta_{208}$ ratio of circular dichroism assesses the supramolecular assembly state of the α -helix. After deamidation, the $\theta_{222}/\theta_{208}$ value of MP decreases from 1.35 to 1.05, indicating that the α -helix structure of DMP exists mainly in a double-helix coiled-coil

state. The heating-cooling cycle induces a dynamic reversible transition of double-helix-single-helix-irregular coils. Upon heating, the DMP double-helix convoluted structure dissociates, while the protein structure unfolds and the α -helix content of DMP decreases from 50.7% to 14.1%. Subsequent cooling reboosts the α -helix content of DMP and, at the same time, induces the reassembly of the DMP double-helix convoluted structure. Rheometry results reflect the cross-linked structure of the myosin protein head that occurs during heating of DMP and subsequently exhibits thermally reversible cold gelation behavior. The analysis of SDS-PAGE electrophoretic profiles revealed that DMP underwent covalent aggregation to a lesser extent than MP, and hydrophobic interactions played a dominant role in the formation and stabilization of DMP gel networks.

3. The thermally reversible gelation properties of DMP are related to the reversible assembly of CC structures. The correlation results show a good correspondence between the gelation onset temperature and the CC transition temperature. CC assembly was specifically inhibited by trifluoroethanol (TFE), and loss of DMP thermoreversible gel capacity occurred, confirming that temperature-responsive dynamic assembly of CC plays a key role in the formation of DMP thermoreversible gels. The results may expand the molecular basis of reversible gelation of natural CC, and may provide a theoretical foundation for the creation of novel muscle protein products.

Keywords: myofibrillar protein, thermo-reversible gels, coiled-coil, enzymatic deamidation, protein glutaminase

目 录

1 绪论.....	1
1.1 肌原纤维蛋白及其产品应用趋势	1
1.1.1 肌原纤维蛋白结构与功能特性.....	1
1.1.2 肌原纤维蛋白的产品应用趋势.....	2
1.2 热可逆凝胶研究与应用现状	3
1.2.1 热可逆凝胶机理及类型.....	3
1.2.2 热可逆凝胶应用现状.....	5
1.3 热可逆特性分子基础.....	6
1.3.1 食品蛋白热可逆特性结构基础.....	6
1.3.2 卷曲螺旋结构与热可逆凝胶机制.....	8
1.3.3 肌原纤维蛋白卷曲螺旋结构与热凝胶机理	9
1.4 立题背景和研究意义.....	11
1.5 主要研究内容.....	12
2 材料与方法.....	14
2.1 实验材料.....	14
2.2 实验仪器.....	14
2.3 实验方法.....	15
2.3.1 肌原纤维蛋白的提取及水溶液的制备	15
2.3.2 蛋白质-谷氨酰胺酶法脱酰胺处理	15
2.3.3 肌原纤维蛋白热可逆凝胶的制备.....	15
2.3.4 热可逆凝胶持水性的测定.....	15
2.3.5 热可逆凝胶色差的测定.....	16
2.3.6 热可逆凝胶强度的测定.....	16
2.3.7 热可逆凝胶微观结构测定.....	16
2.3.8 凝胶热可逆特性测定.....	16
2.3.9 脱酰胺肌原纤维蛋白微观行为变化.....	16
2.3.10 脱酰胺肌原纤维蛋白二级结构测定.....	17
2.3.11 脱酰胺肌原纤维蛋白卷曲螺旋结构测定.....	17
2.3.12 变温过程二级结构测定.....	17
2.3.13 变温过程卷曲螺旋结构测定.....	17
2.3.14 流变学特性.....	17
2.3.15 凝胶温度测定.....	18
2.3.16 螺旋结构转变温度测定.....	18
2.3.17 分子间相互作用.....	18

2.3.18 SDS-PAGE 蛋白图谱	18
2.3.19 热凝胶制备及三氟乙醇处理	19
2.3.20 数据处理与分析	19
3 结果与讨论	20
3.1 热可逆凝胶的构建及表征	20
3.1.1 热可逆凝胶的制备条件的确定	20
3.1.2 凝胶持水性	21
3.1.3 凝胶色差	22
3.1.4 凝胶强度及热可逆特性	23
3.1.5 凝胶微观结构	23
3.2 DMP 热可逆凝胶化过程及分子机制探究	25
3.2.1 形貌变化	25
3.2.2 二级结构及卷曲螺旋结构	26
3.2.3 变温过程中 α 螺旋及卷曲螺旋结构变化	27
3.2.4 流变特性	28
3.2.5 分子间相互作用	29
3.3 卷曲螺旋结构与热可逆凝胶关联性验证	31
3.3.1 凝胶化与螺旋结构转变的相关性	31
3.3.2 TFE 对凝胶形成的影响	31
3.3.3 TFE 对凝胶微观结构的影响	34
3.3.4 TFE 对流变特性的影响	34
3.3.5 TFE 对变温过程二级结构的影响	35
3.3.6 TFE 对变温过程卷曲螺旋结构的影响	36
3.3.7 脱酰胺肌原纤维蛋白热可逆凝胶分子机制	37
主要结论与展望	38
参考文献	40

主要缩写符号说明

缩写符号	英文名称	中文名称
MP	myofibrillar protein	肌原纤维蛋白
PG	protein-glutaminase	蛋白质-谷氨酰胺酶
DMP	deamidation myofibrillar protein	脱酰胺肌原纤维蛋白
MLC	myosin light chain	肌球蛋白轻链
MHC	myosin heavy chain	肌球蛋白重链
LMM	light meromyosin	轻酶解肌球蛋白
CC	coiled-coil	卷曲螺旋
CST	critical solution temperature	临界溶解温度
UCST	upper critical solution temperature	上临界溶解温度
LCST	lower critical solution temperature	低临界溶解温度
3D	three-dimensional	三维
EDTA-2Na	ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt	乙二胺四乙酸二钠
Tris	tris (hydroxymethyl) methyl aminomethane	三羟甲基-氨基甲烷
β -ME	β -mercaptoethanol	β -巯基乙醇
APS	ammonium persulfate	过硫酸铵
TEMED	tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
BPB	bromophenol blue	溴酚蓝
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfonate-polypropylene gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯凝胶电泳
TFE	trifluoroethanol	三氟乙醇
WHC	water holding capacity	持水性

1 绪论

1.1 肌原纤维蛋白及其产品应用趋势

1.1.1 肌原纤维蛋白结构与功能特性

来自于骨骼肌的肌肉蛋白是补充人体生长发育所需蛋白质的主要来源之一。根据溶解性的差异，肌肉蛋白大致可分为三类：（1）难溶于水或盐溶液的基质及结缔组织蛋白（Stromal or connective tissue protein）；（2）可溶于水或低盐溶液的肌浆蛋白（Sarcooplasmic protein）；（3）可溶于高浓度盐溶液（ $>0.3 \text{ mol/L}$ ）的肌原纤维蛋白（Myofibrillar proteins, MP），通常又被称为盐溶蛋白^[1,2]。MP 占骨骼肌肌肉蛋白总量的 50~60%^[3]，是其中最主要的蛋白质。图 1-1 展示了 MP 的结构特征，其中主体骨架由肌丝交替平行排列而成。粗肌丝蛋白和细肌丝蛋白共同组成肌肉纤维肌节（Sarcomere），肌节是肌肉结构中最小的收缩单元。粗肌丝主要由肌球蛋白（Myosin）组成，细肌丝的主要组成部分是肌动蛋白（Actin）^[4,5]。

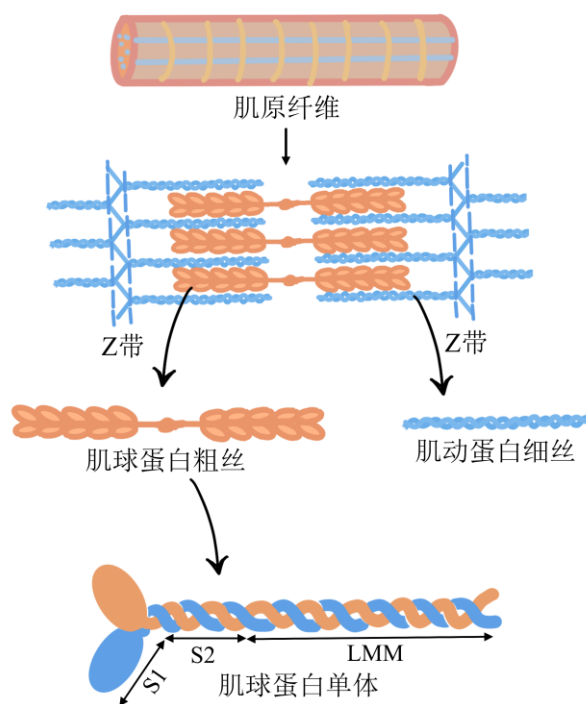


图 1-1 肌原纤维结构

Fig. 1-1 Structure of myofibril

肌球蛋白在 MP 总蛋白中的比例为 45~55%，是 MP 中的主要蛋白组分，对 MP 结构以及功能特性起至关重要的作用。肌球蛋白分子量约 480 kDa，肌球蛋白单体结构如图 1-1 所示，它由两个头部区域以及一个尾部区域共同构成，头部呈现球状，而尾部（长约 160 nm）呈现棒状^[6,7]。在生理条件下，棒状的尾部区域由两条肌球蛋白重链（Myosin heavy chain, MHC，约 200 kDa）通过 α -螺旋相互缠绕而成，然后有序地相互组装为粗肌丝的骨架；两对肌球蛋

白轻链 (Myosin light chain, MLC, 15-27 kDa) 亚基分别与一个 MHC 共同和头部球状区域 (S1) 连接并延伸, S1 区域沿着粗丝骨架凸出^[7-9]。尾部棒状区域蛋白经过消化之后能被水解为轻酶解肌球蛋白 (Light meromyosin, LMM) 片段和亚片段-2 (S2)^[10]。S2 区域含有连接 LMM 和 S1 区域的卷曲螺旋 (Coiled-coil, CC)^[9] 结构。研究表明, 肌球蛋白组装成粗丝是由棒状尾部区域按顺序分布的电荷介导的^[11]。

肌肉蛋白是一种优质蛋白质补充剂^[5], 其氨基酸组成丰富, 其中肌球蛋白头部区域含有约 900 个氨基酸, 尾部区域含有约 1000 个氨基酸^[12], 包含所有必需以及一些非必需氨基酸, 几乎不含致敏成分且消化率高于许多植物蛋白如大豆蛋白^[13]。MP 中可消化的赖氨酸含量高于植物蛋白, 在补充人体生长发育所需的蛋白质方面具有重要意义。掌握肌肉蛋白的功能特性对于开发和利用新型蛋白食品是至关重要的。蛋白质功能特性又称加工特性, 是指决定食品蛋白质在加工、储存和食用过程中行为的物理化学特性^[14,15], 这些物理化学特性通常是指能促进蛋白质与蛋白质分子或环境因素之间的相互作用。对于肉类加工的过程而言, 根据作用原理可以将 MP 的功能特性大致分为三类: (1) 蛋白-水的相互作用; (2) 蛋白-脂肪的相互作用; (3) 蛋白-蛋白的相互作用^[15]。MP 的功能特性及加工利用通常会受各种内部和外部因素的影响, 内部因素包括蛋白质的大小、组成、表面电荷、分子柔性以及疏水性, 外部因素包括 pH 值、溶液的离子强度、温度等。MP 的功能特性会对加工肉制品的最终结构特性产生影响^[16], 同时赋予终产品许多优良的加工特性如纤维膨胀性、起泡性、凝胶性、持水性、溶解性等, 通过合理利用这些特性进一步设计不同类型的产品, 实现消费者的多样化需求^[15], 对未来开发更加健康、外观更佳、感官质量优、营养价值高的新型肌肉蛋白食品具有重要意义。

1.1.2 肌原纤维蛋白的产品应用趋势

随着人民生活水平的不断提高, 对健康饮食的重视程度不断增强, 人们更关注食物中蛋白质含量及其品质。世界上人类蛋白质消费总量的 40% 左右源自动物源性蛋白质, 预计至 2050 年将显著增加^[17,18]。按照联合国粮农组织对未来肉类消费量的预测, 肉类消费总量将在 2000 年至 2050 年间增长 102%。这些数据均表明了肌肉食品在满足人类对于蛋白质的补充需求方面起着至关重要的作用。然而当前市面上售卖的凝胶型肌肉产品具有附加值低等的缺点。此外, 为了避免加工储藏过程中出现氧化酸败、腐败变质等现象, 引发安全问题, 传统的富含肌肉蛋白的肉制品如腌腊肉制品和香肠制品等通常添加大量的食盐, 而过多食盐的摄入对人体健康有害。随着我国人民对于健康生活的理念的不断追求以及社会人口老龄化愈发加剧, 当前的市售肉制品逐渐不符合人们日常健康饮食的理念, 并且无法充分满足老年人、吞咽困难患者等特殊人群对高品质、低致敏性肉蛋白食品的需求。肌肉蛋白虽营养丰富, 但与大豆蛋白、牛奶蛋白等^[5,19]其他一些商业蛋白相比利用度较低, 因此在软食品或饮料中的开发程度也较低。主要原因是: 一方面, MP 在加热过程中容易聚集, 致使稳定性劣变。尽管这种热聚集特性有利于一些凝胶类肉制品的生产, 但是对于一些需经过加热杀菌处理的产品而言, 剧烈的蛋白质聚集或者凝胶行为不可避免的会引起产品在加工以及储藏过程中出现稳定性下降的情况如絮凝、沉淀等现象, 最终导致产品出现分层或者品质劣变的情况。此外, 蛋白质的

过度聚集同时也会使得氨基酸消化率和生物利用率降低。另一方面，在水溶液以及低盐溶液中 MP 的溶解度较低，导致其加工特性差。近年来，国内外关于新型 MP 食品开发的研究正在不断开展。刘婧婧等人^[20]利用酶水解处理羊肌肉纤维蛋白制得了一款肉蛋白饮料，酶处理之后通过乳酸菌对酶水解液进行发酵，产生一系列产物包括少量游离氨基酸、大量的多肽和寡肽以及多种风味物质等，使它具有易于被人体消化吸收的优点。

开发新型 MP 食品关键在于如何通过改变 MP 的结构来创造新的功能特性，这也是当前肉类科学领域所关注的重要问题之一，急需展开相关的基础研究。如果能够使 MP 在水或低离子强度溶液中产生新的功能特性，不仅可以达到减盐的效果，还可以扩大肌肉蛋白的应用范围，为新型肉制品的个性化、健康化的产品设计开发提供新的思路，如果能够实现 MP 向热可逆凝胶的拓展，将有助于进一步促进 MP 的开发利用，丰富其应用场景，对进一步促进肉制品技术革新以及推动肉品工业发展具有重要意义。

1.2 热可逆凝胶研究与应用现状

1.2.1 热可逆凝胶机理及类型

温度敏感型水凝胶能够随温度变化如高于或低于特定温度时发生相变（固体到液体/液体到固体或者聚合物网络的膨胀/收缩），该温度称为临界溶解温度（Critical solution temperature, CST）。根据机理，这些水凝胶可被分为正温敏聚合物和负温敏聚合物。大多数聚合物属于正温敏水凝胶，在水溶液中的凝胶在随着温度升高超过上临界溶解温度（Upper critical solution temperature, UCST）时会发生膨胀。即具有 UCST 的聚合物通常会随着温度的升高而变成溶液，当温度降低到 UCST 以下，聚合物网络会收缩^[21]。负温敏型水凝胶有低临界溶液温度（Lower critical solution temperature, LCST），随着温度升高发生收缩。热可逆凝胶属于正温敏型，是由天然或合成聚合物的溶液形成的凝胶，通过改变温度达到调控体系溶胶-凝胶状态的可逆转变。当温度降低时，聚合物分子自由运动状态发生改变，链与链之间相互缠绕形成网络结构，随后将溶剂束缚于三维网络中，此时，体系从溶胶状态转变为相对稳定的凝胶状态，当再次加热至较高温度时，聚合物大分子发生自由运动，体系从凝胶状态恢复为溶胶状态^[22]。这种凝胶的三维网络结构是通过分子纠缠和/或非共价相互作用（如静电相互作用、范德华力、氢键或疏水相互作用）自组装形成的物理交联网络^[23]。这些相互作用可受物理条件的影响如温度的变化受到破坏，同时这个过程是可逆的^[24]。热可逆凝胶不仅具有热可逆性，还表现出溶解性、高持水性、自修复能力和成膜性等良好性能。因此，热可逆凝胶在食品、热敏材料和药物传输等领域的应用备受关注。

能够构建形成热可逆凝胶的天然大分子主要包括蛋白类和多糖类。其中，胶原蛋白是人们所熟知的能够形成热可逆凝胶的蛋白质^[25-27]，胶原蛋白特有的三股螺旋结构是其热可逆特性的基础^[28]。王彦超等人^[29]以南极磷虾脱脂副产物为原料制备分离蛋白，该蛋白具有良好的营养价值，同时发现在重复加热/冷却循环下，含有磷虾分离蛋白的凝胶在氢键的形成和破坏下表现出热可逆行为。Brenner 等人^[30]发现从鳕鱼肌肉分离的蛋白可以在 pH 值为 9 和 11 时

形成热可逆凝胶，该凝胶在室温或低于室温时都是稳定的。有研究人员曾报道，使用硫酸铵沉淀法分离的豌豆蛋白在 pH 2.4-4.2 和蛋白质浓度 10%~15% 的范围内能够诱导出热可逆凝胶（图 1-2）。在冷却过程中，氢键在凝胶网络结构的形成中发挥主导作用，而疏水相互作用和二硫键没有起到明显作用^[31]。蛋白溶菌酶通过加入还原剂二硫苏糖醇（DTT）可以形成热可逆凝胶，这个过程中 DTT 可以破坏二硫键，使溶菌酶主干更灵活，从而促进蛋白质展开，进一步实现凝胶化^[32]。琼脂在食品和其他工业中已经得到广泛的应用，由琼脂糖和琼脂胶两部分构成，其中琼脂糖是中性线性多糖，溶于水后形成热可逆凝胶^[33]。k-卡拉胶是从红海藻中提取的硫酸盐多糖，它能够形成热可逆凝胶，其凝胶过程通常包括两个步骤：螺旋-螺旋转变和双螺旋聚集^[34]，二者均受到温度、浓度、金属盐的种类和数量以及糖等因素的影响^[35]。瓜尔豆胶在硼酸盐作用下，产生一种多刺激响应的硼酸酯键，形成多刺激响应凝胶^[36]。此外，其他一些聚合物也能够形成热可逆凝胶。

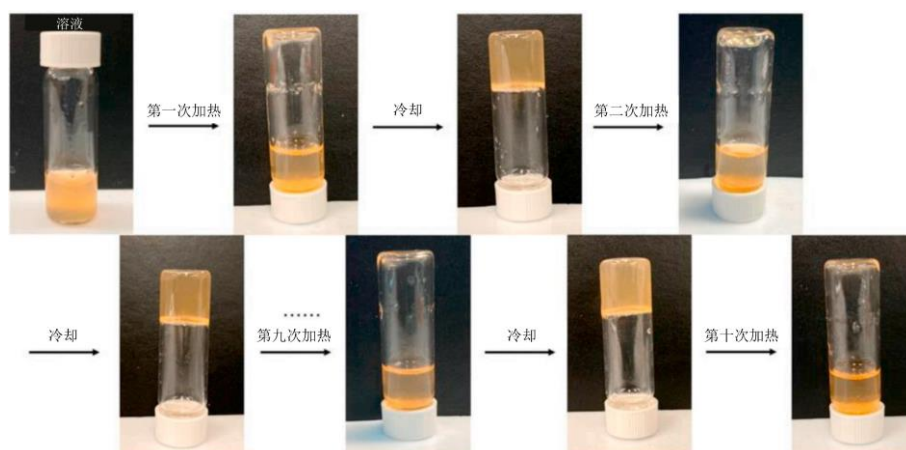


图 1-2 硫酸铵沉淀法分离的豌豆蛋白加热和冷却循环的热可逆凝胶的现象图^[31]

Fig. 1-2 Photographs of thermo-reversible gels of pea proteins separated by ammonium sulfate precipitation with heating and cooling cycles^[31]

在生物医学材料领域，人们通常采用自下向上的方法设计具有热可逆凝胶特性的合成蛋白分子。研究表明，基于 α 螺旋的 CC 结构^[37]、 β 折叠链^[38]、 β 发夹^[39]等是有效的凝胶设计分子构件。Sreenath 等人^[38]研究了 β -乳球蛋白淀粉样纤维在不同蛋白浓度和离子强度下的溶胶-凝胶转变，为使用淀粉样蛋白原纤维作为生物材料的构建材料提供了基础。天然蛋白质的结构亚基通常包括折叠的蛋白质结构域或结构上定义的寡聚体组件，它们通过结构上互补的界面之间的识别进行自我关联，这个响应环境变化的过程通常是可逆、可控的^[40]。一些由 CC 状蛋白质组成的水凝胶也表现出了可调的凝胶化行为，这是因为 CC 状蛋白质通过物理交联形成低聚物^[37]。温度响应性可以通过操纵 CC 结构域的氨基酸序列来实现。研究表明，在线圈结构域中替换氨基酸可对含有蛋白质线圈的热稳定性进行可预测的控制^[41]。Lindsay 等人^[24]设计了由单一卷曲螺旋结构组成的蛋白，它具有自组装成基于纤维网络的水凝胶的能力，物理交联的凝胶具有一个相互连接的纳米纤维组成的多孔网络，在其 UCST 以下具有可逆的热响应性。这项工作表明，CC 蛋白可以独立组装成具有相行为可调控的功能性物理交联水凝胶。

表 1-1 形成热可逆凝胶的生物大分子

Tab. 1-1 Biomacromolecules that form thermo-reversible gels

类型	名称	主要原理	应用	缺点
蛋白类	明胶 ^[26] 、胶原蛋白	升温时，三螺旋结构被破坏，形成随机线圈，降温时，螺旋结构重新恢复。结合的水与三螺旋结构形成氢键 ^[42]	在生理温度（37℃）下实现 3D 打印，并在生物医学应用	粘度不足，需添加其他粘度改性剂来实现打印
蛋白类	豌豆分离蛋白 ^[31]	凝胶是通过氢键进行物理交联的，氢键在高温下会被破坏，在冷却过程中会重新形成	取代明胶在饮料、酸碱度较低的发酵食品等食品的应用	豌豆分离蛋白的提取方法有限制
多糖类	果胶、壳聚糖 ^[43]	氢键控制其凝胶化过程，静电相互作用起到部分作用	凝胶层可提供保护屏障，维持药物在胃中的输送和释放	酸性 pH 才能实现且限制混合比例
多糖类	结冷胶 ^[44] 、琼脂糖 ^[33]	双螺旋聚合体形成，并连接形成微结晶带	在食品工业、医药配方、组织工程或作为软物质有机装	凝胶相的凝固和融化之间有明显的滞后
其他共聚物	三嵌段共聚物 ^[46,47]	通过氢键和金属-配体相互作用构成热可逆离子凝胶	凝胶储能模量可由温度调节。用作高温离子膜或热响应软制动器等	通常需要相对较高的聚合物浓度
合成蛋白	卷曲螺旋蛋白 Q ^[24,37,48]	通过缠绕在一起的卷曲纳米纤维之间的物理交联驱动	多孔凝胶结构能够封装小分子	负载小分子后持续释放过程中出现反复溶胶-凝胶转变
合成蛋白	小肽 MAX3 ^[39]	当温度升高时，肽 MAX3 由展开的状态到单分子折叠，产生两亲性 β 发夹，由低粘度水溶液自组装成水凝胶网络	用于构建可预测的响应材料，通过改变环境因素控制材料性能	限制加热温度及浓度，易形成不溶性、纤维状的沉淀物

1.2.2 热可逆凝胶应用现状

在食品工业中，明胶^[25]、结冷胶^[44]、卡拉胶^[34,35]、可得然胶^[49]等制成的热可逆凝胶凭借其极佳的“入口即化”的特点在果冻、甜点、酸奶和饮料等食品生产中发挥了重要作用。对凝胶的组成结构进行微调，可以改善所需的感官特征，这就意味着当产品需要减少脂肪的添加时，可以通过特定的凝胶设计来保持感官特征^[50]。另一方面，使用易融或易碎的凝胶可以

增强口感，从而减少所需的味觉增强剂的量，如盐和糖^[51]。热可逆凝胶的口腔融化特性，可以增加表面的润滑性，以模仿脂肪感觉^[50]。磷虾分离蛋白在反复加热/冷却循环下表现出热可逆性，优良的胶凝特性以及其丰富的营养，使其可以作为食品原料或营养补充剂应用于食品生产^[29]。热可逆豌豆蛋白凝胶具有透明以及良好机械性能的特点，有望在水果、饮料和发酵食品等弱酸性 pH 环境的食品开发场景中替代明胶^[31]。热可逆凝胶可以避免某些生物活性物质和药物引起的不良味道，因为凝胶的形成抑制或减缓了分子的运输^[51,52]。Lindsay 等人^[24]设计了由单个卷曲螺旋蛋白结构域组成的热可逆水凝胶，水凝胶通过蛋白质纳米纤维之间的分子缠结来稳定，形成能够结合疏水小分子姜黄素的多孔基质，它可以用作持续释放的载体，通过凝胶-溶胶转变行为，控制药物在生理温度下持续释放。在三维（Three-dimensional, 3D）打印中，热可逆水凝胶在其凝胶温度以上挤压，随后进行逐层沉积，然后在凝胶温度以下冷却，打印出目标的形状。打印的理想温度和打印速度不仅取决于热可逆水凝胶基质的性质，还取决于活性成分（营养物质、香料、细胞等）的影响^[53]。热可逆凝胶的 3D 打印在打印时可以利用温度诱导的溶胶-凝胶转变来诱导凝固，无需采用化学交联剂和紫外线照射等苛刻条件。

在其他领域的应用包括组织工程、生物材料植入和药物输送等。温度敏感的水凝胶可以通过感知周围环境温度的变化来改变它们的溶胀行为，从而进行药物释放。泊洛沙姆（Poloxamers）水凝胶具有良好的皮肤耐受性，可以用于治疗热烧伤和伤口愈合^[54]。各种类型的药物，如激素、抗糖尿病药物、抗癌药物以及蛋白质和多肽，已经通过使用这种系统进行了增强输送的研究^[21,55]。该凝胶具有良好的性能，在应用前为液体状态，在与眼睛表面接触时发生凝胶化。更值得一提的是，眼科制剂的最终产品通常需要进行消毒杀菌，而泊洛沙姆可以承受高压灭菌的过程，产品的粘度不发生改变，有利于其在眼科制剂中的应用。此外，泊洛沙姆水凝胶对眼粘膜有良好的耐受性，能最大限度地减少粘膜刺激和过敏反应。有研究人员设计的具有热可逆凝胶能力的卷曲螺旋多肽 AFD 19、AFD 36，在生理 pH 值和生理盐条件下可以支持小鼠成纤维细胞的生长，这些肽凝胶具有分子简单、可生物降解等优势，可以作为复杂聚合物的替代品^[56]。

1.3 热可逆特性分子基础

1.3.1 食品蛋白热可逆特性结构基础

蛋白质是由氨基酸序列定义的聚合物，是天然存在的结构构件。氨基酸侧链之间的相互作用是通过氢键、静电相互作用、 π - π 相互作用、金属离子复合物、盐桥以及共价二硫键来最终实现对结构灵活性、复杂性以及功能特性的控制^[57]。天然蛋白制成的凝胶凭借它们的组成部分具有可再生、生物兼容、可生物降解以及可食用等性质展现了巨大的潜力，再加上它们所具有的各种功能和物理凝胶特性以及这些体系特有的结构和加工机制，这些凝胶的性能越来越接近合成聚合物凝胶，甚至在某些情况下优于合成聚合物凝胶^[58,59]。蛋白质聚合物构成的凝胶在现代食品设计中也发挥着关键作用，例如在构建具有特定感官结构的食品^[60]、使食品结构保持相对稳定和延长货架期^[61,62]、代替脂肪^[63]、通过减少食物摄入量^[64]来增加饱腹感

以及通过 3D 打印设计复杂形状的食品^[65]等等。因此，对于研究或设计食品蛋白热可逆凝胶而言，了解影响其热可逆特性的结构特征具有重要意义。

明胶的热可逆现象广为人知。明胶主要是从动物结缔组织（胶原蛋白）中提取的，存在于牛、猪、鱼、家禽等不同动物物种的皮肤或骨骼中^[66,67]，是一种基于非免疫原性蛋白的可生物降解的亲水胶体。明胶在热水中溶解，在冷却时自发形成凝胶。一般在温度小于 30℃时发生溶胶-凝胶转变，这种可逆凝胶化与明胶聚合链从无规卷曲到胶原蛋白三股卷曲螺旋部分恢复的转变过程有关^[68]。按照 $(\text{Gly-X-Y})_n$ 周期性排列的氨基酸序列是胶原蛋白螺旋区域的最显著特征，胶原蛋白三股卷曲螺旋形成的关键点是每隔三个位置出现一个甘氨酸（Gly）；脯氨酸（Pro）以及羟脯氨酸（Hyp）作为胶原蛋白中的特有氨基酸，分别占据 X、Y 位置。高分子链上的甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸（Gly-Pro-Hyp）重复序列形成一个三股卷曲螺旋结构（图 1-3）。胶原蛋白三股螺旋结构的特征是所有氢键只在不同的多肽链之间形成，存在不同类型的链间氢键，这些氢键对胶原蛋白结构的稳定做出了重要贡献^[69]，其热可逆的物理凝胶网络通常也是由氢键连接在一起。

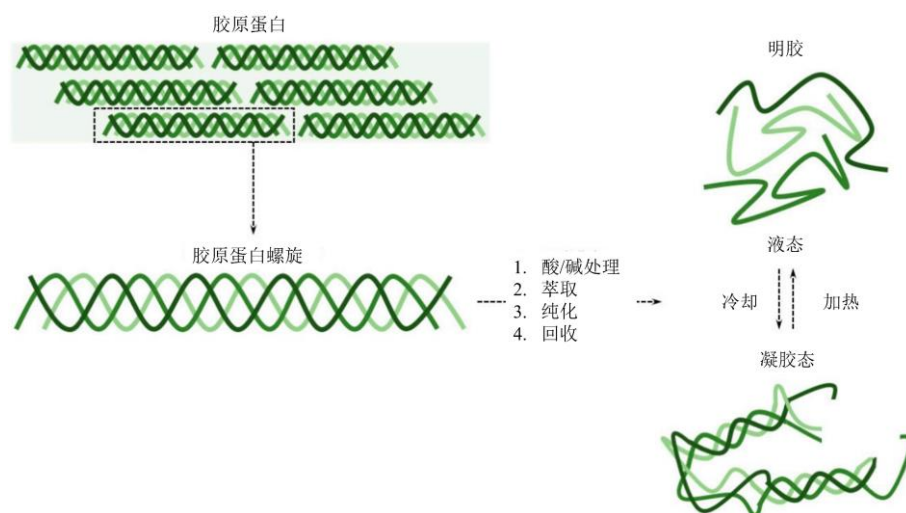


图 1-3 胶原蛋白三股螺旋结构及明胶溶于水通过热-冷过程发生可逆的溶胶-凝胶转变示意图^[68]

Fig. 1-3 Schematic diagram of the triple helical structure of collagen and the reversible sol-gel transition of gelatin in water through a heat-cold process^[68]

豌豆分离蛋白热可逆凝胶研究发现，在加热冷却的凝胶形成过程中，蛋白质在氢键的诱导下聚集形成分子间 β 折叠^[31]。 β 折叠也被发现在热可逆凝胶的纤维形成和随后的凝胶形成中起着重要的作用。牛血清白蛋白在体外可控诱导发生构象变化所形成的淀粉样纤维蛋白具有高度有序的交叉 β 折叠纳米结构，它的稳定性归因于各种分子内和分子间的非共价相互作用，如侧链和主链之间的氢键，分子间的疏水和芳香基团的 π - π 堆积作用。交叉 β 折叠结构可以进一步自组装成稳定的水凝胶^[70]。Khanna 等人^[71]将高浓度的牛血清蛋白溶液在 65℃下的不完全热变性，使得其中小部分分子的二级结构发生变化，这些变化足以通过非共价相互作用引起纳米 β -淀粉样纤维结合成微米大小的纤维束，最终交联成的三维水凝胶网络。如图 1-4 所示，凝胶化通过淀粉样蛋白形成，随后 β -淀粉样纤维可逆地自组装成纤维束，进而通过非共价相互作用形成更高阶的三维网络。Catalini 等人^[72]研究了高浓度溶菌酶水溶液在 pH 1.8

时受热发生解折叠和聚集形成淀粉样聚集体，其特征是具有反向平行交叉 β -折叠链。淀粉样低聚物通过相当弱的相互作用（如短程范德华引力和疏水相互作用）发生缠结，进而建立起渗透凝胶网络。这些聚集体之间的非特异性相互作用受温度变化能够发生破坏或重组，因此该水凝胶是热可逆的。

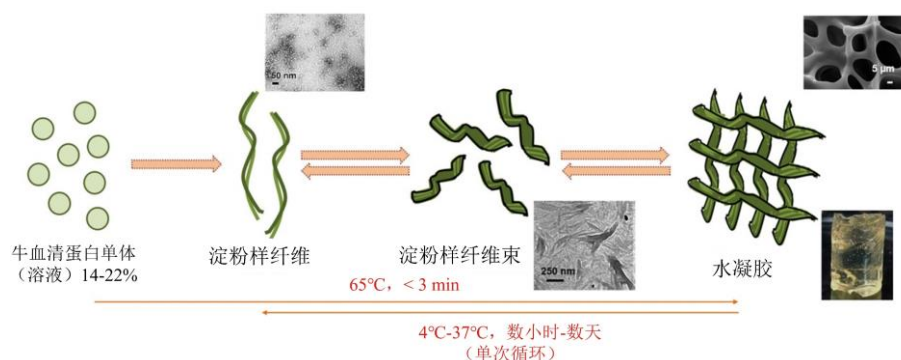


图 1-4 天然 BSA 蛋白在 65°C 下 3 min 快速热凝胶化的可能机制^[71]

Fig. 1-4 Proposed mechanism for rapid thermal gelation of native BSA protein at 65°C under 3 min^[71]

1.3.2 卷曲螺旋结构与热可逆凝胶机制

卷曲螺旋 (Coiled-coil, CC) 是一类由 2 股或 2 股以上右手 α 螺旋相互缠绕形成的平行或反平行的超螺旋结构总称^[73]。CC 是天然蛋白质的基本折叠模式之一，是一种很有吸引力的蛋白质基聚合物模块，由两个或多个 α -螺旋缠绕在一起形成一个超螺旋结构^[74]。如图 1-5，CC 的一级结构具有重复的七肽序列 (abcdefg)_n，其中 a 和 d 位置通常是非极性疏水氨基酸残基，如亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸等，而 e 和 g 位置通常是极性带电氨基酸残基，如赖氨酸、谷氨酸等。a 和 d 残基之间的疏水相互作用以及 e 和 g 残基之间的静电相互作用对于 CC 结构的稳定性具有重要意义^[41]。

影响 CC 结构稳定性的因素主要包括同一条多肽链内的氨基酸残基之间的相互作用、不同螺旋链间氨基酸残基之间的各种作用力（静电相互作用、疏水相互作用、氢键、范德华力等）以及蛋白分子周围的环境因素等。其中，不同螺旋链间的各种作用力对 CC 结构的影响较为关键^[75]。整个 CC 通过螺旋链的缠绕形成了两个性质不一的区域，分别是 CC 内部螺旋链交界面所在的相对疏水的核心区域和 CC 外部暴露在环境中的亲水表面。不同螺旋链的 a 和 d 位置的氨基酸残基构成了疏水核心区域，这些氨基酸残基的侧链疏水基团的疏水相互作用对促进 CC 正确组装以及维持其结构稳定性具有重要价值。天然蛋白质中的 CC 的 a 和 d 位置的氨基酸残基约有 80% 均为疏水性氨基酸残基，如轻酶解肌球蛋白^[76]。CC 中 e 和 g 位置多被极性带电氨基酸残基占据，这些侧链氨基酸残基之间产生的静电相互作用对 CC 稳定性和特异性的维持都有重要意义^[77]。蛋白质中的静电相互作用对 CC 稳定性的影响还受到微环境因素的影响。在无水的微环境中，可以促进螺旋链间形成盐桥，盐桥的形成又会降低极性溶剂环境与疏水核心之间的接触，从而促进 CC 结构的稳定^[78]。这些物理相互作用对其结构稳定性的影响，使得 CC 可以实现可逆的解旋及组装过程。

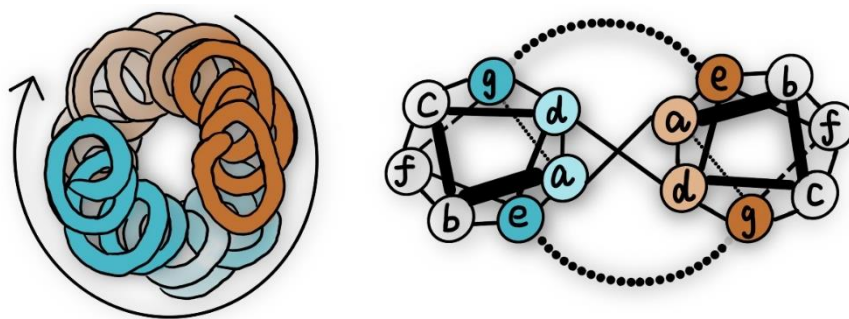


图 1-5 卷曲螺旋结构

Fig. 1-5 The structure of coiled-coil

CC 的自我组装、自我修复、生物相容性以及对其 pH、离子强度及温度变化产生响应等特性使其成为开发智能水凝胶方面颇具潜力的构件^[79]。CC 发生物理交联，通过螺旋链间可逆的分子间相互作用形成，并产生低聚物，这使得含 CC 蛋白形成的纤维水凝胶表现出可控的凝胶化过程^[80]。其中物理交联主要通过分子缠结或非共价相互作用介导，包括氢键、范德华力、静电或疏水相互作用等^[81]。绝大多数文献报道的含 CC 结构的水凝胶是基于 CC 纤维网络的形成。Hill 等人^[24]构建了一种五聚体 CC，这种结构能够在 4°C 时形成纤维凝胶网络结构，而在 37°C 时会发生溶解；同时该水凝胶能够结合小分子姜黄素并实现逐渐释放，表明了其作为药物释放系统的潜力。Dexter 等人^[56]的研究表明，AFD 36 螺旋肽形成的热可逆凝胶，CC 结构在疏水相互作用的驱动下自组装成纤维，使其具有极高的热力学稳定性。

1.3.3 肌原纤维蛋白卷曲螺旋结构与热凝胶机理

肌原纤维结构主要由肌球蛋白粗丝组成（图 1-1），整个超分子结构长约 1.6 μm ，主干直径约 13-18 nm，由 250-300 个肌球蛋白分子的棒状区域通过尾部-尾部结合组装而成^[76,82-84]。肌球蛋白的棒状区域占据肌球蛋白整体结构的三分之二，是一个由两个 α 螺旋链平行缠绕形成的双链卷曲螺旋结构。肌球蛋白棒状区域的一个线圈上的 a 残基与相邻线圈上的 a' 之间存在有利的强烈疏水相互作用、d 残基与 d' 残基之间的疏水以及静电相互作用共同促进了卷曲螺旋结构的形成（图 1-6）。图 1-6A 是一个棒状区域螺旋结构横向截面模拟示意图，展示了螺旋中残基与 CC 七肽重复序列中残基的相互位置关系。a 和 d 位置参与疏水相互作用，以稳定 CC 结构，使其余残基暴露在溶剂中，并可与其他肌球蛋白棒状结构域或肌纤维蛋白产生分子内相互作用^[73]。此外，研究发现在肌球蛋白棒状区域中，带有相反电荷的残基常常占据着相邻七肽中的 e 以及 g 位置，与螺旋间离子对的形成一致，对于螺旋结构的保持起到重要作用。

LMM 中每 28 个残基重复显示出一种特征的正弦模式，即每 7 个氨基酸的 b 和 c 位置交替出现带正负电荷的残基。在每个重复序列中的第一个七肽的 b 和 c 位置主要是由赖氨酸或精氨酸残基占据，而第三个七肽的 b 和 c 位置主要由天冬氨酸或谷氨酸残基占据。因此，重复序列被排列成正负电荷交替带，使得整个尾部棒状区域的外表面形成交替的正负电荷区^[76]。Nakasawa 等人^[6,11]研究表明，肌球蛋白粗丝的装配过程在一定程度上受到 MHC 的羧基末端正负电荷交替的区域产生的静电相互吸引作用驱动。即在低离子强度下，单体肌球蛋白棒状

尾部的正负电荷交替区域通过静电相互吸引有规律的组装形成高度有序的肌纤维结构^[85]。

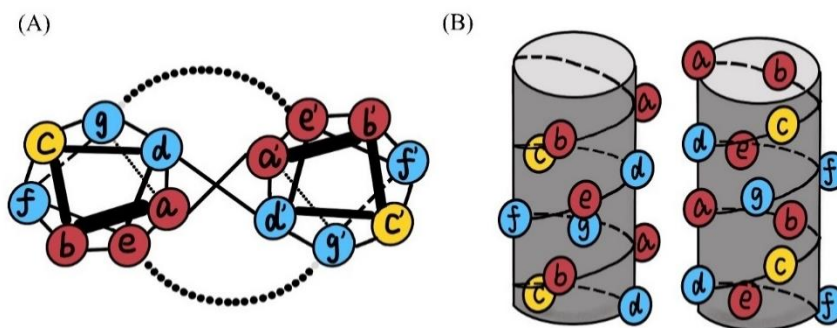


图 1-6 肌球蛋白棒状区域螺旋结构模拟示意图：(A) 横向截面；(B) 纵向卷曲螺旋

Fig. 1-6 Schematic diagram of the simulated helical structure of the myosin rod region: (A) transversal section; (B) vertical coil-coil

MP 在天然状态下受热易发生热聚集或热凝胶化，当前，关于肌原纤维蛋白的冷凝胶报道极少，一项关于阿拉斯加鳕鱼鱼糜凝胶的研究中曾报道过一种在 4℃ 时形成的半凝胶体系^[86]。当 MP 受热达到临界温度时，会发生变性并导致蛋白质展开和构象改变，反应基团暴露，通过进一步的聚集和交联作用形成肌原纤维蛋白热致凝胶。肌球蛋白受热发生聚集凝胶化过程主要分为两个阶段（图 1-7），第一阶段初步加热时，肌球蛋白的球状头部率先发生聚集，此时，肌球蛋白分子的外观未发生变化，持续加热，头部的交联会产生一些新的分子结构如二聚体。随着进一步加热，肌球蛋白尾部螺旋结构开始展开其中疏水基团发生交联，继而形成三维网络基质，最终形成 MP 热诱导凝胶。MP 聚集或凝胶的驱动力主要来自蛋白间的作用力如共价键（二硫键）和非共价键（疏水相互作用、静电相互作用、氢键）等^[87]。肌球蛋白分子的存在形式（单体结构或多聚丝状体）受到离子强度和 pH 的影响。在低离子强度时，肌球蛋白分子组装成多聚丝状体，类似粗丝。随着多聚丝状体的长度增加，其形成的凝胶网络结构将变得更加坚固，气孔更小并且分布更加均匀^[88]。MP 具备较强的热聚集能力，易于形成热不可逆凝胶，这一特性是众多凝胶类肉制品的形成基础，如果能够实现 MP 向热可逆凝胶的拓展，将有助于进一步促进 MP 的开发利用，丰富其应用场景。

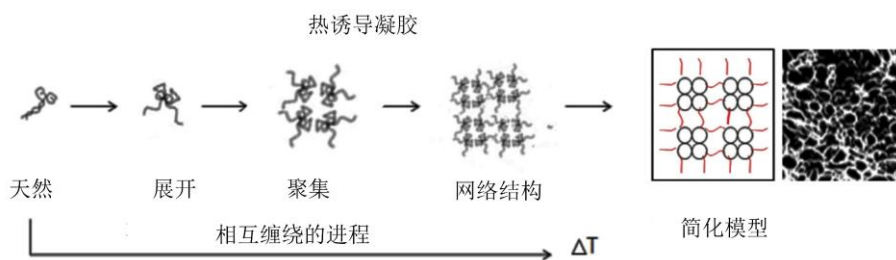


图 1-7 热诱导 MP 聚集凝胶化过程^[86]

Fig.1-7 Mechanism of heat-induced MP aggregation and gelation^[86]

近三十年来，食品蛋白质改性的方法层出不穷，其中脱酰胺技术受到广泛青睐。蛋白质原有功能特性可以通过脱酰胺技术修饰，通过脱酰胺技术也可以使蛋白质产生新的功能特性。此技术具有操作简便、成本低以及强特异性等优点。酶法脱酰胺处理蛋白质更具有反应速度迅速、特

异性强、反应条件温和、安全性良好等优点，其主要原理如图 1-8A 所示。在大量关于蛋白质脱酰胺的研究中蛋白质-谷氨酰胺酶（Protein-glutaminase, PG）被广泛的应用，例如小麦面筋蛋白^[89]、大豆蛋白^[90]、燕麦蛋白^[91]、椰子蛋白^[92]、 α -/ β -酪蛋白^[93,94]等。PG 相比于谷氨酰胺酶和谷氨酰胺转氨酶（TG），其优点是几乎不引起蛋白水解和交联^[95]。PG 自身及其有关生产物已有相关研究证明口服是安全的^[96]。2020 年，在关于“三新食品”的公告中，国家卫健委将 PG 作为新增的食品添加剂，并允许 PG 作为食品工业用酶制剂使用，按照食品安全国家标准（GB 1886.174）进行检测。MP 含有大量谷氨酰胺残基，肌球蛋白分子中存在约 246 个谷氨酰胺残基，其中 70% 以上的谷氨酰胺残基处于肌球蛋白表面 CC 尾部的表面，暴露于溶液环境，研究发现 MP 是 PG 反应的理想底物^[97]。结构方面，MP 通常呈现天然柔性长链状，且含有丰富的侧链功能基团，可作为一种优异生物组件，应用于功能性食品胶体材料的构建。在一项应用 PG 改善 MP 水溶性的研究中，发现 PG 脱酰胺作用能够抑制肌球蛋白粗丝的装配行为^[97]。主要原因有两点：一是原本不带电荷的谷氨酰胺残基通过 PG 作用变成带有负电荷的谷氨酸残基（图 1-8B），肌球蛋白携带的负电荷因此增多，与此同时更多能够与水结合的位点暴露出来，促使蛋白质与水之间的相互作用加强^[98,99]；二是肌球蛋白尾部的粗丝是由正负电荷交替区域借助静电相互作用组装而成的^[100]，当脱酰胺作用使尾部带电区域的电荷分布改变时，粗丝的组装也因此受到影响。由此推断，MP 的极性及其电荷分布通过 PG 脱酰胺作用发生变化，此时肌球蛋白尾部区域的静电相互作用受到影响，最终使得蛋白质分子之间的斥力增大，或许可以阻碍肌球蛋白尾部 CC 或二聚体在加热时发生进一步交联。基于以上基础理论，采用 PG 对 MP 进行靶向脱酰胺作用，有望改善 MP 的凝胶特性，实现 MP 的热可逆凝胶化，探究 MP 热可逆凝胶的相关特征，并通过进一步解析热可逆凝胶的形成机制，以期更多关于肌肉蛋白的研究奠定理论基础。

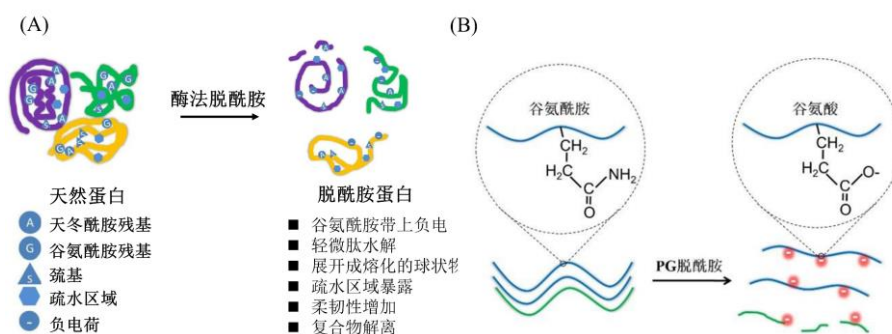


图 1-8 (A) 酶法脱酰胺诱导的食品蛋白质的结构转化^[101]; (B) PG 脱酰胺机理^[102]

Fig. 1-8 (A) Structural transformation of food proteins induced by enzymatic deamidation^[101]; (B) The mechanism of PG deamidation^[102]

1.4 立题背景和研究意义

肉品加工行业是最大的食品加工产业，对我国经济、文化和社会发展做出了重要贡献。随着生活水平不断提升，人们越发关注饮食中高脂肪、高胆固醇、高盐分等成分摄入所带来的营养健康方面的问题；此外，越来越多的人对于肉制品的需求不仅仅停留在可食用这一点，

更追求优越的口感、丰富的营养乃至多样化的产品形式。传统富含肌肉蛋白的肉制品中食盐添加量多，对热加工依赖性强，营养与健康属性弱，市售凝胶型肉蛋白食品附加值较低、产品形式单一，无法完全满足老年人或者吞咽困难患者等特殊人群对优质低过敏性肉蛋白补充的需要，产业发展缓慢，缺乏有效创新推动。目前，MP 结构设计及其功能拓展是肉品加工领域的科学前沿。未来的研究应当着眼于人们当前的营养健康现状及需求等方面，不断拓展 MP 在低离子溶液强度下的新型功能性质如新型凝胶性质等。MP 具有高分子量、高柔韧性、多支化、多电荷、极性等多种分子特性，可以制备流变特性各异的多种胶体体系，因此在开发质构改性食品方面的潜力较大，如老年人专用的流质食品和特殊病患恢复期食用的高蛋白低钠的特医食品。

当前，由于 MP 在低离子强度溶液中的低溶解性和热不稳定性，多数针对 MP 的研究都围绕高食盐添加量凝胶型肉制品的研发，关于 MP 的热可逆凝胶的研究鲜有报道。另外，在食品蛋白质改性中，蛋白质酶法技术已经成功应用于对原有功能特性进行修饰或产生新性能等方面。前期实验研究表明，通过 PG 脱酰胺处理时，肌原纤维可以释放出小的丝状碎片，表观粘度增加。MP 水溶性改善的同时，在低温时出现成胶现象，受热后又恢复至溶液状态。据此推测，脱酰胺作用通过电荷修饰使肌球蛋白粗丝组装受到抑制，能改变 MP 的凝胶机制并形成热可逆凝胶。然而，目前尚不明确 MP 经 PG 酶法脱酰胺处理的热可逆凝胶的分子机制。综上，当前展开关于热可逆凝胶分子机制的基础研究是亟需进行的任务。MP 通过酶法脱酰胺技术实现热可逆凝胶化，并研究揭示其内在分子机制能够在技术及理论层面为 MP 低离子强度下的新型功能性质的拓展提供支持和指导，进一步为设计新型肌肉蛋白产品提供应用依据。

1.5 主要研究内容

本课题从凝胶的热可逆现象出发，以鸡胸肉肌原纤维蛋白为研究对象，通过 PG 对 MP 靶向脱酰胺，实现 MP 的热可逆凝胶化，考察蛋白浓度、PG 酶反应时间等因素对 MP 凝胶热可逆特性的影响，并总结其影响规律，优化处理条件；探究 MP 热可逆凝胶的相关特征，进一步解析肌原纤维蛋白热可逆凝胶的形成机制，探索肌原纤维蛋白的新型实用凝胶特点，为拓宽其在食品工业领域的应用打下基础。本课题的主要研究内容如下：

(1) 构建并表征肌原纤维蛋白热可逆凝胶。明确 MP 热可逆凝胶构建条件，总结蛋白浓度、PG 酶反应时间等因素对 MP 凝胶热可逆特性的影响规律。表征所制备的热可逆凝胶的持水性，采用色差计、流变仪、扫描电子显微镜表征热可逆凝胶的色差、凝胶强度和微观结构。

(2) 探究肌原纤维蛋白热可逆凝胶形成的分子机制。采用原子力显微镜、透射电子显微镜观察 MP 和 DMP 微观形貌的变化；通过监测其变温过程的流变特性，分析其热可逆凝胶化过程。采用圆二色谱表征 MP 和 DMP 的二级结构以及卷曲螺旋结构的变化。通过 SDS-PAGE 蛋白图谱分析肌球蛋白重链的变化、变性剂处理等，探究热可逆凝胶的分子间相互作用。通过分析热可逆凝胶化过程、卷曲螺旋结构变化以及分子间相互作用，探究脱酰胺肌原纤维蛋白热可逆凝胶形成的分子机制。

(3) 进一步验证卷曲螺旋结构与热可逆性的关联。通过计算凝胶转变温度以及螺旋结构

转变温度的相关性，证明卷曲螺旋结构对实现热可逆凝胶化具有重要意义。通过添加超分子结构破坏剂三氟乙醇破坏卷曲螺旋结构，采用流变仪、圆二色谱、扫描电子显微镜表征凝胶的强度变化、结构变化以及微观结构变化，反向验证卷曲螺旋是促进热可逆凝胶化的关键。

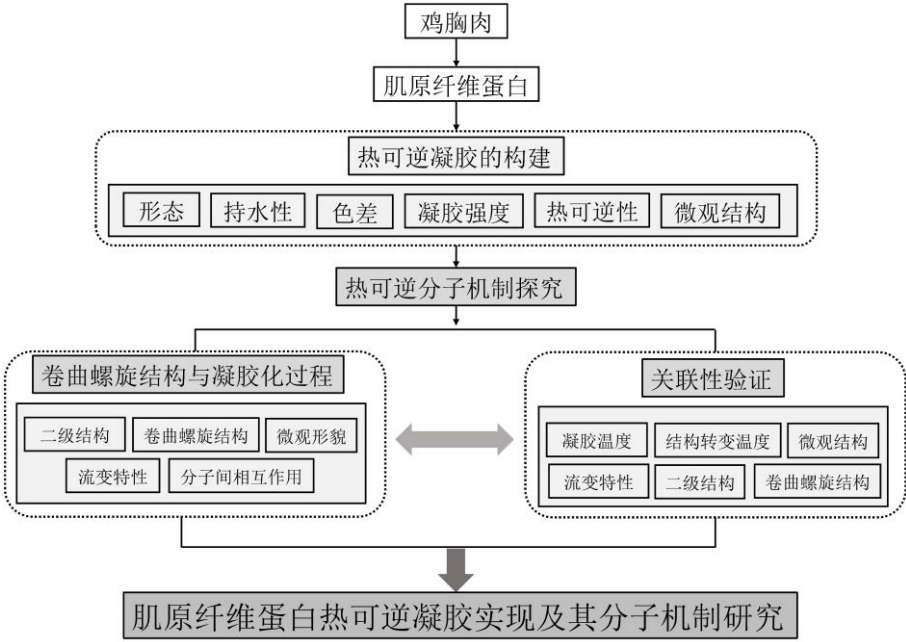


图 1-9 技术路线图

Fig. 1-9 Technology roadmap

2 材料与方法

2.1 实验材料

由平均日龄为 42 天，体重为 2.5~3 kg 的鸡提供鸡胸肉（鸡大胸）。鸡胸肉于鸡屠宰后 36~48 h 之内购于无锡华润万家生活超市，由江苏泰森食品有限公司生产。鸡胸肉预处理除去部分明显筋膜后，将鸡胸肉真空包装并储存在-20℃的冰箱内，于 7 天内使用完毕。为确保所有原始肉样之间的差异最小化，在使用时选取具有相似的滴水损失(<2%)的鸡胸肉。

蛋白质-谷氨酰胺酶（PG），由天野酶制剂（江苏）有限公司上海分公司捐赠且酶活力为 500 U/g。氯化钠（NaCl, AR）、三羟甲基-氨基甲烷（Tris, AR）、盐酸（HCl, GR）、乙二胺四乙酸二钠盐（EDTA-2Na, AR）、硫酸铜（AR）、氢氧化钠（NaOH, AR）、酒石酸钾钠（AR）、尿素（CO(NH₂)₂, AR）、磷钨酸（AR）、考马斯亮蓝 G250、冰乙酸（AR）和 25%戊二醛溶液（AR）购于国药集团化学试剂有限公司。十二烷基硫酸钠（SDS）、β-巯基乙醇（β-ME）、甘油、过硫酸铵（APS）、溴酚蓝（BPB）、四甲基乙二胺（TEMED）和三氟乙醇（TFE）均购于西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司且纯度均为分析级。硅油、甘氨酸（AR）和丙烯酰胺溶液（30%，丙烯酰胺：甲叉双丙烯酰胺=29:1）购自上海麦克林生化科技有限公司。Troiton X-100 购于生工生物工程（上海）股份有限公司。实验中所有用水为 Milli-Q 超纯水。

2.2 实验仪器

Milli-Q Reference 超纯水系统：德国默克密理博公司；AL204 分析天平和 EF20 型 pH 计：梅特勒-托利多仪器上海有限公司；移液枪、5424R 小型台式高速冷冻离心机和 5804R 台式高速冷冻离心机：德国艾本德公司；C-MAG MS 7 S25、IKA T25 高速剪切乳化机和 RO10 S025 磁力搅拌器：德国 IKA 公司；OS20-Pro LCD 数控顶置式电子搅拌器：大龙兴创实验仪器(北京)股份公司；RCZ-8 型溶出度仪：上海黄海药检仪器有限公司；MP-501A 超级恒温循环槽：上海一恒科学仪器有限公司；MX-S 混匀仪：美国赛洛捷公司；Synergy H1 酶标仪：美国伯腾仪器有限公司；HS-800D 数显恒温水浴锅：中国华利达实验设备有限公司；Konica Minolta CR-400 色差仪：柯盛行（杭州）仪器有限公司；DHR-3 流变仪：美国沃特世公司；Chirascan V100 圆二色光谱仪：英国应用光物理公司；Dimension FastScan 原子力显微镜：德国布鲁克股份有限公司；Mini Protean Tetra 垂直电泳仪和 ChemiDoc MP imaging system 化学发光凝胶成像分析系统：美国伯乐公司；JEM-2100F 透射电子显微镜：日本电子株式会社（JEOL）；BTP9L EL-85 冷冻干燥机：美国 SP Scientific 公司；Quanta 450FEG 扫描电子显微镜：美国 FEI 公司。

2.3 实验方法

2.3.1 肌原纤维蛋白的提取及水溶液的制备

鸡胸肉肌原纤维蛋白的提取按照 Li 等人^[103]的方法并稍作修改。使用绞肉机将鸡胸肉充分绞碎，取约 50 g 肉糜，加入十倍体积的缓冲液 A，组织破碎、匀浆 3 min，将匀浆液使用冷冻离心机离心后收集沉淀。向收集的沉淀中添加五倍体积的缓冲液 B，加入 Triton X-100 使其终浓度为 0.5%，使用高速剪切乳化机剪切使之分散均匀，然后离心，再收集沉淀。向收集的沉淀中再加入五倍体积的缓冲液 B，剪切使之分散均匀，四层纱布过滤，收集滤液离心后取沉淀。最后，向收集的沉淀中加入十倍体积的缓冲液 C，剪切使之分散均匀，然后离心，收集膏状沉淀即为肌原纤维蛋白。上述离心条件均为：离心力 10000 g，温度 4℃，时间 10 min；上述剪切条件均为：速率 8000 r/min，时间 1 min；控制提取全程的样品温度在 4℃左右。

注：3 种缓冲液配方如下^[104]：

缓冲液 A：25 mmol/L NaCl+5 mmol/L EDTA-2Na+5 mmol/L Tris，pH 7.5；

缓冲液 B：0.1 mol/L NaCl+5 mmol/L EDTA-2Na+5 mmol/L Tris，pH 7.5；

缓冲液 C：2.5 mmol/L NaCl+5 mmol/L Tris，pH 7.5。

将得到的膏状蛋白溶解于超纯水中，1000 r/min 的条件下搅拌 2 min。最终获得的肌原纤维蛋白悬浮液称为肌原纤维蛋白（MP）。MP 悬浮液置于 4℃冰箱，并于 3 天内使用完毕。采用双缩脲法以牛血清白蛋白作为标准蛋白测定悬浮液中的蛋白浓度。

2.3.2 蛋白质-谷氨酰胺酶法脱酰胺处理

根据 Fu 等人的方法稍作修改^[97]，将 MP 调节 pH 至 7.0，随后在 37℃条件下，使用 PG（16 U/g 蛋白）对 MPs（1%、1.5%、2%、2.5%、3%）进行脱酰胺处理（0、4、8、12、16 h），得到脱酰胺化的 MP（DMP）样品。为保证酶活性同时防止 MP 发生变性或聚集，设置 37℃作为酶反应的温度。MP 对照组以相同条件作处理但不加入 PG。样品反应结束后迅速从溶出仪转移至冰浴，等待进一步使用和分析。

2.3.3 肌原纤维蛋白热可逆凝胶的制备

肌原纤维蛋白热可逆凝胶制备方法根据 Zhang 等人^[31]的方法适量 DMP 样品在 90℃下加热 10 min，然后冷却至 4℃，并在 4℃保持 2 h 以上，得到肌原纤维蛋白热可逆凝胶。考虑到 MP 中组分的变性温度以及实际产品加热杀菌情况选择加热温度为 90℃。将所得凝胶重复上述操作，经过 n 个循环加热和冷却的 DMP 样品称为 n th HC-DMP。制得的凝胶保存在 4℃冰箱，等待进一步分析。

2.3.4 热可逆凝胶持水性的测定

凝胶持水性测定参照 Chen 等人^[105]的方法并稍作修改。取大约 1.0 g 上述方法制备

的肌原纤维蛋白热可逆凝胶样品放置在离心管中，离心条件设置为：离心力 10000 g，温度 4℃，时间 30 min，弃去上层水分。凝胶的持水性（WHC）（%）计算公式如下：

$$\text{WHC} (\%) = \frac{W_2 - W}{W_1 - W} \times 100 \quad (1)$$

式中：W 为离心管的重量（g），W₁ 为离心前样品和离心管的重量（g），W₂ 为样品和离心管去水后的重量（g）。

2.3.5 热可逆凝胶色差的测定

热可逆凝胶的凝胶色差采用色差仪测定。首先对 CR-400 色差仪进行校准，在直径约 30 mm 干净的小皿中放置适量凝胶，然后使用色差仪测定凝胶的色差，其中 L* 为亮度值，a* 为红度值（正值偏红，负值偏绿），b* 为黄度值（正值偏黄，负值偏蓝），凝胶白度（B）按照公式（2）进行计算，每个样品平行测定三次，取平均值。

$$\text{凝胶白度 (B)} = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (2)$$

2.3.6 热可逆凝胶强度的测定

凝胶强度测定采用 DHR-3 流变仪的频率扫描模式，利用储能模量（G'）与频率的对应关系表征凝胶强度，选择直径 40 mm 的平行板夹具，将待测凝胶样品置于样品台上，设置间隙为 1 mm；测定频率范围是 0.1-100 rad/s；温度为 4℃；应变为 2%。

2.3.7 热可逆凝胶微观结构测定

凝胶的形貌使用 Quanta 450FEG 扫描电子显微镜观察。凝胶样品用 2.5% 的戊二醛溶液固定 2 h 之后将样品进行冷冻干燥。用导电胶将冻干蛋白质凝胶固定在样品台上，对表面喷金处理后，在 20 kV 的加速电压下观察其微观形态。

2.3.8 凝胶热可逆特性测定

热可逆特性测定采用 DHR-3 流变仪的频率扫描模式，对样品重复加热和冷却处理一到五次，以凝胶强度随着重复加热和冷却处理的变化情况表征凝胶热可逆特性。首先对 DHR-3 进行校准，选择直径 40 mm 的平行板夹具，将待测凝胶样品置于样品台中心，设置间隙为 1 mm，利用流变仪温度扫描模式进行程序控温，温度变化范围为 25℃升温至 90℃，90℃保持 10 min，90℃降温至 4℃，变温速率为 6℃/min。温度稳定在 4℃后，设置测定频率范围是 0.1-100 rad/s，应变为 2%。

2.3.9 脱酰胺肌原纤维蛋白微观行为变化

原子力显微镜（Atomic force microscope, AFM）。通过 AFM 对 MPs 以及 DMP 的微观形貌进行观察^[2,85]。首先将硅片清洗干净，然后在硅片上滴 10 μL 样品（0.01 g/L），置于室温下自然干燥 12 h。测试时，在常温常压下通过 Dimension FastScan AFM 进行

AFM 分析, 选择轻敲模式 (Tapping mode), 设置线性扫描速率为 1 Hz, 每行采样 512 个样本以达到所需扫描分辨率。

透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM)。使用 JEM-2100F TEM 观察 MPs 以及 DMP 的微观形貌特征。将 10 μ L 的样品溶液 (0.5 g/L) 滴落在铜网格上, 沉积 30 min, 用滤纸条吸除多余样液后对其进行染色, 在铜网表面滴大约 10 μ L 的 1% 磷钨酸溶液, 等待约 30 s 后, 吸去多余的磷钨酸溶液, 用超纯水清洗铜网至少三遍, 直至铜网洗净。待铜网充分干燥之后, 在 80 kV 加速电压下, 通过 TEM 进行观察分析^[106]。

2.3.10 脱酰胺肌原纤维蛋白二级结构测定

根据 Liu 等人^[85]的方法, MP 和 DMP 二级结构通过 Chirascan V100 圆二色谱测定。调整 MP 以及 DMP (pH 7.0) 的浓度为 0.2 g/L。在室温下, 选择光径为 1 mm 的石英比色皿, 在 190-260 nm 范围内进行扫描, 扫描速率设置为 20 nm/min。图谱使用 CD Pro 软件 (Narasimha Sreerama Research Group, Fort Collins, CO, USA) 分析, α 螺旋的含量参照 Yang 的方法^[107]计算。根据公式 (3) 计算平均残基椭圆率 (MRE, θ)。

$$(\text{MRE}, \theta) = \frac{\theta}{10 \times \text{蛋白浓度} \times \text{光径} \times \text{氨基酸残基数}} \quad (3)$$

式中: θ 为椭圆率值。

2.3.11 脱酰胺肌原纤维蛋白卷曲螺旋结构测定

根据 Choy 等人^[108]的方法, 根据圆二色谱图, 通过计算样品在 222 nm 和 208 nm 处 MRE 的比值, 评估 MP 和 DMP 中的 α 螺旋构象状态 (孤立螺旋或 CC), 以 $\theta_{222}/\theta_{208}$ 表征卷曲螺旋结构。

2.3.12 变温过程二级结构测定

使用 Chirascan V100 圆二色谱测定变温过程的二级结构情况。调整 MP 以及 DMP (pH 7.0) 的浓度为 0.2 g/L。选择光径为 1 mm 的石英比色皿, 加入样品后向比色皿中插入针式温度计。主界面参数设置同静态图谱, 详见 2.3.10。热变温时, 采用全图谱模式进行测定, 设置升温过程起始温度为 4°C, 终止温度为 90°C; 降温过程起始温度为 90°C, 终止温度为 4°C; 步进设置为 5°C, 温度稳定时间设置为 30 s, 升温速率设置为 1 °C/min。首先将温控仪温度设定到起始温度, 等待比色皿内温度计也显示该温度或接近该温度后, 再启动变温试验。扫描速率和波长范围同 2.3.10。图谱分析使用 CD Pro 软件, 计算 α 螺旋含量方法同 2.3.10, 并根据公式 (3) 计算平均残基椭圆率 (MRE, θ)。

2.3.13 变温过程卷曲螺旋结构测定

变温过程卷曲螺旋结构计算方法同 2.3.11。

2.3.14 流变学特性

热可逆凝胶的流变性能通过 DHR-3 流变仪测定, 根据 Zhu 等人^[31]的方法并稍做修改。选用 40 mm 的平行板夹具, 进行安装校正, 将待测样品置于样品台中心, 在样品和夹具的边缘滴加覆盖硅油来防止样品中的水分蒸发。使用温度扫描模式进行测试, 间隙为 1 mm; 角频率为 1 Hz; 应变为 2%。变温程序设置为以 6 °C/min 的速率从 25°C 升温至 90°C, 90°C 恒温 10 min, 以 6 °C/min 的速率从 90°C 降温至 4°C, 恒温 3 min, 重复一次。持续监测两个加热-冷却过程循环中样品储能模量 (G') 的变化。

2.3.15 凝胶温度测定

根据 Renkema 等人^[109]的报道, 可以通过两种方式来定义蛋白的凝胶温度: 一是储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') 相等时对应的温度点, 二是 G' 增加速率开始超过 0.5 Pa/°C 时对应的温度点。在本研究中, 蛋白样品在胶凝过程中, G' 值始终高于 G'' 值, 因此将冷却过程中的 G' 的增加速率超过 0.5 Pa/°C 的温度点定义为凝胶温度。

2.3.16 螺旋结构转变温度测定

根据 Xu 等人^[41]的方法并略作修改, 测定圆二色谱, 通过监测在 222 nm 处椭圆度随温度的变化来测量样品的结构稳定性。将 0.2 g/L 的样品溶液置于光径为 1 mm 石英比色皿中, 随后向样品溶液中插入针式温度计。主界面参数将波长范围 Low 和 High 设为同一个波长 222 nm, 每点时间设为 10 s; 热变温过程中采用单点模式进行测试, 设置起始温度为 90°C, 终止温度为 4°C; 设置步进为 1°C, 温度稳定时间设置为 30 s, 升温速率设置为 1 °C/min。对单点采集的图谱使用 Pro-Data Chirascan 软件进行方程模型 sigmoid curve 拟合分析, 得出结构转变点温度。

2.3.17 分子间相互作用

采用不同变性剂处理, 凝胶分别浸泡在超纯水 (对照组)、6 mol L⁻¹ 尿素和 3 wt% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液中解离 2 h, 以破坏氢键和疏水相互作用。对处理后的样品测定采用 DHR-3 流变仪的频率扫描模式, 测定凝胶强度, 选用直径 40 mm 的平行板夹具, 进行安装校正, 将待测凝胶置于样品台中心, 设置间隙为 1 mm; 测定频率范围是 0.1-100 rad/s; 温度为 4°C; 应变为 2%。

2.3.18 SDS-PAGE 蛋白图谱

蛋白质图谱采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法检测, 使用 10% 分离胶和 4% 浓缩胶 (浓度指聚丙烯酰胺的浓度)^[97,110]。将样品 (1 g/L) 与样品缓冲液 (0.125 mol/L Tris, 4% SDS, 20% 甘油, pH 6.8) 等体积比混合, 分为加或不加 53 μL β-ME 的两组, 随后加热 3 min (沸水浴)。用考马斯亮蓝 G250 染色液对凝胶进行染色, 然后用脱色液 (7.5% 冰醋酸, 5% 甲醇) 进行脱色。最后用 ChemiDoc MP imaging system 化学发光凝胶成像分析系统拍摄, Image Lab version 6.0 软件进行图像处理, 测量肌球蛋白重链 (MHC) 像素强度,

MHC 的相对像素强度以 250 kDa 的第一条带为对照。标准蛋白 Marker 为 PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa 分子量标准样品 (No.26630) 来自 Promega 公司。

2.3.19 热凝胶制备及三氟乙醇处理

适量 MP 样品用 0.6 mol/L NaCl 溶液调整蛋白浓度为 25 g/L, 制得盐溶肌原纤维蛋白溶液 (SMP), 在 90°C 下加热 10 min, 然后冷却至 4°C, 并在 4°C 保持 2 h 以上, 得到肌原纤维蛋白热凝胶。

向 DMP 样品中添加不同浓度的三氟乙醇 (14、28、42、56 $\mu\text{mol/g}$ 蛋白), 混合均匀, 随后在 90°C 下加热 10 min, 然后冷却至 4°C, 并在 4°C 保持 2 h 以上。

2.3.20 数据处理与分析

所有实验均独立重复三次以上。所有实验结果数据均以平均数 $\pm$ 标准差表示, 实验数据使用 Origin 2022 软件绘图。数据统计分析通过 IBM SPSS 20.0 软件进行, 采用单因素 ANOVA 分析 (Duncan 法), 认为当 $P < 0.05$ 时数据之间存在显著性差异, 具有统计学意义。

3 结果与讨论

3.1 热可逆凝胶的构建及表征

3.1.1 热可逆凝胶的制备条件的确定

肌球蛋白的解离是构建肌原纤维蛋白凝胶体系的基础。众所周知,肌球蛋白尾部正负电荷交替区域之间的静电相互吸引促进肌球蛋白的自组装,使得肌球蛋白单体在水或低离子强度溶液中以不溶的粗丝状存在^[85]。肌球蛋白经热处理时,蛋白结构展开、构象发生改变,蛋白变性,同时氨基酸侧链的功能基团暴露,此时蛋白分子在各种分子间相互作用力(如二硫键、疏水相互作用、氢键、静电相互作用等)的作用下发生聚集;当溶液中蛋白提高到一定浓度之后,加热促进蛋白分子聚集才会形成热诱导凝胶^[111]。构建热可逆凝胶的关键在于诱导肌球蛋白分子之间发生可逆的物理纠缠。研究发现,PG 脱酰胺作用于肌原纤维蛋白能够使蛋白结构展开,促使肌球蛋白尾部分子间静电斥力增加,进而引起肌原纤维中粗肌丝和细肌丝发生解离,释放肌球蛋白和肌动蛋白单体^[97]。因此,设计不同蛋白浓度和 PG 酶处理时间,研究凝胶形成情况。

制备不同 PG 酶反应时间和蛋白浓度的凝胶观察其热可逆性。图 3-1A 清晰地展示了 2.5% 的 MP 在 PG 反应 12 h 后,形成了热可逆凝胶,通过两个循环的加热-冷却处理展示了 DMP 的热可逆性。加热-冷却循环对 DMP 在 90°C 加热时熔化和在 4°C 冷却时凝胶的能力没有影响,且外观基本保持一致,证明 DMP 凝胶是热可逆的。如图 3-1B 所示,在蛋白质浓度较低(1.0%)的情况下,MP 经过 4 h~12 h 的 PG 处理后形成了热可逆凝胶,随着酶反应时间的增加,凝胶强度逐渐减弱;在 16 h 时,加热和冷却过程未能形成凝胶。当蛋白质浓度为 2% 或超过 2% 时,较短的酶反应时间(4 h)处理无法形成热可逆的冷凝胶,而是形成不可逆的热诱导凝胶。蛋白质浓度大于 3% 时,即使酶反应处理延长到 16 h,也不能形成热可逆凝胶。

蛋白质谷氨酰胺酶的脱酰胺作用将谷氨酰胺残基转化为谷氨酸,这使得负电荷被引入蛋白质链,增强了蛋白质的静电分子间排斥力。因此,在 DMP 中肌纤维被解离以释放出亚丝,这种纳米级的丝状结构具有更高的柔韧性,易于诱发分子间的物理纠缠和阻力^[97],这一点对于热可逆凝胶化至关重要。PG 脱酰胺这种温和的处理方式可能在加热时产生静电排斥抵抗强烈的蛋白质聚集^[112],但在冷却过程中创造了一个有利于物理纠缠的分子空间。经过 16 h 的 PG 处理,1.0% 浓度的蛋白质之间可能产生了强烈的排斥力,最终阻止了 DMP 的凝胶化^[91,97,112]。当蛋白质浓度为 2% 或超过 2% 时,蛋白质体系内分子密度增大,较短的酶反应时间(4 h)处理不能产生有利于物理分子间纠缠的静电排斥力,因此无法形成热可逆的冷凝胶,而是形成不可逆的热诱导凝胶。这一点可以在后续不同浓度的凝胶强度测定中得到进一步验证,高浓度的样品在长时间酶反应之后发

生凝胶化，随浓度增加，凝胶强度明显增加（图 3-3A）。然而，蛋白质浓度大于 3%时，即使酶反应处理延长到 16 h，不能形成热可逆凝胶可能是因为如此密集的蛋白质体系更易发生热聚集，需要更高的表面电荷来抑制蛋白质分子之间的不可逆相互作用^[31]。综上，蛋白质浓度在 1.0%和 2.5%之间，PG 反应 8 h 和 12 h 能够诱导 MP 的热可逆凝胶化。

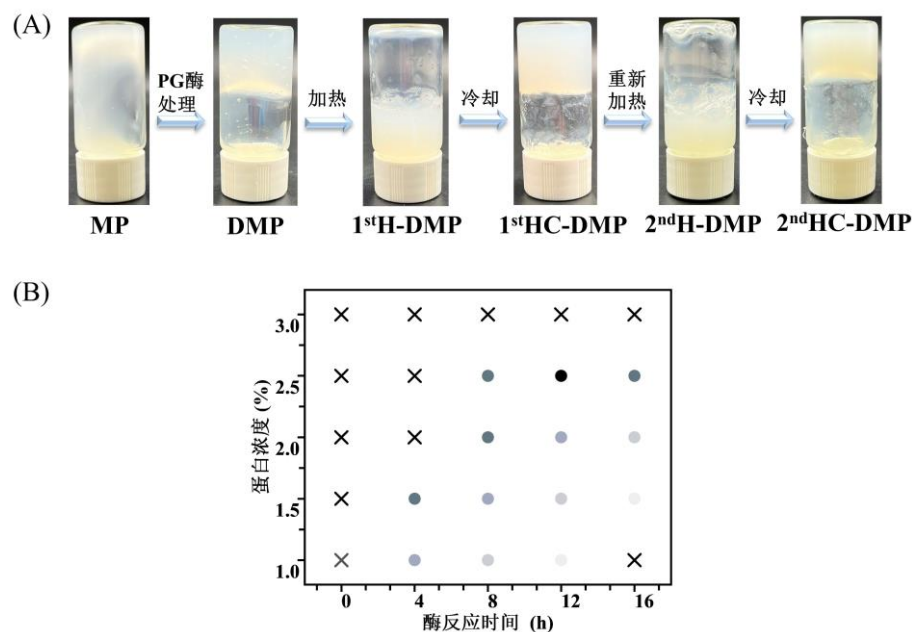


图 3-1 (A) 热可逆凝胶（蛋白浓度 2.5%，酶反应时间 12 h）现象图；1st H-DMP：加热处理的 DMP；1st HC-DMP：加热和冷却处理的 DMP；2nd H-DMP：加热处理的 1st HC-DMP；2nd HC-DMP：两次加热和冷却处理的 DMP；（B）不同酶反应时间和蛋白质浓度下制备的凝胶相图：（×）非热可逆，（●）热可逆；颜色由深到浅表示凝胶强度减弱

Fig. 3-1 (A) Photographs of thermo-reversible gels through heating and cooling cycles starting with 2.5% MP solution with enzyme reaction time 12 h. 1st H-DMP: DMP with treatment of heating; 1st HC-DMP: DMP with heating and cooling treatment; 2nd H-DMP: HC-DMP with heating treatment; 2nd HC-DMP: DMP with 2 cycle heating and cooling treatment; (B) Phase diagram of gels prepared at different enzyme reaction times and protein concentrations: (×) non-thermo-reversible, (●) thermoreversible, and the dark to light color indicates that the gel strength is weakened

3.1.2 凝胶持水性

持水性是表征肌肉凝胶体系功能特性的重要指标之一，持水性大小表示了凝胶体系中的组分对水分结合能力的强弱^[113]。对于肉制品而言，凝胶持水性通常会影响产品的蒸煮损失以及产品得率。不同酶反应时间和蛋白质浓度下制备的凝胶的持水性如图 3-2A 所示，较短的酶反应时间（4 h）处理时，持水性随着蛋白浓度的逐渐增加，总体均低于其他组；其中，当蛋白质浓度为 2%或 2.5%时，所形成的凝胶为热不可逆凝胶，持水性分别为 70.3%和 78.5%。图 3-2B 直观地展示了 PG 反应 8 h 和 12 h 所诱导的 MP 热可逆凝胶的持水性，不同蛋白浓度的 MP 经过酶反应时间 8 h 和 12 h 的所有组均有优良的持水性（95%~99%），高于文献研究中所报道的 MP 热诱导凝胶（30%~65%）^[105,114,115]。蛋白浓度的增加可以增强 DMP 凝胶的 WHC 和水的结合。随着酶反应时间从 8 h 增加

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/097041034030006046>